

Expression transitoire du gène de la β -glucuronidase (Gus) dans les protoplastes de mil (*Pennisetum glaucum* (L) R.) : étude comparative de deux promoteurs, CaMV35S et Emu

Kouakou Tiécoura¹, Lucien Ledoux², Monique Dinant²

Résumé

L'activité du gène Gus, sous le contrôle de deux promoteurs, le CaMV35S avec le plasmide p35SGus et le Emu avec le plasmide pEmuGN, a été étudiée. Pour 10^6 protoplastes, soumis à 20 microgrammes (μg) de DNA plasmidien et 20 μg CT-DNA, pendant 3 min. en présence de PEG (20 %), une activité Gus de 20 à 40 nmoles de MU / h / mg de protéines est observée pour le p35SGus contre 250 à 400 nmoles de MU / h / mg de protéines pour le pEmuGN. Cette activité triple quand la quantité du plasmide double et reste stable quand le temps d'incubation augmente. Dès 4 h après la transformation, l'activité Gus est détectée avec le pEmuGN contre 8 h pour le p35SGus. L'activité Gus augmente quand la concentration du PEG augmente. Le promoteur Emu a une activité 8 à 11 fois supérieure à celle du promoteur CaMV35S.

Mots-clés : promoteur, protoplaste, PEG (polyéthylène glycol), expression transitoire, Gus.

Transient expression of β -glucuronidase (GUS) gene in Pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L) R.) protoplasts: comparative study of two promoters, CaMV35S and Emu

Abstract

A comparative study for Gus gene under CaMV35S promoter with p35SGus plasmid and under Emu promoter with the pEmuGN plasmid has been done. For 20 μg of plasmid, 20 μg of CT-DNA and PEG 20 % used in 10^6 protoplasts transformation during 3 min., the Gus activity was from 20 to 40 nmoles of MU/h x mg of proteins for p35SGus and from 250 to 400 nmoles of MU/h x mg of proteins for pEmuGN. This Gus activity trebled when the plasmid quantity doubles. The increasing of incubation time does not modify the Gus activity. To detect Gus activity, 4 h are enough for pEmuGN and for p35SGus, it needs 8 h. The Gus activity increases when we increase PEG concentration. The Emu promoter activity is eight to eleven times superior to the CaMV35S promoter activity.

Keywords : promoter, protoplast, PEG (Poly ethylene glycol), transient expression, Gus.

¹ Laboratoire de Génétique et Amélioration des plantes, UFR Biosciences, Université de Cocody, B.P. 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire, Tél / Fax : (225) 22 44 03 07.

² Laboratoire de Génétique Moléculaire, Département de Botanique, Université de Liège, Sart Tilman B22, B-4000 Liège, Belgique.

Introduction

La technique de transformation des cellules végétales par l'utilisation du vecteur naturel *Agrobacterium tumefaciens* s'est révélée inefficace pour les céréales (POTRYKUS, 1989). C'est ainsi que d'autres techniques ont donc été développées dont celle du polyéthylène glycol (PEG). Des succès sont obtenus chez le genre *Oryza* (HAYASHIMOTO *et al.*, 1990 ; UPADHYAYA *et al.*, 1998), chez *Triticum aestivum* (LEE *et al.*, 1989 ; GANDHI *et al.*, 1999), chez *Zea mays* (MAAS et WOLFGANG, 1989 ; SCHENK *et al.*, 1998) et chez *Allium sativum* (FERRER *et al.*, 2000). Cette technique a permis d'obtenir des plantes transgéniques fertiles chez *Oryza sativa* (DATTA *et al.*, 1992), chez *Zea mays* (OMIRULLEH *et al.*, 1993) et chez *Glycine max* (PONAPPA *et al.*, 1999).

Pour le genre *Pennisetum*, la technique d'électroporation a été utilisée pour tester l'activité transitoire de gènes dans les protoplastes (HAUPTMANN *et al.*, 1987).

Dans ce travail nous rapportons pour la première fois l'utilisation de la technique du PEG dans la transformation de *Pennisetum glaucum*. Nous y avons testé aussi pour la première fois, le gène Gus sous le contrôle du promoteur Emu, par une étude comparative des activités des promoteurs Emu et CaMV35S.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par les protoplastes des cellules de la suspension établie avec les cals d'apex de *Pennisetum glaucum*.

Les plasmides

Six plasmides portant la séquence codante du gène Gus (*uidA* de *Escherichia coli*) ont été utilisés (figure 1). Ce sont les plasmides p35SGus, pRT99Gus, pULGD2 avec le promoteur CaMV35S (*califlower mosaic virus*) ; le pCa11Gc avec l'intron Adh1 en aval de CaMV35S ; le pAG8 avec le promoteur Adh1 et le plasmide pEmuGN avec le promoteur Emu formé de 6 copies de l'élément anaérobie (6 x ARE, 0,298 kb) du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, de 4 copies d'élément OCS (4 x OCS, 0,172 kb) de ce même gène, du promoteur tronqué Adh1 du gène de maïs (δ Adh1, 0,215 kb), et de l'intron1 (0,56 kb) de ce même gène Adh1 de maïs.

Méthodes

Transformation des protoplastes

Les protoplastes (figure 2) isolés selon SHILLITO *et al.* (1983) en utilisant le milieu de culture de XIA *et al.* (1992) ont été transformés selon la méthode de NEGRUTIU *et al.* (1987) comme suit : A 0,5 ml de milieu de stabilisation MaMg contenant 10^6 protoplastes viables, on a ajouté dans l'ordre 20 μ g (microgramme) de CT-DNA, 20 μ g de plasmide et 0,5 ml de PEG 6000 (Merck) (20 %). Après 3 min. d'incubation, les protoplastes sont cultivés à 25 °C pendant 48 h à l'obscurité. Le témoin ne contenait pas de plasmide.

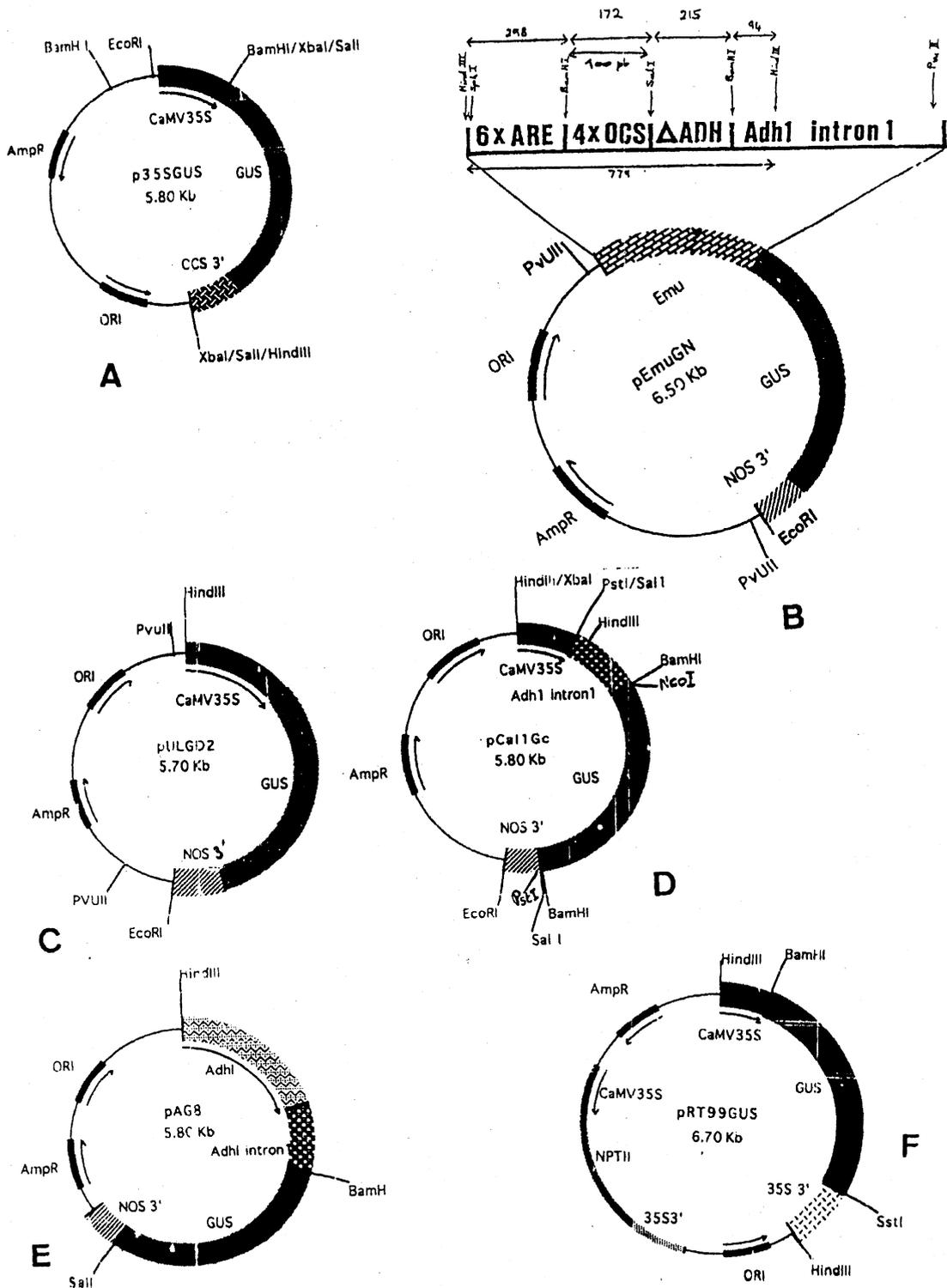


Figure 1. Structure des plasmides utilisés au cours de la transformation : p35SGus (A), pEmuGN (B), pULGD2 (C), pCa11Gc (D), pAG8 (E), pRT99Gus (F).

Pour l'influence des différents paramètres sur l'activité Gus, seul le paramètre étudié a été modifié : pour la quantité de plasmide, on a utilisé 0, 10, 20 ou 40 μg ; l'activité précoce et tardive du gène Gus, les protoplastes ont été cultivés pendant 4, 8, 16, 24, 48, 72, 120 ou 240 h avant d'évaluer l'activité Gus ; le temps d'incubation, avec 3 min. ou 20 min. ; la concentration du PEG avec 5, 10, 15 ou 20 % de PEG et pour le CT-DNA, avec des transformations sans CT-DNA. En plus des plasmides pEmuGN et p35SGus, les autres ont été testés.

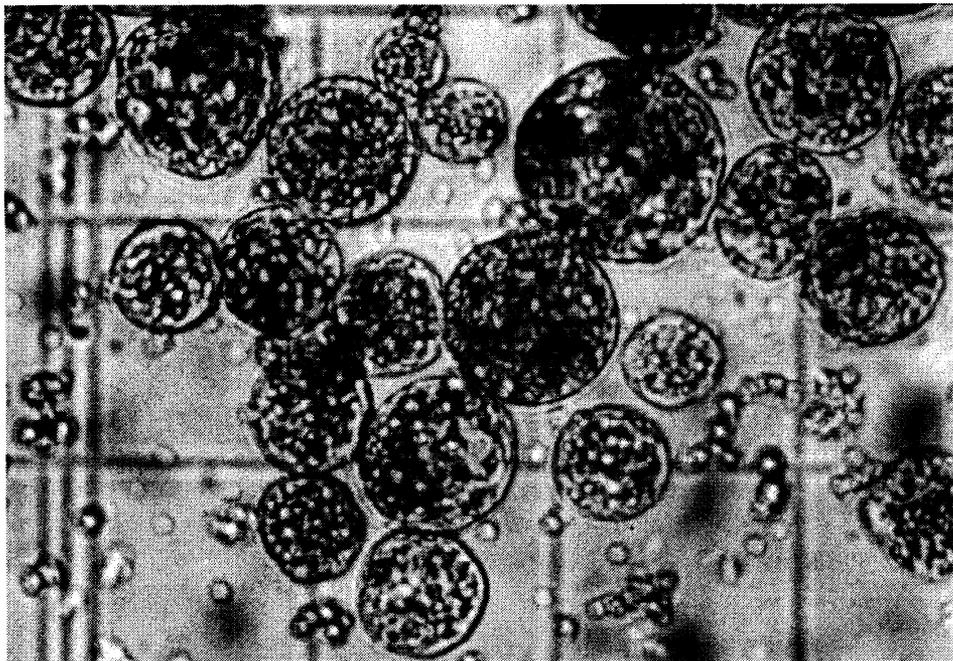


Figure 2. Protoplastes fraîchement isolés des suspensions cellulaires de *Pennisetum glaucum* (G:594x).

Dosage de l'activité Gus

La β -glucuronidase a été extraite et son activité Gus (en MU (méthyl ubelliféron) / h) a été déterminée selon la méthode de JEFFERSON *et al.* (1987). Ici, le tampon d'extraction contenait du méthanol (20 % v / v) pour supprimer l'activité Gus propre de la cellule non transformée (KOSUGI *et al.*, 1990). La quantité de protéines de l'extrait a été déterminée par la méthode de BRADFORD (1976). L'activité du gène Gus a été alors exprimée en nmoles de MU / h x mg de protéines.

Pour les études statistiques des résultats, nous avons utilisé soit la comparaison de deux moyennes observées quand nous en avons deux, soit l'analyse de variances quand nous avons plus de deux moyennes.

Résultats

L'activité Gus des témoins est nulle car elle varie de 0 à 0,065 nmoles de MU / h x mg de protéines.

Effet de la concentration du plasmide

Pour le plasmide p35SGus, l'activité Gus passe de 30 nmoles de MU pour 20 μg à 100 nmoles de MU pour 40 μg (figure 3). Pour le plasmide pEmuGN, de 300 nmoles de MU pour 20 μg , on passe à 1100 nmoles de MU pour 40 μg . Pour la même quantité de plasmides, le pEmuGN a une activité Gus 8 à 11 fois plus élevée que celle du plasmide p35SGus.

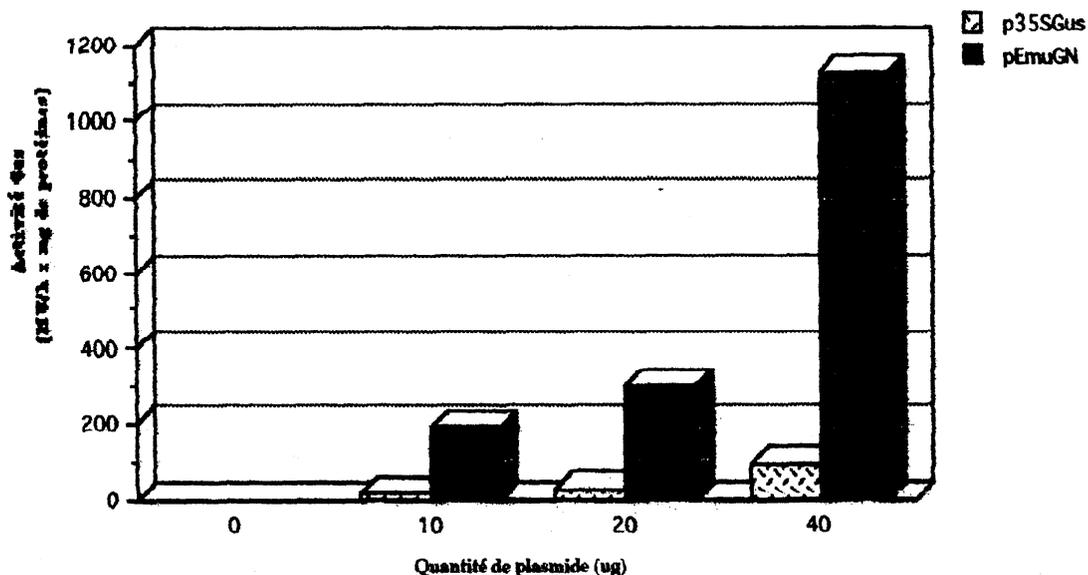


Figure 3. Effet de la quantité du plasmide.

Activité précoce et tardive du gène Gus

L'activité Gus est détectée 4 h après la transformation pour le plasmide pEmuGN et 8 h pour le plasmide p35SGus (figure 4). Cette activité atteint un maximum de 30 nmoles de MU pour le p35SGus et de 350 nmoles de MU pour le pEmuGN à 16 h. Après 16 h, l'activité Gus stagne autour de 40 nmoles de MU pour le p35SGus et autour de 380 nmoles de MU pour le pEmuGN. À 240 h (10 jours) l'activité Gus des plasmides est aussi forte qu'à 16 h. Cette activité tardive a lieu dans des cellules ou microcals transformés (figure 5).

Influence du temps d'incubation

Pour le plasmide p35SGus, l'activité Gus est de 30 nmoles de MU à 3 min. et de 40 nmoles de MU à 20 min. de traitement ; alors que pour le plasmide pEmuGN, l'activité reste à 350 nmoles de MU dans les mêmes conditions (figure 6).

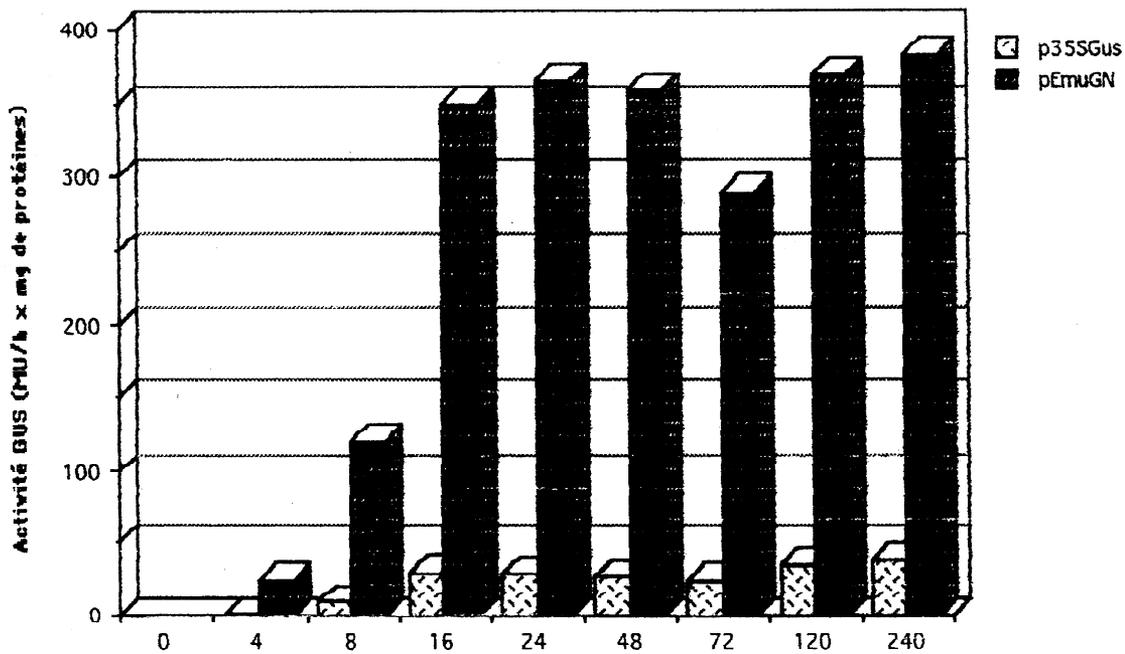


Figure 4. Activité précoce et tardive du gène Gus.

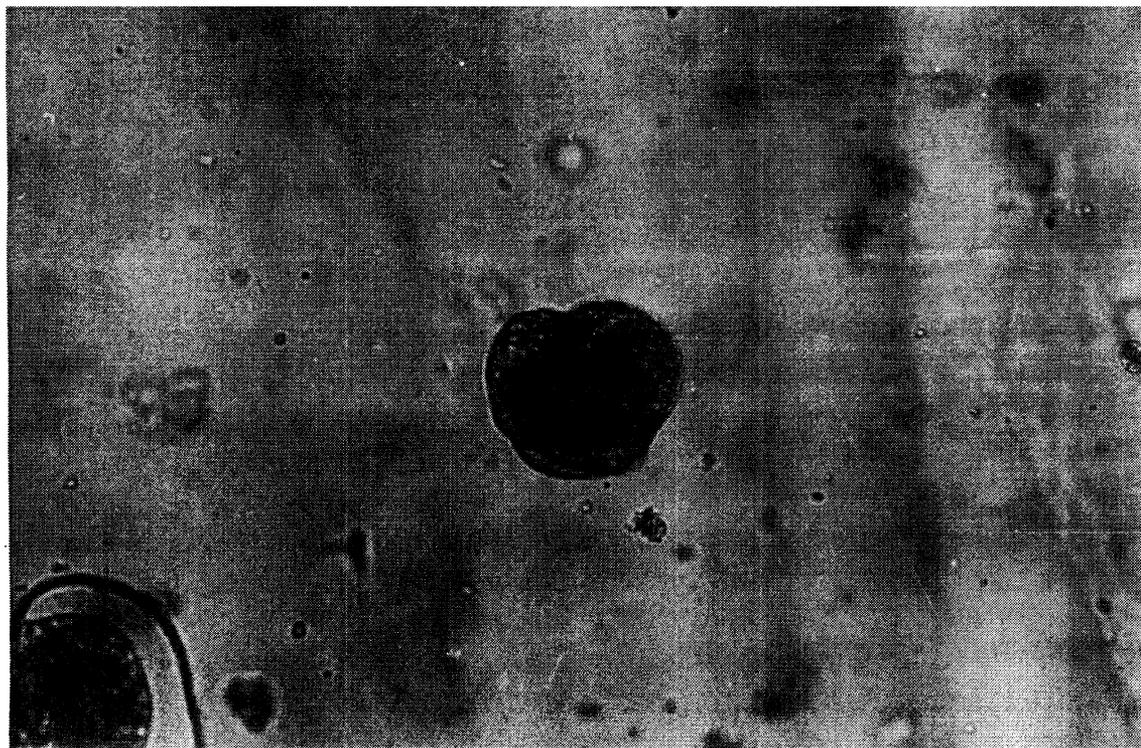


Figure 5. Microcal provenant de protoplastes transformés (2 semaines après transformation).

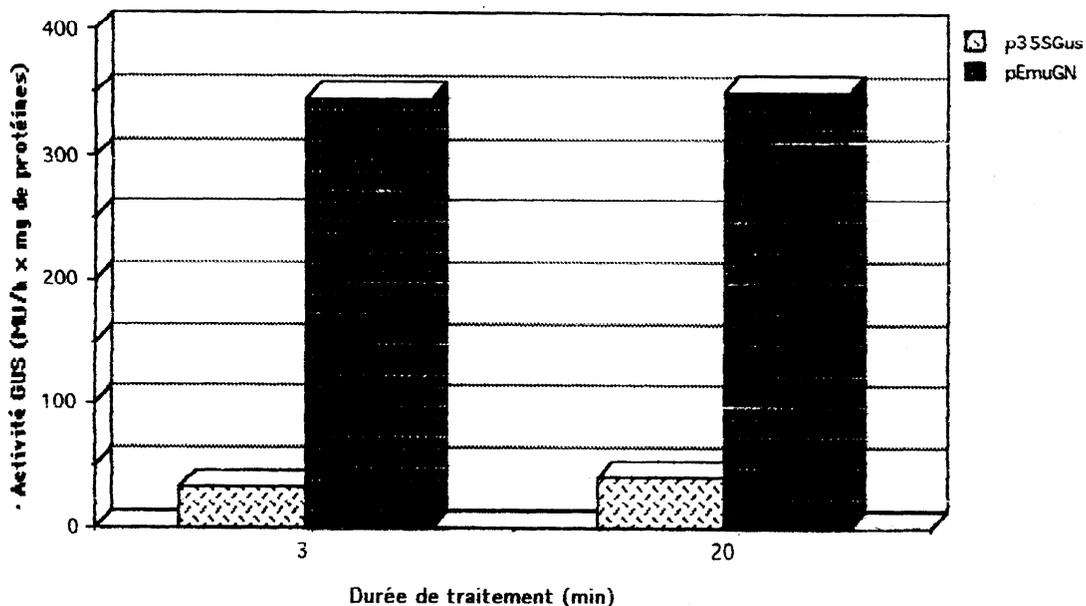


Figure 6. Influence du temps d'incubation.

Effet de la concentration du PEG 6000

L'activité Gus est nulle sans PEG. Elle est de 10 nmoles de MU à 10 % de PEG pour le plasmide p35SGus, et de 30 nmoles de MU à 5 % de PEG pour le plasmide pEmuGN (figure 7). À partir de ces seuils, l'activité Gus augmente progressivement lorsque la concentration du PEG augmente pour atteindre 30 nmoles de MU avec p35SGus et 280 nmoles de MU avec pEmuGN à la concentration de 20 % de PEG.

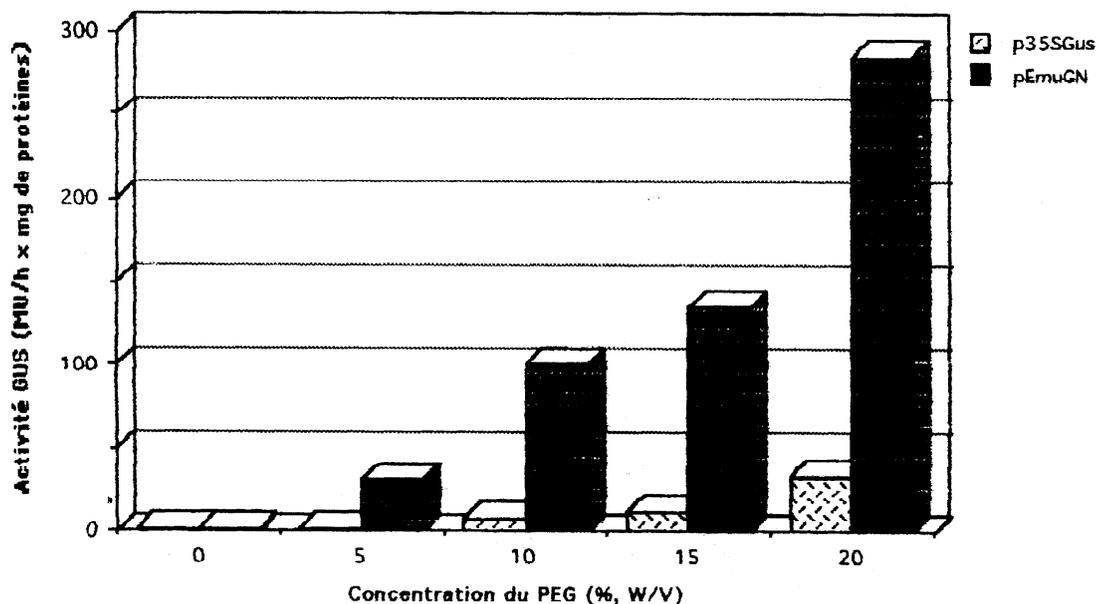


Figure 7. Effet de la concentration du PEG.

L'influence du CT-DNA

L'activité Gus est détectée sans l'utilisation du CT-DNA quel que soit le plasmide (figure 8). Pour le plasmide p35SGus, l'activité Gus est de 20 nmoles de MU sans CT-DNA et de 60 nmoles de Mu avec CT-DNA ; pour le plasmide pEmuGN, de 120 nmoles de MU sans CT-DNA, l'activité est passée à 520 nmoles de MU avec CT-DNA.

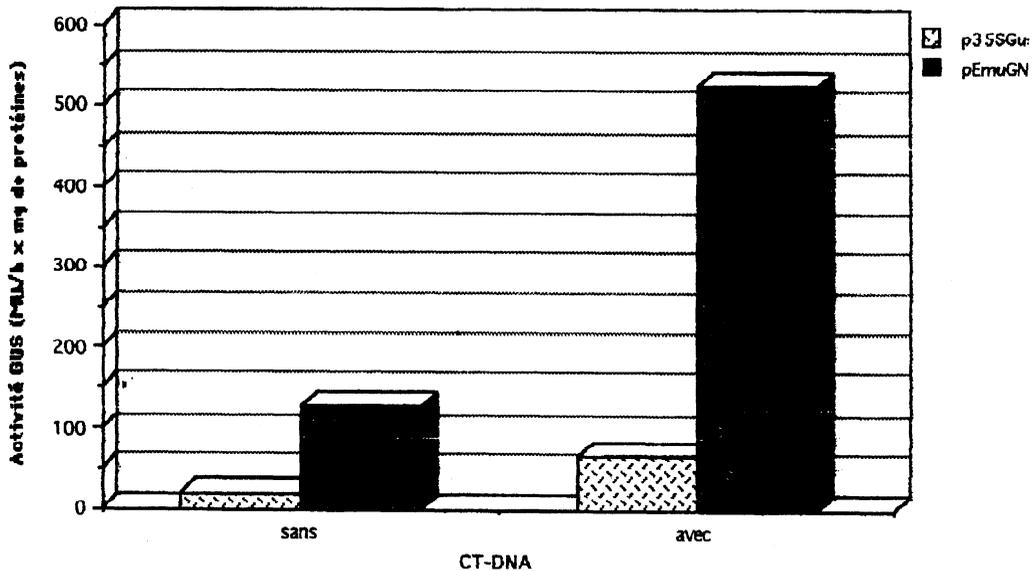


Figure 8. Influence du CT-DNA.

Comparaison de l'activité Gus du plasmide pEmuGN avec celle des autres

Les plasmides pRT99Gus et pULGD2 ont une activité Gus d'environ 20 nmoles de MU, celle du plasmide p35SGus de 40 nmoles de MU, celle des plasmides pAG8 et pCa11Gc d'environ 50 nmoles de MU et celle du plasmide pEmuGN est d'environ 300 nmoles de MU (figure 9).

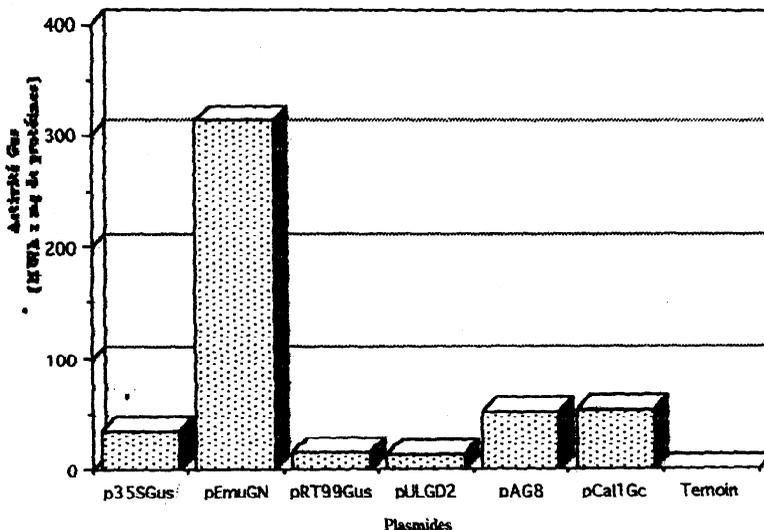


Figure 9. Comparaison des expressions du gène Gus chez différents plasmides.

Discussion

Aussi bien pour le plasmide pEmuGN que pour le plasmide p35SGus, l'activité Gus augmente quand la quantité de plasmides augmente. Cette augmentation de l'activité Gus pourrait s'expliquer si l'activité nucléasique globale du milieu de transformation est relativement constante ; dans la mesure où la quantité de protoplastes utilisée ne varie pas. Dans ce cas, l'augmentation de l'activité est due soit au nombre de plasmides par protoplaste, soit au nombre de protoplastes transformés. Cette augmentation de l'activité Gus liée à la quantité de plasmides est observée chez *Petunia*, avec le promoteur CaMV35S (plasmide pBI221), où DE LANGE *et al.* (1993) estiment l'activité Gus à 90, 120 et 270 nmoles de MU / h x mg de protéines pour respectivement 10, 20 et 40 µg de plasmides ; soit une augmentation de 3 à 7 nmoles de MU pour chaque 1 µg de plasmides supplémentaires.

Le promoteur Emu (pEmuGN) est plus actif que le promoteur CaMV35S (p35SGus) avec une augmentation de 20 nmoles de MU pour chaque 1 µg de plasmides. Des résultats similaires sont observés chez le maïs, le blé et le riz (LAST *et al.*, 1991). En comparant les promoteurs CaMV35S, actin1 et ubiq, cette faiblesse du CaMV35S est aussi signalée par GANDHI *et al.* (1999).

L'expression rapide du gène Gus, 4 h à 8 h contre 16 h chez le riz (UPADHYAYA *et al.*, 1998), montre que les protoplastes de mil sont indiqués pour tester l'efficacité d'un plasmide. L'activité tardive du gène Gus, suggère sa stabilité dans ces protoplastes. Cela signifie que tous les plasmides introduits dans le protoplaste ne sont pas détruits par les nucléases ou alors qu'ils ne restent pas sous la forme libre. Si la présence de microcals transformés était confirmée, les protoplastes seraient indiqués pour la transformation stable du mil. Des résultats semblables ont été obtenus chez le pétunia (DE LANGE *et al.*, 1993), chez *Arabidopsis thaliana* (HOFFMAN *et al.*, 1994), chez le riz (UPADHYAYA *et al.*, 1998 ; GANDHI *et al.*, 1999).

La durée de l'incubation ne modifie pas de façon significative l'activité Gus. Cela peut s'expliquer par la nécrose des protoplastes pendant la transformation. En effet, le PEG est un agent toxique qui peut tuer ou détruire les protoplastes si le traitement est long annihilant du coup l'effet de la transformation. Cette hypothèse est plus plausible car nous observons que la viabilité des protoplastes passe de 100 % avec 3 min. à 80 % lorsque le traitement passe à 20 min.

Sans PEG la transformation est presque nulle ; le PEG est donc nécessaire pour précipiter les plasmides sur les protoplastes. Plus la concentration du PEG augmente plus y a transformation et plus l'activité Gus augmente. Le seuil de sensibilité du plasmide pEmuGN à 5 % de PEG est dû à l'efficacité de son promoteur. On a des résultats semblables chez *Arabidopsis thaliana* (HOFFMAN *et al.*, 1994) ; chez *Allium sativum* (FERRER *et al.*, 2000), mais leur seuil est à 3 % PEG. La différence entre les deux seuils est probablement en rapport avec la physiologie de la membrane des deux types de cellules ; car, d'une part, nous avons des protoplastes de monocotylédone et, d'autre part, des protoplastes de dicotylédone. Notons qu'au delà de 20 % le PEG est difficilement soluble.

Le CT-DNA est indispensable pour la transformation ; sans lui, l'activité Gus baisse de plus de 70 %. Le CT-DNA a un double rôle : protéger l'ADN plasmidien des nucléases et l'entraîner dans les protoplastes. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'activité Gus baisse d'environ 50 % sans CT-DNA (HOFFMAN *et al.*, 1994). Nous voyons donc que *Pennisetum glaucum* est plus

sensible à l'absence de CT-DNA ; cela soit à cause d'une forte activité nucléasique, soit parce que le plasmide pénètre difficilement le protoplaste.

La forte activité du promoteur Emu (plasmide pEmuGN) est confirmée parmi plusieurs autres promoteurs. Sous le promoteur CaMV35S seulement (plasmides pRT99Gus et pULGD2), l'activité du gène Gus est faible. Avec l'intron Adh1 en aval de CaMV35S (plasmide pCa11Gc), l'activité Gus double ; mais l'Adh1 (plasmide pAG8) seul comme promoteur a la même performance que celui-ci. Nous pouvons donc dire que l'augmentation de l'activité Gus est due à la présence de l'intron. Le rôle positif de l'intron dans la séquence promotrice est observé chez le maïs (CALLIS *et al.*, 1987) et chez le riz (WANG *et al.*, 1998). L'efficacité de l'intron reste toutefois en deçà de l'efficacité promoteur Emu. Cette différence montre que la seule présence de l'intron n'explique pas la force du promoteur Emu. La présence des séquences 6ARE-4OCS-Adh semble être sélectivement responsable de la force de ce promoteur Emu.

Il est donc possible de transférer des gènes étrangers dans les protoplastes de mil par la technique du polyéthylène glycol. Les paramètres étudiés ont permis d'établir les conditions d'une bonne transformation. Ce travail semble consacrer le promoteur Emu (plasmide pEmuGN) comme l'un des meilleurs pour l'expression de gènes chez le mil.

Remerciements

Les auteurs remercient le Pr. Aké Sévérin. et le Dr Kouassi Philippe pour leur contribution à la rédaction de cet article. □

Références citées

- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 : 248-254.
- CALLIS J., FROMM M. and WALBOT V., 1987. Introns increase expression in cultured maize cells. *Genes Dev.*, 1 : 1183-1200.
- DATTA S.K., DATTA K., SOLTANIFAR N., DONN G. and POTRYKUS I., 1992. Herbicide-resistant Indica rice plants from IRR1 breeding line IR72 after PEG - mediated transformation of protoplasts. *Plant Mol. Biol.*, 20 : 619-629.
- DE LANGE P., DE BOER G.-J., MOL M.N.J. and KOOTER M.J., 1993. Conditional inhibition of B-glucuronidase expression by antisense gene fragments in petunia protoplasts. *Plant Mol. Biol.*, 23 : 45-55.
- FERRER E., LINARES C. and GONZALES J.M., 2000. Efficient transient expression of the glucuronidase reporter gene in garlic (*Allium sativum*). *Agronomie*, 20 : 869-874.
- GANDHI R., MAHESHWARI S. C. and KHURANA P., 1999. Transient gene expression and influence of promoters on foreign gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 35 : 232-237.
- HAUPTMANN R.M., OZIAS-AKINS P., VASIL V., TABAEIZADEH Z., ROGERS G.S., HORSCH R.B., VASIL I.K. and FRALEY R.T., 1987. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. *Plant Cell Reports*, 6 : 265-270.
- HAYASHIMOTO A., LI Z. and Murai N., 1990. A polyethyleneglycol-mediated protoplast transformation system for production of transgenic rice plants. *Plant Physiol.*, 93 : 857-863.
- HOFMAN A., HALFTER U. and MORRIS P.-C., 1994. Transient expression in leaf mesophyll protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36 : 53-58.

- JEFFERSON R.A., KAVANAGH T. and BEVAN M.W., 1987.** Gus fusion: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J.*, 6 : 3901-3907.
- KOSUGI S., OHASHI Y., NAKAJIMA K. and ARAI Y., 1990.** An improved assay for β -Glucuronidase in transformed cells. Methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -Glucuronidase activity. *Plant Science*, 70 : 133-140.
- LAST D.I., BRETTELL R.I.S., CHAMBERLAIN D.A., CHAUDHURY A.M., LARKIN P.J., MARSH E.L., PEACOCK J. and DENNIS E.S., 1991.** pEmu: an improved promoter for gene expression in cereal cells. *Theor. Appl. Genet.*, 81 : 581-588.
- LEE B., MURDOCK K., TOPPING J., KREIS M. and JONES M.G., 1989.** Transient gene expression in alerone protoplasts isolated from developing caryopses of barley and wheat. *Plant Mol. Biol.*, 13 : 21-29.
- MAAS C. and WOLFGANG W., 1989.** Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts. *Plant Cell Reports*, 8 : 148-151.
- NEGRUTIU I., SHILLITO R., POTRYKUS I., BIASINI G. and SALA F., 1987.** Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol. Biol.*, 8 : 363-373.
- OMIRULLEH S., ABRAHAM M., GOLOVKIN M., STEFANOV I., KARABAEV M.K., MUSTARDY L., MOROCZ S. and DUDITS D., 1993.** Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV-35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol. Biol.*, 21 : 415-428.
- PONAPPA T., BROZOZOWSKI A.E. and J.J. FINER, 1999.** Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Reports*, 19: 6-12.
- POTRYKUS I., 1989.** Gene transfer to cereals. An assessment. *Tib-Tech.*, 7 : 269-273.
- SCHENK P.M., ELLIOTT A.R. and J.M. MANNERS, 1998.** Assessment of transient gene expression in plant tissues using the green fluorescent protein as reference. *Plant Mol. Biology*, 16 : 313-322.
- SHILLITO R.D., PASZKOWSKI J., and POTRYKUS I., 1983.** AGAROSE plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplasts-derived colonies in a number of plant Species. *Plant Cell Reports*, 2 : 244-247.
- UPADHYAYA N.M., RAMM K., GAUDRON J., CREIG S., WANG M.B., GUPTA S., OKITA T.W. and WATERHOUSE P.M., 1998.** Can gfp replace uidA as a reporter gene to monitor transformation of cereals by biolistics or *Agrobacterium*? *Agricultural Biotechnology*, 13 : 111-113.
- WANG M.B., UPADHYAYA N.M., BRETTELL R.I.S. and WATERHOUSE P.M., 1998.** Intron-mediated improvement of a stable marker for plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Genet. breed*, 51 : 325-334.
- XIA G.-M., LI Z., GUO G.-Q. and CHEN H.-M., 1992.** Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Bupleurum scorzonnerifolium* Willd. *Plant Cell Reports*, 11 : 155-158.