

# **SECTION B**

**Transgénèse :  
son impact et estimation des risques**

**Communications orales B1 à B8**



# **B1 : Impact de la transformation génétique du colza**

**CHÈVRE A.M.<sup>1</sup>, EBER F.<sup>1</sup>, VALLÉE P.<sup>1</sup>, PIERRE J.<sup>2</sup>, RENARD M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> INRA, Station d'Amélioration des Plantes, BP29 35653 Le Rheu

<sup>2</sup> INRA, Laboratoire de Zoologie, BP29 35653 Le Rheu

Les nombreux travaux de recherche engagés depuis une quinzaine d'années sur la transgénèse appliquée à l'amélioration génétique du colza ont porté principalement sur la mise au point d'un système d'hybridation (système Seedlink<sup>®</sup> de Plant Genetic Systems), la résistance aux parasites, aux insectes et à certains herbicides (glyphosate, glufosinate, oxynils) ainsi que la qualité de la graine (composition en acides gras d'huiles de colza à usages alimentaires ou non alimentaires, protéines de réserve du tourteau, peptides d'intérêt pharmaceutique). Ces travaux ont abouti aux premières commercialisations en Amérique du Nord en 1995. La production aux U.S.A. de colza riche en acide laurique serait ainsi réalisée sur environ 50.000 ha en 1997. Les surfaces en colzas résistants aux herbicides cultivés au Canada en 1997 seraient de plus de 700 000 ha. Par contre, les premières mises sur le marché en Europe sont en cours d'instruction. La société Plant Genetic Systems a obtenu une autorisation partielle pour un colza hybride résistant au glufosinate.

Dès l'obtention des premières lignées transgéniques de colza, des études portant sur les risques ou les inconvénients liés aux caractères introduits ont été engagées en ce qui concerne aussi bien la qualité alimentaire de la graine et de ses produits que l'impact potentiel sur l'environnement ou les conséquences au niveau agronomique. Une telle démarche avait été antérieurement développée sur les nouvelles variétés de colza sans acide érucique (qualité alimentaire de la nouvelle huile de colza) ou double-zéro (effet de ces variétés plus appétentes sur la faune sauvage par exemple) obtenues par sélection classique.

Du fait du caractère mellifère du colza, l'étude de l'impact de différents transgènes sur la faune a été réalisée sur le modèle abeille (J. Pierre Zoologie, Rennes et M.H. Pham-Delegue, Zoologie, Bures sur Yvette). Notre équipe, en collaboration avec H. Darmency, X. Reboud, J.Gasquez (Malherbologie, INRA Dijon), C. Lavigne et P.H. Gouyon (Université Orsay), s'est intéressée aux risques de flux de gènes et plus particulièrement aux aspects concernant d'une part la dispersion du pollen et d'autre part l'introgression de transgènes dans le génome d'espèces adventices par hybridation interspécifique.

## **DISPERSION DU POLLEN**

Le colza est une plante hermaphrodite dont le système de reproduction est mixte (20 à 30 % de fécondation croisée). De par sa forme, sa densité et son caractère collant, le pollen de colza est peu susceptible d'être transporté par le vent sur de longues distances. Cependant, des piègeages utilisant différents types de capteur placés à quelques mètres de hauteur permettent de retrouver du pollen viable jusqu'à au moins 1,5 km de distance de la source de pollen (Timmons et al, 1995). Il est donc tout à fait

possible que le pollen desséché de colza puisse être ainsi transporté par le vent sur de grandes distances quand les conditions climatiques sont favorables. Le colza très attractif est fréquenté par de nombreuses espèces d'insectes pollinisateurs appartenant à des ordres différents. Les inventaires pratiqués dans différentes conditions signalent principalement la présence d'Hyménoptères, de Diptères et plus rarement de Lépidoptères. Les Hyménoptères sont de très loin les plus représentés et plus particulièrement les abeilles domestiques qui constituent de 53 à 95 % des insectes pollinisateurs totaux. Ces insectes jouent un rôle important dans le transport du pollen de colza même si leur capacité à disséminer le pollen sur plusieurs kilomètres reste à démontrer.

L'action de ces différents vecteurs de pollen sur la dispersion du pollen de colza a été estimée à partir de dispositifs discontinus (parcelles pièges situées à différentes distances de la parcelle source) ou continus (parcelle piège entourant la parcelle source). Dans un dispositif discontinu constitué d'une parcelle source de 20 x 20 m située à 200 m ou 400 m de parcelles sources de même surface, Scheffler et al (1995) ont ainsi estimé le taux de fécondation croisée à 0,0156 % à 200 m et à 0,0038 % à 400 m. Dans un dispositif continu circulaire, Scheffler et al (1993) ont estimé le taux de fécondation croisée à 0.00033% à 47 m de distance.

Afin de préciser la courbe de dispersion du pollen de colza, nous avons mis en place à Rennes différents dispositifs :

- un dispositif circulaire composé d'une parcelle source de 3 m ou de 9 m de diamètre de colza résistant au glufosinate entourée d'une parcelle piège de colza mâle-fertile ou mâle-stérile sensible au glufosinate d'environ 100 m de diamètre ;
- un dispositif carré comprenant une parcelle source de colza résistant aux oxynils de 10 m de côté entourée d'une parcelle piège sensible aux oxynils de 90 m de côté.

Les résultats obtenus sont en cours d'analyse selon une approche discrète (dispositif circulaire) ou selon la méthode de déconvolution préconisée par Lavigne et al (1996). Le taux de fécondation croisée décroît très rapidement en fonction de la distance. Mais il apparaît clairement qu'il n'y a pas de discontinuité dans la dispersion du pollen de colza. Dans ces conditions, il n'y a pas de limite au-delà de laquelle on peut espérer obtenir un isolement complet de toute source de pollen de colza.

## FLUX DE GÈNES ENTRE CRUCIFÈRES

Au départ, les travaux d'hybridation interspécifique ont été développés par les sélectionneurs de colza pour tenter d'augmenter la variabilité du colza lorsque certains caractères agronomiques étaient absents de l'espèce (gènes de résistance aux maladies, restauration de la fertilité mâle...). En revanche, aucune étude sur les flux de gènes spontanés entre le colza et les crucifères adventices endémiques n'avait jusqu'alors été réalisée du fait que :

- ces espèces présentent des structures génomiques distinctes: le colza (*Brassica napus*, AACC,  $2n=38$ ) est un amphidiploïde issu de l'hybridation spontanée entre le chou (*B. oleracea*, CC,  $2n=18$ ) et la navette (*B. rapa* syn : *B. campestris*, AA,  $2n=20$ ) alors que les espèces adventices sont diploïdes, leur nombre chromosomique variant de  $2n=14$  à  $2n=24$ ,
- les hybrides interspécifiques triploïdes (ACX, X étant le génome haploïde de l'adventice) sont généralement très stériles à moins que l'espèce diploïde soit l'un des progéniteurs du colza (les travaux publiés par Mikkelsen et al. (1996)

montrent en effet qu'il est possible en 2 générations d'obtenir des introgressions de colza dans le génome de navette spontanée, cette dernière espèce étant fréquente au Danemark mais rare en France).

L'absence d'informations scientifiques sur les flux de transgènes du colza vers ses adventices nous a conduit à mettre en place des programmes pour tenter de répondre aux questions suivantes :

- la production d'hybrides interspécifiques est-elle possible ?
- des échanges entre les génomes en présence peuvent-ils se produire sachant qu'ils conditionnent la possibilité d'intégration stable dans le génome de l'adventice ?
- ces hybrides peuvent-ils produire une descendance dans laquelle le transgène s'exprime après pollinisation par l'espèce diploïde ?

La méthodologie choisie pour tenter d'apporter des réponses à ces questions a consisté à faire les croisements interspécifiques en serre dans un premier temps puis au champ en conditions favorables à l'hybridation interspécifique, c'est-à-dire en l'absence de pollen de colza en utilisant des plantes mâle-stériles puis en situation agronomique normale.

**Dans un premier temps**, l'étude a été réalisée en conditions contrôlées, par croisements manuels réciproques et sauvetage *in vitro* d'embryons.

La variété de colza transgénique utilisée était la variété canadienne de printemps, « Westar », contenant le gène *bar* qui confère la résistance au glufosinate (nom commercial Basta®). Les espèces adventices étudiées ont été choisies sur la base des connaissances acquises sur leur proximité phylogénétique relative avec le colza et sur celle de leur importance en tant que mauvaises herbes dans les cultures :

- le chou (*B. oleracea*, CC, 2n=18), une des espèces parentales du colza,
- la moutarde des champs ou sanve (*Sinapis arvensis*, SarSar, 2n=18),
- la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*, RrRr, 2n=18)
- la moutarde noire (*B. nigra*, BB, 2n=16),
- la roquette bâtarde (*B. adpressa*, syn: *Hirschfeldia incana* AdAd, 2n=14).

**Tableau 1 : Nombre d'hybrides interspécifiques produits pour 100 fleurs soit par croisement manuel et sauvetage d'embryons (A) soit en conditions naturelles, en utilisant la variété de colza 'Brutor' mâle stérile comme parent femelle (B).**

Croisements	A	B
<i>B. napus</i> x <i>B. oleracea</i>	20,1	--
<i>B. oleracea</i> x <i>B. napus</i>	1,1	--
<i>B. napus</i> x <i>H. incana</i>	11,6	1,9
<i>H. incana</i> x <i>B. napus</i>	2,5	--
<i>B. napus</i> x <i>B. nigra</i>	4,2	--
<i>B. nigra</i> x <i>B. napus</i>	0,0	--
<i>B. napus</i> x <i>Sinapis arvensis</i>	3,7	0,2
<i>Sinapis arvensis</i> x <i>B. napus</i>	0,0	--
<i>B. napus</i> x <i>Raphanus raphanistrum</i>	1,2	2,8-23,8
<i>Raphanus raphanistrum</i> x <i>B. napus</i>	2,8	--

Des hybrides interspécifiques ont été produits pour toutes les combinaisons étudiées (Kerlan *et al.*, 1992 ; tableau 1). Un plus grand nombre d'hybrides a cependant été

obtenu en utilisant le colza comme parent femelle, à l'exception de ceux impliquant la ravenelle. Aucun hybride ne s'est développé lorsque la moutarde noire ou la moutarde des champs était utilisée comme parent femelle.

Lorsque le gène *bar* est présent, il est exprimé, conférant ainsi aux hybrides interspécifiques la résistance au Basta®. Les hybrides ont généralement la structure génomique attendue (ACX), c'est-à-dire les génomes haploïdes du colza (AC) et de l'espèce sauvage (X). Cependant, parmi les hybrides colza-chou, colza-moutarde des champs et colza-ravenelle, des amphidiploïdes (AACCXX) ont été observés : ils présentent une méiose presque régulière mais il n'a été possible de produire une descendance qu'à partir des amphidiploïdes obtenus avec le chou (Kerlan, 1992). L'analyse du comportement méiotique des hybrides triploïdes (ACX), comparé à celui d'haploïdes (AC) issus des colzas ayant permis de les produire, révèle que les pourcentages d'appariement varient en fonction du génome X (Kerlan *et al.*, 1993; **tableau 2**). Ce sont les hybrides avec le chou, la ravenelle, la moutarde noire et la moutarde des champs qui présentent le plus fort taux d'appariement chromosomique lequel permet des échanges intergénomiques. Les hybrides avec la roquette bâtarde présentent par contre une inhibition de l'appariement chromosomique homéologue. Aucun effet cytoplasmique sur le taux d'appariement des chromosomes n'a été observé. La fertilité pollinique des hybrides varie de 0 à 30 %.

Les hybrides F1 interspécifiques étant peu fertiles, la production de graines est faible après croisements manuels et sauvetage d'embryons (Kerlan, 1992 : **tableau 3**).

**Dans un second temps**, les résultats présentés ci-dessus nous ont conduits à réaliser des essais au champ en conditions favorables à l'hybridation interspécifique, c'est-à-dire en utilisant comme parent femelle des colzas mâle-stériles (stérilité cytoplasmique *Ogu*-INRA). Deux facteurs ont été étudiés : l'espèce adventice et le génotype du colza.

**Tableau 2 : Analyse du nombre moyen de chromosomes appariés des hybrides interspécifiques triploïdes issus de croisement manuel avec la variété 'Westar' transgénique suivi de sauvetage d'embryons (A) ou en conditions naturelles en utilisant la variété de colza 'Brutor' mâle stérile comme parent femelle (B).**

Hybrides F1	Génomes	2n	A Nombre moyen de chromosomes appariés	B Nombre moyen de chromosomes appariés
<i>B. napus x H. oleracea</i>	ACC	28	18,1	--
<i>B. napus x H. incana</i>	ACAAd	26	7,7	13.0-6.7
<i>B. napus x B. nigra</i>	ACB	27	12,4	--
<i>B. napus x H. Sinapis arvensis</i>	ACSar	28	11,5	19.1
<i>B. napus x Raphanus raphanistrum</i>	ACRr	28	13,0	15.3
<i>B. napus</i> haploïdes	AC	19	7,4	12.5

**Tableau 3 : Nombre de graines obtenues pour 100 fleurs à partir d'hybrides interspécifiques soit après croisement manuel et sauvetage d'embryons (A) ou en conditions naturelles en présence de l'espèce adventice diploïde (B).**

Croisements	A	B
<i>B. napus</i> x <i>H. oleracea</i>	0,8	--
<i>B. oleracea</i> x <i>B. napus</i>	0,3	--
<i>B. napus</i> x <i>H. incana</i>	0,3	0.2-0.3
<i>H. incana</i> x <i>B. napus</i>	0,0	--
<i>B. napus</i> x <i>B. nigra</i>	0,3	--
<i>B. nigra</i> x <i>B. napus</i>	--	--
<i>B. napus</i> x <i>H. Sinapis arvensis</i>	0,5	0,1
<i>Sinapis arvensis</i> x <i>B. napus</i>	--	--
<i>B. napus</i> x <i>Raphanus raphanistrum</i>	0,6	0.1-1.7
<i>Raphanus raphanistrum</i> x <i>B. napus</i>	0,6	--

### Comparaison de différentes adventices

Les adventices étudiées sont les plus fréquentes dans les conditions françaises de culture à savoir la ravenelle, la roquette bâtarde et la moutarde des champs. Pour chacune de ces espèces, un isolement a été mis en place selon un dispositif en bandes alternées avec du colza de printemps mâle stérile, variété de printemps 'Brutor' mâle-stérile et non transgénique, selon un ratio 1/1. La production d'hybrides interspécifiques, identifiés parmi les graines présentant un diamètre inférieur à 1,6 mm, est présentée **tableau 1** (Eber *et al.*, 1994 ; Chèvre *et al.*, 1996).

Les hybrides interspécifiques produits sont vigoureux et ont une morphologie proche de celle du colza. L'observation du comportement méiotique (**tableau 2**) et des fertilités mâle et femelle ont confirmé les premières observations réalisées. L'implantation au champ, selon un dispositif équivalent à celui utilisé pour produire la première génération, a été réalisée : les hybrides F1 interspécifiques ont été cultivés en présence de l'espèce adventice. La production de plantes supposées issues de rétrocroisement par l'espèce adventice (« BC1 ») est faible (**tableau 3** ; Eber *et al.*, 1994 ; Chèvre *et al.*, 1996).

Ces études ont permis d'identifier la ravenelle comme étant l'espèce sauvage, parmi celles analysées, présentant la plus forte aptitude à l'hybridation avec le colza et une fréquence élevée d'appariements chromosomiques intergénomiques (Eber *et al.*, 1994 ; Chèvre *et al.*, 1996). Cette espèce est de plus l'une des principales adventices du colza en France. Pour la poursuite de l'étude, le modèle colza-ravenelle a donc été retenu.

### Effet du génotype de colza sur la production d'hybrides interspécifiques avec la ravenelle

• *Effet du fond génétique colza sur la production d'hybrides interspécifiques avec la ravenelle*

Nous avons pu noter lors de l'étude du modèle colza mâle stérile - ravenelle que :

- les 10 génotypes de colza analysés, dont 5 produits à partir de la variété 'Westar' de colza contenant le gène *bar* de résistance au Basta®, présentent des aptitudes à l'hybridation interspécifique significativement différentes (**tableau 4** ; Baranger *et al.*

1995) ; il est important de noter que la période de floraison de la ravenelle coïncide avec celle du colza et que les variétés de colza d'hiver, principalement cultivées en France sous forme de lignées ou d'hybrides, présentent la plus forte aptitude à l'hybridation interspécifique;

- les hybrides F1 interspécifiques sont aussi vigoureux, ont toujours une morphologie proche de celle du colza et sont résistants au Basta® lorsque le transgène est présent. Ce dernier a une transmission mendélienne. Les hybrides interspécifiques ont généralement la structure génomique attendue (ACRr, 2n=28) à l'exception des quelques amphidiploïdes (AACCRrRr, 2n=56), et leur fertilité est fortement réduite ;

- les hybrides « BC1 », issus des graines récoltées sur des hybrides F1, sont généralement résistants au Basta® lorsque la plante-mère est résistante; la majorité d'entre eux a une morphologie proche de celle de la ravenelle : ils ont des structures génomiques très distinctes : soit identiques à celle de la plante-mère (ACRr, 2n=28), soit de type BC1 (ACRrRr, 2n=37), soit de type amphidiploïde (AACCRrRr, 2n=56), soit à nombre chromosomique intermédiaire ; les plantes ayant le plus faible nombre de chromosomes présentent la meilleure fertilité femelle ;

- les hybrides « BC2 » produits dans les mêmes conditions, présentent majoritairement un nombre de chromosomes plus proche de celui de la ravenelle. Leur fertilité est meilleure que celle de la génération précédente, en revanche, le taux de transmission du transgène diminue ;

- les hybrides « BC3 » présentent un faible nombre de chromosomes. Peu d'entre eux présentent le transgène. Ces descendances sont actuellement en cours d'expérimentation.

**Tableau 4 : Production d'hybrides interspécifiques en fonction du génotype maternel de colza.**

	Génotypes	1993		1994	
		Nb gr	Nb gr	Nb gr	Nb
Lignées	Brutor	2,7	8,3	1,5	33,1
	Miyuki	1,4	5,3	8,1	38,9
	Drakkar	27,6	210,6	26,6	233,0
	Samourai	26,4	206,1	37,7	525,6
	Hobson	41,3	202,1	95,4	1058,3
Hybrides F1	Brutor-WestarT5 Basta®	37,4	175,0	17,3	175,7
	Miyuki-WestarT5 Basta®	28,9	393,6	25,5	361,2
	Drakkar-WestarT5 Basta®	15,9	89,8	29,3	250,2
	Samourai-WestarT5 Basta®	88,6	445,0	47,8	498,9
	Hobson-WestarT5 Basta®	68,4	556,5	100,4	1213,3

*Les variétés d'hiver sont présentées en caractères gras.*

• *Effet de la localisation du transgène sur le génome de colza*

Parallèlement, les risques de transfert pouvant être différents en fonction du site d'insertion du transgène dans le génome de colza, différents transgènes ont été localisés sur la carte génétique du colza et des hybrides interspécifiques entre la

ravenelle et ces différents événements de transformation ainsi que leurs descendance ont été produits.

Dans un premier temps, la même variété 'WestarT5' portant une copie du gène *bar* à l'état homozygote a donc été croisée avec la variété asiatique « Miyuki ». A partir de l'hybride F1, des haploïdes doublés ont été produits. Cette population en ségrégation a été utilisée pour constituer 2 mélanges d'ADN de 10 plantes résistantes au Basta® et de 10 plantes sensibles. L'utilisation de la méthode de marquage moléculaire avec des RAPD a permis d'identifier des marqueurs du site d'insertion (Baranger, 1995). La comparaison avec la carte génétique du colza (Foisset *et al.* 1996) a révélé que le transgène, placé en partie terminale d'un groupe de liaison, pourrait se trouver en position télomérique (Baranger *et al.*, 1997). De plus ces marqueurs permettront de suivre la zone dans laquelle s'est inséré le transgène dans les différentes générations d'hybrides interspécifiques obtenues.

Parallèlement, sept plantes issues de sept événements différents de transformation de la variété « Westar », contenant le gène de la nitrilase, *Brnx*, conférant la résistance aux herbicides de la famille des oxynils, à l'état homozygote, ont été croisées avec la variété mâle stérile « Brutor ». Les hybrides F1 ayant la même structure génotypique mais des sites d'insertion supposés différents ont été :

- rétrocroisés par la variété 'Brutor' et par la variété 'Westar' afin de marquer par la même méthode que précédemment ces sites d'insertion,
- placés au champ en présence de ravenelles. Les hybrides F1 interspécifiques ont été produits ainsi que leur descendance. Les plantes « BC1 » sont en cours d'expérimentation.

L'étude des générations avancées de rétrocroisement par la ravenelle devrait permettre, connaissant la position initiale du transgène, de préciser si cette dernière a un effet.

**Dans un troisième temps**, des essais ont été réalisés en conditions agronomiques normales en association avec la ravenelle.

Un essai a été mis en place dans le cadre du projet Inter-Instituts en 1996 afin de déterminer quel peut être le taux d'hybrides interspécifiques en conditions de compétition pollinique. Un champ de 1ha de la variété 'Synergy' (80 % d'hybrides F1 mâle-stériles, hétérozygotes pour le gène *pat* conférant la résistance au Basta® + 20 % d'une lignée contenant 2 copies à l'état homozygote du transgène) a été implanté à Rennes et à Dijon. Selon un dispositif défini par H. Darmency (Malherbologie, INRA Dijon), des ravenelles à fleurs blanches ont été repiquées soit en tant que plantes isolées, soit en peuplement plus ou moins dense, en bordure et en milieu de champ. Les notations ont permis d'observer une bonne synchronisation des floraisons du colza et de la ravenelle. Les ravenelles ont été récoltées plante à plante. Les graines seront semées et les plantes traitées au Basta® pour identifier les hybrides interspécifiques. Un échantillonnage de graines de colza a également été récolté par prélèvement manuel et à la moissonneuse batteuse. Nos résultats antérieurs indiquant que les hybrides interspécifiques sont présents parmi les graines de diamètre inférieur à 1,6mm, seules ces dernières seront étudiées. Les plantes obtenues étant toutes résistantes au Basta®, seules les notations au printemps de plantes à fleurs blanches couplées à des études de cytométrie en flux indiqueront la présence d'hybrides interspécifiques.

## CONCLUSION

L'utilisation de la transgénèse constitue une révolution dans le domaine de la sélection, ce qui justifie les mesures de précaution qui sont prises par le biais des différentes commissions. Des questions d'éthique se poseront en raison de l'accès à une variabilité génétique quasi illimitée. La décision de mise sur le marché sera prise au cas par cas en fonction principalement du caractère apporté.

Dans le cas du colza, le sélectionneur sera amené dans certaines situations à privilégier à court terme l'approche traditionnelle de la sélection, dans la mesure du possible, du fait des interrogations qui persistent en relation avec la biologie florale de cette espèce et des possibilités d'hybridation spontanée avec certaines crucifères adventices. Dans nos conditions, il paraît illusoire de vouloir isoler totalement une parcelle de colza transgénique de tout autre champ de colza, aucune distance limite d'isolement ne pouvant être définie. Les travaux entrepris sur la ravenelle permettront quant à eux de préciser les risques réels de flux de gènes dans cette espèce. Sachant qu'en dehors des progéniteurs du colza, la ravenelle est certainement l'espèce pour laquelle le risque de flux de gènes apparaît le plus élevé, jusqu'à présent aucune plante à 18 chromosomes et résistante au glufosinate n'a encore été mise en évidence dans notre étude. Au vu des premiers résultats obtenus, les difficultés rencontrées dans la dissémination de colzas génétiquement modifiés concerneront plus le domaine de l'intraspécifique (fécondation croisée et surtout gestion des repousses) que le domaine de l'interspécifique. Les questions soulevées par les colzas génétiquement modifiés rejoignent en fait en grande partie celles posées par la diversification de la production de colza à usages alimentaires ou non alimentaires. Il faut signaler que des travaux ont été initiés par certaines équipes pour tenter de réduire les risques de flux de gènes à partir de cette espèce (morphologie florale, incompatibilité interspécifique) et tenter de mieux gérer les repousses (itinéraires techniques, approche génétique dont la résistance à l'égrenage).

## Bibliographie

1. BARANGER A., 1995. Évaluation en conditions naturelles des risques de flux d'un transgène d'un colza (*Brassica napus*) résistant à un herbicide à une espèce adventice (*Raphanus raphanistrum*). Thèse de l'université d'Orsay n° d'ordre 3668, pp 97.
2. BARANGER A., CHEVRE A.M., EBER F., RENARD M., 1995. Effect of oilseed rape genotype on the spontaneous hybridization rate with a weedy species : an assessment of transgene dispersal. *Theor. Appl. Genet.* 91: 956-963.
3. BARANGER A., DELOURME R., FOISSET N., BARRET P., DUPUY P., RENARD M., CHEVRE A.M., 1997. Wide mapping of a T-DNA insertion site in rapeseed using bulk segregant analysis and comparative mapping (soumis)
4. CHEVRE A.M., EBER F., BARANGER A., KERLAN M.C., BARRET P., VALLEE P., RENARD M., 1996. Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic Brassicas. Ninth Crucifer genetic workshop, ISHS, Ed. J.S. Dias, I. Crute, A.A. Monteiro, *Acta Horticulturae* 407: 169-179.
5. EBER F., CHEVRE A.M., BARANGER A., VALLEE P., TANGUY X., RENARD M., 1994. Spontaneous hybridization between a male sterile oilseed rape and two weeds. *Theor. Appl. Genet.* 88 : 362-368.
6. FOISSET N., DELOURME R., BARRET P., HUBERT N., LANDRY B.S., RENARD M., 1996. Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. *Theor. Appl. Genet.* 93 : 1017-1025.

7. HEYN F.W., 1977. Analysis of unreduced gametes in the Brassicaceae by crosses between species and ploidy levels. *Z. Pflanzenzücht.* 78 : 13-30.
8. KERLAN M.C., CHEVRE A.M., EBER F., 1993. Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed (*Brassica napus* L.) and related species : cytogenetical characterization and detection of the transgene. *Genome* 36 : 1099-1106.
9. KERLAN M.C., CHEVRE A.M., EBER F., BARANGER A., RENARD M., 1992. Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species : I. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica* 62 : 145-153.
10. LAVIGNE C., GODELLE B., REBOUD X., GOUYON P.H., 1996. A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. *Theor Appl. Genet.* 93: 1319-1326.
11. SCHEFFLER J.A., PARKINSON R., DALE P., 1993. Frequency and distribution of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic research* 2:356-364.
12. SCHEFFLER J.A., PARKINSON R., DALE P., 1995. Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plot of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breeding* 114: 317-321.
13. SONG K., OSBORN T.C., WILLIAMS P.H., 1988. *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor. Appl. Genet.* 75 : 784-794.
14. TIMMONS A.M., O'BRIEN E.T., CHARTERS Y.M., DUBBELS S.J., WILKINSON M J , 1995 Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp *oleifera*. *Euphytica* 85: 417-423.



## **B2 : Impact de colzas transgéniques exprimant des inhibiteurs de protéases sur coléoptères phytophages et sur abeilles**

**JOUANIN L.<sup>1</sup>, BONADÉ-BOTTINO M.<sup>1</sup>, GIRARD C.<sup>1</sup>, LE MÉTAYER M.<sup>2</sup>,  
ZACCOMER B.<sup>1\*</sup>, PICARD NIZOU A.L.<sup>2</sup>, LERIN J.<sup>3</sup>, PHAM  
DELÈGUE M.H.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie cellulaire, INRA, 78026 Versailles Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Neurobiologie comparée des invertébrés, INRA, 91440 Bures/Yvette, France

<sup>3</sup> Station de Zoologie, 86600 Lusignan, France

\* Adresse actuelle: Semences Cargill, BP17, 28310 Toury, France

### **INTRODUCTION**

Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante très cultivée en Europe (2 680 000 ha en 1996 dont 865 000 ha en France). Une grande partie de ce colza est plantée pour des usages alimentaires (huile, tourteaux...). La nécessité de laisser une partie des surfaces agricoles en jachère a stimulé la culture du colza à usage industriel (580 000 ha en 1996 pour la CEE). Le colza héberge de nombreux insectes qui ne sont pas tous nuisibles, toutefois les plus importants phytophages nécessite un contrôle de population (Cetiom, 1997). Certains de ces insectes comme la mouche du chou, le charançon du bourgeon terminal, l'altise, et le puceron cendré sont actifs en automne. Les autres se trouvent en printemps. Par ordre chronologique, il faut citer, le charançon de la tige, la méligèthe, le couple charançon des siliques/cécidomye, le baris, et les pucerons cendrés. Un seul de ces insectes (principalement des coléoptères) ne peut être considéré comme le ravageur principal du colza. L'attaque du colza à différents moments de sa culture fait qu'il est souvent nécessaire d'effectuer plusieurs traitements insecticides. Ces traitements sont coûteux et ne doivent être réalisés que si le nombre d'insectes atteint un certain seuil (différent pour chaque ravageur). De plus, le colza étant une plante mellifère, très visitée par les abeilles en période de floraison, il est primordial de n'utiliser que certains insecticides non nocifs pour cet insecte. Il serait très intéressant à différents niveaux (protection de l'environnement, coût cultural, simplification de la conduite de la culture...) de planter des variétés de colza plus résistantes aux insectes phytophages. L'utilisation des biotechnologies est une nouvelle voie d'obtention de telles plantes: la création de colzas transgéniques exprimant des protéines entomopathogènes pourrait contribuer à la protection de cette culture, tout en limitant l'emploi d'insecticides. La principale stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux insectes consiste à introduire et à exprimer dans le génome des plantes des delta-endotoxines de la bactérie, *Bacillus thuringiensis* (Vaek, 1987 ; Perofoen, 1992, 1997 ; Estruch *et al*, 1997). Toutefois, cette voie d'approche n'est pas adaptée au cas du colza car ces toxines possèdent un spectre d'hôte étroit et sont surtout actives sur des lépidoptères. La plupart des insectes ravageurs du colza sont des coléoptères, non sensibles aux toxines de *B. thuringiensis*. Une autre voie d'approche consiste à introduire et à exprimer dans les plantes des

gènes codant pour des inhibiteurs de protéases (IP) capables d'interférer avec la protéolyse digestive des insectes. L'ingestion de ces protéines par les insectes se traduit par des retards de développement et/ou une mortalité larvinaire accrue. Cette stratégie a été décrite pour la première fois en 1987 sur un lépidoptère (Hilder *et al*, 1987). Nous avons essayé d'adapter cette stratégie pour la lutte contre les coléoptères chez le colza en utilisant 2 différents d'inhibiteurs de protéases. Toutefois, le colza étant une plante mellifère, il est important de vérifier que l'expression de ces protéines n'a pas d'effet sur l'abeille.

## LES INHIBITEURS DE PROTÉASES

Les protéases appartiennent à quatre familles correspondant aux 4 mécanismes réactionnels identifiés :

- protéases à sérine : trypsine, chymotrypsine, élastase ;
- protéases à cystéine : papaïne, bromélaïne, différentes cathepsines ;
- métallo-protéases : carboxypeptidases ;
- aspartyl protéases : pepsine, chymosine.

Face aux 4 types de protéases, on trouve 4 types d'inhibiteurs. Les IPs sont de petites protéines (généralement de PM inférieur à 25kDa) classées en famille en fonction de leurs spécificités et de leurs homologies (Ryan, 1990).

Dans les plantes, les IPs semblent remplir plusieurs fonctions :

- la régulation de la mise en place des réserves dans la graine ;
- la régulation des réserves lors de la germination ;
- la défense des graines ou des organes de réserve ;
- la défense des parties végétatives. Dans ce cas, les IPs sont inductibles par la blessure pour la défense contre les insectes ou inductibles par des éliciteurs pour la défense comme des pathogènes.

Les endoprotéases majoritaires dans le tube digestif des insectes étant de type sérine et/ou cystéine (Christeller *et al*, 1992; Murdock *et al*, 1987), nous nous sommes intéressés aux IPs à sérine (= serpine) et aux IPs à cystéine (= cystatine) d'origine végétale.

Des essais d'alimentation artificielle comprenant de tels IPs sur différents insectes ont montré que l'ingestion de ces protéines pouvait avoir un effet délétère sur la croissance larvinaire et entraîner la mort (Gatehouse *et al*, 1992 ; Boulter, 1993). Les IPs testés étaient principalement des IP à sérine sur des lépidoptères ou des IPs à cystéine sur des coléoptères.

Au début de notre travail, il n'existait aucune information sur les protéases digestives des insectes cibles pour le colza. De plus, si de nombreuses publications démontraient que les lépidoptères dépendent essentiellement de protéases à sérine pour leur digestion, Murdock *et al* (1987) avaient montré la présence de protéases à cystéine chez des coléoptères. En parallèle avec une caractérisation des protéases de certains insectes ravageurs du colza, nous avons choisi d'introduire dans cette plante les ADNc d'un IP à sérine et d'un IP à cystéine. Nous avons choisi l'IP de type Bowman Birk CII isolé de graine de soja possédant une activité antitrypsine et anti chymotrypsine (Joudrier *et al*, 1987) et l'IP à cystéine OCI isolé de grain de riz (Abe *et al*, 1987). Ces ADNc ont été insérés dans des vecteurs de transformation sous le contrôle du promoteur de l'ARN 35S du virus du chou fleur (p35S) dont la séquence activatrice a été doublée (p70). La séquence leader  $\Omega'$  du virus de la mosaïque du tabac a été ajoutée en 5' afin d'augmenter l'efficacité de la traduction. Le vecteur comprend

également le gène de la néomycine phosphotransférase (*nptII*) conférant la résistance à la kanamycine aux cellules transformées et le gène de la  $\beta$ -glucuronidase (*gus*).

## TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE DU COLZA

Une méthode de transformation génétique du colza dérivée de celle publiée par Moloney *et al* (1989) a été utilisée sur le génotype de colza de printemps 00 Drakkar. Des pétioles de cotylédons prélevés sur des plantules de 3 jours cultivées en conditions stériles sont co-cultivés pendant 1h avec la souche C58pMP90 d'*Agrobacterium tumefaciens* possédant un vecteur binaire contenant les gènes *nptII*, *gus* et de l'IP. Après une culture de 48h sous lumière continue sur milieu RCC (Pelletier *et al.* 1983) en boîte de Petri, les explants sont transférés sur milieu de régénération additionné de 15mg/l de kanamycine et placés en chambre de culture (26°C, 16h de jour/8h de nuit). Après 4 à 6 semaines, les bourgeons apparus sur les cals sont transférés sur milieu neuf additionné de céfotaxime et de tétracycline. Les plantules sont transférées en serre après enracinement.

En utilisant ce protocole, une dizaine de lignées ont été obtenues par construction. Des hybridations moléculaires de type northern ont permis de déterminer celles qui expriment le gène de l'IP à un fort niveau. Les lignées comportant un seul site d'insertion ont été identifiées par analyse de la ségrégation de la descendance sur kanamycine, et par des hybridations de type Southern. Les plantes sélectionnées ont été autofécondées afin d'avoir des lignées homozygotes. Les essais sur insectes ont été réalisés sur des descendants de ces lignées.

Pour les plantes exprimant l'IP à cystéine OCI, des expériences de type Western et ELISA réalisées avec un anticorps anti-OCI (Leplé *et al.*, 1995) ont permis de déterminer le niveau de production de la protéine dans les différents tissus consommés par les insectes ravageurs. L'activité de la protéine OCI a été démontrée par la capacité des plantes transgéniques à inhiber la papaïne.

**Tableau 1: Production d'OCI dans les tissus de la lignée OCI-4B.**

	Jeunes feuilles	Pétioles	Graines	Pollen	Nectar
% des protéines solubles	0,1 à 0,3	0,03 à 0,07	0,05	Non détectée	Non détectée

La caractérisation des plantes exprimant l'IP à sérine CII s'est avérée beaucoup plus délicate car il n'a pas été possible de fabriquer un anticorps anti-CII et le colza possède des activités anti protéases à sérine endogènes qui perturbent la mesure de l'activité anti-trypsine. La production de la protéine due au transgène n'induit pas une très forte augmentation de cette activité. Actuellement, nous ne connaissons pas les raisons de cette faible accumulation de CII dans les tissus de colza. Des lignées contenant OCI et CII ont été obtenues par croisement et quelques bioessais ont été réalisés avec ces doubles transformants.

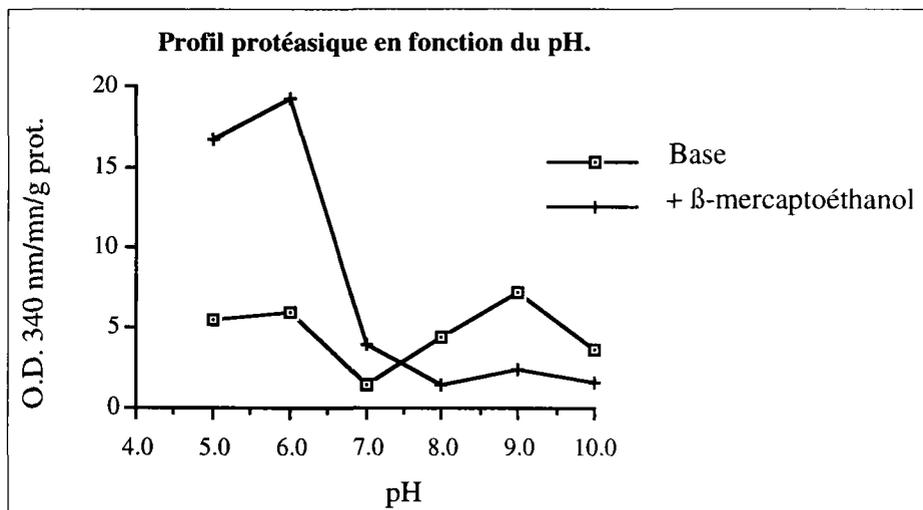
## CARACTÉRISATION DES PROTÉASES DE PLUSIEURS COLÉOPTÈRES RAVAGEURS DU COLZA

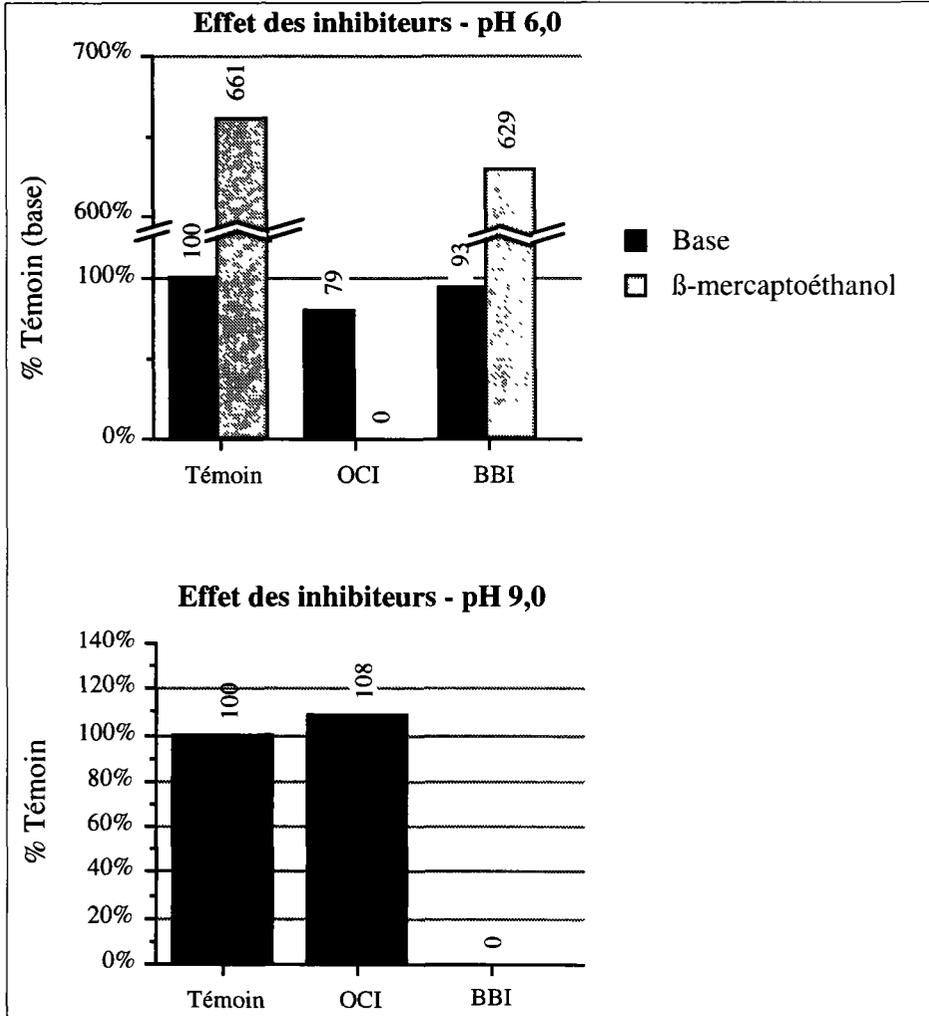
Les activités protéasiques de larves des 4 insectes, le baris (*Baris coerulescens*), l'altise (*Psylliodes chrysocephala*, le charançon des tiges (*Ceutorhynchus napi*) et le charançon des siliques (*Ceutorhynchus assimilis*) ont été déterminées sur une large

gamme de pH en présence ou sans agent réducteur (DTT,  $\beta$ -mercaptoéthanol). Leur inhibition par des agents spécifiques des différents types de protéases ainsi que par les IPs OCI (produit dans *E. coli*) et BBI (un IP similaire à CII, disponible commercialement) a été étudiée. De plus des gels d'activité (Michaud *et al* ; 1993) ont permis de caractériser les différentes protéases digestives de ces insectes.

Deux pics d'activité protéasique sont observés pour chaque insecte. Le premier pic à pH 6 ou 5 correspond à des protéases à cystéine. Cette activité est fortement réduite en présence de OCI. Le second pic détecté à pH 9 ou 10 correspond à des protéases à sérine et est inhibé par BBI. Ces résultats montrent que les larves de ces coléoptères ravageurs du colza possèdent les 2 types d'activité protéasique, sérine et cystéine. Toutefois, le pic correspondant à l'activité de protéases à cystéine est souvent le plus important et les plantes exprimant OCI ont été testées en premier.

**Figure 1 : Activité endoprotéasique de la larve de charançon de la tige et effet d'inhibiteurs.**





## TESTS SUR PLANTES

Les coléoptères ravageurs du colza ne peuvent pas être élevés en laboratoire. Il est donc nécessaire de récolter des adultes dans les champs au moment opportun et de faire pondre les femelles. Les œufs ou les jeunes larves nées au laboratoire sont déposées sur les plantes de colza normal ou transgénique. Tous les bioessais ont été réalisés sur plante entière cultivée en conditions contrôlées en serre. En effet, à part pour l'altise adulte qui consomme des feuilles, seules les larves causent des dégâts et sont foreuses (collet pour *Baris*, tige pour le charançon de la tige, graine pour le charançon des siliques). Vers la fin du développement larvaire, les larves sont récupérées sur plantes témoins et transformées, pesées et leur contenu en protéases est déterminé aux 2 pics correspondant aux maxima d'activités.

Chez les 4 insectes testés, les résultats ont été décevants. En effet, contrairement à ce qui avait été observé pour les larves de *Chrysomela tremulae* élevées sur des peupliers transgéniques exprimant OCI (Leplé *et al.*, 1995) aucune mortalité ou retard dans le développement larvaire n'ont été observés. Au contraire, dans le cas de certains

insectes du colza, les larves consommant les plantes transgéniques sont plus grosses. Les analyses sur gels montrent des perturbations des profils de protéases digestives. Ainsi pour l'altise, une augmentation des 2 types de protéases est observée (tableau 2). Pour le charançon des siliques une protéase à cystéine est absente pour les larves élevées sur colzas transgéniques. Dans le cas du charançon des siliques et du baris, la détermination des protéases digestives après ingestion de plantes transgéniques est en cours. Les bioessais réalisés sur les doubles transformants (OCI + CII) donnent des résultats identiques à ceux obtenus avec les plantes exprimant OCI seul.

### Tableau 2 : Résultats des tests avec l'altise.

De 3 à 5 larves ont été déposées au collet des plantes. Les larves ont été récoltées 14 jours après l'infestation.

Larves récoltées sur :	Plantes contrôles	Plantes exprimant OCI
Nombre de plantes infestées	16	13
Nombre de larves déposées	45	41
Nombre de larves survivantes	21	18
Poids (mg) $\pm$ SD	0,64 $\pm$ 0,25	1.1 $\pm$ 0,34
Activité protéasique à pH 6	100 %	167 %
Activité protéasique à pH 9	100 %	240 %

Sur gel d'activité, une plus forte intensité des différentes bandes est observée mais aucune nouvelle bande n'est détectée.

### EFFETS SUR ABEILLE

OCI n'a pas été détecté dans le pollen et dans le nectar des colza transgéniques (tableau 1). Il semble que chez les crucifères, le promoteur 35S ne permette pas l'expression dans cet organe. Les risques d'ingestion des IPs par les abeilles au cours de leurs visites sont donc réduits. Toutefois, ce n'est pas le cas pour toutes les plantes (le même promoteur permet une expression dans le pollen de tabac ; Wilkinson *et al.* 1997). Il est donc important d'évaluer l'impact des IPs sur l'abeille (*Apis mellifera*). L'abeille possède essentiellement des protéases digestives à sérine (Belzunces *et al.* 1994). Différentes expériences ont d'abord été réalisées avec des doses d'IP voisines de celles produites dans les feuilles des plantes transgéniques (26  $\mu$ g/l). Aucune toxicité à court et long terme de OCI et de BBI (similaire à CII) n'a été montrée. Les performances olfactives des abeilles ne sont pas perturbées et en situation de choix entre plantes normale et transgénique, aucune différence n'a été décelée au niveau du butinage (Girard *et al.* 1998). À cette dose, aucune modification du profil protéasique n'est observée.

Toutefois, afin d'établir un seuil de toxicité des IPs, des études ont été réalisées avec 3 différentes doses d'IP (0,1 / 1 / 10 mg/l). Les 2 premières doses (0,1 et 1 mg/l) correspondent à des niveaux d'expression compatibles avec une production *in planta*. Aucun effet d'OCI n'a été observé sur la mortalité à long terme, les performances d'apprentissage et le profil protéasique de l'abeille quelle que soit la dose. Ces résultats sont tout à fait compatibles avec le fait que l'abeille ne possède pas de protéase à

cystéine. Par contre, BBI dès 1 mg/l n'induit pas de mortalité sur le long terme mais perturbe les protéases digestives. Les abeilles consommant BBI à 10 mg/l ont une durée de vie réduite, des performances d'apprentissage olfactif perturbées (analysée par des expériences d'extension conditionnée du probocis en réponse à une odeur) et une forte augmentation des protéases digestives à sérine.

Des études sont en cours afin de déterminer si des perturbations peuvent être observées au niveau de la ruche si des IPs sont concentrés dans le miel qui sert à nourrir les larves. Les techniques mises au point pour ce travail seront utilisées pour tester les éventuels effets délétères sur l'abeille d'autres molécules à activité insecticide.

## CONCLUSION

De nombreux travaux ont montré que différents inhibiteurs de protéases incorporés dans des diètes artificielles pouvaient induire des retards de développement larvaires et de la mortalité. Toutefois, la plupart de ces expériences a été réalisée sur des lépidoptères en utilisant des IPs à sérine. Quelques essais ont également montré un effet des IPs à cystéine sur des coléoptères (Liang *et al*, 1991; Edmonds *et al*, 1996). Le premier résultat montrant l'intérêt de la stratégie d'expression d'IP dans des plantes transgéniques concerne l'expression de CpTI, un IP à sérine isolé du Niébé (Hilder *et al*, 1987) dans le tabac. Plusieurs autres publications démontrent l'intérêt de cette stratégie pour différents lépidoptères phytophages (Johnson *et al*, 1989 ; McManus *et al*, 1994 ; Duan *et al*, 1996 ; Xu *et al*, 1996) tandis qu'une seule montre l'effet de l'ingestion de plantes exprimant un IP à cystéine, OCI, sur un coléoptère (Leplé *et al*, 1995). Nous avons voulu tester l'efficacité de cette stratégie vis-à-vis des coléoptères ravageurs du colza. Nous avons montré que ces coléoptères possèdent un pool de protéases digestives complexe de type sérine et cystéine. Des expériences réalisées *in vitro* ont montré que ces protéases sont respectivement sensibles à BBI et OCI. Sur la base de ces résultats, des lignées de colzas transgéniques exprimant un IP à cystéine (OCI isolé du soja), ou un IP à sérine de type Bowman-Birk isolé du soja (CII), ont été obtenues. Le niveau d'expression de OCI dans les colzas transgéniques est correct alors que celui de CII est faible. Les bioessais réalisés avec les larves de 4 insectes ravageurs du colza démontrent que l'ingestion des colzas exprimant OCI (et dans certains cas, des colzas exprimant OCI + CII) ne provoque pourtant pas de mortalité ni de retard dans le développement larvaire. Il a été montré que ces coléoptères sont capables de compenser l'inactivation d'un type de protéase par une hyperproduction de cette protéase ou par une augmentation d'une autre protéase. Des résultats semblables ont été observés chez le doryphore (Bolter et Jongsma, 1996). Ces résultats montrent une grande adaptabilité de ces insectes à l'ingestion prolongée d'un IP produit de manière continue dans une plante. Ils nous incite à faire des études plus fines entre protéases d'insectes et IP. D'autres équipes utilisant les IP sont arrivées à des conclusions identiques (Jonsgma *et al*, 1996 ; Michaud, 1997 ; Jonsgma et Bolter, 1997).

Les effets directs ou indirects sur abeille des IPs exprimés des plantes transgéniques ont été étudiés. Les abeilles possèdent des protéases à sérine (Girard *et al*, 1998). Néanmoins, l'ingestion d'un IP à sérine en alimentation artificielle, à des doses similaires à celles produites dans les plantes transgéniques, ne provoque pas de mortalité à court et long terme. Seule la consommation de doses beaucoup plus élevées induit une augmentation de mortalité à long terme. L'ingestion de l'IP à cystéine OCI ne provoque pas de mortalité même à forte dose. Le comportement de

butinage observé en cage de vol est identique pour les plantes témoins et les plantes transformées.

Une meilleure connaissance des interactions entre protéases d'insectes et inhibiteurs permettra peut être d'affiner la stratégie afin d'obtenir des plantes plus résistantes aux insectes. Ces résultats montrent également que pour que cette stratégie puisse se développer, il est urgent d'identifier de nouvelles protéines insecticides (Hallahan *et al.*, 1992). En effet, de plus en plus de travaux montrent que l'expression d'une seule toxine de *B. thuringiensis* ne permettra pas de conférer une résistance durable et qu'il est souhaitable d'associer plusieurs protéines à activité entomopathogène possédant des modes d'action différents (Estruch *et al.*, 1997 ; Peferoen, 1997). De plus, les toxines de Bt sont actives sur un nombre restreint d'insectes en particulier dans le cas des coléoptères. Le verrou de cette stratégie n'est donc pas la possibilité de transformer la plante cible mais de disposer de gènes codant pour des substances actives sur les insectes ravageurs de cette plante.

### Remerciements

Les travaux sur insectes ravageurs et abeilles ont reçu le soutien de la Société Rustica-Prograin-Génétique et de la Fondation Limagrain. Les travaux sur les effets à long terme des IPs font partie du programme Européen Biotech ITI (PL96-365). Ce travail a également bénéficié de la collaboration avec la station d'amélioration des plantes de l'INRA de Rennes et de la Station expérimentale de Rothamsted (UK).

### Bibliographie

---

1. ABE K., EMORIS Y., SUZUKI K., ARAA S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (*Oryza/cystatin*). *J Biol Chem*, 262 (1987) 16793-16797.
2. BELZUNCES L.P., LENFANT C., DI PASQUALE S., COLLIN M.E.. *In vivo* and *in vitro* effects of wheat germ agglutinin and Bowman Birk soybean trypsin inhibitor, two potential transgene products, on midgut esterase and protease activities from *Apis mellifera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B (1994) 63-69.
3. BOLTER C.J., JONGSMA M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapts to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *J. Insect Physiol.*, 12 (1995) 1071-1078.
4. D. BOULTER. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops *Phytochem.*, 34 (1993) 1453-1466.
5. CETIOM. Colza d'hiver : le contexte économique, les techniques culturales, les débouchés. 1997.
6. CHRISTELLER J.T., LAING W.A., MARKWICK N.P., BURGESS E.P.J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae - Dietary and protease inhibitor interactions *Insect Biochem Mol Biol.*, 22 (1992) 735-746.
7. DUAN X., LI X., XUE Q., ABO-EL-SAAD M., XU D., WU R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotech.*, 14 (1996) 494-498.
8. EDMONDS H.S., GATEHOUSE L.N., HILDER V.A., GATEHOUSE J.A. The antimetabolic effects of oryzacystatin on larvae of the Southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howard*); use of a bacterial expression system for oryzacystatin. *Entomol. Exp. Appl.*, 78 (1996) 83-94.
9. ESTRUCH J.J., CAROZZI N.B., DESAI N., DUCK N.B., WARREN G.W., KOZIEL M.G. Transgenic plants : an emerging approach to pest control. *Nature Biotech.*, 15 (1997) 137-141.
10. A.M.R. GATEHOUSE, V.A. HILDER et D. BOULTER, Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. Dans *Biotechnology in Agriculture* N° 7: Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, 1992, pp 155-181.

11. GIRARD C., PICARD-NIZOU A.-L., ZACCOMER B., GRALLIEN E., JOUANIN L., PHAM-DÉLÉGUE M.-P. Risk assessment of proteinase inhibitors expressed in transgenic crops : toxicity and behavioural effects on the honeybee. *Transgenic Res.*, 7 (1998) 1-8.
12. HILDER V.A., GATEHOUSE A.M.R., SHEERMAN S.E., BARKER R.F., BOULTER D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 333 (1987) 160-163.
13. HALLAHAN D.L., PICKET J.A., WADHAMS L.J., WALLSGROVE R.M., WOODCOCK C. Potential of secondary metabolites in genetic engineering of crops for resistance. Dans *Biotechnology in Agriculture n° 7 : Plant genetic manipulation for crop protection*. CAB International, 1992, pp 215-248.
14. JOHNSON K.A., NARVAEZ J., GYNHEUNG A., RYAN C.A. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants : Effect on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 9871-9875.
15. JONGSMA M.A., STIEKEMA W.J., BOSCH D. Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. *TIBTECH.*, 14 (1996) 331-333.
16. JONGSMA M.A., BOLTER C. The adaptation of insects to plants protease inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 43 (1997) 885-895.
17. JOUDRIER P.E., FOARD D.E., FLOENER L.A., LARKINS B. Isolation and sequence of cDNA encoding the soybean protease inhibitors PIIV et CII. *Plant Mol Biol*, 10 (1987) 35-42.
18. LEPLÉ J.-C., BONADÉ-BOTTINO M., AUGUSTIN S., PILATE G., DUMANOIS-LE TAN V., DELPLANQUE A., CORNU D., JOUANIN L. Toxicity to *Chrysomela tremulea* (Coleoptera : Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol Breeding* 1 (1995) 319-328.
19. LIANG C., BROOKHART G., FENG G.H., REECK G.R., KRAMER K.J. Inhibition of digestive proteinase of the stored grain coleoptera by oryzacystatin, a cysteine protease inhibitor from rice seeds. *FEBS Lett.*, 278 (1991) 139-142.
20. MC MANUS M.T., WHITE D.W.R., MC GREGOR P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgenic Res.*, 3 (1994) 50-58.
21. MESQUIDA J., MARLILLEAU R., PHAM-DÉLÉGUE M.-H., RENARD M. A study of rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera* Metzger) flower nectar secretion. *Apidologie* 19 (1988) 307-318.
22. MOLONEY M.M., WALKER J.M., SHARMA K.K. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep.*, 8 (1989) 238-242.
23. MICHAUD D., FAYE L., YELLE S. Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. *Electrophoresis* 14 (1993) 94-98.
24. MICHAUD D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends Biotech.*, (1997) 15 : 4-6.
25. MURDOCK L.L., Brookhart G., Dunn P.E., Foard D.E., Kelley S., Kitch L., Shade R.E., Shudkole R.H., Wolfson. Cysteine digestive proteinase in coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87 (1987) 783-787.
26. PEFEROEN M. Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. Dans *Biotechnology in Agriculture n°7 : Plant genetic manipulation for crop protection*. CAB International, 1992, pp 135-153.
27. PEFEROEN M. progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *TIBTECH* 15 (1997) 173-177.
28. PELLETIER G., PRIMARD C., VEDEL F., CHÉTRIT P., REMY R., ROUSSELLE P., RENARD M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in cruciferae by protoplast fusion. *Mol Gen. Genet.*, 191 (1983) 244-250.
29. RYAN C.A., Proteinase inhibitors in plants : genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28 (1990) 939-943.
30. THOMAS J.C., WASMANN C.C., ECHT C., DUNN R.L., BOHNERT H.J., MC COY T.J. Introduction and expression of an insect proteinase inhibitor in alfalfa. *Plant Cell Rep.*, 14 (1994) 31-36.
31. THOMAS J.C., ADAMS D.G., KEPPEL V.D., WASMANN C.C., BROWN J.K., KANOST M.R., BOHNERT H.J. *Manduca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. *Plant Physiol. Biochem.*, 33 (1995) 611-614.
32. VAECK M., REYNAERTS A., HOFTE H., JANSSENS S., DE BEUCKELEER M., DEAN C., ZABEAU M., VAN MONTAGU M., LEEEMANS J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 327 (1987) 33-37.
33. WILKINSON J.E., TWELL D., LINDSEY K. Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen : Implications for field release of transgenic plants. *J. Exp. Bot.*, 48 (1997) 265-275.
34. XU D., XUE Q., MC ELROY D., MAWAL Y., HILDER V.A., WU R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major insect pests. *Mol. Breeding*, 2 (1996) 167-173.



# **B3 : Régénération efficace et rapide de plantes transgéniques après transformation d'entre-nœuds de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) via *Agrobacterium tumefaciens***

**BEAUJEAN A., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S.**

Université de Picardie Jules Verne, Faculté des Sciences, Laboratoire Androgénèse et Biotechnologie, Ilot des Poulies, 33, rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex 01, FRANCE

## **INTRODUCTION**

La Pomme de terre est l'une des plantes agronomiques les plus importantes au niveau mondial, notamment du fait de sa haute productivité et de sa teneur élevée en amidon, vitamines et protéines. Mais, en raison de sa tétraploïdie et de la stérilité mâle de nombreuses plantes, la sélection par les méthodes classiques de caractères intéressants est très longue et délicate, voire impossible pour certains caractères. Les techniques de culture *in vitro*, et plus particulièrement la transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens* rendent aujourd'hui possible la création de nouvelles variétés résistantes à différents types d'agression (maladie, herbicide, prédateur). Plusieurs protocoles de transformation génétique utilisant des feuilles, des entre-nœuds ou des disques de tubercule ont déjà permis de régénérer des plantes transgéniques. En raison de la faible fréquence de transformation obtenue et de la variation somaclonale importante ainsi décrite dans la littérature, il apparaît intéressant de développer de nouvelles méthodes de transformation génétique, permettant en un minimum de temps, la formation de bourgeons transgéniques en nombre important.

La variété Désirée est la variété la plus utilisée en transformation génétique malgré son importance économique relativement faible, car elle est très réactive en culture *in vitro* et permet des manipulations sur de nombreux organes (De Block, 1988 ; Ooms *et al.*, 1987 ; Wenzler *et al.*, 1989).

La variété Bintje et la variété Kaptah Vandel sont des variétés très importantes en Europe, Bintje de par ses qualités gustatives et culinaires, Kaptah Vandel de par ses qualités féculières. De nombreux travaux font état dans la littérature de la relative difficulté à régénérer en peu de temps et en grand nombre de nouvelles plantes transgéniques notamment sur la variété Bintje (Hänisch ten Cate *et al.*, 1988; Ottaviani *et al.*, 1993).

Nous reportons, ici, les travaux concernant la transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens* des variétés Bintje, Désirée et Kaptah Vandel à partir de deux types d'explants : les entre-nœuds et les feuilles. La méthode originale employée nous a permis d'obtenir en six semaines de nombreux bourgeons transgéniques sur les trois variétés. Nous n'avons pas observé de variations somaclonales sur les bourgeons transgéniques ainsi produits.

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **Matériel végétal**

Les plants de Pomme de terre cv. Désirée, Bintje et Kaptah Vandel sont cultivés de manière axénique sur un milieu de base MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de 20 g/l de saccharose et 8 g/l d'agar (Danagel) en chambre de culture avec une photopériode de 16h à 22°C. Les échantillons foliaires et internodaux sont prélevés après 4 semaines de culture sur ce milieu.

### **Matériel bactérien**

La bactérie C58C1rif employée lors de nos expériences de transformation génétique est une *Agrobacterium* possédant un plasmide binaire. Elle nous a été fournie par J. LEEMANS (PGS, Gent, Belgique). Le plasmide pGS Gluc 1 possède entre les bordures de son T-DNA le gène NPT II codant pour la néomycine phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine et le gène Gus codant pour la  $\beta$ -glucuronidase (Sangwan *et al.*, 1991).

### **Régénération/transformation**

Deux types d'explants ont été utilisés pour la transformation : les explants foliaires et internodaux. Ceux-ci sont prélevés sur des plantes âgées de 4 à 5 semaines.

Seuls les 6 premiers entre-nœuds et les 5 premières feuilles sont prélevés. Les entre-nœuds, d'une longueur d'environ 4 à 6 mm, sont découpés dans le sens de la longueur et les feuilles sont dégagées de leurs extrémités. Directement après dissection, les explants sont plongés dans du MS liquide dans lequel ont été ajoutés 10 % d'inoculum bactérien ensemencé 15 h avant dans du LB liquide. Après 30 min, les explants sont séchés sur papier puis déposés sur le milieu d'initiation CIM. Les échantillons foliaires sont placés la face abaxiale contre le milieu et les entre-nœuds la face coupée contre le milieu. Après 3 jours de coculture, les explants sont rincés dans du MS liquide additionné de claforan à 1 g/l pendant 30 min. Après séchage, les échantillons sont cultivés sur le milieu d'initiation CIM complété de 250 mg/l de Claforan et de 125 mg/l de Kanamycine (CIMs) puis repiqués sur un milieu d'organogenèse SIMs également complété de ces mêmes antibiotiques aux mêmes concentrations.

Après apparition des bourgeons, ceux-ci sont prélevés et repiqués sur un milieu d'enracinement (RIMs).

### **Analyse par cytométrie de flux**

La détermination du niveau de ploïdie a été réalisée en cytométrie de flux par analyse avec un cytomètre (Partec CA II, Chemunex) comme décrit dans la littérature (Brown *et al.*, 1991 ; Sangwan *et al.*, 1991, 1992). Nous avons utilisé de jeunes feuilles provenant de plantes témoins et de plantes transgéniques passées en serre. Les suspensions de noyaux sont obtenues par coupage de 0.3g de feuille dans le tampon décrit par Brown (1991). Après filtration sur filtre de 30  $\mu$ m, 10  $\mu$ l de DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) sont ajoutés à la solution qui est placée ensuite 15 min à 4°C. Chaque histogramme représente la distribution de la fluorescence de 3 000 noyaux environ.

### **Détermination de l'expression du gène Gus**

L'activité enzymatique de la  $\beta$ -glucuronidase est détectée histochimiquement par la méthode de Jefferson (1987). Les explants de plantes potentiellement transgéniques sont incubés à 37°C pendant une nuit avec du 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide (X-Gluc) dans un tampon phosphate.

## Amplification de l'ADN par PCR

L'ADN des plantes potentiellement transgéniques et des contrôles positif et négatif a été extrait suivant la méthode décrite par Rogers et Bendich en 1988. La présence du gène NPT II nouvellement introduit a été montrée en utilisant la technique PCR décrite par Sambrook *et al.*, 1989. Le gène NPT II a été amplifié à l'aide des primers : 201-222 : 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3' ; 900-879 : 5'-ATC GGG AGG GGC GAT ACC GTA-3'. La taille du fragment que nous devons obtenir est de 700bp.

## RÉSULTATS

### Transformation à partir d'entre-nœuds

Nous avons donc réalisé la transformation génétique, à partir d'explants internodaux et foliaires sur une combinaison de milieux CIM2, CIM2s et SIM2s. Les protocoles utilisant des entre-nœuds pour permettre la régénération de plantes utilisent des entre-nœuds entiers (Ooms *et al.*, 1987 ; Visser *et al.*, 1989). Pour nos expériences, nous avons utilisé des entre-nœuds que nous avons préalablement coupés longitudinalement en deux parties égales. Ce protocole nous a permis d'obtenir un nombre de bourgeons important sur les deux variétés Bintje et Désirée, notamment sur les explants internodaux pour lesquels nous obtenons une moyenne de, respectivement, 3,7 et 6,4 bourgeons par explant (**Figure 1**). Mais, du fait de la phase cal relativement importante par cette méthode, nous avons obtenu plusieurs bourgeons (> 15 %) ayant une ploïdie anormale.

### Utilisation d'une cytokinine forte lors de la régénération

C'est pourquoi nous avons utilisé une méthode différente impliquant une cytokinine forte, la zéatine riboside. Il est apparu que le temps de culture sur le milieu CIM3s est prépondérant pour obtenir dans un second temps une régénération de bourgeons sur le milieu d'organogenèse. Ainsi, après trois jours de coculture sur le milieu CIM3, nous avons placé les explants sur le milieu CIM3s pendant une période allant de 3 à 11 jours. Après cette période les explants sont repiqués sur le milieu SIM3s. On constate que les explants foliaires et internodaux, des deux variétés testées, cultivés de trois à six jours sur CIM3s se nécrosent après quinze jours de culture sur le milieu SIM3s (**Tableau 1**). En revanche, on note l'apparition de bourgeons sur les différents explants cultivés de sept à dix jours sur CIM3s après 3 semaines de culture sur SIM3s (**Tableau 1**).

**Tableau 1 : Pourcentage de transformation en fonction de la durée de culture sur le milieu de callogénèse CIM3 sur les variétés Bintje et Désirée.**

		% de transformation <sup>a</sup>				
		3	5	7	9	11
<b>Bintje</b>	<b>Entre-nœud</b>	0	0	24,7	<b>95,2</b>	55,9
	<b>Feuille</b>	0	0	28,3	<b>97,3</b>	67,4
<b>Désirée</b>	<b>Entre-nœud</b>	0	0	0	<b>88,7</b>	53,1
	<b>Feuille</b>	0	0	17,4	<b>91,2</b>	63,5

<sup>a</sup> Résultats relevés après trois semaines de culture sur le milieu SIM3. Pour chaque expérience, 150 explants ont été mis en culture.

Pour la suite de nos expériences, nous avons utilisé une période de culture sur le milieu CIM3s de 9 jours. Cette méthode nous a permis d'obtenir un grand nombre de bourgeons, 6 à 11 bourgeons par explant, sur les trois variétés que nous avons testées (Tableau 2), ceci dans une période de 4 à 6 semaines.

**Tableau 2 : Pourcentage de transformation et nombre de bourgeons transgéniques formés sur les trois variétés testées**

	type d'explant	Nombre d'explants <sup>a</sup>	% transformation <sup>b</sup>	Nb de bourgeons/explant <sup>c</sup>
Désirée	entre-nœud	155	88,7 (± 3,7)	,8 (± 0,34)
	feuille	147	91,2 (± 4,1)	10,8 (± 0,3)
Bintje	entre-nœud	163	95,2 (± 2,8)	9,3 (± 0,87)
	feuille	172	97,3 (± 5,3)	11,4 (± 0,76)
Kaptah Vandel	entre-nœud	124	74,7 (± 3,4)	8,2 (± 1,13)
	feuille	118	81,6 (± 4,8)	11,3 (± 0,46)

<sup>a</sup> 3 répétitions de 50 (≈) explants par expérience. <sup>b</sup> % d'explants formant au moins un bourgeon après trois semaines de culture sur le milieu CIM3. <sup>c</sup> Nombre de bourgeons s'enracinant sur le milieu RIMs après trois semaines de culture.

Ces bourgeons ont ensuite été prélevés et repiqués sur le milieu RIMs. Après une semaine de culture sur ce milieu, 100 % des bourgeons s'enracinent et forment de nouvelles plantes transgéniques. En effet, dans la littérature, la concentration en antibiotiques utilisée est relativement faible dans les milieux de culture par rapport à la concentration utilisée ici. C'est pourquoi nous observons un taux d'échappement nul par cette méthode.

### Analyse des plantes régénérées

Ces plantes ont ensuite été passées en serre. Une analyse morphologique et une analyse de la ploïdie par cytométrie en flux ont été effectuées sur ces plantes. En effet, l'un des problèmes le plus souvent rencontré en régénération/transformation de la Pomme de terre est le taux de variation somaclonale important rencontré sur les plantes régénérées (Hänish ten Cate *et al.*, 1987 ; Higgins *et al.*, 1992). Une inspection morphologique sur 150 plantes transgéniques provenant d'explants cultivés soit sur la série 1 soit sur la série 2 de milieux passées en serre révèle la présence de 8 plantes ayant une morphologie perturbée provenant d'explants cultivés sur la série 1. Cependant, aucune anomalie morphologique n'a été observée sur les plantes dérivant d'explants cultivés sur la série 2. Nous avons ensuite déterminé le taux de ploïdie des plantes transgéniques par cytométrie de flux. La position des pics était comparée aux pics obtenus avec des plantes témoins non transgéniques. Nous avons analysé 100 plantes transgéniques obtenues à partir d'explants cultivés sur la série 1 ou sur la série 2 de milieux. Cela nous a permis de mettre en évidence la présence de plantes provenant de la série 1 de milieux possédant une ploïdie différente des plantes témoins (**Figure 2C-D**), notamment chez les plantes présentant des anomalies morphologiques.

Afin de confirmer l'état transgénique des plantes, nous avons effectué des tests Gus sur des feuilles de plantes potentiellement transgéniques ainsi que sur des feuilles provenant de plantes témoins. Les feuilles transgéniques montrent une forte activité Gus alors qu'aucune activité de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase n'a pu être détectée chez les contrôles. L'intégration et l'expression du transgène semblent donc être stables dans les cellules de Pommes de terre transgéniques.

## Analyse par PCR

Une analyse par PCR sur 20 plantes régénérées après transformation génétique nous a permis de mettre en évidence la présence dans le génome de la Pomme de terre du gène NPT II. En effet, les plantes transgéniques présentent une bande d'amplification à 700 bp, comme attendue, alors que les plantes témoins ne présentent pas cette bande d'amplification (**Figure 5**). La concentration en kanamycine, relativement élevée, utilisée dans les différents milieux de culture permet la sélection des bourgeons transgéniques sans que l'on puisse observer la présence d'échappement.

## CONCLUSION

Nous avons mis au point une méthode reproductible de transformation régénération sur les variétés Bintje, Désirée et Kaptah Vandel sur des explants foliaires et internodaux provenant de plantes cultivées *in vitro*. Sur les 3 variétés et sur les 2 types d'explants, nous avons obtenu des pourcentages de régénération importants (6 à 11 bourgeons par explant). Les analyses par PCR et par cytométrie nous ont permis de montrer que ce protocole de transformation permet la régénération de nombreux bourgeons transgéniques ayant une ploïdie identique aux plantes mères n'ayant pas subi cette transformation. Dans la littérature, de nombreux auteurs reportent les problèmes de variation somaclonale rencontrés (Ooms et al, 1987 ; Visser et al 1989). Ces variations sont dues en partie au passage par une phase cal importante lors de la régénération des bourgeons chez la Pomme de terre. Les analyses de ploïdie effectuées montrent que ces variations sont essentiellement dues au nombre de chromosomes présents dans les bourgeons régénérés comme Ooms *et al*, 1987, avaient déjà montré ce phénomène. De plus, l'utilisation de cette technique semble être variété indépendante. Cela peut être dû à l'utilisation de zéatine, qui, comme chez De Block 1988, permet ici une régénération importante de bourgeons chez trois variétés différentes.

De plus, nous avons montré que la transformation sur la variété Kaptah Vandel était possible. Nous obtenons en effet, un pourcentage de transformation supérieur à 90 % avec la formation de 8 à 11 bourgeons par explant.

La possibilité d'obtenir un grand nombre de bourgeons en peu de temps permettra de sélectionner plus facilement des Pommes de terre développant un caractère agronomique intéressant ainsi que la possibilité d'utiliser cette plante pour effectuer des recherches fondamentales.

## Composition des milieux de culture

On désigne par CIM, les milieux d'induction de la callogenèse, par SIM les milieux d'induction des bourgeons, par RIM le milieu inducteur de l'enracinement.

Tous les milieux ont pour base le milieu MB :

MB = MS macroéléments, microéléments, vitamines, fer chélaté + 25 g/l saccharose + 8 g/l agar.

Pour les milieux de callogenèse et d'organogenèse contenant des antibiotiques (300 mg/l de claforan + 125 mg/l kanamycine), ceux-ci sont notés respectivement CIMs et SIMs.

---

### Série de milieux 1

CIM2 = BM + BAP (1 mg/l) + NAA (0,1 mg/l) + GA3 (0,1 mg/l)

SIM2s = BM + BAP (1 mg/l) + GA3 (0,1 mg/l) + kanamycine (125 mg/l) + cefotaxime (300 mg/l)

RIMs = BM + AIA (0, 1mg/l) + kanamycine (80 mg/ l) + céfotaxime (200 mg/l)

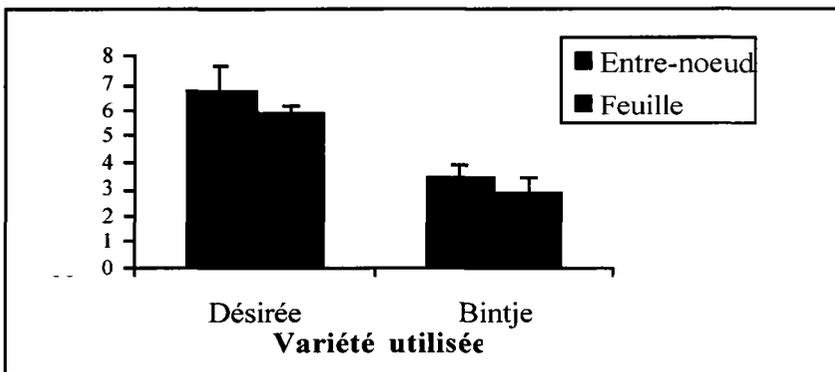
**Série de milieux 2**

CIM3 = BM + ZR (0,8mg/l) + 2.4-D (2 mg/l)

SIM3s = BM + ZR (0,8 mg/l) + GA3 (2 mg/l) + kanamycine (125 mg/l) + céfotaxime (300 mg/l)

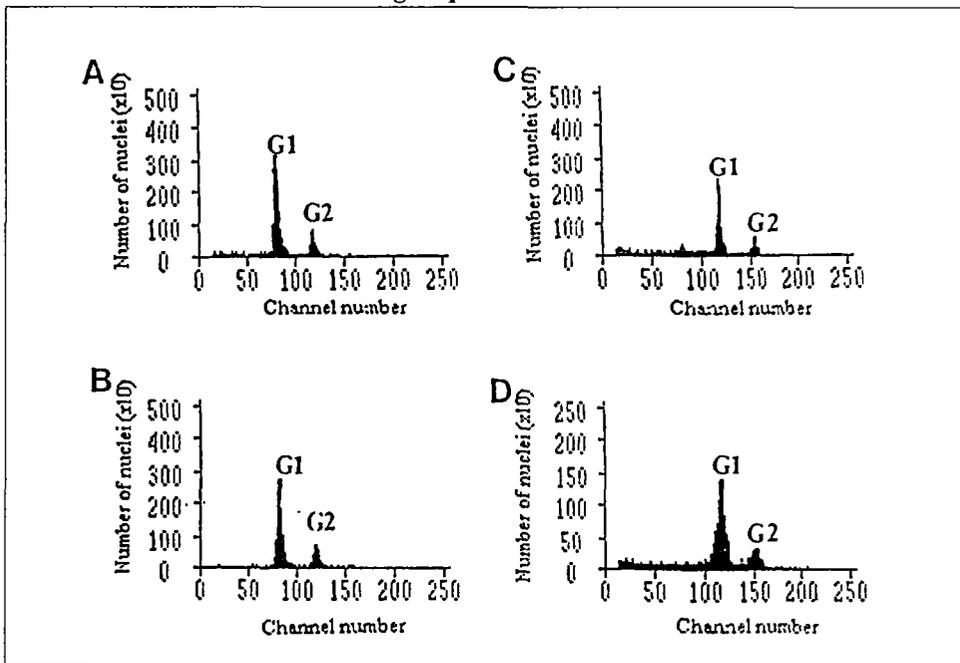
RIMs = BM + AIA (0,1mg/l) + kanamycine (80 mg/l) + cefotaxime (200 mg/l)

**Figure 1. Nombre de bourgeons transgéniques obtenus en fonction du type d'explants et de la série de milieux utilisée.**



Résultats relevés après trois semaines de culture sur le milieu RIMs 150 explants ont été mis en culture en trois répétitions de 50 explants par expérience par variété et par type d'explant.

**Figure 2 A-D : Histogrammes du contenu en ADN des noyaux isolés de plants de Pommes de terre témoin et transgéniques.**



**A : plante tétraploïde témoin non transformée, B : Plante transgénique obtenue après culture sur la série de milieux E2 ; C-D : Plantes transformées octoploïdes obtenues après culture sur la série 1.**

## Remerciements

Nous tenons à remercier plus particulièrement les Dr. C. ASSAF-DUCROCQ et L. DUVIVIER-LAVIEVILLE pour leur aide ainsi que la Station de Beaurains de la FNPPPT pour la production des différentes variétés utilisées pour nos expériences. Ce travail a bénéficié du support financier du Conseil Régional de Picardie, Association Biopôle Végétal.

## Bibliographie

1. BROWN S.C., BERGOUNIOUX C., TALLET S., MARIE D. (1991). Laboratory guide for cellular and molecular plant biology, pp 326-345. Eds. I. Negrutiu, G. Gharti-Chhetri, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
2. DE BLOCK M. (1988). Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theor. Appl. Genet., 76 : 767-774.
3. HANISCH TEN CATE C.H., RAMULU K.S. (1987). Callus growth, tumour development and polyploidization in the tetraploid potato cultivar Bintje. Plant Science, 49 : 209-216.
4. HANISCH TEN CATE C.H., ENNIK E., ROEST S., RAMULU K.S., DIJKHUIS P., DE GROOT B. (1988). Regeneration and characterization of plants from potato root lines transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Theor Appl Genet, 75 : 452-459.
5. HIGGINS E.S., HULME J.S., SHIELDS R. (1992). Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, 82 : 109-118.
6. JEFFERSON R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system. Plant Molecular Biology Reporter, 5 : 387-405.
7. MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant., 15 : 473-479.
8. OOMS G., BURRELL M.M., KARP A., BEVAN M., HILLE J. (1987). Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. Theor. Appl. Genet., 73 : 744-750.
9. OTTAVIANI M-P., SMITS T., HANISCH TEN CATE C.H. (1993). Differential methylation and expression of the  $\beta$ -glucuronidase and neomycin phosphotransferase genes in transgenic plants of potato cv. Bintje. Plant Science, 88 : 73-91.
10. ROGERS S.O., BENDICH A.J. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. Plant Mol. Biol. Manual, A6 : 1-10.
11. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989). Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor, 2<sup>nd</sup> eds, NY.
12. SANGWAN R.S., BOURGEOIS Y., SANGWAN-NORREEL B.S. (1991). Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* zygotic embryos and identification of critical parameters influencing transformation efficiency. Mol. Gen. Genet., 230 : 475-485.
13. SANGWAN R.S., BOURGEOIS Y., BROWN S.C., VASSEUR G., SANGWAN-NORREEL B.S. (1992). Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. Planta, 188 : 439-456.
14. VISSER R.G.F., JACOBSEN E., HESSELING-MEINDERS A., SCHANS M.J., WITTHOLT B., FEENSTRA W.J. (1989). Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious regeneration on leaf and stem segments. Plant Molecular Biology, 12 : 329-337.
15. WENZLER H., MIGNERY G., MAY G., PARK W. (1989). A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. Plant Science, 63 : 79-85.



## **B4 : La transformation génétique des arbres tropicaux fixateurs d'azote de la famille des casuarinacées**

**FRANCHE C., BOGUSZ D., LAPLAZE L., DUHOUX E.**

Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Arbres  
(ORSTOM/GeneTrop), 911 avenue Agropolis, BP 5045, 34 032 Montpellier cedex 1,  
France.

Tél : 04 67 61 10 12- Fax : 04 67 63 82 65- Email : [franche@mpl.orstom.fr](mailto:franche@mpl.orstom.fr).

Dans les régions tropicales arides et semi-arides, les arbres de la famille des *Casuarinaceae* ont un rôle écologique extrêmement important. Grâce à leur aptitude à établir une symbiose avec un micro-organisme fixateur d'azote appelé *Frankia*, ces ligneux sont des espèces pionnières, colonisatrices de sols pauvres dont elles vont restaurer la fertilité (National Research Council, 1984). L'établissement de la symbiose implique le développement d'un nouvel organe, le nodule (appelé actinorhize pour les plantes vivant en symbiose avec *Frankia*), qui est le site de la fixation d'azote (Berry et Sunell, 1990). Il faut souligner que les plantes actinorhiziennes (c'est-à-dire vivant en symbiose avec *Frankia*) constituent, après les légumineuses, le deuxième groupe de plantes capables de fixer biologiquement l'azote atmosphérique.

La famille des *Casuarinaceae* comprend quatre genres, *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Ceuthostoma* et *Gymnostoma*, et plus de 90 espèces d'arbres et d'arbustes dont l'aire d'origine s'étend de l'Australie aux îles du Pacifique et au sud-est de l'Asie (pour revue, voir National Research Council, 1984). Les *Casuarinaceae* possèdent des rameaux chlorophylliens à activité photosynthétique et des feuilles réduites à des écailles membraneuses verticillées, limitant les pertes en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs. En association avec *Frankia* et des champignons mycorhiziens, les *Casuarinaceae* peuvent croître sur des sols marginaux carencés en azote et en phosphore. La famille des *Casuarinaceae* comprend des essences tropicales, subtropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3000 m) et à différents types de sols (acides à alcalins). L'ensemble de ces propriétés facilite l'introduction de ces arbres en zone tropicale, en dehors de leur aire d'origine. Les *Casuarinaceae* sont largement utilisées dans les régions tropicales pour enrichir les sols, fixer les terrains érodés et les dunes mobiles, et produire du fourrage et de la biomasse (Diem et Dommergues, 1990). Le bois de *Casuarina* possède également un pouvoir calorifique très élevé et constitue une source importante de charbon de bois ; il est également utilisé pour fabriquer des outils agricoles ou plus rarement pour produire de la pâte à papier.

À l'inverse des symbioses *Rhizobium*-Légumineuses qui font l'objet de nombreuses études du fait de leur intérêt agronomique (beaucoup d'espèces sont des plantes vivrières ou des plantes fourragères), peu de laboratoires étudient les symbioses actinorhiziennes. Le but poursuivi par notre laboratoire est de comprendre les interactions moléculaires qui président à l'établissement et au fonctionnement de la symbiose entre *Casuarina* et *Frankia*, afin de pouvoir obtenir des symbioses plus performantes et mieux adaptées aux stress de l'environnement.

Parallèlement à un programme d'isolement de gènes végétaux symbiotiques, nous avons entrepris de mettre au point des systèmes de transformation génétique sur deux espèces, *Allocasuarina verticillata* et *Casuarina glauca*. Les plantes transgéniques sont utilisées d'une part, comme outil de recherche fondamentale pour l'étude des gènes symbiotiques de la plante hôte, et d'autre part, comme moyen d'amélioration génétique des *Casuarina* grâce à l'introduction de gènes d'intérêt (tolérance aux pathogènes ou modification de la qualité de la lignine). Les différentes méthodes de transformation génétique des *Casuarinaceae* mises au point dans notre laboratoire seront décrites dans cet article.

## **LA TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE DES CASUARINACEAE PAR AGROBACTERIUM RHIZOGENES**

La sensibilité des *Casuarinaceae* à plusieurs souches d'*A. rhizogenes* a été mise à profit pour obtenir des plantes transgéniques d'*Allocasuarina verticillata* (Phelep *et al.*, 1991). Les souches d'*A. rhizogenes* A4RS et 2659 ont été inoculées sur des jeunes plantes d'*A. verticillata* cultivées *in vitro*. Des racines transgéniques se sont développées sur le site d'inoculation, puis ont été excisées et cultivées en culture pure sur milieu gélosé. Deux mois après inoculation, des bourgeons sont apparus spontanément sur les racines transformées par la souche 2659, ou ont été induits par l'apport exogène de régulateurs de croissance dans le cas des racines induites par la souche A4RS. Des plantes transgéniques régénérées sont caractérisées par une altération importante de leur phénotype : système racinaire abondant et plagiotrope ; partie aérienne très ramifiée à dominance apicale réduite. Ces altérations sont le résultat de l'expression dans la plante hôte des oncogènes transférés dans le génome végétal par la bactérie. Outre les modifications de phénotype, ce système de transformation génétique est relativement long puisqu'il faut compter environ neuf mois pour régénérer des plantes transgéniques.

Notre laboratoire a donc développé une méthode de transformation génétique plus rapide, toujours basée sur l'utilisation d'*A. rhizogenes*, mais conduisant à l'obtention de plantes partiellement transformées appelées plantes composites (Diouf *et al.*, 1995). De jeunes plantes sont inoculées sur l'hypocotyle à l'aide d'une aiguille imbibée dans la culture d'agrobactéries. Des racines transformées caractérisées par une croissance rapide apparaissent cinq jours après inoculation. Au bout de trois semaines, le système racinaire principal est éliminé, et les jeunes plantes sont décontaminées par des lavages en présence de céfotaxime. Les plantes sont transférées en tube ; elles sont donc composées d'un système aérien non transformé et d'un système racinaire contenant l'ADN-T d'*A. rhizogenes*. L'introduction dans la souche d'*Agrobacterium* d'un plasmide binaire permet d'obtenir 40 % de plantes composites exprimant les gènes de l'ADN-T du vecteur binaire. Avec un tel système, une étude de la régulation de l'expression dans les racines et nodules transgéniques peut être réalisée.

## **TRANSFORMATION DES CASUARINACEAE PAR DES SOUCHES DÉSARMÉES D'AGROBACTERIUM TUMEFACIENS**

De nombreuses expériences ont été consacrées à l'optimisation des conditions de transformation de *C. glauca* par *A. tumefaciens* : choix de la souche, de l'explant végétal, présence d'inducteur des gènes de virulence, temps de coculture et de contact entre le matériel végétal et les agrobactéries, sélection des cellules transformées (Le *et al.*, 1996). Le protocole de transformation qui a été choisi pour *C. glauca* est le suivant : prélèvement des cotylédons, hypocotyles et épicotyles sur des jeunes plantes

âgées de trois semaines, contact pendant une heure avec une suspension à  $10^8$  bactéries/ml de la souche C58C1(GV2260 ; BIN19GUSINT), coculture de trois jours en présence de 25  $\mu$ M d'acétosyringone, puis sélection en présence de kanamycine à 50 mg/l et de céfotaxime à 250 mg/l. Dans ces conditions, 13 % des hypocotyles, 19 % des cotylédons et 26 % des épicotyles développent de un à trois calcs poussant sur antibiotiques et exprimant l'activité  $\beta$ -glucuronidase. Après quatre mois de culture, on observe une différenciation de bourgeons sur 30 % des calcs issus d'épicotyles. Après neuf à douze mois, la régénération de plantes transgéniques est observée à faible fréquence (Smouni et Franche, résultats non publiés). Les plantes obtenues possèdent un phénotype identique à celui de plantes témoins non transformées.

En raison de la difficulté à obtenir une régénération de plantes entières à partir des calcs de *C. glauca*, notre laboratoire a également entrepris des expériences de transformation génétique avec *Allocasuarina verticillata* (Franche *et al.*, 1997a) Cette espèce est en effet moins récalcitrante que *C. glauca* en culture *in vitro*. Des embryons zygotiques matures d'*A. verticillata* ont donc été transformés dans les conditions définies pour *C. glauca*. Après trois semaines de culture sur milieu sélectif contenant 100 mg/l de kanamycine et 250 mg/l de céfotaxime, on observe sur 21 % des embryons transformés l'apparition de calcs exprimant le gène rapporteur. Le développement de bourgeons est obtenu sur 70 % de ces calcs 5 semaines après la coculture. En l'espace de six à neuf mois, il est possible de régénérer des plantes transgéniques présentant un phénotype identique à celui des plantes témoins non transformées. L'intérêt du système de transformation génétique mis au point réside dans sa simplicité (un seul milieu de culture est utilisé pour la régénération des rameaux) et dans la possibilité de régénérer de nombreux rameaux transgéniques à partir de chaque calc transformé.

## LE TRANSFERT DIRECT DE GÈNES CHEZ LES CASUARINACEAE

Un canon à poudre a été utilisé pour étudier, chez *A. verticillata* et *C. glauca*, les possibilités de transfert direct de gènes par des microprojectiles accélérés à grande vitesse (Franche *et al.*, 1997b). Une optimisation des conditions de tir a tout d'abord été réalisée : choix des explants, des microparticules (nature et taille), de la technique d'enrobage, de la distance de la cible et de la charge de poudre. Les explants les plus favorables à l'expression transitoire du gène rapporteur GUS sont les calcs de *C. glauca* et les cotylédons d'*A. verticillata*. Une moyenne de trois à quatre unités transitoires GUS a été mise en évidence par calc (d'environ 1 cm) et par cotylédon. En raison de la faible efficacité d'intégration stable obtenue avec les microprojectiles (0,1 %), la seule application du transfert direct par canon chez les *Casuarinaceae* est le système d'expression transitoire.

Des bombardements ont été réalisés avec des microparticules non enrobées d'ADN en vue de créer de multiples sites de blessure permettant un transfert plus efficace de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* chez *C. glauca* (Le *et al.*, 1996). Quelles que soient les conditions de bombardement réalisées, un prétraitement des explants avec des microprojectiles n'augmente pas l'efficacité de transformation par *Agrobacterium*. Respectivement 16 % et 14 % de calcs transgéniques ont été obtenus sur des cotylédons de *C. glauca* témoins et bombardés par canon, puis cocultivés avec la souche C58C1(GV2260 ; BIN19GUSINT). Les résultats suggèrent que l'ADN-T ne peut pas être transféré dans les cellules blessées, que la cible végétale a été trop endommagée par le tir, ou encore que la poudre a un effet toxique sur le matériel végétal.

## LA NODULATION DES PLANTES TRANSGÉNIQUES PAR *FRANKIA*

Afin de vérifier qu'il n'y avait pas modification des propriétés symbiotiques occasionnées par la présence des transgènes, des expériences de nodulation ont été entreprises avec les plantes transgéniques résultant d'un transfert par *A. rhizogenes* ou d'un transfert par *A. tumefaciens*. Les plantes d'*A. verticillata* ont été inoculées avec la souche de *Frankia* Allo2 et celles de *C. glauca* par la souche THR.

Dans le cas des plantes transgéniques d'*A. verticillata* et des plantes composites de *C. glauca* obtenues après inoculation par *A. rhizogenes*, on note une réduction importante (diminution d'un facteur 2 ou 3) de l'aptitude à la nodulation (Franche *et al.*, 1994; Diouf *et al.*, 1995). L'activité réductrice d'acétylène reste cependant identique dans les nodules transgéniques et dans les nodules témoins. Il faut noter que chez les légumineuses composites obtenues après transformation par *A. rhizogenes*, une réduction de la nodulation est également observée lorsque les plantes sont inoculées par *Rhizobium* (Beach et Gresshoff, 1988). L'hypothèse la plus vraisemblable est que cette réduction est la conséquence de la modification de la balance hormonale dans les racines transgéniques qui contiennent les oncogènes d'*A. rhizogenes*.

Plus d'une centaine de plantes transgéniques d'*A. verticillata* obtenues après transformation par *A. tumefaciens* ont été transférées en serre, puis inoculées par la souche de *Frankia* Allo2. Après deux mois, 68,5 % des plantes transgéniques et 57 % des plantes témoins non transformées ont développé de un à 12 nodules. L'activité réductrice d'acétylène est identique dans les nodules transgéniques et témoins (Franche *et al.*, 1997a).

## ÉTUDE DE L'INTÉGRATION DES TRANSGÈNES

La présence des gènes *uidA* et *nptII* a tout d'abord été mise en évidence par analyse PCR à la fois dans les cals de *C. glauca* (Le *et al.*, 1995) et dans les plantes transgéniques d'*A. verticillata* (Franche *et al.*, 1997a). Une amplification avec des oligonucléotides spécifiques du gène *virD1* d'*A. tumefaciens* a également été réalisée afin de vérifier l'absence de contamination par *Agrobacterium*. L'étude détaillée que nous avons réalisée sur 200 plantes d'*A. verticillata* potentiellement transformées a mis en évidence que :

- 89,1 % des plantes contiennent à la fois les gènes *nptII* et *uidA* ;
- 2,8 % des plantes régénérées à partir des cals poussant sur milieu sélectif ne contiennent ni le gène *nptII*, ni le gène *uidA*. Il s'agit vraisemblablement de plantes qui ont échappé à la sélection par la kanamycine ;
- 8 % des plantes poussant sur milieu avec kanamycine contiennent bien le gène *nptII*, mais pas le gène *uidA* ; l'ADN-T a donc été partiellement délété au cours du transfert à la cellule végétale ;
- enfin une amplification avec les oligonucléotides spécifiques du gène *virD1* a été obtenue sur 4,5 % des plantes, traduisant la présence d'agrobactéries contaminantes.

L'intégration de l'ADN-T dans le génome de cinq cals transformés de *C. glauca* et de cinq plantes transgéniques d'*A. verticillata* a été vérifiée par la technique de Southern (Le *et al.*, 1995 ; Franche *et al.*, 1997a). L'hybridation a été réalisée avec une sonde correspondant à la partie codante du gène *uidA*. Une à trois copies du gène *uidA* ont été mises en évidence dans le matériel transformé. Aucune hybridation n'a été obtenue sur les plantes ou cals témoins non transformés.

## EXPRESSION DU GÈNE *UIDA* SOUS CONTRÔLE DU PROMOTEUR 35S CHEZ LES CASUARINACEAE

Cinquante cals résultant de la transformation de *C. glauca* par la souche C58C1(GV2260 ; BIN19GUSINT) ont été étudiés (Le *et al.*, 1995). 43 (soit 86 %) présentent des secteurs plus ou moins bleus. L'activité  $\beta$ -glucuronidase déterminée par analyse fluorométrique varie de 1,5 à 628  $\mu$ moles/min/mg de protéine, avec une activité moyenne de 243  $\mu$ moles/min/mg de protéine. Les différents niveaux d'expression observés sont le résultat du site d'intégration des transgènes dans le génome de la plante hôte, de l'état physiologique des cals cultivés *in vitro*, du degré de méthylation des gènes introduits et du nombre de copies des transgènes.

Des plantes transgéniques d'*A. verticillata* ont été régénérées à partir de vingt cals provenant d'événements de transformation indépendants (Franche *et al.*, 1997a). Une grande variation a également été observée dans les niveaux d'expression du gène *uidA*, tant dans les racines ( $10,3 \pm 26$   $\mu$ moles/min/mg de protéine), que dans les rameaux ( $6,9 \pm 17$   $\mu$ moles/min/mg de protéine). L'analyse histochimique révèle une expression constitutive dans les rameaux (à l'exception des cellules de l'épiderme des écailles), tandis que dans les racines, le gène rapporteur est surtout exprimé dans le cylindre central et la région méristématique.

## EXPRESSION DE PROMOTEURS DE NODULINES

Le gène *uidA* a été placé sous le contrôle des promoteurs d'hémoglobine suivants : *Lbc3* (soja ; légumineuse/symbiose avec *Rhizobium*), *Parasponia* (non légumineuse/symbiose avec *Bradyrhizobium*) et *Trema* (non légumineuse/non symbiotique). En utilisant le système de transformation de *C. glauca* basé sur l'inoculation par *A. rhizogenes*, des racines et nodules transgéniques contenant ces différentes constructions ont été analysés (Franche *et al.*, 1997b).

Les promoteurs *Lbc3* et *Parasponia* sont exprimés dans les cellules infectées par *Frankia*. Le promoteur de *Trema* est exprimé dans les racines et dans le système vasculaire des nodules. Ces résultats mettent en évidence que la spécificité d'expression de ces promoteurs d'hémoglobine est conservée dans les plantes actinorhiziennes.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La transformation génétique d'une plante actinorhizienne a été entreprise pour la première fois en 1988, mettant en évidence la sensibilité d'*Alnus incana* et *Alnus glutinosa* à des souches sauvages d'*A. tumefaciens* (développement de tumeurs) (MacKay *et al.*, 1988). En 1990, le gène *uidA* était exprimé dans des protoplastes électroporés d'*Alnus incana* (Séguin et Lalonde, 1988). Les seules plantes actinorhiziennes transgéniques sont à notre connaissance celles qui ont été obtenues au laboratoire PCMA, grâce à l'utilisation d'*A. rhizogenes* et d'*A. tumefaciens*.

L'obtention de *Casuarinaceae* transgéniques ouvre de très nombreuses perspectives :

- Peu d'espèces ligneuses tropicales ont été transformées (pour revue, voir Sederoff, 1995) ; la possibilité de disposer d'un système de transformation génétique efficace et relativement rapide va permettre de faire progresser les connaissances fondamentales des espèces tropicales : expression de promoteurs connus et stabilité des transgènes dans un ligneux tropical.
- L'étude de l'expression de promoteurs de nodulines (symbiose avec *Rhizobium*) est désormais possible dans une plante actinorhizienne (symbiose avec *Frankia*). Les

résultats obtenus vont fournir des informations sur les similarités ou différences entre les symbioses avec *Rhizobium* et *Frankia*, et sur l'évolution des symbioses fixatrices d'azote.

- L'introduction de constructions géniques portant des gènes d'actinorhizines (gènes symbiotiques de plantes actinorhiziennes) en orientation sens ou antisens va conduire à moduler l'expression des gènes symbiotiques de *Casuarina*. A court terme, on pourra ainsi attribuer des fonctions aux gènes symbiotiques nouvellement isolés chez *Casuarina*. À long terme il devrait ainsi être possible d'améliorer ces symbioses.

- Enfin, l'introduction de gènes d'intérêt peut être entreprise chez *Casuarina* à la fois grâce aux techniques de transformation mises au point et à l'identification de promoteurs permettant de hauts niveaux d'expression des transgènes chez les *Casuarinaceae*.

## Bibliographie

1. BEACH K.H., GRESSHOFF P.M. (1988) Characterization and culture of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of forage legumes. *Plant Sci.*, 57, 73-81.
2. BERRY M.A., SUNELL A.L. (1990) The infection process and nodule development Dans : *The biological of Frankia and actinorhizal plants* (Schwintzer, R.C. and Tjepkema, J.D. eds.), Academic Press Inc., San Diego, pp. 61-81.
3. DIEM H.G., DOMMERGUES Y.R. (1990) Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics. Dans : *The biological of Frankia and actinorhizal plants* (Schwintzer, R.C. and Tjepkema, J.D. eds.), Academic Press Inc., San Diego, pp. 317-342.
4. DIOUF D., GHERBI H., PRIN Y., FRANCHE C., DUHOUX E., BOGUSZ D. (1995) Hairy root nodulation of *Casuarina glauca* : a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, 8, 532-537.
5. FRANCHE C., BOGUSZ D., LE V.Q., PHELEP M., DUHOUX E. (1994) Genetic transformation of trees in the *Casuarinaceae* family. Dans : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Volume 29 (Bajaj, Y.P.S. ed.), Springer-Verlag, pp. 257-273.
6. FRANCHE C., DIOUF D., LE Q.V., N'DIAYE A., GHERBI H., BOGUSZ D., GOBÉ C., Duhoux E (1997a) Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J.*, 11, 897-904.
7. FRANCHE C., LAPLAZE L., DUHOUX E., BOGUSZ D. (1997b) Actinorhizal symbioses : recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17, 1-28.
8. LE Q.V., BOGUSZ D., GHERBI H., LAPPARTIENT A., DUHOUX E., FRANCHE, C. (1996) *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to *Casuarina glauca*, a tropical nitrogen-fixing tree. *Plant Sci.*, 118, 57-69.
9. MACKAY J., SEGUIN A., LALONDE M. (1988) Genetic transformation of 9 *in vitro* clones of *Alnus* and *Betula* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 7, 229-232.
10. National Academy of Sciences (1984) *Casuarinas : Nitrogen-Fixing Trees for Adverse Sites*. National Academy Press, Washington DC.
11. PHELEP M., PETIT A., MARTIN L., DUHOUX E., TEMPÉ J. (1991) Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocauarina verticillata* Lam. *Biotechnology*, 9, 461-466.
12. SEDEROFF R.R. (1995) Forest trees. In *The transformation of plants and soil microorganisms* (Wang, K., Herrera-Estrella, A. and Van Montagu, M., eds). Cambridge University Press, pp. 150-163.
13. SEGUIN A., LALONDE M. (1988) Gene transfer by electroporation in *Betulaceae* protoplasts : *Alnus incana*. *Plant Cell Rep.* 7, 367-370.

# **B5 : Transformation génétique de la Pomme de Terre pour la production de plantes résistantes au PVY**

**GARGOURI-BOUZID R., ROUIS S., HASSAIRI A., MASMOUDI K., LAKHOUA L.<sup>1</sup>**

Centre de Biotechnologie de Sfax B.P. 358, 3018, Sfax Tunisie.

<sup>1</sup> Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax, B.P. W 3038, Sfax Tunisie

## **INTRODUCTION**

Le virus Y de la pomme de terre (PVY) est l'un des pathogènes les plus dévastateurs des cultures de pomme de terre, de tomates et de piments en Tunisie. L'infection par ce virus peut engendrer jusqu'à 80 % de pertes en rendement de tubercules.

Ce virus est le membre type de la famille des potyvirus. Son génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive polyadénylé à l'extrémité 3' et covalamment lié à une protéine (Vpg) à l'extrémité 5'. Sa séquence nucléotidique a été déterminée (Robaglia et coll., 1989). Cet ARN code pour une polyprotéine d'environ 350 kDa. Les huit protéines virales sont le produit d'un clivage autocatalytique de la polyprotéine. Les potyvirus se caractérisent par la formation d'inclusions nucléaires (NI) et cytoplasmiques (CI) dans les cellules qu'ils infectent. Ils représentent la famille de virus phytopathogènes la plus importante par le nombre de ces membres et par l'importance des dégâts qu'ils génèrent sur les différentes plantes hôtes.

En Tunisie, la culture de la pomme de terre se pratique essentiellement au nord du pays (16500 ha). Le calendrier de plantation et de récolte est réparti sur toute l'année selon trois saisons (primeur, de saison et d'arrière saison). La Tunisie importe 16 000 t/an de tubercules de semences en plus des tubercules (0-20000 t/an) pour la consommation en cas de déficit de la production nationale.

Afin de pallier ce besoin en tubercules de pomme de terre et de produire des semences de bonne qualité phytosanitaire, le programme de recherche que nous avons développé et présenté ici vise à utiliser la transformation génétique de la pomme de terre par *Agrobacterium tumefaciens* pour la production de plantes résistantes au PVY. Il est déjà connu dans la littérature que la pomme de terre est parmi les plantes faciles à transformer par cette méthode indirecte de transfert de gènes (Ooms et coll., 1983).

D'autre part, l'expression de gènes de capsides par les plantes transgéniques s'est avéré un moyen efficace de lutte contre les infections virales (cf revue de Beachy et coll., 1990 et Wilson, 1993). Il a même été montré que pour certains virus, l'insertion de cDNA de capsides du même virus ou de virus apparentés (hétérologue), a permis d'obtenir des plantes transgéniques totalement résistantes aux virus de la même famille (Beachy et coll. 1990).

Le projet de recherche développé dans le cas de la pomme de terre a pour but de faire exprimer par les plantes transgéniques des cDNA de gène de la protéine capside du PVY et de deux virus apparentés. Le gène de la capside du virus de la mosaïque de la laitue (LMV) a été testé en premier chez deux variétés de pomme de terre les plus cultivées en Tunisie (Spunta et Claustar).

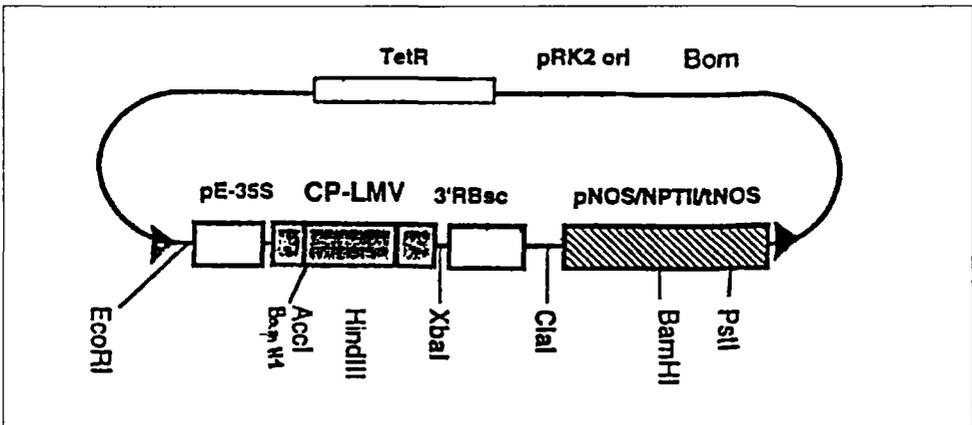
D'autre part, il a été démontré récemment que l'expression par les plantes transgéniques, d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine capsidale d'un virus permet à la plante d'acquiescer une certaine immunité contre ces virus (revue dans Robaglia et Tepfer, 1996). Nous avons donc envisagé d'appliquer cette nouvelle approche dans le cas de la résistance de la pomme de terre au PVY et ce par production d'anticorps monoclonaux dirigés contre une protéine fonctionnelle du virus et non la capsidale. Nous discuterons ici la production et la caractérisation de 4 anticorps monoclonaux reconnaissant 4 protéines différentes du PVY.

## MÉTHODOLOGIE

### Transformation des microtubercules de pomme de terre

Le cDNA correspondant au gène de la capsidale du LMV que nous devons au Docteur J. Albouy (INRA Versailles) est inséré dans le vecteur binaire pKYLX-35S2 sous le contrôle du promoteur doublé de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMv). Ce vecteur porte également le gène codant pour la néomycine phosphotransférase (NPTII) conférant aux plantes transformées, la résistance à la kanamycine. Le plasmide résultant pKLY-35S2-CPLMV (**Figure 1**) est introduit dans *A. tumefaciens* C58 (pGV2260) par électroporation. La transformation de la pomme de terre est réalisée par incubation de disques de microtubercules obtenus *in vitro* avec la souche d'*Agrobacterium* portant le plasmide pKLYX-35S2-CPLMV pendant 3 jours. Les bactéries sont alors éliminées par addition de céfotaxime (100 mg/l). Les disques de microtubercules sont transférés sur milieu inducteur de bourgeons MS (Murashige et Skoog 1962) en présence de zéatine et d'ANA contenant également 50 mg/l de kanamycine. Au bout de 1 à 2 mois, les premiers bourgeons apparaissent. Ils sont alors transférés sur milieu inducteur de racines puis passés en pots pour l'acclimatation sous serre.

**Figure 1** : carte génétique du plasmide pKLY-35S2-CPLMV.



La présence du transgène est vérifiée au niveau de l'ADN génomique des plantes par amplification d'un fragment interne du gène de capsidale du LMV par PCR. Un Southern blot sur les produits PCR et sur l'ADN génomique des plantes résistantes à la kanamycine après digestion par deux enzymes de restriction EcoRI ou BamHI est réalisé. Au niveau transcriptionnel, les ARN totaux sont extraits des plantes résistantes à la kanamycine puis une RT-PCR (transcription réverse suivie d'une amplification par PCR) est réalisée sur ces ARN traités au préalable à la DNaseI (*RNase-free*). Les

amorces utilisées permettent l'amplification d'une partie centrale du gène de la protéine capsidale du LMV. Une hybridation par Northern blot est également réalisée pour confirmer la transcription du gène CPLMV dans les plantes transgéniques. Au niveau de la protéine, des hybridations par Western blot ont été réalisées sur un extrait brut de protéines avec un sérum dirigé contre la protéine CPLMV.

Les plantes transgéniques sont alors testées pour leur capacité à résister à l'infection par le virus. Une première inoculation est pratiquée 40 jours après acclimatation suivie d'une seconde 10 jours plus tard. Les tests sérologiques (ELISA) sont alors effectués tous les 10 jours pour suivre l'accumulation du virus dans les plantes et ce pendant 8 semaines. Le degré d'accumulation du PVY dans les plantes est déterminé par mesure de la D.O. à 405 nm sur l'extrait de feuilles.

Le niveau de protection des plantes transgéniques contre le virus est également testé sur les plantes issues de minitubercules obtenus à partir des premiers clones transgéniques résistants.

### **Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines fonctionnelles de PVY**

Une fraction semi-purifiée d'inclusions nucléaires a été obtenue à partir de feuilles de tabac infectées par le PVY selon le protocole décrit par Chang et coll. (1988). Cette fraction comprend, en plus des protéines d'inclusion nucléaire (NIa et NIb), la protéine CI d'inclusion cytoplasmique et la protéine capsidale. Le mélange a été injecté à des souris pour la production d'anticorps monoclonaux. Une centaine d'hybridomes ont été obtenus dont quatre, pris au hasard, ont été caractérisés. Ces anticorps ont été utilisés pour la détection *in situ* des protéines virales sur épiderme de feuilles de tabac infectées par le PVY.

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### **Transformation de la pomme de terre**

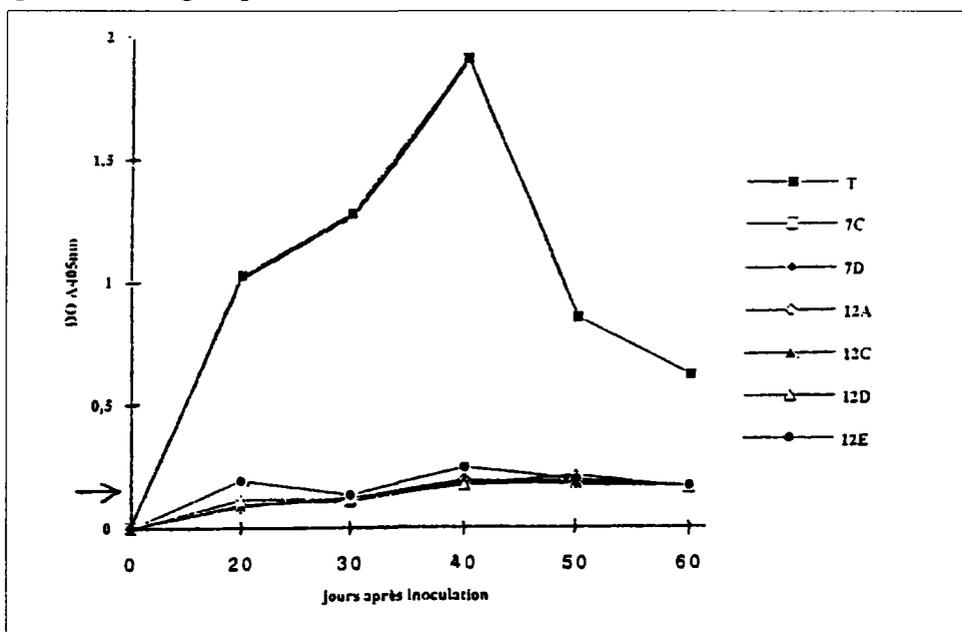
Après transformation de disques de microtubercules de pomme de terre (Spunta et Claustar) par la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens* (pGV2260:pKYLX-35S2-CPLMV), la régénération de bourgeons est réalisée en présence de kanamycine. Le pourcentage de régénération est de l'ordre de 20 % dans les deux cas. L'amplification par PCR d'un fragment interne de 0,8 kpb de l'ADN génomique de ces plantes a permis de déterminer le pourcentage de transformation. Ainsi, 60 à 65,7 % des plantes régénérées en présence de kanamycine ont intégré le gène CP pour les deux variétés Spunta et Claustar.

L'hybridation par Southern blot de l'ADN génomique de 4 clones, digérés par EcoRI ou BamHI a permis de confirmer l'intégration du gène (**Figure 2**). L'enzyme BamHI libère un fragment de 4 kpb alors que EcoRI reconnaît un site unique dans la séquence intégrée.

La présence de l'ARN correspondant au gène CPLMV a été testée sur 4 clones de la variété Spunta par RT-PCR. L'ARN total, traité par *DNase-RNase-free* a été utilisé pour synthétiser un cDNA correspondant à une partie centrale du gène. Dans un deuxième temps, la transcription du gène en ARNm a été confirmée par Northern blot sur l'ARN total (**Figure 3**). Le niveau de transcription est identique chez tous les clones testés.

Le niveau de résistance des plantes CPLMV+ a été testé sous serre. Après micropropagation, 15 boutures enracinées de chaque clone CP+ et des plantes témoins ont été transférées en pots sous serre. Une première inoculation mécanique de ces plantes est réalisée 40 jours après acclimatation suivie d'une deuxième 10 jours plus tard. Les tests sérologiques réalisés tous les 10 jours ont permis de montrer que les plantes CP+ sont résistantes au PVY. Aucune accumulation de virus n'est observée (**Figure 4**), alors que les plantes témoins non transformées ont développé des symptômes d'infection. Ces plantes CP+ ont produit des minitubercules qui ont été utilisés comme semence pour la production de plantes de deuxième génération. Ces plantes, inoculées à leur tour par le PVY comme dans le premier cas. Après 40 jours de l'inoculation, aucun symptôme n'est apparu sur ces plantes alors que les témoins non transformés ont été complètement nécrosés.

**Figure 2. Accumulation du PVY dans les plantes témoins et transgéniques de pomme de terre variété Spunta T : témoin, 7C, 7D, 12A, 12C, 12D, 12E : plantes transgéniques -> : bruit de fond DO à 405nm = 0, 14.**



### Production d'anticorps monoclonaux contre différentes protéines fonctionnelles du PVY

Une fraction semi-purifiée d'inclusions nucléaires a été préparée à partir de feuilles de tabac infectées par le PVY. Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant, nous avons pu détecter quatre protéines : celles formant les inclusions nucléaires (NIa et NIb), la protéine CI et la protéine capsidale. Le mélange a été utilisé comme antigène pour la production d'anticorps monoclonaux.

Quatre parmi les 100 hybridomes positifs ont été caractérisés. Les anticorps monoclonaux correspondants représentent 3 groupes différents reconnaissant trois protéines du PVY.

L'anticorps 22-1 est dirigé contre la protéine NIa et plus particulièrement la partie Vpg donc N-terminale de cette protéine. En effet, il reconnaît spécifiquement la protéine NIa dont le gène a été cloné dans *E. coli*.

L'anticorps 136-13 est dirigé contre la protéine capsidale du PVY. En effet, il donne le même profil d'hybridation qu'un anticorps dirigé contre cette protéine pure.

Les anticorps 15-1 et 18-5 semblent reconnaître des épitopes chevauchant sur la protéine CI. Ils donnent un profil d'hybridation similaire à celui obtenu avec un anticorps monoclonal dirigé contre cette même protéine.

Ces différents anticorps monoclonaux ont été utilisés pour le dépistage des protéines virales sur épiderme de feuilles de tabac infectées. Les résultats montrent que ces anticorps reconnaissent les protéines virales *in situ* et que le profil d'hybridation varie avec la nature de la protéine cible.

## Bibliographie

---

1. AITCHITT M., AINSWORTH C.C., THANGAVELU M., (1993) *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11, 318-319.
2. BEACHY R., LOESCH-FRIES S., TUMER N.E. (1990) *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28, 451-474.
3. CHANG C.A., HIEBERT E., PURCIFULL D.E. (1988) *Phytopathology*, 78, 1266-1275.
4. MURASHIGE T., SKOOG F. (1962) *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
5. ROBAGLIA C., DURAND-TARDIF M., TRONCHET M., BOUDAZIN G., ASTIER-MANIFACIER S., CASSE-DELBART F. (1989) *J. Gen. Virol.*, 70, 935-947.
6. VAN DER VLUGT R.A.A., RUITER R.K., GOLDBACH R. (1992) *Plant Mol. Biol.*, 20, 631-639.



## **B6 : Estimation des risques associés aux cultures transgéniques : outils et contraintes**

**PEssel F.<sup>1</sup>, Lecomte J.<sup>2</sup>, Lavigne C.<sup>3</sup>, Laredo C.<sup>4</sup>, Messean A.<sup>5</sup>,  
GUYON P.H.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire Évolution et Systématique, CNRS-URA 2154, Bât. 362, Université Paris XI-Orsay, 91405 ORSAY CEDEX. Tel 01 69 15 61 15, Fax 01 69 15 73 53, Email Fabrice.Pessel@esv.u-psud.fr

<sup>2</sup> Laboratoire Évolution et Systématique, Université de Paris-Sud (CNRS-URA 2154) Bâtiment 362, F-91405 ORSAY CEDEX

<sup>3</sup> Laboratoire de Phytopathologie Moléculaire, Institut de Biotechnologie des Plantes Université de Paris-Sud, Bâtiment 630, F-91405 ORSAY CEDEX

<sup>4</sup> Laboratoire de Biométrie - INRA, Centre de Recherche de Jouy-en-Josas, Domaine du Vilvert, 78350 JOUY-EN-JOSAS

<sup>5</sup> Centre Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains, 174 Avenue Victor Hugo 75116 PARIS

### **INTRODUCTION**

L'opinion publique largement sensibilisée par les événements de ces dernières années (sang contaminé, hormones de croissance, vache folle) exprime son inquiétude, voire son refus, des manipulations génétiques, angoisses généralement reprises et amplifiées par les médias. C'est dans ce contexte que la communauté scientifique, sous l'impulsion des pouvoirs publics et du secteur privé, tente aujourd'hui d'identifier et de quantifier les risques associés à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans notre environnement. Lorsque l'on parle de disséminations d'OGM, c'est principalement de plantes cultivées transgéniques dont il est question. Alors que dans certains pays comme les États-Unis, le Canada ou la Chine, les cultures transgéniques sont déjà largement répandues, l'introduction de ces nouvelles cultures en Europe fait encore l'objet de débats entre pouvoirs publics, industriels et consommateurs. En effet, si la transgénèse végétale apparaît comme une véritable révolution technologique et un outil puissant pour les sélectionneurs, de nombreuses interrogations subsistent quant à ses répercussions éventuelles sur l'environnement. Pour tenter de déterminer l'impact écologique de l'introduction massive de ces plantes transgéniques, les pouvoirs publics et les industriels se sont tournés vers la communauté scientifique, lui conférant ainsi un rôle d'arbitre dans un débat qui dépasse de loin les seules questions scientifiques. Nous présentons ici au travers de quelques résultats scientifiques une réflexion sur les outils dont disposent les scientifiques pour tenter d'estimer ces risques écologiques en insistant sur les contraintes afférentes à ces différentes approches.

### **LA NOTION DE RISQUE**

L'estimation du risque passe à la fois par l'évaluation de la probabilité qu'un événement se produise et par la quantification des conséquences de ce dernier. Le risque se représente classiquement par le produit de deux composantes : la fréquence

d'un événement identifié comme potentiellement dangereux et les dommages occasionnés par cet événement (MacKenzie & Henry, 1990). Un exemple classique pour illustrer cette notion est celui de l'implantation d'une centrale nucléaire (encadré 1). Dans ce cas, l'estimation du risque doit tenir compte de la probabilité d'explosion de la centrale (fréquence de l'événement), de la présence de populations à proximité de celle-ci et des effets des radiations sur ces populations (dommage). Cet exemple illustre très bien l'une des difficultés rencontrées lorsqu'il s'agit de quantifier un risque puisqu'il s'agit généralement du produit d'une faible *fréquence* par un fort *dommage*. Notons également que le risque zéro n'existant pas, la prise de risque résultera d'un compromis entre les bénéfices attendus et les conséquences (négatives) envisagées. De ce fait, pour une même fréquence de l'événement (ici l'explosion de la centrale), le risque sera acceptable ou inacceptable suivant la sensibilité et les intérêts de chacun des intéressés.

En adoptant la même représentation que précédemment, le risque écologique associé à l'introduction de cultures transgéniques dans notre environnement peut se représenter par le produit de trois composantes (encadré 1) :

- la probabilité qu'un transgène présent dans une variété cultivée se retrouve dans un environnement autre que la culture (repousses hors champs et/ou hybridations avec des espèces sauvages apparentées) ;
- le devenir de ce transgène au sein de ce nouvel environnement lorsqu'il est soumis aux forces évolutives (génétique et hérédité du caractère transgénique) ;
- les conséquences écologiques de l'expression de ce transgène dans son nouvel environnement (impacts sur la stabilité des écosystèmes et sur la biodiversité).

**Encadré 1 :**

$$\text{risque} = \frac{\text{probabilité de transfert du transgène}}{\text{fréquence}} \times \frac{\text{devenir du transgène dans un environnement sauvage}}{\text{exposition}} \times \frac{\text{effets(s) pour l'agriculteur, l'écologiste, l'industriel...}}{\text{dommage}} \times \frac{\text{effets(s) pour l'agriculteur, l'écologiste, l'industriel...}}{\text{danger}}$$

Actuellement, si de nombreux travaux permettent de quantifier plus ou moins précisément les deux premières composantes de ce risque, peu de recherches portent aujourd'hui sur l'impact écologique, sans doute parce que leur mise en place est plus complexe. Pourtant les interrogations sont grandes, en particulier lorsqu'il s'agit de conservation des ressources génétiques. En effet, nous savons que les espèces sauvages apparentées aux plantes cultivées sont depuis toujours utilisées comme réservoirs naturels de résistances aux nouveaux ravageurs ou pathogènes des cultures. Une des questions est donc de déterminer comment cette diversité génétique, base de l'adaptation de ces plantes aux changements environnementaux, est susceptible d'être modifiée par l'introduction de caractères génétiques nouveaux, caractères souvent corrélés à des modifications de la valeur sélective des individus. Toutefois, pour quelques cas particuliers, cet impact a été discuté. Il fût proposé, par exemple, d'introduire un gène d'apomixie<sup>1</sup> chez le mil ou le maïs afin d'aider les agriculteurs

<sup>1</sup> Aptitude de certaines plantes à produire des graines sans intervention de la reproduction sexuée (pollen).

traditionnels d'Afrique et d'Amérique Centrale à sélectionner eux-mêmes les génotypes les plus productifs en semant uniquement les graines issues des plantes présentant les plus forts rendements. Cette transformation aurait eu cependant des conséquences importantes à long terme sur la diversité génétique des populations sauvages de mil et de téosinte. En effet, les plantes apomictiques gardant la capacité de produire du pollen, le gène d'apomixie se serait propagé massivement dans les populations sauvages, entraînant de ce fait une homogénéisation génétique de ces populations. Ce raisonnement évolutif a d'ailleurs été confirmé par des résultats de modélisation (Lavigne, 1994). Dans le cas de l'introduction d'une stérilité mâle nucléaire, les conclusions vont dans le sens contraire. En effet, ce type de modification génétique s'accompagnant d'une forte diminution de la fitness des individus exprimant ce caractère, le transgène ne pourrait se propager.

L'estimation du risque passe donc par une étape d'identification des événements à considérer et des conséquences à envisager. Il s'agit ensuite de dresser une liste aussi exhaustive que possible des paramètres susceptibles d'interférer sur les processus identifiés (tableau 1) en hiérarchisant *a priori* leur importance au regard des connaissances déjà acquises dans des domaines comme la génétique, l'évolution, la biologie des populations, l'amélioration des plantes, la malherbologie...

**Tableau 1. Paramètres intervenant dans l'estimation des risques liés à la culture de plantes transgéniques (d'après Arnould *et al.*, 1993).**

			Composantes du risque		
			Transfert	Devenir	Impact
Biologie des espèces cultivées et sauvages	Régime de reproduction	autogame	√	√	
		homogame	√	√	
	Possibilités de croisements entre espèces cultivées et sauvages	barrières à l'hybridation	√		
		décalage de floraison	√		
		distance entre plantes et populations	√	√	
	Comportement des types sauvage, hybride ou cultivé	distance et mode de dissémination du pollen et des graines	√	√	
		aptitude compétitrice		√	√
	Introduction et expression du (ou des) gène(s)	Paramètres génétiques	survie dans les différents milieux ("coût de la domestication")		√
hérédité				√	
stabilité dans le nouveau génome				√	√
Expression du nouveau caractère		liaison génétique avec d'autres gènes		√	√
		recessif ou dominant		√	
Paramètres de l'environnement	Pression de sélection sur le caractère	conséquence sur la valeur sélective		√	√
		structuration temporelle		√	
	Techniques culturales	structuration spatiale		√	
		pourcentage de récolte des différents types sauvage, hybride ou cultivé		√	
		rotation des cultures		√	
		travail du sol		√	

## LES OUTILS

On peut considérer qu'il existe trois approches pour tenter de quantifier et de prédire les risques associés à l'introduction de plantes transgéniques en culture. La première est basée sur l'observation de situations existantes, la seconde sur l'expérimentation et la troisième sur l'extrapolation des observations et des expérimentations à des situations hypothétiques au moyen de modèles mathématiques ou informatiques.

### L'observation

La transgenèse végétale en sélection a pour objectif de créer, non pas des nouvelles espèces, mais bien des nouvelles variétés exprimant des caractères venant s'ajouter à ceux de la plante domestiquée. Par conséquent, pour tout un ensemble de caractères transgéniques neutres (c'est-à-dire ne conférant ni avantage, ni désavantage sélectif à la plante), certaines situations "naturelles" existantes peuvent être considérées comme relativement proches de ce qui pourrait se passer si des plantes transgéniques venaient à être introduites en culture. De plus, dans la littérature, existent de nombreux travaux relatifs aux échanges génétiques entre variétés cultivées et leurs apparentées sauvages existent et peuvent être extrapolés au cas des plantes transgéniques comme par exemple les travaux de Robert *et al.* (1991) sur le mil ou de Langevin, Clay & Grace (1990) sur le riz (Oard *et al.*, 1996).

Pour ce qui est de l'observation de situations existantes, on peut citer par exemple les travaux effectués sur le colza (*Brassica napus*) par une équipe anglaise. Après avoir montré que le comportement écologique d'un colza transgénique (résistant au glyphosate) était identique à celui d'un colza classique en conditions naturelles (Crawley *et al.*, 1993), les auteurs se sont intéressés à la dispersion et à la dynamique de populations de colza non-transgénique le long de l'autoroute M25 menant à une usine de trituration (Crawley & Brown, 1995). Ils ont ainsi mis en évidence, à une large échelle (190 km autour de Londres), une corrélation entre le sens de circulation des camions de transport de semence et la présence de populations spontanées de colza sur le bord des routes. De plus, par un suivi sur plusieurs années, ils ont montré qu'en absence de perturbations, ces populations avaient tendance à s'éteindre. Des données récentes viennent compléter les données écologiques sur ces populations de colza, montrant que les potentialités de dormances des graines de colza issues de variétés transgéniques sont légèrement inférieures à celle d'un colza non-transgénique et très inférieures à celles d'une apparentée sauvage (Hails *et al.*, 1997). On voit, à travers cet exemple, que l'aller-retour entre l'observation de terrain et l'expérimentation fournit des informations très intéressantes même si les résultats obtenus dépendent fortement des conditions écologiques considérées (Hails *et al.*, 1997).

Dans le même esprit, une équipe américano-écossaise (Luby & Mc Nicol, 1995), profitant de la situation particulière que représente la culture de framboise (*Rubus idaeus*) dans le centre de l'Écosse, a étudié les flux de gènes entre populations cultivées et sauvages à l'échelle de la région d'exploitation (superficie de plus de 2 000 ha). Se basant sur deux caractères phénotypiques facilement identifiables et spécifiques des variétés cultivées (gros fruits, allèle L1 et fermeté de la tige, allèle s), ces chercheurs ont ainsi mis en évidence des flux de gènes entre populations cultivées et sauvages. Toutefois, malgré deux décennies de cultures de variétés à tiges fermes, l'allèle s ne se retrouve qu'à de très faibles fréquences (0,4 % en moyenne) dans les populations spontanées de *Rubus*. En conclusion, les auteurs soulignent combien une telle situation d'étude est exceptionnelle. Ils précisent également que leurs observations ne peuvent pas être extrapolées à des caractères transgéniques augmentant, même très faiblement, la valeur sélective des individus dans un

environnement non-anthropisé, comme ce que l'on attend *a priori* dans le cas de résistances à des ravageurs ou à des pathogènes.

En résumé, ces approches sont particulièrement intéressantes dans la mesure où elles peuvent être réalisées à des échelles voisines de situations réellement envisageables contrairement à l'expérimentation sur matériel transgénique (voir ci-après). D'ailleurs, Gliddon (1994) avait déjà souligné l'intérêt de ces approches en rappelant qu'elles étaient, de plus, bien moins coûteuses que les études sur plantes modifiées par transgénèse. Toutefois, de telles observations doivent s'accompagner d'expérimentations contrôlées comme l'illustrent très bien les travaux sur le colza (Crawley & Brown, 1995 ; Crawley *et al.*, 1993 ; Hails *et al.*, 1997) et ne peuvent être extrapolées qu'au domaine d'observation comme le soulignent Timmons *et al.* (1996, 1995) en conclusion de leurs études.

## L'expérimentation

Les approches expérimentales sur du matériel transgénique sont donc souvent nécessaires, en particulier lorsqu'il s'agit d'identifier l'effet du transgène sur le comportement propre de la plante (coût d'expression du transgène : sur le colza (Crawley *et al.*, 1993 ; Hails *et al.*, 1997), ou sur son environnement direct (ravageurs, pathogènes, pollinisateurs (Picart-Nizou *et al.*, 1995). Mais on constate également que le matériel transgénique s'impose comme un très bon support pour étudier les flux de gènes, qu'ils soient intra-spécifiques (distances de dispersion) ou inter-spécifiques (croisements cultivées-sauvages). En effet, le transgène codant généralement pour une tolérance, voire une résistance, à une pression de sélection (herbicides, antibiotiques, insectes...), il est souvent facile de mettre en évidence ce caractère en appliquant simplement le traitement sélectif sur la descendance des plantes soumises aux flux de pollen transgénique (Baranger *et al.*, 1995 ; Darmency, 1996 ; Mikkelsen, 1996 ; Paul, 1995 ; Scheffler, 1993 ; Scheffler, 1995). De plus, la nature exacte du transgène introduit étant connue, il est plus facile de confirmer au niveau moléculaire la présence du caractère dans la descendance au moyen de techniques moléculaires de type PCR-RAPD (Baranger *et al.*, 1995 ; Chevre *et al.*, 1996 ; Skogsmyr, 1994) ou « Southern Blots » (Frello *et al.*, 1995).

Toutefois, ces expérimentations soumises en Europe à la législation sur la dissémination volontaire des organismes génétiquement modifiés (directive 90/220 CEE), ne peuvent être réalisées que sur des parcelles réduites et sur une durée limitée généralement à une génération de plantes transgéniques. De ce fait, comme il s'agit souvent de quantifier des événements se produisant à faible fréquence (hybridations interspécifiques) ou à longue distance (migration pollinique), les résultats de ces expérimentations doivent être interprétés avec précaution, en particulier lorsqu'il s'agit de les extrapoler à une situation commerciale. Les travaux réalisés par Scheffler *et al.* sur la dispersion du pollen de colza transgénique résistant au Basta illustrent très bien les limites de ce type d'approche. Alors qu'en 1990, ils n'observaient que 0,00034 % de colza résistants à 47 mètres de la source de transgène (Scheffler *et al.*, 1993), en 1992, ces mêmes auteurs en recensaient 10 fois plus dans des blocs situés cette fois-ci à 400 mètres (Scheffler *et al.*, 1995). Les travaux réalisés dans le cadre du projet européen BRIDGE sur la dispersion du pollen de colza fournissent des résultats similaires. Pour un même dispositif expérimental, alors qu'en 1989 des résistants avaient été trouvés en fréquence non négligeable à 50 mètres de la source de transgène, leur fréquence était quasi-nulle à 24 mètres en 1990 (BRIDGE, 1994). Cette même équipe de l'INRA de Rennes a également pu observer en 1993, de façon tout à fait fortuite, des colza résistants (10 à 12 % sur mâle-stériles) à plus de

800 mètres de toute plante transgénique. On sait d'ailleurs aujourd'hui que le pollen de colza se disperse sur des distances de plusieurs kilomètres (Timmons *et al.*, 1996).

On voit donc au travers de ces quelques exemples que les expérimentations sur matériel transgénique fournissent des résultats qui dépendent non seulement des conditions du milieu (BRIDGE, 1994) mais aussi et surtout du dispositif expérimental (Scheffler *et al.*, 1995 ; 1993). Lorsque l'on examine en détail ces expérimentations, on retrouve systématiquement des hybrides intra-spécifiques en bordure de parcelle (BRIDGE, 1994; Lavigne, 1998), ce qui suppose que d'autres peuvent apparaître à des distances plus élevées. Ce problème d'échelle entre expérimentations et situations réellement envisageables est une contrainte forte qui pèse sur l'estimation des risques. D'ailleurs, les protocoles expérimentaux tendent de plus en plus à considérer cette dimension spatiale : on peut citer par exemple le projet pluriannuel inter-instituts<sup>1</sup> « Impact du développement des plantes transgéniques dans les systèmes de culture » mis en place en 1995 sur trois sites en France.

Quoiqu'il en soit, les expérimentations sont absolument nécessaires puisqu'elles fournissent une estimation des paramètres biologiques identifiés comme pertinents dans l'étude des risques. On peut par exemple, définir des lois de dispersion individuelle du pollen (Lavigne *et al.*, 1996) à partir de données expérimentales sur le colza (Lavigne, 1998) qui pourront par la suite être introduites dans des modèles mathématiques ou des simulations informatiques.

### La modélisation

Pour l'ensemble des raisons que nous avons évoquées précédemment, les observations de situations existantes ainsi que les expérimentations sur matériel transgénique sont donc difficilement extrapolables, en l'état, à des situations commerciales d'introduction de plantes transgéniques. En résumé et pour simplifier, ces approches sont soumises à trois types de contraintes :

- des contraintes d'ordre temporel (nombre de générations en expérimentations)
- ;
- des contraintes d'ordre spatial (superficie réduite des expérimentations) ;
- des contraintes d'ordre « évolutif » (extrapolation des observations uniquement pour des caractères neutres ou légèrement contre-sélectionnés).

Pour estimer les risques, il faut donc disposer d'outils théoriques permettant à la fois de synthétiser les résultats d'expérimentation et les observations de terrain et de les extrapoler à des échelles spatiales et temporelles plus proches de situations réellement envisageables, sans omettre de considérer les forces évolutives (migration, sélection, dérive et mutation) auxquelles va être soumis le transgène dans son nouvel environnement. La modélisation mathématique et les simulations informatiques sont donc apparues comme des outils puissants dans l'étude des risques puisqu'elles permettent de prendre en compte ces deux dimensions. Si la littérature est riche en résultats d'expérimentations et d'observations, on ne trouve que peu de publications de modèles théoriques (Andow, 1994 ; Kareiva, 1994) ou de simulations (Van Raamsdonk & Schouten, 1997) directement reliées à la problématique. Pourtant, comme le souligne Andow (1994), les modèles mathématiques fournissent un cadre de recherche intéressant, non seulement pour les raisons exposées précédemment, mais aussi parce qu'ils évitent le « flou » généralement entretenu par le discours verbal. Ces modèles permettent également de hiérarchiser l'influence des différents paramètres considérés, réorientant le cas échéant les expérimentations. Par exemple, Reboud

<sup>1</sup> AGPM, CETIOM, INRA, ITB, ITCF.

(1992) et Lavigne (1994) ont observé dans leurs simulations que le coût de la résistance à un herbicide était le paramètre déterminant, à long terme, la fréquence du transgène dans une population soumise à des flux de pollen cultivé. Nous retrouvons également que dans un modèle spatialisé, ce paramètre détermine très fortement la distance maximale de dispersion d'un transgène depuis un champ source (non publié).

Bien que l'approche par modélisation des risques écologiques associés à l'introduction de plantes transgéniques soit relativement récente, la structure des modèles a évolué rapidement. On constate aujourd'hui que la structuration spatiale des populations sources et réceptrices de transgène ainsi que leur évolution dans le temps (prise en compte de la rotation des cultures, des extinctions de populations sauvages...) apparaissent comme des paramètres importants. De même, les effectifs des populations sauvages réceptrices de transgènes, ainsi que leurs caractéristiques biologiques, s'imposent comme des paramètres incontournables pouvant éventuellement modifier les échanges génétiques entre compartiments cultivé et sauvage (Ellstrand, Devlin & Marshall, 1989). En effet, si aujourd'hui l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde à dire qu'avec les constructions génétiques actuelles il n'est pas envisageable de confiner un transgène uniquement au niveau de la parcelle cultivée, il devient absolument nécessaire de déterminer :

1. la dynamique de dispersion du transgène (vitesse et distance de diffusion dans les populations sauvages) ;
2. l'impact de son expression sur les populations sauvages (modification des équilibres écologiques, de la diversité génétique au sein de ces populations).

Ceci sous-entend de considérer davantage dans les modèles ce qui différencie les populations sauvages des populations cultivées, en particulier en terme de composantes de fitness : aptitudes compétitives (Andow, 1994), potentialité invasives, dormance des graines (Adler *et al.*, 1993 ; Hails *et al.*, 1997 ; Linder & Schmitt, 1994), etc. En particulier, il faut s'attacher à prendre en compte comment, en absence ou en présence de pressions de sélection sur le caractère transgénique, ces paramètres vont modifier les effectifs (Van Raamsdonk & Schouten, 1997) et le maintien de ces populations.

Toutefois, il faut bien garder à l'esprit que les modèles ne sont que des simplifications de la réalité biologique. Même si de plus en plus ces derniers intègrent de nouveaux paramètres et se complexifient (approche métapopulationnelle, modèles combinant génétique des populations et démographie), il reposent sur des hypothèses, souvent fortes, qu'il ne faut pas mettre de côté. Notons également que l'exploration de ces modèles nécessite de fixer un certain nombre de paramètres à des valeurs biologiques (paramétrisation) et que de plus ces modèles doivent être validés par des expérimentations. Par conséquent, on constate que certaines contraintes portant sur les expérimentations et les études de terrains se répercutent indirectement sur les modèles.

## CONCLUSION

L'estimation scientifique des risques écologiques associés à la culture des plantes transgéniques peut donc se faire suivant trois approches : l'observation, l'expérimentation et la modélisation. Nous avons montré que ces trois types d'approches sont intimement liés et complémentaires puisque réalisés à des échelles de temps et d'espace différents (de la plante transgénique à des situations commerciales de culture). Nous avons également souligné, indirectement au travers de quelques exemples, que des études au cas par cas sont incontournables, chaque complexe plante cultivée-plantes sauvages apparentées présentant ses propres caractéristiques qu'elles

soient culturelles ou biologiques. Pour l'ensemble de ces raisons, l'évaluation scientifique du risque s'avère complexe et demande des investissements importants aussi bien en personnes qu'en temps. Ce dernier point est d'ailleurs souvent incompatible avec les délais fournis par les instances décisionnaires soumises également à des contraintes dépassant largement cette fois le simple cadre scientifique. Aux difficultés techniques (observation impossible de situations réelles) s'ajoutent des problèmes socio-économiques, voire politiques, que les scientifiques ne sont ni habitués à rencontrer, ni habilités à résoudre. Les affaires concernant le sang contaminé, la vache folle ou les hormones de croissance pour ne citer que les plus voyantes, remettent aujourd'hui en cause la confiance que pouvait accorder notre société au système de décision (BEPCA, 1997). Pendant un temps, la logique de la compétition industrielle a conditionné cette prise de décision mais aujourd'hui les mouvements citoyens sont à même de créer un contrepoids à la pression industrielle lorsqu'il est question de défendre l'individu et son environnement. Il n'est donc pas étonnant de constater que dès qu'il s'est agi d'introduire des OGM dans l'environnement, l'opinion publique ait été facilement mobilisable. Dans ces interactions complexes entre industriels, citoyens et pouvoirs politiques, les scientifiques sont souvent consultés mais presque toujours pour appuyer une décision donnée *a priori*. Or ces derniers, en tant qu'ensemble d'individus, n'ont pas d'opinion tranchée à avoir sur ces questions. Ils peuvent se mettre d'accord sur des données (distances de dispersion, probabilités d'hybridation...) mais les avis restent individuels et les décisions ne peuvent être prises que par des instances politiques issues du système démocratique. Dans ce contexte, l'information des citoyens est une nécessité et nous espérons que cet article contribuera à montrer au lecteur toute la complexité du dossier.

## Bibliographie

1. ADLER L.S., WIKLER K., WYNDHAM F.S., LINDER C.R., SCHMITT J. (1993). Potential for persistence of genes escaped from canola : germination cues in crop, wild, and crop-wild hybrid *Brassica napus*. *Functional Ecology* 7, 736-745.
2. ANDOW D. A. (1994). Community response to transgenic plant release . using mathematical theory to predict effects of transgenic plants. *Molecular Ecology* 3, 65-70.
3. ARNOULD J., GOUYON P.H., LAVIGNE C., REBOUD X. (1993). OGM: Une théorie pour les risques. *Biofutur* Juin, 45-50.
4. BARANGER A., CHEVRE A.M., EBER F., RENARD M. (1995). Effect of oilseed rape genotype on spontaneous hybridization rate with a weedy species : an assessment of transgene dispersal. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 956-963.
5. Biotechnology and the European Public Concerted Action group (1997). Europe ambivalent on biotechnology. *Nature* 387, 845-847.
6. BRIDGE (1994) Safety assessment of the deliberate release of two model transgenic crop plants, oilseed rape and sugar beet. Final report.
7. CHEVRE A. M., EBER F., BARANGER A., KERLAN M.C., BARRET P., FESTOC G., VALLEE P. & RENARD M. (1996). Ninth Crucifer Genetics Workshop. In *International Symposium on Brassicas*, vol. 407 (ed. C. I. Dias J.S., Monteiro A.A.), pp. 169-179. Acta Horticultura.
8. CRAWLEY M.J., BROWN, S.L. (1995). Seed limitation and the dynamics of feral oilseed rape on the M25 motorway. *Proceedings of The Royal Society* 259, 49-54.
9. CRAWLEY M.J., HAILS, R.S., REES M., KOHN D., BUXTON J. (1993). Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363, 620-623.
10. DARMENCY H., FLEURY A., LEFOL E. (1996). Effect of transgenic release on weed biodiversity oilseed rape and wild radish. In *Brighton Crop Protection Conference-Weeds*, Brighton.

11. ELLSTRAND N.C., DEVLIN B., MARSHALL D.L. (1989). Gene flow by pollen into small populations: data from experimental and natural stands of wild radish. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86, 9044-9047.
12. FRELLO S., HANSEN K.R., JENSEN J., JORGENSEN R.B. (1995). Inheritance of rapeseed (*Brassica napus*)-specific RAPD markers and a transgene in the cross *B. juncea* x (*B. juncea* x *B. napus*). *Theoretical and Applied Genetics* 91, 236-241.
13. GLIDDON C. (1994). The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species : biological models and Theoretical perspectives. *Molecular Ecology* 3, 41-44.
14. HAILS R.S., REES M., KOHN D.D., CRAWLEY M.J. (1997). Burial and seed survival in *Brassica napus* subsp. *oleifera* and *Sinapis arvensis* including a comparison of transgenic and non-transgenic lines of the crop. *Proceedings of The Royal Society* 264, 1-7.
15. KAREIVA P., MORRIS W., JACOBI C.M. (1994). Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3, 15-21.
16. LANGEVIN S.A., CLAY K., GRACE J.B. (1990). The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* 44, 1000-1008.
17. LAVIGNE C., GODELLE B., REBOUD X., GOUYON, P.H. (1996). A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 1319-1326.
18. LAVIGNE C., KLEIN E.K., VALLÉE P., PIERRE J., GODELLE B., RENARD M. (1998). A pollen dispersal experiment with transgenic oilseed rape : estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field.
19. LAVIGNE C. (1994). Les risques associés à la culture de plantes transgéniques résistantes aux herbicides, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
20. LINDER C.R., SCHMITT J. (1994). Assessing the risks of transgene escape through time and crop-wild hybrid persistence. *Molecular Ecology* 3, 23-30.
21. LUBY J.F., MC NICOL R.J. (1995). Gene flow from cultivated to wild raspberries in Scotland : developing a basis for risk assessment for testing deployment of transgenic cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 90, 1133-1137.
22. MAC KENZIE D.R., HENRY S.C. (1990). Toward a consensus. In *Kiawah Island Conference . Biological monitoring of genetically engineered plants and microbes* (ed. D. R. MacKenzie and S. C. Henry), pp. 273-283. Agriculture Research Institute, Beteshda, Maryland, USA.
23. MIKKELSEN R.T., ANDERSEN B., JORGENSEN R.B. (1996). The risk of crop transgene spread *Nature* 380, 31.
24. OARD J.H., LINScombe S.D., BRAVERMAN M.P., JODARI F., BLOUIN D C., LEECH M., KOHLI A., VAIN P., COOLEY J.C., CHRISTOU P. (1996). Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. *Molecular Breeding* 2, 359-368.
25. PAUL E.M., THOMPSON C., DUNWELL J.M. (1995). Gene dispersal from genetically modified oil seed rape in the field. *Euphytica* 81, 283-289.
26. PICART-NIZOU A.L., PHAM-DELÈGUE M.H., KERGUELEN V., DOUALT P., MARILLEAU R., OLSEN L., GRISON R., TOPPAN A., MASSON C. (1995). Foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) on transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *Transgenic Research* 4, 270-276.
27. REBOUD X. (1992). Les risques associés aux manipulations génétiques : le cas de la résistance aux herbicides, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
28. ROBERT T., LESPINASSE R., PERNÈS J., SARR A. (1991). Gametophytic competition as influencing gene flow between wild and cultivated forms of pearl millet (*Pennisetum typhoides*). *Genome* 34, 195-200.
29. SCHEFFLER J.A., PARKINSON R., DALE P.J. (1993). Frequency and distance dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research* 2, 356-364
30. SCHEFFLER J. A., PARKINSON R., DALE P.J. (1995). Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plots of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breeding - Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung* 114, 317-321.
31. SKOGSMYR I. (1994). Gene dispersal from transgenic potatoes to conspecifics : a field trial. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 770-774.
32. TIMMONS A.M., CHARTERS Y.M., CRAWFORD J.W., BURN D., SCOTT S.E., DUBBELS S.J., WILSON N.J., ROBERTSON A., O'BRIEN E.T., SQUIRE G.R., WILKINSON M.J. (1996). Risks from transgenic crops. *Nature* 380, 487.

33. TIMMONS A.M., O'BRIEN E.T., CHARTERS Y.M., DUBBELS S.J., WILKINSON M.J. (1995). Assessing the risks of wind pollination from fields genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Euphytica* 85, 417-423.
34. VAN RAAMSDONK L.W.D., SCHOUTEN H.J. (1997). Gene flow and establishment of transgenes in natural plant populations. *Acta Botanica Neerlandica* 46, 69-84.

## **B7 : Les risques liés à la commercialisation des plantes transgéniques**

**LAINÉ E.<sup>1</sup>, HAICOUR R.<sup>2</sup>, MENIEUX JJ.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Université de Picardie J. Verne Labo Biotechnologies Végétales 33, rue St Leu  
80039 Amiens Cedex FRANCE

<sup>2</sup> Université Paris Sud Labo Morphogenèse Végétale Expérimentale Bât 360 91405  
Orsay Cedex FRANCE

<sup>3</sup> Université Paris Sud Labo Morphogenèse Végétale Expérimentale Bât 360 91405  
Orsay Cedex FRANCE

### **INTRODUCTION**

La transgénèse végétale réalisée par l'homme est une technique récente, on peut faire remonter ses débuts à 1983 environ avec les premières utilisations d'*Agrobacterium tumefaciens* et ses premiers produits commercialisés à 1994 (tomate « Calgene » à maturation retardée aux USA). Aux États-Unis la part des surfaces dévolues à la culture de plantes transgéniques devient significative : 6 % pour le maïs et 12 % pour le soja et représente des millions d'hectares (surtout colza, soja, coton et maïs).

À l'heure actuelle plusieurs milliers d'essais au champ de plantes transgéniques ont été autorisés. Plus des trois quarts sont effectués avec la douzaine de plantes suivante : colza, tabac, tomate, pomme de terre, maïs, tournesol, soja, coton, luzerne, betterave sucrière, courgette et melon. Les **gènes** introduits jusqu'à présent ne sont guère plus variés, la plupart codant pour des résistances aux pathogènes (surtout aux insectes) et des résistances à des herbicides. La maturation retardée ou modifiée est également au point pour plusieurs espèces de fruits (et bientôt pour les fleurs). La gamme des **promoteurs** utilisés est encore plus réduite puisque la plupart des réalisations emploient des promoteurs viraux constitutifs. Les plantes déjà commercialisées reflètent l'état de la technique du début des années 90.

Comme pour toute technique qui en est à ses balbutiements l'évaluation est nécessairement difficile, d'abord parce qu'étant encore peu répandue son impact est difficile à évaluer (certains problèmes ne se font jour que lors d'une diffusion de masse), ensuite parce qu'elle est encore très imparfaite et que de nombreux perfectionnements ne manqueront pas de voir le jour, sans doute aussi d'ailleurs certaines défaillances ou dérives

Des recherches pluridisciplinaires sont menées afin de fournir des données fiables aux experts et aux politiques qui ont à prendre les décisions d'autoriser production et consommation des produits issus de la transgénèse. Ainsi, l'agence américaine de l'agriculture (USDA) finance 10 projets d'évaluation des risques liés aux agro-biotechnologies.

### **RISQUES SANITAIRES**

#### **Toxicité**

Les gènes introduits sont inquiétants pour le public car ils ne viennent plus seulement d'autres végétaux comme pour la sélection classique mais de bactéries ou de virus qui ne font pas habituellement partie de notre alimentation. Certains composés, même végétaux, peuvent montrer des effets nocifs seulement après une consommation

répétée, par exemple il y débat actuellement sur les effets féminisants des « phytoœstrogènes » du soja. Une toxicité pourrait aussi résulter de la transgénèse dans le cas où la résistance à un herbicide serait accompagnée de la rémanence de produits de dégradation toxiques dans la partie consommée de la plante, le risque est alors celui d'un « empoisonnement à bas bruit durant des dizaines d'années » (Bargoin, 1997).

**Ces problèmes toxicologiques sont en fait les mêmes que ceux rencontrés lors de la mise sur le marché de nouvelles molécules pharmaceutiques ou phytosanitaires, dans ces domaines aussi il y eut des retraits du marché lorsque des effets nocifs à long terme sont apparus après des années de consommation, remarquons que personne n'a demandé alors l'interdiction globale des insecticides ou des médicaments...**

Pour le moment les autorisations de mise sur le marché se font pour des plantes qui expriment le gène dans tous les organes et en particulier dans ceux qui constituent la récolte. **Il est possible d'éviter la consommation du produit résultant de la transgénèse.** En utilisant des promoteurs spécifiques d'organes ou de stade de développement qui vont conduire à une expression localisée, dans ce cas la toxicité éventuelle restera limitée à des organes non consommés. En effet l'expression des gènes introduits n'est souvent pas nécessaire dans l'organe consommé, ainsi les résistances doivent parfois être exprimées au niveau des feuilles ou des racines alors que la partie consommable est constituée par la graine ou le fruit. **Il est aussi envisageable de choisir d'autres gènes :** il existe, pour lutter contre les insectes ravageurs ou pathogènes, d'autres stratégies que la substance insecticide, par exemple le transfert du génome d'un virus pathogène pour le parasite (ex : cotonnier résistant au ver de la capsule, réalisé par le CSIRO (ADIT, 1996)). On peut citer encore l'exacerbation des défenses naturelles du végétal (chitinasés, thionines, résistance systémique acquise) voire la synthèse par le végétal de « planticorps » (contre les nématodes). Les résistances aux virus de végétaux ne posent pas a priori de problèmes de toxicité.

## Allergies

Hormis les transformations ayant des stratégies antisens (ou cosuppression) la transgénèse entraîne au minimum la présence de protéines nouvelles dans une plante et donc celle d'allergènes potentiels. Les propriétés allergéniques des protéines ne sont toutefois pas toujours imprévisibles, on connaît par exemple des familles de protéines allergéniques très conservées dans le règne végétal (profilines du pollen, protéinases, lysozyme etc.) et on peut donc parfois prédire ce risque, à l'inverse celles dont les masses moléculaires ne sont pas comprises entre 10 et 70kDa sont rarement allergéniques (Monneret-Vautrin, 1997).

La démonstration (ou la bourde?) la plus célèbre à ce jour est la réalisation par une équipe de Pioneer Seeds d'un soja transgénique (non commercialisé) possédant un gène codant pour l'albumine 2S de la noix du Brésil, ceci était destiné à améliorer la richesse en acides aminés indispensables à l'homme. Il se trouve que les propriétés allergisantes (connues) de la noix du Brésil étaient dues à cette protéine et furent transférées aussi (Nordlee et al., 1996). La transformation des gluténines du blé est également à l'ordre du jour, or pour ce type de transformation, il ne sera jamais question d'expression en dehors du produit récolté !

**En soi, le risque d'allergie existe pour toute nouvelle plante consommée et on va retrouver les problèmes rencontrés lors de l'introduction de n'importe quel nouvel aliment.** Le problème en fait réside plutôt dans la possibilité pour le consommateur allergique d'être informé de la présence éventuelle de protéines

nouvelles par un étiquetage. On objectera que cela sera difficile, en effet il est plus facile d'éviter un aliment identifié particulier (fraise, œuf etc...) qu'une variété transgénique de soja ou de blé, surtout si de plus elle entre dans la composition de produits alimentaires dérivés. Cependant un tel étiquetage existe déjà : on peut lire sur de nombreux produits des mises en garde comme « peut contenir un produit issu d'arachide » (responsable fréquent d'allergies alimentaires)... Le corollaire d'une telle obligation est que les récoltes transgéniques et non-transgéniques doivent être identifiées, pour l'heure c'est plutôt le contraire qui est la règle, bien qu'il existe la possibilité technique de marquer simplement une récolte, avec des confetti par exemple (cela a déjà été effectué pour du colza, les confetti sont ôtés par soufflage avant la trituration). L'étiquetage sera peut être en fait bientôt réalisé plutôt sur les produits non transgéniques si ceux ci deviennent minoritaires, à la façon des produits « bio ».

Le problème soulevé par l'étiquetage réside dans sa véracité qu'il sera difficile de contrôler. En effet il faut que techniquement le contrôle soit réalisable afin que toute fraude puisse être détectée, ce qui n'est pas le cas. Il y a deux obstacles majeurs : la détection par PCR impose de connaître les séquences nucléotidiques introduites : il faut savoir quel gène on cherche !, une solution proposée est d'imposer la présence d'une petite séquence donnée dans tous les organismes transgéniques (Benoit-Browaeyts, 1997).

Il est à signaler que le transfert de gène pourra aussi servir à rendre non allergisantes certaines plantes qui l'étaient naturellement, ceci en empêchant l'expression de gènes codant pour les protéines impliquées dans ces allergies (par stratégie antisens, cosuppression ou action via des régulateurs de transcription). Du riz ne contenant pas la protéine à l'origine d'allergie chez 10 000 Japonais a été obtenu par fusion cellulaire, la réalisation de la même performance par transgénèse est envisageable.

### **Acquisition de résistances par des organismes pathogènes pour les humains**

Faut-il craindre que des organismes du sol ou de la flore commensale ou pathogène, intestinale ou stomacale, des hommes et des animaux puissent être en contact avec des transgènes conférant des résistances ? Ceci étant particulièrement important pour les gènes de résistance aux antibiotiques (parfois utilisés pour la sélection des plantes ayant reçu un transgène). La transmission horizontale de matériel génétique entre espèces non apparentées existe, particulièrement chez les bactéries, et son existence est un élément important du risque lié à la transgénèse. En dehors de ces cas l'insertion de gènes exogènes reste difficile à prouver... sauf exceptions très notables... comme ce qui est réalisé par *Agrobacterium*!. De plus on commence à réaliser que l'ADN transféré n'est pas toujours seulement celui que l'on croit : Van de Graff et al. (1996) ont ainsi montré qu'en plus de l'ADN-T, tout ou partie d'un plasmide d'*Agrobacterium* était parfois intégré dans le génome végétal (et donc éventuellement d'autres gènes de résistance que ceux souhaités). Le passage *via* le sol d'un transgène de résistance à l'hygromycine d'un végétal vers *Aspergillus niger* et son expression par celui ci a été décrit par Hoffmann et al. (1994), les auteurs avancent l'hypothèse que la dégradation de l'ADN est retardée par des molécules protectrices. Il a été également remarqué que les transferts de gènes entre bactéries sont favorisés en présence de vers de terre ! (Daane et al., 1996). Cependant souvent l'organisme d'origine de la résistance existe déjà dans le sol (par exemple résistance au glufosinate d'ammonium). **Rappelons à cette occasion que jusqu'à présent les gènes de résistance introduits ne sont pas synthétiques mais tirés d'organismes déjà présents dans la nature, l'opportunité**

**de leur transfert naturel vers d'autres organismes préexistait donc à la transgénèse !** Remarquons quand même qu'il s'agit souvent d'antibiotiques plus ou moins obsolètes en raison justement de la grande fréquence de souches de pathogènes déjà résistants. Cependant l'ampicilline ou la kanamycine entrent encore dans la composition de spécialités pharmaceutiques commercialisées.

**Une stratégie simple serait de n'utiliser que des gènes de résistance à un herbicide.**

Une source plus efficace de dissémination des gènes vers les bactéries est *Agrobacterium* lui-même. Une étude récente (Barrett et al. 1997) a démontré qu'une importante proportion de tiges transgéniques abritait encore des agrobactéries (portant encore leur plasmide binaire), en particulier dans le xylème. **Il apparaît donc souhaitable de s'assurer de l'axénie des plantes régénérées (PCR avec des amorces correspondant à des gènes d'agrobactéries et culture d'explants sur milieu favorable à la multiplication des bactéries pour indexation).**

En fait la transmission de gènes de résistance est déjà très répandue parmi les bactéries, cependant les plasmides qui les portent tendent à être perdus en l'absence de pression de sélection. **Ce qui conduit à la multiplication gênante de souches résistantes c'est donc plus l'usage intensif d'un antibiotique que l'apparition sporadique, nécessaire mais pas suffisante, d'individus résistants.** Un antibiotique utilisé dans l'alimentation des porcs (l'avoparcine ; analogue à la vancomycine utilisée pour les entérocolites humaines multirésistantes) vient d'ailleurs d'être interdit pour cette raison. Les souches multirésistantes qui posent des problèmes sanitaires resteront sans doute plus à même d'être trouvées dans les hôpitaux que dans le rumen d'une vache élevée au maïs transgénique...

Il est possible d'utiliser une résistance à un antibiotique mais de l'éliminer après usage en réalisant une double transformation à l'aide de deux plasmides ayant chacun un ADN-T, les double-transformations donneront des insertions à des sites différents avec ensuite une ségrégation dans la descendance permettant de recouvrer des plantes portant seulement le gène d'intérêt (Casse-Delbart, 1996).

## RISQUES ÉCOLOGIQUES

### Sélection de populations de pathogènes résistantes

La population parasite évolue d'autant plus vite que la pression de sélection qui s'applique est forte et ceci se produit lorsque la variété résistante devient très répandue. Ainsi des variétés d'avoine résistantes à la rouille mises sur le marché américain en 1943 furent ravagées dès 1949 par de nouvelles races de rouilles. Même plurigéniques les résistances seront vraisemblablement contournées si elles concernent des voies métaboliques proches : il existe déjà des insectes multirésistants aux différentes protéines de *Bacillus thuringiensis*. **La prochaine génération de plantes transgéniques sera plus sophistiquée avec entre autres stratégies possibles l'introduction conjointe de plusieurs résistances très différentes ou l'introduction de gènes codant pour des inhibiteurs de protéases afin de protéger le produit générateur de la résistance, ceci va rendre plus difficile la multiplication de ravageurs résistants.** À défaut, la rotation des cultures présentant des résistances variées ou la culture conjointe de plantes non résistantes prévient aussi la sélection du parasite. Une autre parade existe c'est la culture de parcelles non-transgéniques servant de « refuge » pour des insectes non virulents se croisant avec les résistants diminuant ainsi la proportion de résistants dans la génération suivante (Peferoen, 1997).

## Dissémination des plantes résistantes : de nouvelles adventices ?

La plupart des plantes devenues envahissantes après leur introduction hors de leur zone d'origine l'ont été parce qu'elles n'ont pas été accompagnées de leurs pathogènes ou prédateurs d'origine. L'introgression dans la flore sauvage des transgènes fait donc l'objet d'études nombreuses et contradictoires, pourtant elle semble inéluctable dès que d'importantes populations de plantes transgéniques seront cultivées dans des zones où existent des adventices interféconds. En effet lorsqu'on augmente le nombre de « tirages », même avec une probabilité faible, l'espérance mathématique tend vers un.

Une étude Néerlandaise (De Vries et al., 1992) réalisée sur 42 plantes cultivées concluait que la moitié de celles-ci étaient peu ou pas à même de se croiser avec des espèces sauvages apparentées, par contre pour un quart d'entre elles un flux de gènes important était probable. Ce dernier pourcentage peut être plus élevé sous les tropiques, zone d'origine de nombreuses espèces cultivées ou si l'on prend en compte les croisements provoqués. Ainsi, une étude plus récente (Hancock et al., 1996) mentionne que la quasi-totalité des espèces cultivées peut se croiser avec un cousin sauvage. Le colza par exemple peut polliniser des espèces sauvages apparentées et ceci dans un rayon important. Le passage de transgène de résistance au glufosinate a ainsi déjà été observé du colza vers *Brassica campestris* (Mikkelsen et al. 1996).

**La question qui se pose n'est donc plus vraiment « les gènes vont-ils s'échapper ? » mais plutôt quelles en seront les conséquences ?**

L'apparition d'une plante sauvage portant le transgène ne signifie pas qu'une population importante va en découler, une pression de sélection doit s'exercer pour cela.

*Les résistances aux herbicides* sont appelées à se multiplier si l'on considère qu'en plus de leur intérêt agronomique elles sont la principale alternative aux résistances aux antibiotiques. Si des adventices apparentées et fécondables existent, le risque va être important de voir apparaître des mauvaises herbes hybrides capables de résister aussi bien que la culture au traitement herbicide voulu sélectif. Si l'on veut bien admettre que ces plantes vont être envahissantes ce ne sera que par rapport à un traitement herbicide donné et non pas en conditions naturelles, leur avantage sélectif n'existant qu'en présence de l'herbicide. Il faudra donc envisager une rotation de cultures (résistantes à des produits différents). Sinon, ce qui risque fort de se produire, c'est que l'herbicide en question devienne inefficace donc invendable ainsi d'ailleurs que les variétés résistantes à cet herbicide : ce sera une catastrophe économique pour le producteur de l'herbicide et des variétés résistantes. **L'apparition d'une résistance des adventices à ces herbicides totaux, peu toxiques et facilement bio-dégradés, en conduisant à leur abandon présente donc indirectement un risque plus sanitaire qu'écologique !**

Contrairement aux résistances aux herbicides, dans ce cas de *résistances à des pathogènes ou à des stress abiotiques* la pression de sélection sera naturelle et non pas créée par l'homme et on peut craindre de donner ainsi la possibilité à certaines « mauvaises herbes » de se développer plus ou de sortir de leur niche écologique pour en coloniser une nouvelle.

## Plus ou moins d'herbicides?

Les sélectionneurs ont déjà mis sur le marché des variétés de maïs résistantes à des herbicides *obtenues par sélection classique* (Asgrow, 1997), chez le colza on rencontre aussi de telles résistances « spontanées » ; **les problèmes posés par ces plantes ne sont donc pas limités aux variétés transgéniques.** La quasi-totalité des

cultures reçoit actuellement des herbicides, soit totaux appliqués en pré-levée (avant la culture), soit sélectifs durant la culture (10 % seulement des cas). On retrouve certains de ces produits pourtant très suspectés d'effets nocifs (ex : atrazine très utilisée pour le maïs) dans la nappe phréatique. Bien sûr, les menaces d'interdiction limitent la création des variétés qui lui soient résistantes. **Il est plus sûr commercialement pour un obtenteur de réaliser des transformations avec des gènes codant pour des résistances à des herbicides peu toxiques et facilement dégradés, sur lesquels ne pèse aucun risque d'interdiction.**

On peut donc considérer que les herbicides « ex-totaux » destinés aux plantes transgéniques sont un moindre mal car ils sont parmi les plus facilement et rapidement biodégradables, par exemple par des bactéries du sol, celles précisément d'où provient le gène de résistance.

### **Et les pollinisateurs ?**

Un risque particulier et attaché aux résistances aux insectes c'est celui de la toxicité possible pour l'insecte pollinisateur, le plus souvent l'abeille. Des études menées à la station apicole de Bures-sur-Yvette (Pham-Delègue) ont montré un impact seulement à dose très élevée dans le cas d'une antiprotéase de riz mais il existe d'autres substances insecticides à tester. Il faut préciser que le promoteur CaMV 35S, très utilisé, n'est pas vraiment constitutif : ainsi parfois il ne s'exprime quasiment pas dans le pollen qui fournit une partie de la ration alimentaire des abeilles (Wilkinson et al., 1997).

### **De nouveaux virus végétaux ?**

Les résistances à différents virus phytopathogènes posent un autre problème : l'incorporation de séquences virales est une des stratégies qui a fait ses preuves. Des acquisitions de propriétés nouvelles de transmission ou de spectre d'hôte par des virus venant infecter de telles plantes transgéniques sont elles possibles ? On sait que des recombinaisons peuvent exister entre ARN de transgène et virus inoculé même si cela n'a pas été observé en champ (Wintermantel et Schoeltz, 1996). Un autre phénomène, déjà observé (Prufer et al., 1995) est la transencapsidation qui est la possibilité qu'un virus vienne « surinfecter » la plante et que son acide nucléique soit emballé dans la protéine de capsid « transgénique ».

### **Une menace pour la biodiversité ?**

Peut-on considérer comme Kahn (1996) que « le transfert d'un gène d'une espèce dans une autre espèce, en particulier, crée une nouvelle diversité biologique et ne la réduit pas. »?

L'appauvrissement variétal n'a pas attendu la transgénèse pour se produire : quelques variétés vedettes issues de la sélection classique représentent une part prépondérante des emblavements. On peut le déplorer mais il s'agit d'un autre débat. Quel effet spécifique peut avoir la transgénèse ? L'amélioration de variétés déjà performantes peut les rendre encore plus attractives et renforcer l'uniformisation déjà en cours. Mais contrairement à ce que l'on pourrait penser la transgénèse ne va pas uniquement faire disparaître des variétés : en rendant possible l'amélioration de variétés existantes ou abandonnées elle peut leur redonner une chance. Par exemple, le fait de réaliser une maturation sur commande peut donner un attrait nouveau à une variété de melon comme le Charentais, intéressant pour ses qualités organoleptiques mais difficilement exportable.

## RISQUES ÉCONOMIQUES

### **Distorsion de concurrence due aux situations réglementaires différentes : l'Europe, les USA, les PVD**

**On craint que le génome lui-même ne soit breveté** par des sociétés de génétique, en fait, une *invention* est brevetable, pas une découverte! La nuance est d'importance : il faut démontrer une faisabilité technique et la notion d'un produit généré par ce procédé. En réalité cela est très flou : certaines sociétés déposent des séquences par centaines !

Le système de dépôt de variété est en France indépendant du système des brevets, la brevetabilité du vivant est pour l'heure interdite mais la réglementation européenne est en cours de « finition ». PGS s'est vu refuser un brevet sur du colza transgénique en 1995 par l'Office des brevets européens qui a considéré qu'il s'agissait d'une nouvelle « variété » et refuse maintenant d'examiner les brevets de plantes transgéniques. Aux États-Unis le dispositif réglementaire est différent : on peut breveter une plante transgénique par un « Utility Patent » (brevet) en plus des deux autres systèmes du « Plant Variety Certificate » et du « Plant Patent ». Il y donc dans ce pays un développement rapide du commerce des semences transgéniques. À l'inverse, de nombreux pays du tiers-monde n'ont aucune législation protégeant les variétés, ni même d'organisme certificateur, ce qui peut décourager la création de variétés qui leur soient destinées.

À signaler qu'il existe une alternative au dépôt de brevet de plante transgénique : pour certaines utilisations, telles la production de vaccins dans un végétal, il sera possible d'infecter des plantes « normales » par un virus transgénique ayant intégré une séquence codante pour un épitope (Miele, 1997).

### **Concentration des pouvoirs, monopoles**

Transgénèse ou pas, la domination du marché des semences par quelques firmes ou pays est déjà bien avancée : environ deux tiers des semences de grande culture exportées le sont par trois pays (USA, Pays-Bas et France) (Le Buanec, 1996). Les trois « grands » : Novartis, Agrevo et Monsanto achètent les sociétés d'ingénierie génétique ou les semenciers. On tend vers une situation où le fabricant de produits phytosanitaires sera aussi le fournisseur de graines. La situation du fournisseur de semences également acheteur de la récolte existe déjà pour les céréales et la dépendance de l'agriculteur augmente comme cela s'est produit avec les élevages en batterie contrôlés par les groupes d'aliment pour volaille ou bétail. Une telle dépendance serait-elle compensée par un revenu plus élevé et plus régulier ? Pour le moment les variétés transgéniques de soja et de maïs sont vendues 50 % plus cher que les variétés équivalentes non transgéniques... malgré cela l'augmentation très importante des surfaces emblavées cette année laisse penser qu'un gain a été perçu par les cultivateurs... Parfois l'existence de solution alternative va entraîner une compétition plus forte, par exemple le lâcher de trichogrammes est une alternative intéressante pour lutter contre la pyrale du maïs.

### **Désintérêt pour les cultures des PVD ou nouvelles opportunités ?**

Peut-on prétendre avoir pour but de nourrir le monde grâce à la transgénèse alors que les essais et les demandes de mise sur le marché concernent quasi exclusivement des plantes cultivées en zones tempérées ou des cultures tropicales non vivrières. Mellon se demandait récemment (1996) si des efforts équivalents à ceux entrepris pour retarder la maturité des melons ne devraient pas aussi exister pour améliorer des plantes de PVD. Ces travaux sont peut-être moins médiatisés que ceux touchant les

espèces phares mais ils existent : ainsi l'ORSTOM en France ou les grands organismes internationaux monogénériques (IRRI, CIMIT etc.) réalisent des transferts de gènes sur des plantes tropicales : résistance à la bactériose du riz (Philippon, 1997), résistance à un virus pour la papaye et la patate douce (Monsanto, 1997).

On peut objecter que le travail à accomplir en agronomie et sélection classique reste immense en ce qui concerne les cultures des pays économiquement défavorisés mais **la transgénèse, en permettant d'introduire des résistances à des pathogènes est de nature à réduire le coût des intrants et à limiter les pertes avant et après récolte.**

Pour les fruits exportés, l'intérêt de la maturation retardée est également important : on estime à un quart la part des récoltes qui pourrissent ! (par exemple les bananes dans les docks du Costa-Rica ou les ananas à même le champ) (Evans, 1996). Il en va de même pour les cultures vivrières avec des pertes estimées parfois à plus de 50 % (Grierson, 1996).

### **Vers une modification de la répartition mondiale des cultures ?**

En conférant des caractéristiques radicalement nouvelles à certaines cultures ou récoltes, la transgénèse peut conduire à des bouleversements dans la répartition mondiale des cultures, et ce d'autant plus que les multinationales contrôlent une grande partie des cultures faisant l'objet d'un commerce international (fruits, café, bois papetier entre autres).

**Ainsi, la création de fruits (et bientôt de fleurs) à maturité retardée (par inhibition de la synthèse d'éthylène ou de sa perception), en rendant possible un transport du fruit vert puis un mûrissement sur commande autorise la délocalisation des cultures vers des zones mêmes lointaines aux coûts de main-d'oeuvre très bas et bénéficiant d'ensoleillements plus élevés.** Il peut y avoir là de nouveaux débouchés pour les PVD dont certains souffrent de la désaffection pour leurs cultures d'exportation (café robusta ou arachide par exemple)... et des problèmes pour les agriculteurs des pays auparavant producteurs.

À l'inverse, de nombreuses plantes aromatiques ou médicinales constituent pour certains pays des monopoles en raison d'une répartition géographique étroite des espèces considérées. **Or il va devenir possible de faire produire certains de ces métabolites par des plantes de grande culture des climats tempérés. Il en va de même pour des cultures comme le palmier à huile, menacé par l'introduction dans le colza de gènes conduisant à la synthèse d'acides gras comme le laurate... Des pans entiers de l'économie d'un pays peuvent ainsi s'écrouler.**

### **En cas de « coup dur » : risque d'écroulement de filières**

Pour l'instant le consommateur perçoit plus les risques de la transgénèse que ses avantages, ce qui est normal car les gains sont pour le producteur de semence et pour le cultivateur ... et les risques pour le consommateur ou son environnement. En effet les réalisations actuelles apportent rarement un gain en qualité du produit mais plutôt un avantage pour la culture ou le stockage ; la situation évoluera sans doute : un quart des tests au champ déjà réalisés concerne la qualité (Aphis, 1997). Si un problème de santé publique consécutif à la transgénèse se révèle après plusieurs années de production il y a fort à parier qu'on assistera à un phénomène analogue à celui rencontré par la filière viande bovine suite à l'épidémie d'encéphalite bovine : désaffection brutale des consommateurs et effondrement des cours.

## CONCLUSION

Pour pouvoir considérer qu'un *danger réel* est dû aux plantes transgéniques il faut réunir deux critères :

- l'événement favorisé par la transgénèse doit avoir une *conséquence réellement néfaste*. Par exemple l'apparition sporadique de bactéries ou d'adventices résistants doit pour constituer une menace être suivie de leur survie et de leur multiplication importante, ce qui suppose une adaptation au milieu et une pression de sélection ;
- le danger considéré *ne doit pas préexister* à l'apparition des plantes transgéniques. Ainsi l'existence de bactéries résistantes à des antibiotiques ou la sélection de pathogènes végétaux virulents n'est aucunement une nouveauté. Les recombinaisons entre génomes viraux peuvent se produire lors d'une co-infection naturelle. De même l'utilisation intensive d'herbicides constitue déjà la règle. L'habileté des opposants à la transgénèse consiste à jouer sur l'ignorance du public concernant la situation présente afin de faire ressortir la « nouveauté » d'un événement.

De nombreuses recherches restent pourtant à mener dans des domaines comme :

- **l'écologie et la génétique des populations** afin de mieux cerner les risques de dissémination de gènes et leur impact ;
- **la génétique et la physiologie des plantes transgéniques** : l'expression d'un gène introduit semble pouvoir varier dans le temps, dans l'espace et au fil des générations sans qu'on en connaisse bien les causes ;
- **la recherche de promoteurs spécifiques** évitant l'expression souvent inutile dans ce qui constitue la récolte, celle aussi de gènes d'expression et de sélection moins porteurs de risques sanitaires ;
- **la toxicologie** des expositions longues à un produit (insecticide naturel par exemple) pour l'homme, l'animal domestique et aussi les insectes pollinisateurs.

En conséquence, on peut penser que la réglementation, quitte à retarder parfois de quelques années la mise sur le marché, pourrait être exigeante sur au moins quatre points :

- 1- l'absence de populations d'adventices capables de s'hybrider avec la plante transgénique dans la zone de culture envisagée lorsque le gène introduit confère une résistance ;
- 2- l'absence *dans les parties consommées* d'une plante d'un produit dont la non-toxicité à long terme n'est pas démontrée. Ceci limiterait l'utilisation de promoteurs constitutifs ;
- 3- l'utilisation de constructions n'utilisant *pas de résistances à des antibiotiques* encore utilisés en médecine humaine ou vétérinaire (sauf en cas de protocoles permettant d'ôter ensuite le gène) ;
- 4- *l'étiquetage* des produits (même dérivés) particulièrement en cas d'allergie connue à l'organisme d'origine du gène introduit.

**En effet, une mise en évidence d'effets néfastes mal évalués a priori aurait à coup sûr un impact très négatif sur le marché des plantes transgéniques. Quand aux risques qui effraient plus le public que les scientifiques, en ces temps d'érosion de la confiance envers les experts, il est quand même utile d'y parer cela ne pourra que faciliter l'acceptation des produits transgéniques.**

## Bibliographie

1. BARGOIN V. Aliments transgéniques : les résistants expriment leur gène. Le Quotidien du Médecin. 1997 ; 6059 : 20-21.
2. BARRETT C., COBB E., MC NICOL R., LYON G.. A risk assessment study of plant genetic transformation using *Agrobacterium* and implications for analysis of transgenic plants PCTOC. 1997 ; 47 : 135-144.
3. BENOIT-BROWAEYS D. L'étiquetage des "nouveaux aliments" est un leurre. La Recherche 1997 ; 299 : 34-6.
4. CASSE-DELBART F. La transgénèse végétale in Les plantes transgéniques en agriculture; John Libbey Eurotext. 1996 : 59-88.
5. DAANE L.L., MOLINA J.A., BERRY E.C., SADOWSKY M.J.. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. Appl Environ Microbiol. 1996 ; 62 (2) : 515-52.
6. DE VRIES F.T., VAN DER MEIJDEN R., BRANDENBURG W.A. Botanical files-a study of the real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. *Gorteria* 1992 ; 1-100.
7. EVANS D. Produce on demand: What's good for US markets is good for world markets too. *Nature Biotech.* 1996 ; 14 : 802.
8. GRIERSON D. Silent genes and everlasting fruits and vegetables?. *Nature Biotechnology.* 1996 ; 14 : 828-29.
9. HANCOCK J.F., GRUMET R., HOKANSON S.C. The opportunity for escape of engineered genes from transgenic crops. *Hort. Science* 1996 ; 31 (7) : 1080-85.
10. KAHN A. Société et révolution biologique. 1996. INRA éditions.
11. HOFFMANN T., GOLZ C., SCHIEDER O. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Curr Genet* 27(1). 1994 ; 27 : 70-76.
12. LE BUANNEC B. Perspectives économiques de la transgénèse végétale. in Les plantes transgéniques en agriculture; John Libbey Eurotext. 1996 ; 19-34.
13. MELLON M. Ripen on command: In a society with ample food, why bother ? *nature Biotechnology.* 1996 ; 14 : 800.
14. MIELE L. Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *TibTech.* 1997 ; 15.
15. MIKKELSEN T.R., ANDERSON B., JORGENSEN R.B. The risk of transgene spread. *Nature.* 1996 ; 380 : 31.
16. MONNERET-VAUTRIN D.A. Les allergènes alimentaires et leurs modifications par les technologies agro-alimentaires. *Cahiers Agricultures* 1997 ; 6 : 21-9.9.
17. NORDLEE J.A., TAYLOR S.L., TOWNSEND J.A., THOMAS L.A., BUSH R.K. Identification of a brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med* 1996 ; 334 : 688-92.
18. PEFEROEN M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops *TibTech.* 1997 ; 15 : 173-7.
19. PHILIPON P. Pas de miracle pour les pays en voie de développement. *Biofutur* 1997 ; 164 : 23-24.
20. PRUFER D., WIPF-SCHEIBEL C., RICHARDS K., GUILLEY H., LECOQ H., JONARD G. Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* 1995 ; 214 (1): 150-8.
21. VAN DE GRAFF E., DULK-RAS A., HOOYKAAS P.J.J. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium* to plants. *Plant Molec Biol.* 1996 ; 31 : 677-81.
22. WINTERMANTEL W.M., SCHOELZ J.E. Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology* 1996 ; 223 (1): 156-64.
23. WILKINSON J.E., TWELL D., LINDSEY K. Activities of CaMV 35S and *nos* promoters in pollen : implications for field release of transgenic plants. *J of Exp. Bot.* 1997 ; 307 : 265-75.

### Pages WEB :

ADIT <<http://www.adit.fr>>.

APHIS <<http://www.aphis.usda.gov:80/bbep/bp>> et USDA <<http://usda.gov>>.

# **B8 : Incidence écologique de la diffusion des plantes transgéniques**

**CHARRIER A.<sup>1</sup>, JACOB S.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> UFR Génét. et Amélior. Plantes ENSAM 2, place Viala 34060 Montpellier Cedex 1  
France

<sup>2</sup> INERA BP 7192 Ouagadougou 03 Burkina Faso

## **INTRODUCTION**

L'utilisation de plantes génétiquement modifiées par génie génétique sera probablement l'un des faits marquants du début du XXI<sup>e</sup> siècle. Des perspectives d'applications intéressantes sont attendues pour l'amélioration des productions végétales à des fins alimentaires, médicinales, industrielles... Dans le même temps, la société est très déstabilisée par des « affaires » touchant la santé publique et très inquiète de l'émergence des biotechnologies végétales visant son alimentation, sa santé, son environnement...

Il faut tout d'abord rappeler l'intérêt scientifique majeur du génie génétique pour la connaissance du génome et de l'expression des gènes... Le transfert des résultats de ces recherches concerne en particulier la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGM) ; la mise en culture des 1<sup>ers</sup> cultivars transgéniques se fait sous l'impulsion des institutions de recherche et des entreprises agro-industrielles. Cette nouvelle technologie émergente est encadrée par des législations nationales, des recommandations internationales (FAO, PNUE...), des directives européennes (90/220 CEE)... Les commissions chargées de ce dossier, telle la commission du génie biomoléculaire (CGB) en France, fondent leurs recommandations et propositions sur l'expertise et l'indépendance des scientifiques (Kahn, 1996).

Dans le cas des cultures de plantes OGM, la dissémination des transgènes et ses conséquences pour l'environnement peuvent être abordées par différentes approches complémentaires, au cas par cas. Elles sont fonction de la biologie de l'espèce, des relations entre espèces apparentées, de la nature du transgène, du caractère considéré et de l'écosystème récepteur. Les travaux réalisés concernent des expérimentations en conditions contrôlées (Chèvre et al 1996), des modélisations et simulations informatiques (Lavigne, 1994) ou encore l'analyse de situations de terrain favorables pour des plantes cultivées tropicales (Charrier, 1991).

Dans le cadre de cette dernière approche, nous présentons un nouvel éclairage sur les flux de gènes (et de transgènes) existant dans les systèmes de culture du maïs au Burkina Faso (Sanou, 1996) et sur l'impact écologique potentiel de la diffusion des plantes transgéniques dans les pays tropicaux.

## **CADRE DE L'ÉTUDE**

Dans beaucoup de pays d'Afrique de l'ouest, les cultivars locaux des cultures vivrières sont encore largement exploités et leur multiplication assurée par les paysans ; la diffusion lente de nouvelles variétés améliorées peut conduire à la cohabitation des 2 types de variétés. Dans certaines régions favorables de savane comme la zone

cotonnière, l'accès à la culture attelée, à la fertilisation et à la semence améliorée est plus aisée. C'est le cas pour le maïs au Burkina Faso avec la coexistence de nombreux cultivars locaux adaptés aux différentes zones écologiques du pays et la vulgarisation de quelques variétés améliorées chez les producteurs de coton.

Les collectes des cultivars locaux de maïs réalisées de 1988 à 1994 dans 80 villages sur l'ensemble du territoire ont été réalisées dans le double objectif de la conservation *ex situ* des ressources génétiques et de l'étude de la variabilité de la centaine de cultivars identifiés. Ils se répartissent en 2 zones agro-écologiques liées au climat et aux systèmes de culture :

1. une zone principale de culture du maïs, avec une pluviométrie de 900 à 1100 mm, associée à des cultures vivrières (sorgho, riz) et industrielles (coton, arachide) ;
2. une zone secondaire de culture de maïs, avec une pluviométrie de 600 à 900 mm, associée au sorgho-mil et à l'élevage pastoral.

Il est possible de donner une typologie des cultivars en rapport avec les pratiques agricoles. Les populations rurales du Burkina Faso cultivent le maïs soit dans des jardins de case, soit dans des champs plus ou moins éloignés des villages. En zone principale et secondaire, dans le jardin de case, véritable potager, les femmes cultivent en association des plantes vivrières (maïs, sorgho, niébé, gombo, tomate, oseille), avec des apports de matière organique et des arrosages. Les cultivars de maïs de case sont précoces (80 jours) et utilisés en immatures. En zone principale, l'agriculture itinérante, de brousse, accueille sur de grandes parcelles cultivées par les hommes, des cultures pures (maïs, sorgho ou mil, coton) ou des associations céréale-légumineuse en saison de pluies. On y cultive des maïs plus tardifs (100 jours) à grain corné-denté, utilisé pour la préparation du tô.

L'étude de la variabilité des cultivars a porté sur la variation des caractères agromorphologiques et sur la diversité génétique neutre évaluée par les marqueurs isoenzymatiques (Sanou et al 1997).

## MISE EN ÉVIDENCE DE FLUX DE GÈNES

Les marqueurs utilisés concernent 10 systèmes enzymatiques représentés par 18 loci répartis sur 9 des 10 chromosomes du maïs. La variabilité intra et inter cultivars a été analysée pour l'ensemble des variétés locales ainsi que 2 variétés élites IRAT 171 et SR22. L'analyse en composantes principales effectuée sur les fréquences alléliques met en évidence l'originalité du cultivar SR22 associée à 2 allèles IDH 1.2 et IDH 2.4.Ê: ils sont fréquents chez SR22 (fréquence 0.4 et 0.14 respectivement) et absents chez la plupart des cultivars locaux. Seuls 10 cultivars locaux possèdent ces allèles et pourraient résulter de flux de gènes avec SR22.

Un faisceau d'arguments en faveur de cette hypothèse est à considérer :

1. Les cultivars locaux présentant les allèles IDH 1.2 et 2.4.2 proviennent de villages pionniers de la zone cotonnière où a été cultivée la variété SR22, ainsi que dans 3 villages où des essais de comportement de SR22 ont eu lieu.
2. La variété améliorée SR22 a été diffusée à partir de 1986 pour son bon comportement vis-à-vis de la virose du maïs (maize streak virus) qui provoque des dégâts importants sur les cultivars locaux. Son taux d'adoption par les paysans peut dépasser 50 % bien que la qualité des grains soit inférieure.
3. Les flux de gènes entre plantes de maïs sont favorisés par le mode de reproduction allogame de l'espèce et sa pollinisation anémophile. La densité de

pollinisation décroît rapidement dans les premiers mètres, mais la distance de pollinisation à taux faible dépasse plusieurs dizaines de mètres.

4. Le niveau d'exposition des cultivars à l'introgression est dépendant des pratiques agricoles. La substitution par SR22 concerne les cultivars de plein champ chaque fois que le paysan accède à des conditions de culture améliorée et favorise la pollution des parcelles voisines ensemencées avec nombre d'autres cultivars locaux. L'isolement des cultivars de case est relatif, quelques exemples d'introgression ayant été identifiés.

5. La technique de multiplication par le paysan de ses propres semences s'accompagne d'une sélection des épis les mieux remplis, sur les plantes les plus vigoureuses. Ce choix favorise à chaque génération les plantes introgressées par la variété élite présentant de l'hétérosis - tel que démontré expérimentalement pour quelques caractères agronomiques.

En conclusion, l'existence d'échanges géniques entre la variété SR22 et les cultivars locaux du Burkina Faso a pu être démontrée grâce à une situation particulièrement favorable. En effet, SR22 a été sélectionné dans un pool génique original constitué par le CIMMYT à partir de cultivars mexicains. Il présente de ce fait une constitution génétique différente des cultivars africains pour quelques allèles et une distance génétique plus importante : la (distance de Nei entre cultivars locaux est de 0,004 à 0,006 et atteint avec SR22 0,049 à 0,067.

Dans une étude des cultivars locaux de maïs d'une région du Mexique, Louette (1994) a aussi mis en évidence les facteurs favorables à de tels flux géniques et l'enrichissement génétique des variétés résultant de cette gestion paysanne.

## CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA DIFFUSION DES TRANSGÈNES

1. Les échanges génétiques entre plantes d'une même espèce cultivée, surtout si elle est allogame, et avec les espèces apparentées sont connus (Darmency, 1994; Jorgensen et al, 1996). Les fondements conceptuels de cette approche reposent sur la notion d'espèce biologique d'une part, sur les pools géniques de Harlan et de Wet et les complexes d'espèces de Pernès d'autre part. Ainsi, nombre d'espèces végétales cultivées sont capables de se croiser avec les espèces spontanées ancêtres ou apparentées et de donner naissance à des plantes adventices.

La mise en culture prochaine de variétés transgéniques constitue une situation nouvelle, non pas du point de vue des flux géniques, mais par les conséquences du recours à des gènes nouveaux d'origine bactérienne, virale, voire artificielle. Il est donc indispensable d'étudier et d'approfondir au cas par cas notre connaissance des ensembles d'espèces apparentées, surtout ceux pour lesquels des variétés transgéniques sont en cours de développement. Les régions tropicales étant les zones d'origine et de diversification de nombre d'espèces cultivées, des risques potentiels de diffusion de transgènes sont à prévoir à terme, à cause de la circulation des semences à l'échelle mondiale, même si les pays concernés ne développent pas d'OGM à l'heure actuelle.

2. La majorité des scientifiques est consciente de l'impossibilité d'empêcher la diffusion de n'importe quel gène dans les cultures, ainsi qu'aux espèces adventices et spontanées avoisinantes. C'est la raison pour laquelle des mesures très strictes de confinement en laboratoire et en serre sont appliquées aux expérimentations sur les OGM et des mesures d'interdiction d'importation et de mise en culture sont prises par les législations nationales.

Par contre, il n'est guère possible de prédire la vitesse, l'étendue et l'impact à long terme des flux de gènes introduits par génie génétique. Les facteurs à prendre en considération dans une modélisation sont :

- la biologie de l'espèce (mode reproduction, dissémination pollen et grains...), et les paramètres démographiques ;
- la nature du caractère (déterminisme, valeur sélective...) ;
- l'agroécosystème.

3. Il est intéressant de considérer l'ensemble de ces paramètres agissant sur la dissémination des gènes dans le cas du maïs, en comparant des situations extrêmes de culture intensive aux USA ou en Europe et des pratiques culturales traditionnelles des régions tropicales (Sanou 1996 ; Louette et al. 1997).

Dans le premier cas, un nombre limité de variétés hybrides est cultivé sur de grandes surfaces au niveau de chaque exploitation et de la région agro-écologique. L'utilisation généralisée des traitements herbicides (triazines) depuis plusieurs décennies a permis la monoculture sur une même parcelle pendant plusieurs années. Cette pression de sélection constante a entraîné le tri de mutants résistants à la triazine dans les espèces adventices des champs de maïs comme le chénopode blanc. La dissémination de maïs transgéniques pour la résistance à des herbicides totaux à base de glyphosate ou glyfosinate mimerait la situation actuelle, avec les mêmes conséquences vis-à-vis de la flore adventice.

Dans les pays africains où l'on cultive de nombreux cultivars de maïs sur de petites surfaces, les possibilités de croisements sont favorisées, et la diffusion des transgènes serait rapide. L'introduction volontaire ou fortuite de maïs transformé résistant à la toxine de Bt entraînerait une sélection d'insectes résistants, identique à celle de la lutte chimique.

En conclusion, la notion de risque écologique associé à la diffusion des OGM n'est pas facile à évaluer et ne se prête à aucune généralisation selon les espèces végétales, les transgènes, le lieu, la période.... Les phénomènes biologiques (flux de gènes, introgressions) et le fonctionnement des populations (sélection, migration, dérive) intervenant ne sont pas nouveaux, mais nul ne peut prédire l'impact d'une nouvelle biotechnologie. Le principe de précaution (Godard, 1997) servira donc de guide à toute expérimentation et à toute diffusion d'OGM. Quant aux scientifiques, ils peuvent contribuer à la prise de décision (Roqueplo, 1997), en fournissant aux décideurs et au public des informations biologiques solides et en réalisant des expérimentations adaptées à chaque situation particulière.

---

## Bibliographie

---

1. CHARRIER A., 1991. *in* Actes des Journées de l'Environnement/CNRS, 249-255.
2. CHÈVRE et al., 1996. *Acta Hort.* 407, 169-179.
3. DARMENCY H., 1994. *Mol. Ecol.* 3, 37-40.
4. GODARD, 1997. INRA Editions, Paris.
5. JORGENSEN R.B. et al., 1996. *Trends in plant sciences*, 10,356-358.
6. KAHN A., 1996. John Libbey Eurotext, 165 p.
7. LAVIGNE C., 1994. Thèse INA.PG, Paris.
8. LOUETTE D., CHARRIER A., BERTHAUD J., 1997. *Economic Botany* 51(1), 20-38..
9. ROQUEPLO P., 1997. INRA Edition.
10. SANOU J., 1996. Thèse ENSA. Montpellier.
11. SANOU J., GOUESNARD B. et CHARRIER A., 1997. *Maydica* 42, 1-11.

# **SECTION B**

**Textes et résumés des Affiches  
de B9 à B16**



---

## **B9 : Vers la création de variétés d'épinard à teneur réduite en nitrate**

**CHARLES G., ASKOUK L., LEGUILLON S., DAMIOLINI F., XIAO X.G., LE ROUX M.,  
BRANCHARD M.**

Laboratoire d'Amélioration des Végétaux - Biotechnologie. ISAMOR, Université de Bretagne Occidentale

Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané (France). email : Gilbert.Charles@univ-brest.fr

---

### **INTRODUCTION**

Certains végétaux, tels que l'épinard, la laitue ou la carotte, accumulent le nitrate aux niveaux feuille, tige et racine. Si la consommation de cet ion en tant que tel n'apparaît pas préjudiciable à la santé, il n'en n'est pas nécessairement de même pour ses dérivés, nitrite et nitrosamines. En conséquence, il existait dans certains pays, dont la France, des recommandations concernant la teneur maximale en nitrate des légumes commercialisés et une directive européenne limitant leur taux est appliquée depuis le début de l'année 1997. La concentration en nitrate peut être diminuée, notamment par le contrôle de la fertilisation azotée, le choix du génotype et le moment de la récolte. Cependant, même dans les meilleures conditions, dont la mise en pratique à l'échelon industriel n'est que partiellement envisageable, la teneur en nitrate de l'épinard peut rester élevée. La sélection traditionnelle n'ayant pas permis d'obtenir de variétés à teneur réduite en nitrate, la transgénèse a été envisagée. L'intégration du gène codant pour la nitrate réductase, et s'exprimant de façon constitutive, doit permettre d'éviter l'accumulation de nitrate généralement observée dans les vacuoles. Les résultats obtenus sur des plants de tabac transgéniques ayant intégré de telles constructions (Dorlhac de Borne *et al.*, 1994 ; Crété, 1995) ont conforté le bien-fondé de cette approche.

Diverses méthodes de régénération et de transgénèse ont donc été étudiées dans notre laboratoire afin d'intégrer chez l'épinard une construction codant pour la nitrate réductase. Les principaux résultats sont récapitulés dans cet exposé.

### **MÉTHODES DE RÉGÉNÉRATION**

La maîtrise de la néoformation de plantes a déjà été obtenue soit par embryogenèse somatique, à partir de segments d'hypocotyles (Xiao et Branchard, 1993) ou de racines (Komai *et al.*, 1996), soit par organogenèse à partir de cals foliaires (Al-Khayri *et al.*, 1991), de segments d'hypocotyles et de racines (Mii *et al.*, 1992 ; Xiao et Branchard, 1995) et par culture de cellules (Xiao *et al.*, 1997) ou de protoplastes (Komai *et al.*, 1996).

Les protocoles de régénération actuellement mis au point sont en cours d'optimisation pour deux raisons majeures : i) un taux de régénération important est nécessaire pour produire des plantes à partir des cellules transformées ; ii) les plantes obtenues par les méthodes actuelles fleurissent prématurément, ce qui limite la production de graines. Signalons que l'épinard *in vitro*, qu'il s'agisse d'une germination ou d'une régénération à partir de cellules ou de tissus, ne se bouture pas : les plantes obtenues se développent, fleurissent rapidement, produisent éventuellement quelques graines et meurent. Un génotype intéressant, tout comme une structure transgénique nouvelle, doivent donc être entretenus par culture de tissus. Dans nos expériences, les explants « traditionnels », segments de racines ou d'hypocotyles, passent par une phase de callogenèse importante avant de néoformer des plantes, plusieurs mois après la mise en culture. De plus, le taux de régénération observé est limitant. Les facteurs génétiques, physiques et nutritionnels doivent donc être redéfinis pour résoudre ces problèmes, et ceci pour chacune des nouvelles méthodes de régénération retenues et actuellement en cours d'étude, à savoir les couches cellulaires minces transversales (CCMt) et les suspensions cellulaires. Le

choix d'un explant initial de petite taille devrait accroître les chances de régénérer une plante transgénique homogène.

### Les couches cellulaires minces transversales

Cette technique de préparation de l'explant reprend celle mise au point par Tran Thanh Van (1973) avec des couches cellulaires minces longitudinales, et a permis de résoudre le problème de la régénération chez de nombreuses espèces récalcitrantes, mono et dicotylédones (Gendy *et al.*, 1996 ; Detrez *et al.*, 1988). Elle consiste à mettre en culture des explants obtenus par coupes transversales de différents organes et ne comportant que quelques assises cellulaires d'épaisseur. Ces explants sont donc particulièrement sensibles au milieu de culture et à l'environnement. De plus, l'origine des cellules réactives est facilement identifiable au sein de l'explant.

Les milieux de Xiao (Xiao et Branchard, 1993, 1995) mis au point et utilisés au laboratoire, à base d'une combinaison hormonale GA<sub>3</sub>-AIA, ne sont plus adaptés pour régénérer à partir de couches minces.

Des plantes de 7 jours développées *in vitro* sont entièrement découpées en CCMt et déposées en boîtes de Petri sur un milieu utilisé par Komai *et al.* (1996) à base de MS/2 additionné d'ANA (10 µM), de GA<sub>3</sub> (0,1 µM) et de saccharose (10 g/l). Après 2 semaines d'obscurité à 25°C, où les premiers cals apparaissent, les boîtes sont transférées en photopériode de 16h (50 µM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Après 8 semaines sur ce même milieu, les cals sont repiqués sur milieu MS à 20 g/l de saccharose. Les régénérations sont visibles après 8 semaines, au niveau des cals issus des fragments de la base des cotylédons (1,7 % des CCMt totales) et sont transférées en tubes où elles se développent et fleurissent rapidement. Chaque couche mince embryogène produit généralement plusieurs plantes, les embryons pouvant également porter des embryons secondaires.

Un autre milieu d'induction à base de MS additionné d'ANA, de GA<sub>3</sub> et de BAP (respectivement 100, 10 et 1 µM) a, pour l'instant, donné les meilleurs résultats et permet en particulier d'observer des embryons somatiques après 2 mois, ce qui est le temps le plus court actuellement réalisé pour régénérer l'épinard. Ce milieu sert donc maintenant de référence pour évaluer l'effet du préconditionnement de la plante-mère, de la concentration en ANA et des sucres (nature et concentration).

### Les suspensions cellulaires

Le protocole de Xiao *et al.* (1997) a été repris en vue d'augmenter le nombre de régénérants, de raccourcir leur délai d'obtention et d'augmenter leur conformité. Des milieux moins riches en régulateurs de croissance ont tout récemment permis d'observer de nouvelles régénérations, et ceci à partir de différents génotypes et de différentes fractions cellulaires, selon le protocole suivant : les racines et les hypocotyles de germinations âgées d'une semaine sont découpés et déposés sur milieu de callogenèse (milieu MS avec 49 µM d'AIA et 10 µM de GA<sub>3</sub>) durant 4 à 5 semaines. Des cals friables sont obtenus et mis en agitation (125 rpm) en milieu liquide (milieu de Dalton et Street (1976) avec AIA, GA<sub>3</sub> et kinétine (respectivement 6, 1 et 2,3 µM)) en photopériode de 10h (40 µM. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), à 22°C. Une semaine plus tard, les cellules libres sont récupérées par filtration (fraction 100-200 µm et 63-100 µm) et remises en suspension (90 rpm) dans du milieu neuf, avec repiquage toutes les deux semaines et changement de milieu toutes les 4 semaines (contenant AIA, GA<sub>3</sub> et kinétine aux concentrations respectives : 6,1 et 2,3 µM puis 14,1 et 0 µM et enfin 0,1 et 0 µM). Les petites cellules de la première fraction sont les plus actives. Au bout d'un mois, les cals visibles à l'œil nu, apparus en milieu conditionné, sont transférés en milieu liquide de régénération (milieu de Al Khayri (1991)). Certains forment alors des pousses feuillées qui sont repiquées sur le même milieu de croissance solide en boîtes de Petri, puis en tube à essais contenant un milieu de culture solide, sans hormones (MS/2), qui les conduit à une floraison généralement précoce.

## TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE

Différentes méthodes de transgénèse, directes et indirectes, ont été utilisées pour notre étude, et les principaux résultats sont récapitulés ci-après.

### **Agrobacterium rhizogenes**

Cette méthode est la seule qui permette de s'affranchir d'un protocole de régénération très performant quant au taux de plantes produites par explant, puisque la transformation induit le développement d'une racine transgénique génétiquement « homogène ». En théorie, il suffit donc de régénérer quelques plantes de « bonne qualité » à partir de cette racine. C'est aussi la seule méthode qui ait permis d'obtenir des plantes transgéniques et des descendants Gus positifs à l'heure actuelle (Askouk, 1996). Des difficultés demeurent néanmoins, en particulier pour régénérer des plantes à floraison normale et abondante en vue de produire des graines.

La souche A4 utilisée est une souche à agropine. Le TL-DNA contient le plasmide pMarcel 70 GUS (Robaglia *et al.*, 1987), porteur d'un gène *gus* chimérique sous contrôle du promoteur 2x35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Des plantes de la variété Carpo, âgées de 15 jours et développées *in vitro* sont décapitées et infectées. Les racines apparues au site d'infection sont repiquées en boîtes de Petri sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) avec 250 mg/l de céfotaxime. Un mois plus tard, des segments d'1 à 2 cm sont placés sur milieu MS additionné d'AIA (8 mg/l) et GA3 (3,5 mg/l) où des cals puis des pousses feuillées vont se développer pour atteindre 2 à 5 cm après 10 semaines. Toutes ces pousses expriment le caractère Gus et fleurissent le mois suivant. Une pollinisation manuelle a permis d'obtenir quelques graines ainsi qu'une descendance exprimant également le caractère Gus.

Ce protocole a été appliqué à l'obtention de racines transgéniques chez divers génotypes (Carpo, lignées #2 de Rijk Zwaan et RS1 de Royal Sluiss) pour intégration du gène codant pour la nitrate réductase. Les difficultés rencontrées ont conduit à mettre en évidence une inhibition du développement racinaire induite par la céfotaxime au cours de la phase de décontamination. Elles laissent également envisager une perturbation du métabolisme, liée à la surexpression de la nitrate réductase, qui fera l'objet d'une étude spécifique.

Des cals résistants à la kanamycine et ayant potentiellement intégré le gène de la nitrate réductase ont cependant été obtenus et sont en cours de différenciation.

### **Agrobacterium tumefaciens**

Des développements tumoraux ont été observés après inoculation de plantes et d'explants par les souches sauvages C58 et 139.82. Cette dernière souche a produit des tumeurs rhizogènes, et non des tumeurs caulogènes comme observé habituellement chez le peuplier (Brasileiro *et al.*, 1991) et le chou-fleur (Passelègue et Kerlan, 1996), mais les racines obtenues n'ont néoformé aucune plante. L'utilisation des souches désarmées LBA 4404 GUSint, C58GV2260 GUSint et C58pMP90 GUSint a permis d'induire la formation de quelques secteurs Gus positifs (colorés en bleu), mais aucune structure transgénique organisée n'a pu se développer.

Plus récemment, des expériences ont été réalisées en transformant non plus les fragments traditionnels, mais des CCMt. Plus de 90 % des CCMt traitées se sont révélées Gus positives.

### **Biolistique**

Notre étude de cette approche de la transgénèse directe a été effectuée sur le cultivar Carpo, en utilisant un plasmide pCH 1 (8,5 kb) contenant le gène *gus* et le gène de sélection *npt II* conférant la résistance à la kanamycine. Différents facteurs ont été testés en vue d'évaluer la capacité des microprojectiles à transférer l'ADN étranger dans le génome de l'épinard : poids de la charge propulsive, concentration en CaCl<sub>2</sub>, spermidine, ADN et tungstène. L'efficacité du transfert a tout d'abord été évaluée par bombardement de disques foliaires et comptage du nombre de spots bleus obtenus par boîte de Petri deux jours après le bombardement. Les meilleures conditions de transfert sont obtenues avec 30 à 40 mg de poudre, 10 µl d'ADN (0,5 µg/µl), 25 µl de CaCl<sub>2</sub> (2,5 M) et 25 µl de spermidine (100 mM).

Ces conditions ont été appliquées à des cals organogènes et embryogènes (0,5 cm de diamètre). Sept jours après bombardement et culture sur milieu MS additionné d'AIA (8 mg/l), GA3 (3,5 mg/l) et kanamycine (25 mg/l), le test histochimique GUS a révélé  $21 \pm 7$  spots bleus par boîte de Petri (80 cals par boîte). Deux semaines après, 6,5 % des cals formés étaient GUS positifs et 6 semaines après bombardement, 5 cals parmi les 1460 bombardés ont régénéré des pousses qui ont fini par se nécroser. Les mêmes conditions appliquées à des suspensions cellulaires ont permis d'isoler des cellules bleues mais les divisions ont cessé après 2 semaines. L'utilisation de cette méthode directe a conduit à la première introduction et expression d'un gène étranger chez l'épinard, mais aucune plante transgénique n'a pu être obtenue et sevrée.

## CONCLUSION

Le point sur ces recherches montre que l'obtention d'épinard transgénique est possible. L'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens*, comme celle du canon à particules, a permis de transférer de l'ADN étranger qui s'est exprimé dans des cellules d'épinard, mais aucune plante n'a encore été régénérée par ces méthodes.

L'utilisation d'*Agrobacterium rhizogenes* comme vecteur de transfert a conduit à la production de plantes transgéniques. Bien que le processus soit très lent (environ 9 mois), il est efficace et reproductible.

Le principal obstacle actuel concerne la floraison précoce des pousses transgéniques, comme déjà constaté chez *Nicotiana* (Schmülling *et al.*, 1988) ou *Cichorium* (Sun *et al.*, 1991). L'effet du génotype et de l'environnement physique et hormonal seront évalués pour résoudre ce problème.

Les méthodes de transformation par canon à particules ou par *A. tumefaciens*, combinées avec des méthodes de régénération à partir de couches cellulaires minces ou de cellules, devraient également permettre d'évaluer un plus grand nombre de régénérateurs et d'accroître leur conformité notamment en raccourcissant la durée du cycle de culture *in vitro*.

## Abréviations

AIA : acide indole-3 acétique, ANA : acide 1-naphtalène acétique, GA<sub>3</sub> : acide gibbérellique, CCMt : couches cellulaires minces transversales, MS : milieu de Murashige et Skoog (1962).

## Remerciements

Les auteurs remercient le Dr. Caboche (INRA Versailles) pour la construction « nitrate réductase », le Dr. L. Jouanin et le Dr. M. Tepfer pour la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* et le plasmide pCH1, les Compagnies Nunhems Zaden, Rijk Zwaan et Royal Sluis pour les semences, Coopagri-Bretagne et la région Bretagne pour leur support financier.

## Bibliographie

---

1. AL-KHAYRI J.M., HUANG F.H., MORELOCK T.E., 1991. Regeneration of spinach from leaf callus. *HortSci.*, 26, 913-914.
2. AL-KHAYRI J.M., HUANG F.H., MORELOCK T.E., ZHANG H.T., 1992. Transient gene expression in spinach callus transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Hort Sci.*, 27, 621.
3. ASKOUC L., 1996. Mise au point d'une méthode de transformation génétique de l'épinard (*Spinacia oleracea* L.) en vue de l'obtention de plantes à teneur réduite en nitrate. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 90p.
4. BRASILEIRO A.C.M., LEPLÉ J.C., MUZZIN J., OUNNOUGHI D., MICHEL M.F. JOUANIN L., 1991. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains. *Plant Mol. Biol.*, 17, 441-452.
5. CRÉTÉ P., 1995. Dérégulation de l'expression de la nitrite réductase : conséquences physiologiques et mise en évidence d'un contrôle post-transcriptionnel. Thèse de doctorat, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 107 p.

6. DALTON C.C., STREET H.E., 1976. The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension cultures of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *In Vitro*, 12, 485-494.
7. DETREZ C., TETU P., SANGWAN R.S., SANGWAN-NORREEL B.S., 1988. Direct organogenesis from petiole and thin layer explants in sugar beet cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 39, 917-926.
8. DORHLAC DE BORNE F., DE ROTON C., DELON R., CHUPEAU Y., 1994. Étude du comportement agronomique de tabacs industriels transgéniques présentant une activité nitrate réductase élevée. *Ann. du Tabac - Seita - Bergerac - Sect 2*, 26, 19-37.
9. GENDY C., SÈNE M., BUI VAN LE, VIDAL J., KIM TRAN THANH VAN, 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Cell Rep.*, 45, 900-904
10. KOMAI F., OKUSE I., HARADA T., 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Sci.*, 113, 203-208.
11. KOMAI F., MASUDA K., HARADA T., OKUSE I., 1996. Plant regeneration from adventitious root of spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown from protoplasts. *Plant Sci.*, 120, 89-94.
12. MII M., NAKANO M., OKUDA K., IIZUKA M., 1992. Shoot regeneration from spinach hypocotyl segments by short term treatments with 5,6-dichloro-indole 3-acetic acid. *Plant Cell Rep.*, 11, 58-61
13. MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
14. PASSELÈGUE E., KERLAN C., 1996. Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) by transfer of cauliflower mosaic virus genes through combined cocultivation with virulent and avirulent strains of *Agrobacterium*. *Plant Sci.*, 113, 79-89.
15. ROBAGLIA C., VILAINE F., PAUTOT V., RAIMOND F., AMSELEM J., JOUANIN L., CASSE-DELBART F., TEPFER M., 1987. Expression vectors based on the *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid transformation system. *Biochimie*, 69, 231-237.
16. SCHMULLING T., SCHELL J., SPENA A., 1988. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J.*, 7, 2621-2629.
17. SUN L.-Y., TOURAUD G., CHARBONNIER C., TEPFER D., 1991. Modification of phenotype in Belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes* conversion from biennial to annual flowering. *Transgenic Research*, 1, 14-22
18. TRAN THANH VAN M., 1973. Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 115, 87-92.
19. XIAO X.-G., BRANCHARD M., 1993. Embryogenesis and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.) from hypocotyl segments. *Plant Cell Rep.*, 13, 69-71.
20. XIAO X.-G., BRANCHARD M., 1995. *In vitro* high frequency plant regeneration from hypocotyl and root segments of spinach by organogenesis. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 42, 239-244
21. XIAO X.-G., CHARLES G., BRANCHARD M., 1997. Plant regeneration from cell suspensions of spinach. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult. In Press*.

---

## **B10 : Régénération et transformation par biolistique chez *Digitaria sanguinalis* (L.) scop utilisant la méthode des couches cellulaires minces**

**BUI V.L., DO M.Y.T., GENDY C., VIDAL J., TRAN THANH VAN K.**

Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France

---

Des embryons somatiques puis des plantes ont été régénérées directement à partir de couches cellulaires minces transversales (CCMt) de *Digitaria sanguinalis*. Les CCMt (de 0,1 à 0,3 mm, 1 mm de diamètre) sont excisées à partir de jeunes plantes de 4 semaines. L'influence des différentes auxines, celle du saccharose et des conditions d'environnement seront présentées ainsi que les techniques de transformation par biolistique des CCMt.

Différentes constructions d'ADN ont été utilisées, notamment de promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), le promoteur phosphoénolpyruvate carboxylase du sorgho (PEPC). Les gènes de résistance soit à la kanamycine (gène NPT II) soit au glufosinate (gène BAR) sont utilisés comme marqueurs de sélection et le gène de la  $\beta$ -glucuronidase (GUS) comme marqueur de visualisation.

Des plantes résistantes au glufosinate et au Basta ont été sélectionnées (F<sub>0</sub>). Des graines issues de F<sub>0</sub> ont été testées pour leur résistance au même agent de sélection : 5 % de plantes résistantes à 3 mg/l de glufosinate ont été obtenues, alors que 100 % des plantes-témoin meurent.

---

## **B 11 : Transformation génétique de suspensions embryogènes de bananier (*Musa* AAB) par bombardement de particules**

COTE F.X., LEGAVRE T., GRAPIN A., VALENTIN B., MONMARSON S., FRIGOUT O.,  
BABEAU J., BAKRY D., TEISSON C.

CIRAD-FLHOR, CIRAD-BIOTROP. Av. du val de Montferrand. 34032 Montpellier cedex. F

---

Une technique de culture de suspensions cellulaires établies à partir de tissus embryogènes issus de fleurs mâles a été développée. Cette technique a été appliquée avec succès à des cultivars AAA, AAB, AA. Les suspensions ont un pouvoir embryogène élevé. Les embryons somatiques régénérés ont dans leur majorité une origine unicellulaire. Un canon à particules (BioRad PDS-1000/ He) a été utilisé pour développer une méthode de transfert de gène, la cible étant constituée d'agrégats d'une suspension cellulaire en phase de croissance exponentielle. Deux paramètres ont une influence majeure sur le niveau d'expression transitoire (déterminé par l'activité  $\beta$ -glucuronidase du gène GUS) : les niveaux d'expression les plus importants sont obtenus lorsque la croissance de la suspension embryogène est rapide et ils sont proportionnels à la pression du flux d'hélium. On passe ainsi de moins de 100 points bleus par tir à 900 PSI à plus de 1200 points à 1500 PSI. Les niveaux moyens d'expression sont supérieurs à 1000 spots par tir (chaque tir est réalisé sur 0,2 ml de volume cellulaire) et peuvent atteindre plus de 4000 spots. Des suspensions du cv French sombre (plantain *Musa* AAB) ont servi de cible pour la transformation stable. La transformation a été réalisée avec le plasmide pILTAB 309 contenant les gènes *gus* et *hph* de résistance à l'hygromycine sous le contrôle de la séquence promotrice du CaMV35S. Quatre jours après le tir, les agrégats cellulaires sont placés sur milieu de multiplication auquel est ajouté 50 mg/l d'hygromycine. Les masses embryogènes résistantes sont transférées après 100 jours de culture sur un milieu de régénération contenant également un agent sélectif. Les plantules qui se sont développées sur ce milieu sont repiquées 50 jours plus tard sur un milieu d'enracinement contenant lui aussi de l'hygromycine. Dans ces conditions, la croissance des plantules est continue mais retardée alors que les plantes témoins se nécrosent entièrement en moins de 15 jours. L'analyse moléculaire de ces plantules confirme une intégration stable du transgène. Cette méthode de transformation est en cours de transfert sur d'autres génotypes.

---

## **B12 : Application de la technique biolistique pour la transformation du blé (*Triticum aestivum* L.)**

**DELPORTE F., JACQMIN S., JACQUEMIN J.M.**

Centre de Recherches Agronomiques - Station d'Amélioration des Plantes. Rue du Bordia, 4, B-5030 GEMBLOUX. (BELGIQUE)

---

L'intérêt du canon à particules est clairement établi pour la transformation génétique d'espèces végétales d'intérêt agronomique récalcitrantes aux techniques classiques de transformation. Le succès d'une méthode de transformation génétique repose sur la définition de la meilleure combinaison d'un vecteur de transformation et d'une méthode de régénération à haute fréquence. Cette combinaison est couplée à des techniques efficaces de sélection des transformants et de validation du phénomène de transgénèse. Les travaux publiés jusqu'à présent faisant état de l'obtention de blé transgénique sont basés sur un système de régénération induit au départ d'embryons immatures. Nous développons deux modes de régénération par embryogenèse somatique. La callogenèse est initiée, soit au départ d'agrégats cellulaires d'embryons matures, soit au départ de la culture du scutellum d'embryons immatures. Deux constructions plasmidiques sont utilisées conjointement pour effectuer le bombardement. La construction pUCBasta contient la séquence codante *bar* (De Block et al. 1987) flanquée du promoteur du transcrit 35S du virus de la mosaïque du chou fleur et la construction pEmuGN comporte la séquence codante *gus* insérée en aval du promoteur pEmu (Last et al. 1991). Le gène marqueur *bar* code pour la phosphinotrycine acétyle transférase, il confère aux cellules qui l'expriment la résistance à la Phosphinotrycine (PPT), matière active entrant dans la composition de l'herbicide Basta. Le gène marqueur *gus* code pour l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase, dont l'activité est décelable par un essai de type colorimétrique ou fluorométrique.

### **CALLOGENÈSE INITIÉE AU DÉPART D'EMBRYONS MATURES**

Les agrégats cellulaires d'embryons matures sont obtenus par extrusion de ces derniers au travers d'un fin tamis en Nylon, en conditions aseptiques. Cette méthode de régénération créée au laboratoire est un procédé original qui offre l'avantage d'un gain de temps et de simplicité du mode opératoire. Les procédés de régénération utilisés par Narender *et al.* 1994 et Becker *et al.* 1994 pour l'induction de l'embryogenèse somatique au départ d'embryons immatures furent adaptés à nos conditions de culture. Le choix des conditions de culture finalement adoptées est déduit de la comparaison des moyennes du pourcentage de régénération relatives à chacune de ces méthodes. L'effet du bombardement sur la capacité de callogenèse et de régénération est estimé ainsi que l'effet du rapport ADN/particules sur le taux d'expression transitoire du gène marqueur *gus*. Nous avons testé les conditions de bombardement et les modalités d'application de la pression de sélection en fonction de l'état physiologique des explants.

### **CALLOGENÈSE INITIÉE AU DÉPART D'EMBRYONS IMMATURES.**

Les embryons sont prélevés en conditions aseptiques, 12 à 20 jours après fécondation. Nous évaluons l'efficacité de la pression de sélection lorsque celle-ci est appliquée immédiatement après bombardement ou de manière différée, ainsi que l'avantage de combiner la molécule sélective à une source de carbone autre que le saccharose. De plus, nous comparons l'efficacité du bialaphos (antibiotique naturel, précurseur de la PPT) comparée à celle du sel d'ammonium de la phosphinotrycine.

## RÉGÉNÉRATION DE PLANTES AU DÉPART DE CALS EMBRYOGÈNES BOMBARDÉS AVEC LES GÈNES MARQUEURS *BAR* ET *GUS*

Près de 7000 cals obtenus selon l'une ou l'autre des méthodes précitées furent bombardés avec les plasmides pUCBasta et pEmuGN. 146 plantules sont obtenues par embryogenèse somatique au départ des cals embryogènes bombardés et sélectionnés en présence de l'agent sélectif PPT. 2,09 plantes en moyenne sont générées par 100 explants bombardés, ce pourcentage de régénération moyen oscillant entre les valeurs extrêmes de 0,4 et 6 %. 10<sup>6</sup> et 40 plantes émanent respectivement de la mise en culture des embryons immatures et des agrégats cellulaires d'embryons matures. Tous les cals témoins non bombardés et sélectionnés ont dépéri. L'analyse des plantes F0 est réalisée par les méthodes PCR et Southern. Afin de discerner les plantes non transgéniques des plantes ayant intégré les transgènes de manière stable (selon une nature chimérique ou non), nous avons examiné la génération F1 émanant de l'autofécondation des plantes F0. Trente lignées de 15 graines d'un même épi F0 sont semées et pulvérisées au stade 3 feuilles avec l'herbicide Basta. Certaines familles F0 donnent naissance à des plantes F1 dont le comportement au traitement sélectif se démarque légèrement de celui des témoins. Ces plantes sont soumises à un dosage de l'activité du marqueur *gus*, par un essai de type fluorométrique. On observe que des épis F0 ont produit des plantes dont l'activité moyenne est de 2,6 et 3 fois plus élevée que celle des témoins. Trente autres lignées de 15 graines F1 sont semées et soumises au dosage fluorométrique de l'activité du gène marqueur *gus*, indépendamment de tout traitement sélectif. Treize descendances F1 présentent une activité moyenne au moins 2 fois supérieure à celle des témoins. L'ADN de ces plantes F1 est extrait en vue d'effectuer des analyses de type Southern. Les résultats préliminaires indiquent la présence de séquences homologues aux plasmides introduits. Des études plus détaillées de la structure des séquences intégrées dans le génome sont en cours.

### Bibliographie

---

1. BECKER D. et al. (1994) *The Plant Journal* 5(2): 299-307.
2. DE BLOCK et al. (1987) *The EMBO Journal* 6(9): 2513-2518.
3. LAST et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588.
4. NARENDER S., NEHRA et al. (1994) *The Plant Journal* 5(2):285-297.

---

## **B13 : Définition d'un modèle d'embryogenèse somatique du blé dur (*Triticum durum* Desf.) propice à l'application d'une méthode de transformation génétique**

FERNANDEZ S., COUMANS M.

Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétale Appliquée UMII, Place Eugène Bataillon. Case 002, 34095 Montpellier Cedex 5, France

---

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est une céréale tétraploïde *circum* méditerranéenne, utilisée pour confectionner les pâtes et la semoule.

Dans le but d'en améliorer génétiquement les variétés, la transgénèse offre une alternative intéressante, celle de pouvoir introduire spécifiquement dans le génome d'une plante, le ou les gènes désirés. L'application des méthodes de transformation génétique (Biolistique,

Electroporation, *Agrobacterium tumefaciens*...) nécessite l'établissement de systèmes hautement embryogènes. Chez le blé dur, de tels systèmes ont été initiés sur cal à partir du scutellum d'embryons immatures de blé dur [1] ou par l'intermédiaire de protoplastes [2]. Toutefois, les 2 techniques décrites nécessitent un temps de culture *in vitro* important et il est admis que c'est l'un des facteurs impliqués dans l'apparition des variations somaclonales [3].

Nous avons donc cherché à définir un système d'embryogenèse somatique de préférence d'origine unicellulaire ou oligocellulaire rapide et à haut rendement de régénération à partir du scutellum de l'embryon immature de blé dur.

Une étude morphologique, complétée d'une étude histologique, a permis de déterminer la chronologie de la réponse des embryons immature *in vitro*. Dès le 5<sup>e</sup> jour de culture sur milieu d'induction, les proembryons sont visibles à la surface du scutellum de l'embryon immature cultivé sur milieu MS modifié. Après 21 jours de culture, 3 types de réponses sont observés : cals non régénérants, cals régénérants mais non embryogènes et explants embryogènes. Après 28 jours de culture, certains embryons somatiques sont déjà développés et montrent une structure foliacée semblable à un scutellum. Après 42 jours de culture, les explants embryogènes sont repiqués sur milieu de germination. Une optimisation du taux de conversion des embryons somatiques en plantes vertes est actuellement en cours d'étude. Ces données rejoignent les résultats obtenus récemment sur d'autres cultivars de blé dur [4].

Une étude histologique plus détaillée des premiers jours de culture a démontré que ces embryons somatiques sont d'origine oligocellulaire. Pendant cette même période, l'estimation des index mitotiques des zones sous-épidermique et épidermique supérieure et inférieure du scutellum montre que ces embryons somatiques proviennent de divisions de l'épiderme supérieur du scutellum. D'autre part, cette même étude permet de définir de façon plus précise la transition entre les divisions normales d'harmonisation de croissance de l'épiderme et la reprise des divisions de l'épiderme lié à l'ontogenèse des embryons somatiques ce qui permet de mieux cibler dans le temps la période de bombardement. Le modèle défini répond en partie aux caractéristiques recherchées puisque des embryons d'origine oligocellulaire s'individualisent dès les 8 premiers jours de culture et sont complètement formés après 6 semaines de culture. De plus, l'origine épidermique stricte des embryons somatiques est susceptible de faciliter la transformation génétique.

Toutefois, le potentiel embryogène de ce modèle s'est révélé nettement insuffisant (13,6 % de cals embryogènes). Le repiquage des explants à partir de 7 jours après l'initiation des cultures a conduit à une perte du potentiel embryogène. Ceci a suggéré une implication de l'éthylène dans le processus d'embryogenèse somatique du blé dur, déjà démontrée pour l'embryogenèse somatique du maïs [5] et pour l'androgenèse du blé dur [6]. Un mg.l<sup>-1</sup> d'AgNO<sub>3</sub> augmente significativement la capacité embryogène des explants *via* le pourcentage de cals embryogènes (x 6) ainsi que le nombre moyen d'embryons somatiques par explants (x 22).

Ce modèle a servi de point de départ à des manipulations de transformation génétique par biolistique (canon type PIG). La comparaison des effets de 2 plasmides (pJIT 72 et pRPA-RD 109 fournis par Rhône-Poulenc) sera présentée. Des expérimentations d'expression transitoire ont permis d'optimiser les paramètres du canon utilisé (distance de tir, pression d'hélium). Une étude histologique menée en parallèle devrait permettre de localiser la couche cellulaire la plus touchée par les impacts de billes. L'influence du tir sur la capacité embryogène des explants et les essais de transformation stable sont en cours.

## Bibliographie

1. BORELLI G.M., LUPOTTO E., LOCATELLI F., WITTMER G., Long-term embryogenic cultures in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Plant Cell Rep., 10 (1991) 296-299.
2. YANG Y.M., HE D.D., SCOTT K.J., Plant regeneration from protoplasts of durum wheat (*Triticum durum* Desf. D6962). Plant Cell Rep., 12 (1993) 320-323.
3. SKIRVIN R.M., MC PHEETERS K.D., NORTON M., Sources and frequency of somaclonal variation. HortSci., 29 (1994) 1231-1237.
4. BOMMINENI V.R., JAUHAR P.P., Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. Plant Sci., 116 (1996) 197-203.

5. VAIN P., FLAMENT P., SOUDAIN P., Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea Mays* L. J. Plant Physiol., (1989) 537-540.
6. SÉVENIER R., COUMANS M., Ethylene production and involvement during the first steps of durum wheat (*Triticum durum*) anther culture. Physiol. Plant., 96 (1996) 146-151.

---

## **B14 : Production massive de transgènes OCI de pomme de terre (cv. Kennebec) par le système de transfert *Agrobacterium tumefaciens***

LE V.Q., MICHAUD D.

---

Nous avons développé un protocole à haut rendement pour la transformation et la régénération de plantules de pomme de terre (cv. Kennebec) à partir d'explants foliaires matures. Une lignée d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche LB4404) transformée avec un plasmide encodant le marqueur de sélection nptII et le gène de résistance aux insectes oryzacystatin I (OCI) a été utilisée comme vecteur de transfert. Dans les conditions utilisées, environ 80 % des explants avaient produit des cals résistants à la kanamycine (5 à 15 cals par explant) après 4 semaines sur milieu de sélection. Après 5-6 semaines sur milieu d'organogénèse, les cals ont produit des bourgeons dans une proportion de 60 % à raison de 10 à 20 bourgeons distincts par cal, alors que des tiges de 5 cm prélevées à partir des cals et placées sur milieu d'enracinement avaient développé des racines après 10 jours en présence de kanamycine (50 mg/l). En bref, le cycle de transformation/régénération décrit est d'environ 10 semaines, avec un taux de transformation de 700-800 plantes par 100 explants traités. L'intégration du gène nptII au génome des plantes enracinées a été confirmée dans la quasi-totalité des cas. Les plantules obtenues, de phénotype normal, montraient une gamme variée de taux d'expression (de 0 à 2,5 % des protéines solubles) et d'activité OCI. Des rendements de transformation similaires ont été obtenus pour d'autres variétés de pomme de terre et pour d'autres gènes d'intérêt.

---

## **B15 : Transformation génétique du tournesol (*Helianthus annuus* L.) par *Agrobacterium tumefaciens* : analyse de différents facteurs**

MOLINIER J.

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes 12, rue du Général Zimmer 67084 Strasbourg Cedex

---

Le tournesol, *Helianthus annuus* L., est devenu au début des années 90 la deuxième espèce oléagineuse cultivée au monde après le soja. On le retrouve actuellement dans les zones tempérées de l'Europe, de l'Asie et de l'Amérique du Sud. Ses akènes contiennent un fort pourcentage d'huile constituée essentiellement d'acides gras insaturés (plus de 65 % d'acide linoléique et 20 % d'acide oléique) mais très peu d'acides gras saturés (moins de 12 % d'acides palmitique et stéarique). Actuellement la valorisation du tournesol à des fins alimentaires (huile pour salade, pour cuisson, margarine) représente 80 % de la valeur économique de la plante. D'un autre côté l'utilisation du tournesol à des fins non alimentaires (détergents, peintures, produits pharmaceutiques) nécessiterait une modification de son équilibre en acides gras et pourrait permettre aux agriculteurs de valoriser leurs cultures sur un marché économique novateur et porteur. Pour cela, des programmes de sélections ont été mis en œuvre, mais ces procédés s'avèrent long et limités. L'évolution du génie génétique permet d'appréhender ce

problème d'une façon plus directe et plus ciblée. L'introduction, grâce à *Agrobacterium tumefaciens*, de gènes codant pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse des acides gras, telles des thioestérases, permettant la production de chaînes moyennes d'acides gras, ou des désaturases, permettant la modification de l'équilibre entre acides gras saturés et insaturés, est envisagée. Plusieurs protocoles de transformation du tournesol par *Agrobacterium tumefaciens* ont été développés (Everett et al. 1987, Schrammeijer et al. 1990) mais ils s'avèrent d'une fiabilité aléatoire dans l'optique d'une application à grande échelle. En se basant sur le travail de Burrus et al. (1997) nous avons fait une étude systématique de l'ensemble des facteurs intervenant dans le protocole de transformation. Dans un premier temps les quantifications ont été réalisées après 4 semaines de culture par la visualisation de l'expression d'un gène marqueur codant pour la  $\beta$ -D glucuronidase (GUS). L'utilisation de différentes combinaisons de facteurs de croissance (AIA/BAP, TIBA/BAP, TDZ/AIA) nous a permis d'augmenter le pouvoir de régénération et de formation de pousses adventives des axes embryonnaires. Le nombre de cellules dans lesquelles l'ADN-T des agrobactéries a été transféré a aussi été augmenté en multipliant les sites de blessure sur les explants. La virulence des agrobactéries (souches GV 2260 et EHA 105) vis-à-vis des axes embryonnaires a été stimulée grâce à l'utilisation de composés phénoliques activant les gènes vir de l'agrobactérie. La combinaison de ces différents facteurs nous a permis d'optimiser le protocole existant et d'obtenir, après 4 semaines de culture, une fréquence beaucoup plus élevée de plantules présentant l'expression de gènes rapporteurs tels que le GUS ou la GFP (Green Fluorescent Protein). La deuxième phase du travail reposera sur le maintien de l'expression de ces gènes marqueurs après le transfert en serre. L'ensemble de ces travaux sera appliqué à l'introduction des gènes codant pour l'acyl-[ACP] thioestérase et la  $\Delta 9$ -stéaroyl-[ACP]désaturase sous le contrôle de promoteurs spécifiques de l'embryon ainsi qu'à l'analyse de la descendance des plantes transgéniques et la stabilité de l'expression du transgène.

## Bibliographie

---

1. BURRUS et al. (1997). *Molecular Breeding* 2: 329-338.
2. EVERETT et al. (1987). *Biotechnology* 5: 1201-1204.
3. SCHRAMMEIJER et al. (1990). *Plant Cell Reports* 9: 55.

---

## **B16 : Ingénierie de la stérilité-mâle à l'aide d'un gène mitochondrial non-édité. Restauration de la fertilité par la stratégie des ARNm antisens**

MOURAS M.

Laboratoire de Biologie Cellulaire & Biotechnologie Végétale Université de Bordeaux II. Laboratoire de Biologie Moléculaire. Institut de Biochimie & Génétique Cellulaires - CNRS, Bordeaux.

---

Le contrôle de la fertilité mâle chez les plantes est un des problèmes clés des programmes d'amélioration des plantes ; il repose fréquemment sur l'exploitation de la stérilité mâle cytoplasmique (CMS) qui se traduit par un avortement du pollen. Dans les systèmes alloplasmiques, la CMS est due à une incompatibilité noyau-cytoplasme. Des observations réalisées chez le Maïs et le Pétunia émergent l'hypothèse que la CMS est due à une déficience de la machinerie bioénergétique mitochondriale. Au niveau cellulaire, cette déficience est corrélée avec une dégénérescence des cellules du tapis de l'anthere sans perturber le développement de la plante. Nous avons émis l'hypothèse que toute altération du fonctionnement des complexes

impliqués dans la chaîne bioénergétique pourrait conduire à une baisse substantielle et permanente du taux d'ATP synthétisé, sans perturber les étapes essentielles du développement de la plante. Cette situation pourrait se traduire par le phénotype mâle-stérile. Notre démarche a consisté à importer dans les mitochondries une protéine du complexe ATP synthase, la sous-unité 9 (ATP 9) modifiée (protéine non fonctionnelle), laquelle entrerait en compétition avec la protéine endogène. Notre projet fait appel à une fonction mitochondriale concernant la modification du message génétique (editing). Nous avons disposé de deux formes du gène *atp9* (édité et non édité) dont les protéines seraient le produit d'un message avant editing ou après editing, ce dernier correspondant à la forme fonctionnelle. En effet, il a été montré chez le blé que la protéine fonctionnelle dérive d'un ARNm édité alors que les produits des messagers non-édités ne sont pas détectables. L'importation dans les mitochondries est assurée par la fusion en 5' d'*atp9* de la préséquence du gène *cox IV* de levure. Ce gène chimère a été placé sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV dont l'activité est constitutive. Ce projet a pour but le contrôle de la formation du pollen par une approche qui prétend se rapprocher d'une situation qui se produit *in vivo*. L'application de ce modèle sera étendue à des plantes d'intérêt agronomique. En outre ce modèle d'étude constitue un modèle très intéressant pour comprendre la fonction de l'editing chez les plantes

## OBTENTION DE PLANTES MÂLE-STÉRILES

Les plantes transgéniques, renfermant la forme non-éditée ou la forme éditée du gène, ont un phénotype comparable voire identique aux plantes témoins contenant uniquement le gène de sélection ou aux plantes non transformées *N. tabacum* SR1 : croissance pondérale, vitesse de croissance, nombre d'entre-nœuds, taille et forme des feuilles, nombre et forme des fleurs. La fertilité des plantes transgéniques obtenues après transformation avec le gène *atp 9* non-édité est en revanche considérablement modifiée : 19 % d'entre-elles présentent une fertilité très réduite, 31 % sont mâle-stériles. La stérilité et la semi-fertilité est corrélée avec une production de pollen très faible, voire nulle, et une viabilité (test de germination du pollen) qui varie de 0 à 40 % pour les plantes stériles à semi-fertiles contre 50 à 90 % pour les fertiles. La mise en évidence de la protéine transgénique a été analysée à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre la partie préséquence du transgène. Ces anticorps ne réagissent pas avec les protéines des plantes témoin non transformées ; ils présentent par contre, chez les plantes transgéniques, une réaction croisée, avec deux types de protéines : une protéine cytosolique de 15 kD représentant le précurseur qui après maturation donne naissance à une protéine mitochondriale de 12 kD. L'analyse cytologique de plantes mâle stériles a montré que le tapis des anthères est affecté. La dégénérescence des mitochondries en est le symptôme. Ces résultats sont conformes avec l'hypothèse formulée à savoir que le dysfonctionnement mitochondrial est corrélé avec la présence de la protéine transgénique sous sa forme non-éditée.

## RESTAURATION DE LA FERTILITÉ DES PLANTES TRANSGÉNIQUES MÂLE-STÉRILES PAR LE BIAIS DE LA STRATÉGIE « ARN ANTISENS »

Dans un souci d'application de notre travail au domaine de l'amélioration des plantes, la restauration de la fertilité des plantes transgéniques mâle-stériles s'avérait absolument nécessaire. Pour ce faire, une expérimentation similaire à celle déjà réalisée pour produire des plantes mâle-stériles a été mise en œuvre. Elle est toutefois basée sur la stratégie des « antisens » à savoir que des plantes transgéniques fertiles exprimant le gène *atp9* disposé en position inverse dans le vecteur de transformation devraient produire des ARNm antisens dont la séquence nucléotidique devrait être complémentaire de celle produite dans les plantes transgéniques mâle-stériles. Des croisements entre des plantes mâle-stériles (parent femelle) avec des plantes produisant l'ARN antisens (parent mâle) étaient susceptibles de conduire à des plantes fertiles-restaurées. Des lignées restauratrices hémizygote (H4.4) et homozygote (H4.4s) de tabac transgénique exprimant fortement le transcrit antisens *coxIV-atp9*, sous le contrôle du promoteur constitutif 35S, ont été créées. Une lignée mâle-stérile homozygote (H2.11s) a

également été sélectionnée pour les études de restauration de la fertilité. L'intégrité des transgènes dans les plantes a été contrôlée par la technique de PCR à l'aide de primers qui permettent de distinguer les constructions sens des antisens, ainsi que la liaison entre le marqueur de sélection et le transgène. Les croisements (H2.11s) x (H4.4s) et (H2.11s) x (H4.4) ont été réalisés. La descendance F1 issue de ce croisement a fait l'objet d'investigations au niveau phénotypique, génétique et moléculaire :

- Au niveau phénotypique, les plantes F1 présentent des caractéristiques semblables à celles des parents. En ce qui concerne la fertilité, deux cas de figure sont à distinguer:

- la descendance du croisement (H2.11s) x (H4.4s) produit des plantes chez lesquelles le pollen relativement abondant est capable de germer, sur un milieu approprié, dans des proportions allant de 26 à 85 % suivant les plantes. La F1 produit en moyenne 2,3 g de graine par plante.

- La descendance du croisement (H2.11s) x (H4.4) produit deux types de plantes : des plantes produisant du pollen fertile, et des plantes produisant du pollen stérile. Ces dernières ne produisent pas de graines. Quant aux plantes fertiles, elles produisent approximativement la même quantité de graines que les plantes sauvages.

- Au niveau génétique, la descendance F1 du croisement (H2.11s) x (H4.4s) ségrège dans les proportions 4:0 (fertile : stérile). Les graines de 2 plantes prises au hasard dans la population F1 ont été semées en serre pour suivre la ségrégation de la fertilité à la génération F2. La descendance des 2 plantes analysées, ségrège le caractère fertile : stérile dans les proportions 13:3, selon un schéma classique de ségrégation mendélienne. La descendance F1 du croisement (H2.11s) x (H4.4) ségrège dans les proportions 1:1 (fertile : stérile).

- Au niveau moléculaire, des expériences de RT-PCR réalisées sur des descendants des croisements de H2.11s avec les plantes hétéro- et homozygotes « restauratrices anti-sens », montrent que les transcrits correspondant au transgène antisens sont détectables dans toute la descendance. Par contre, les transcrits du transgène non-édité, inducteur de la stérilité mâle, sont absents. Dans tous les individus où l'expression du transgène *atp9* non-édité est inhibée par les antisens, le phénotype est mâle fertile. Des expériences de Northern blot sur des ARNm poly(A<sup>+</sup>) confirment les résultats de RT-PCR et corréleront parfaitement avec la ségrégation du phénotype mâle-stérile. À la lumière de ces résultats, il est possible de : (a) confirmer la fonctionnalité du transgène *coxIV-atp9-non-édité* (contrôlé par le promoteur 35S de CaMV) dans l'induction de la stérilité mâle chez le tabac. (b) conclure à l'effet restaurateur de la construction antisens et considérer la lignée H4.4 s comme restauratrice de la fertilité.

