

**Summary** **Impact of oilseed rape expressing proteinase inhibitors on coleopteran pests and honeybees**

L. JOUANIN, ET AL.

Oilseed rape is an important crop in Europe. Many insect pests, mainly Coleoptera, feed on various parts of this plant at different cultural stages. Creation of genotypes more resistant to these pests via the expression of entomopathogenic proteins in transgenic plants could reduce the need for chemical control. We thus investigated a new crop protection strategy based on the expression of proteinase inhibitors (PI) in transgenic oilseed rape to limit attacks by coleopteran pests (Table 1). A serine PI (CII from soy-

bean) and a cysteine PI (OCI from rice; Figure 1), able to inhibit the corresponding proteolytic activities of these coleoptera in vitro, were introduced via Agrobacterium in a spring genotype. The expression level of the introduced PIs was determined and homozygous plants were obtained. The impact of ingestion of OCI or/and CII expressed in transgenic plants was evaluated on growth, development and mortality of four pests feeding on oilseed rape (Baris, cabbage stem flea beetle, rape stem weevil and cabbage seed weevil). Although there were no marked deleterious effects on the tested insects, various reactions were observed at the gut proteinase level (Table 2). The results are discussed along with prospects for improving pest resistance in oilseed rape. Moreover, since this

plant is highly attractive to pollinating insects, possible deleterious effects on honeybees were assessed. Honeybees mainly possess serine gut proteinases, and in vitro feeding bioassays allowed us to determine a threshold dose (50-100 µg/g pollen) of a serine PI, beyond which negative effects were observed (Figure 2). Consumption of high doses of this PI (much higher than those produced in leaves) induced protease overproduction (Table 3). However, oilseed rape expressing serine PI, under control of the CaMV 35S promoter, does not threaten honeybees, since the transgene is not expressed in pollen and nectar.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 531-6.

## Transformation génétique des arbres tropicaux fixateurs d'azote de la famille des casuarinacées

Claudine/Franche, Didier/Bogusz, Laurent/Laplaze,  
Aziz Smouni, Florence/Auguy, Maryannick/Rio,  
Thierry/Frutz, Émile/Duhoux

Les casuarinacées sont des plantes actinorhiziennes possédant la propriété remarquable de vivre en symbiose avec un actinomycète du sol appelé *Frankia*. Lors de cette symbiose, une structure originale, le nodule actinorhizien ou actinorhize, est formée sur le système racinaire de la plante après un processus com-

plexe d'interactions cellulaires et moléculaires entre la plante hôte et le micro-organisme. Comme dans le cas des symbioses rhizobium-légumineuses, le nodule actinorhizien est le siège de la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac qui est ensuite assimilé par la plante sous forme d'acides aminés.

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 [1]. 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 mycorrhiziens,

les *Casuarina* peuvent croître sur des sols marginaux carencés en azote et en phosphore. La famille des *Casuarina* comprend des essences tropicales, sub-tropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3 000 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 *Casuarina* 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 [2]. 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.

C. Franche, D. Bogusz, L. Laplaze, F. Auguy, M. Rio, T. Frutz, E. Duhoux : Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire des arbres (IRD/GeneTrop), 911, avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France.

A. Smouni : Laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire, Faculté des sciences, Université Mohammed-V, Ibn Batouta Street, BP 1014, Rabat, Maroc.

Tirés à part : C. Franche



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 équipe 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. Dans cet article, nous présenterons brièvement l'intérêt des nodules actinorhiziens, puis nous décrirons le système de transformation génétique développé dans notre laboratoire sur deux espèces de casuarinacées, *Casuarina glauca* et *Allocasuarina verticillata*; enfin, nous expliquerons ce qu'apportent les plantes transgéniques pour la connaissance et l'amélioration des casuarinacées.

## Le nodule actinorhizien, un modèle de racine induite par un micro-organisme

Les nodules actinorhiziens sont des structures coralloïdes composées de multiples lobes nodulaires. Contrairement aux nodules des légumineuses qui sont des organes nouveaux, les nodules des plantes actinorhiziennes s'apparentent à des racines adventives modifiées. Comme pour une racine latérale, les primordia de nodules sont initiés dans les cellules du péricycle, toujours à l'opposé des pôles de protoxylème. Le lobe nodulaire possède également une structure typique de racine avec une vascularisation centrale, entourée d'un endoderme, d'un cortex et d'un périoderme [3]. Les signaux émis par *Frankia* induisent donc chez la plante un phénomène que l'on peut qualifier de rhizogénèse symbiotique.

L'étude des gènes exprimés lors de la différenciation des nodules actinorhiziens va donc à la fois constituer un modèle pour comprendre les interactions plante-micro-organisme et permettre de mieux appréhender le programme génétique de la rhizogénèse adventive.

## *Agrobacterium tumefaciens*, un vecteur naturel pour la transformation des casuarinacées

La transformation génétique consiste à introduire dans la plante hôte un ou plusieurs caractères génétiques nouveaux (les transgènes) qui vont s'intégrer de façon stable dans le génome végétal et être transmis à la descendance. Depuis l'obtention de la première plante transgénique en 1983, les techniques de transformation génétique se sont diversifiées et ont été appliquées à de nombreuses espèces végétales. On peut cependant classer les méthodes de transfert génétique en deux catégories : celles qui consistent à utiliser un vecteur biologique, *Agrobacterium*, et celles qui font pénétrer le matériel génétique par des moyens physiques (électroporation ou microprojectiles accélérés à grande vitesse) [4]. Nous avons profité de la sensibilité naturelle des casuarinacées à *A. tumefaciens* pour mettre au point une stratégie de transformation génétique qui est désormais utilisée en routine dans notre laboratoire. Cette stratégie mise au point sur deux espèces différentes, *C. glauca* et *A. verticillata*, est résumée sur la figure. Des épicotyles excisés de plantes âgées de 1 à 2 mois sont mis en contact avec la souche d'*A. tumefaciens* C58C1 [5]. Cette souche porte le plasmide pGV2260, qui est un plasmide Ti délété de ses oncogènes (c'est-à-dire qu'il n'induit plus de phénotype tumoral sur les plantes hôtes), et un vecteur de transformation binaire BIN19 contenant les gènes que l'on souhaite transférer à la plante hôte. Pour mettre au point la stratégie de transformation, le vecteur de transformation BIN19 contient un marqueur de résistance à un antibiotique, la kanamycine, qui va permettre la sélection des cellules transformées, ainsi qu'un gène rapporteur permettant de suivre le transfert de matériel génétique dans les cellules végétales ; il s'agit du gène *uidA*, appelé plus communément gène GUS ; il code pour l'enzyme de la  $\beta$ -glucuronidase dont l'activité enzymatique se traduit par l'apparition de cristaux bleu indigo lorsque les tissus transformés sont incubés en présence du substrat X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucuronide) [6]. Les explants blessés sont placés pendant 3 jours en présence des agrobactéries (phase de co-culture), puis transférés sur

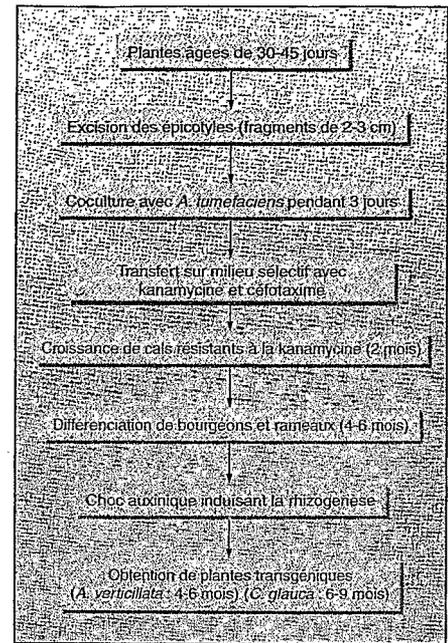


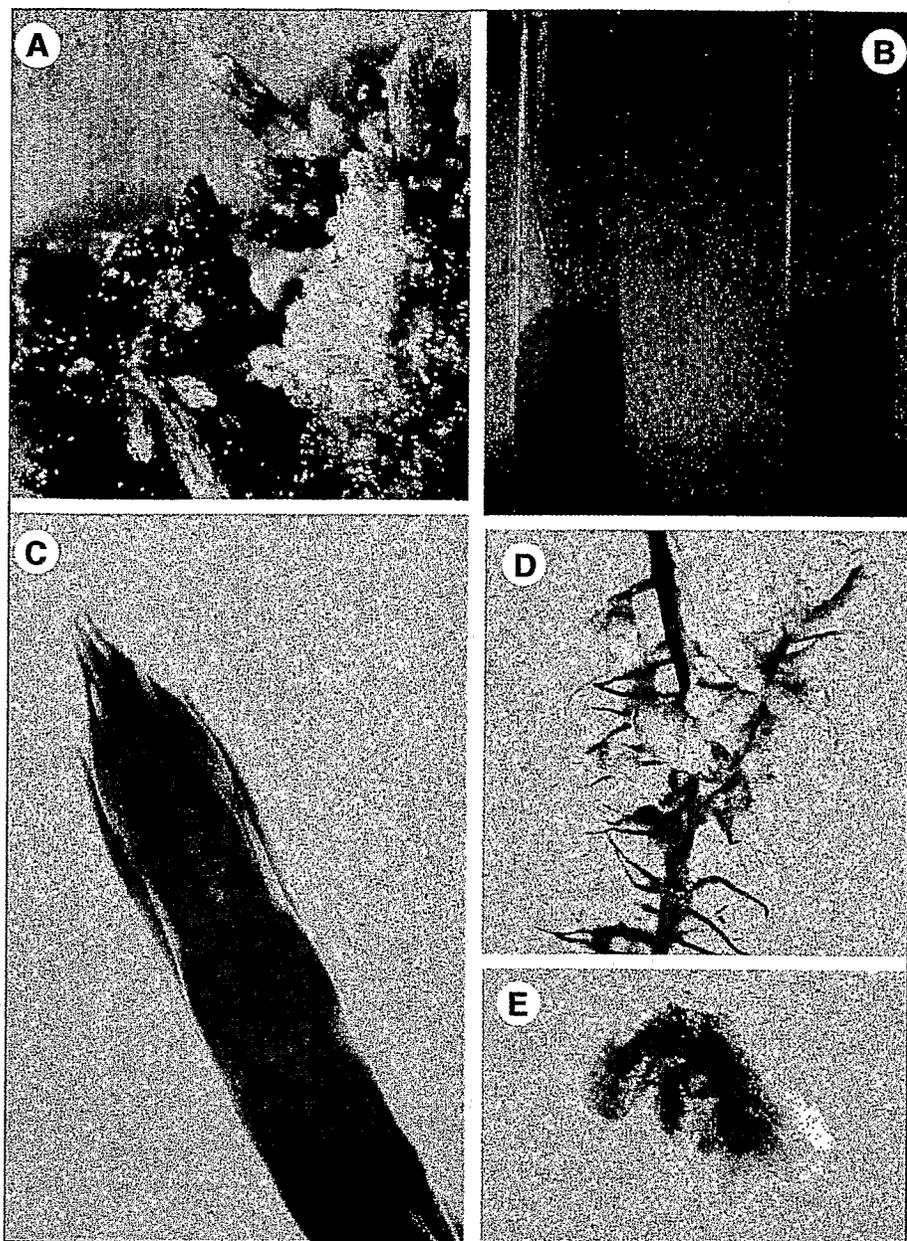
Figure. Les différentes étapes de la transformation génétique des casuarinacées par *Agrobacterium tumefaciens*.

Figure. Procedure for genetic transformation of Casuarinaceae trees using *Agrobacterium tumefaciens*.

un milieu sélectif contenant de la kanamycine à 100 mg/l et de la céfotaxime à 250 mg/l dont la fonction est d'éliminer l'excès d'agrobactéries. Deux mois après la co-culture, on observe l'apparition de cals résistants à la kanamycine sur les sites de blessure des explants et en l'espace de 4 à 6 mois, des rameaux transgéniques mesurant plusieurs centimètres sont différenciés sur les cals (photo 1A). Un choc auxinique permet l'enracinement de ces rameaux (photo 1B). Cette technique de transformation génétique assure la production de nombreuses plantes transgéniques sur 70 % des cals transgéniques d'*A. verticillata* [7]. Pour *C. glauca*, la régénération des plantes est un peu plus lente (6 à 9 mois) et la différenciation de un à trois rameaux n'est observée que sur 40 % des cals [8].

## Caractérisation des casuarinacées transgéniques

Afin d'apporter la preuve que le matériel végétal régénéré à partir des cals résistants à la kanamycine est bien transformé génétiquement,



**Photo 1.** Régénération de plantes transgéniques d'*Allocasuarina verticillata* nodulées par *Frankia*. **A** : Différenciation de bourgeons et de rameaux sur un cal d'*A. verticillata* transformé par *A. tumefaciens*. **B** : Plante témoin (à gauche) et plante transgénique d'*A. verticillata* (à droite). **C** : Expression du gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase dans un rameau transgénique d'*A. verticillata*. **D** : Obtention de nodules sur des racines transgéniques d'*A. verticillata* inoculées par le microorganisme *Frankia*. **E** : Expression du gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase dans un nodule transgénique d'*A. verticillata*.

**Photo 1.** Regeneration of *Allocasuarina verticillata* transgenic plants nodulated by *Frankia*. **A** : Differentiation of buds and shoots on a callus of *A. verticillata* genetically transformed by *A. tumefaciens*. **B** : Nontransformed plant (left) and transgenic *A. verticillata* plant (right). **C** : Expression of the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in a transgenic shoot of *A. verticillata*. **D** : Nodules on a transgenic root of *A. verticillata* inoculated by *Frankia*. **E** : Expression of the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in a transgenic nodule of *A. verticillata*.

quement, nous avons effectué plusieurs analyses.

Tout d'abord nous avons recherché la présence d'une activité  $\beta$ -glucuronidase à la fois par des analyses qualitatives (tests his-

tochimiques) et quantitatives (tests fluorométriques). Environ 86 % des plantes étudiées présentent une activité  $\beta$ -glucuronidase plus ou moins intense (photo 1C). 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 [9].

La présence des gènes *uidA* (gène rapporteur) et *nptII* (gène de résistance à la kanamycine) a ensuite été mise en évidence par analyse PCR à la fois dans les cals de *C. glauca* [10] et dans les plantes transgéniques d'*A. verticillata* [7]. Une amplification avec des oligonucléotides spécifiques d'un gène de virulence d'*A. tumefaciens*, *virDI*, a également été réalisée afin de vérifier l'absence de contamination par *Agrobacterium*. Ce gène présent sur le plasmide Ti désarmé est en effet nécessaire au transfert de matériel génétique de la bactérie à l'hôte végétal, mais n'est pas transmis à la plante. 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 transféré (ou ADN-T) a donc été partiellement délété au cours de son passage dans la cellule végétale ;
  - enfin une amplification avec les oligonucléotides spécifiques du gène *virDI* 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 [7, 10]. 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.

## Propriétés symbiotiques des plantes transgéniques

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 de

*C. glauca* et d'*A. verticillata*. Les plantes d'*A. verticillata* ont été inoculées avec la souche de *Frankia* Allo2 et celles de *C. glauca* par la souche THR.

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 2 mois, 68,5 % des plantes transgéniques et 57 % des plantes témoins non transformées ont développé de un à douze nodules (*photo 1D-E*). L'activité réductrice d'acétylène est identique dans les nodules transgéniques et témoins [7].

Dans le cas des plantes transgéniques de *C. glauca*, une vingtaine de plantes témoins et de plantes transformées ont été inoculées par *Frankia* en chambre de culture. Environ 65 % des plantes contenant ou non les transgènes ont développé une moyenne de cinq nodules. Les plantes nodulées poussent dans un milieu nutritif carencé en azote, ce qui traduit la fonctionnalité des nodules.

## La transformation génétique, un outil important pour l'étude des gènes symbiotiques dans les plantes actinorhiziennes

Afin d'étudier des gènes végétaux spécifiquement exprimés lors de la symbiose actinorhizienne, nous avons entrepris au laboratoire l'isolement des ARN messagers (ARNm) de jeunes nodules de *C. glauca*, puis nous avons synthétisé les ADN complémentaires (ADNc) correspondants. Une trentaine de clones spécifiquement exprimés ou surexprimés dans les nodules ont ainsi été purifiés et partiellement séquencés. Des homologues avec des banques de données ont été recherchés et ont permis de caractériser certains gènes symbiotiques de *C. glauca* : gènes d'hémoglobine, de chalcone synthase, de méthyllothionéine, d'alpha-tubuline, etc. [11].

Les systèmes de transformation génétique que nous avons développés interviennent à plusieurs niveaux pour contribuer à la caractérisation de ces gènes symbiotiques. Tout d'abord, les plantes transgéniques permettent l'étude de la région promoteur des gènes symbiotiques. Au sein de ces séquences promoteurs se trouvent diffé-

rents modules qui vont contribuer à la régulation de l'expression des gènes correspondants. L'approche suivie consiste à réaliser une fusion entre la séquence promoteur choisie et le gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase. L'expression spatio-temporelle de ces constructions chimères est ensuite étudiée au cours de l'établissement de la symbiose avec *Frankia*. La localisation de l'activité  $\beta$ -glucuronidase permet d'émettre des hypothèses sur la fonction des gènes. Cette approche est en cours de réalisation pour le promoteur d'un gène de méthyllothionéine identifié lors de l'analyse de la banque d'ADNc de *C. glauca*.

Une autre stratégie permettant de préciser la fonction d'un gène dans la symbiose consiste à diminuer ou éteindre l'expression de ce gène en introduisant une construction chimère contenant le gène étudié en orientation inverse dite orientation « antisens ». L'analyse physiologique des plantes transgéniques dans lesquelles l'un des gènes symbiotiques n'est plus exprimé permet de préciser le rôle de ce gène tant pour la nodulation que pour la croissance de la plante. Une telle stratégie est actuellement suivie chez *C. glauca* avec un gène de méthyllothionéine et avec un gène codant pour un facteur de transcription.

## Utilisation des casuarinacées transgéniques pour comparer les symbioses actinorhiziennes et les symbioses rhizobium-légumineuses

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les symbioses actinorhiziennes ne sont pas identiques aux symbioses rhizobium-légumineuses, tant par la structure des nodules que par la nature des microorganismes symbiotiques [12]. On peut donc s'interroger sur l'aptitude des plantes actinorhiziennes à reconnaître et exprimer des séquences promoteurs de gènes de légumineuses.

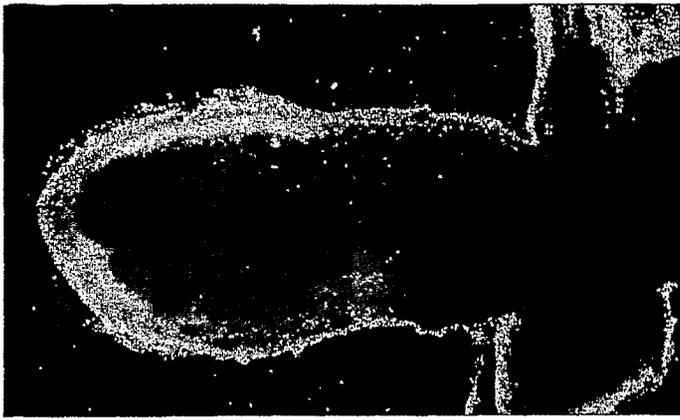
C'est pour répondre à cette question que nous avons entrepris d'introduire chez *C. glauca* et *A. verticillata* le gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase sous contrôle de dif-

férents promoteurs hétérologues d'hémoglobine. L'hémoglobine est une métalloprotéine transporteuse d'oxygène que l'on trouve en grande quantité dans les nodules des légumineuses (on parle de leghémoglobine chez les légumineuses). Cette protéine est également présente dans les nodules de certaines plantes actinorhiziennes telles que *C. glauca*. L'approvisionnement en oxygène du nodule est soumis à des exigences contradictoires : d'une part, la nitrogénase bactérienne qui permet la fixation de l'azote est inactivée de façon irréversible par de faibles concentrations d'oxygène mais, d'autre part, la fixation d'azote est très demandeuse en énergie fournie par les chaînes respiratoires. La fonction de l'hémoglobine symbiotique est de fournir un flux important d'oxygène dans le nodule, tout en maintenant une faible pression d'oxygène libre dans l'environnement immédiat de la nitrogénase [13]. Deux promoteurs d'hémoglobine symbiotique ont été étudiés dans notre laboratoire : le promoteur *lbc3* provenant d'un gène de leghémoglobine de soja (légumineuse/rhizobium) [14] et le promoteur *Pa* provenant d'un gène d'hémoglobine de *Parasponia andersonii* (arbuste de la famille des ulmées), la seule non-légumineuse connue pour établir une symbiose avec rhizobium [15]. Ces promoteurs ont été placés en amont du gène rapporteur GUS, puis introduits grâce à *Agrobacterium* chez *C. glauca* et *A. verticillata*. Les plantes transgéniques correspondantes ont ensuite été inoculées par le micro-organisme *Frankia*, et les nodules transgéniques ont été analysés. Pour les deux constructions, on observe une expression du gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase dans les cellules végétales infectées par *Frankia* et situées dans la zone de fixation d'azote (voir la *photo 2* pour la construction *lbc3-GUS*) [16].

Ces résultats traduisent donc l'aptitude des cellules végétales des casuarinacées à reconnaître et exprimer des séquences régulatrices provenant de légumineuses. Au cours de l'évolution, il y a donc eu une forte conservation de la régulation de l'expression de ces gènes.

## Introduction de gènes d'intérêt dans les espèces forestières ligneuses

Si la transformation génétique est, comme nous l'avons souligné précédemment, un



**Photo 2.** Analyse histochimique d'un nodule transgénique d'*Allocasuarina verticillata* exprimant le gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase sous contrôle du promoteur du gène de leghémoglobine *lbc3* de soja. La coloration bleue est observée dans les cellules fixatrices d'azote infectées par le micro-organisme *Frankia*.

**Photo 2.** Histochemical analysis of a transgenic nodule of *Allocasuarina verticillata* expressing the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene under control of the *lbc3* leghemoglobin promoter from soybean. Indigo blue staining is located in the nitrogen-fixing cells infected by the microsymbiont *Frankia*.

the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene under control of the *lbc3* leghemoglobin promoter from soybean. Indigo blue staining is located in the nitrogen-fixing cells infected by the microsymbiont *Frankia*.

outil important pour les études fondamentales des gènes végétaux, elle constitue également un outil précieux pour les programmes d'amélioration génétique des espèces ligneuses. En effet, les programmes d'amélioration génétique classiques fondés sur la reproduction sexuée sont longs. Le temps nécessaire pour atteindre la maturité reproductive, la grande taille des individus et la fréquente incompatibilité entre les espèces rendent difficiles les expériences d'hybridation. Parmi les gènes d'intérêt qui ont fait leur preuve chez les espèces ligneuses forestières, on peut citer des gènes de résistance à des herbicides, des gènes conférant des résistances à des insectes soit par la production d'entotoxines de *Casuarina*, soit par l'expression d'inhibiteurs de protéases [17] et, enfin, de nombreux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la lignine qui ont été clonés en vue d'obtenir un bois présentant une quantité réduite de lignine ou d'obtenir une lignine plus facilement hydrolysable, ce qui réduirait le coût lié à l'extraction de la cellulose lors de la fabrication de pâte à papier [18]. De telles approches sont désormais possibles avec les casuarinacées. Il est cependant nécessaire, pour la mise en place de tels programmes en collaboration avec les pays du Sud, qu'une législation permettant le suivi des organismes génétiquement modifiés soit établie dans chacun des pays concernés.

## Conclusion

La maîtrise d'un système de transformation génétique chez les casuarinacées ouvre de nombreuses perspectives. En effet, peu d'espèces ligneuses tropicales ont été transformées ; la possibilité de disposer d'un système de trans-

fert de gènes efficace et relativement rapide va permettre de faire progresser les connaissances fondamentales des espèces ligneuses tropicales : identification de vecteurs d'expression constitutifs ou tissus spécifiques, caractérisation de gènes exprimés dans les racines et les nodules, étude de la stabilité des transgènes au cours du développement d'un arbre.

Ce système va également profiter à la connaissance des symbioses fixatrices d'azote [19]. À court terme, on pourra mieux comprendre le programme génétique qui permet la différenciation des nodules actinorhiziens et attribuer une fonction aux gènes symbiotiques nouvellement isolés chez *Casuarina*. À long terme il devrait être possible d'améliorer ces symbioses en modulant l'expression de certains gènes symbiotiques. L'étude comparative des symbioses actinorhiziennes et des symbioses rhizobium-légumineuses va également fournir des informations sur l'évolution des symbioses fixatrices d'azote et sur les possibilités de transférer l'aptitude à fixer l'azote dans de nouvelles associations symbiotiques artificielles ■

### Remerciements

La mise en place du programme de transformation génétique des casuarinacées a été possible grâce au soutien de l'IRD (Institut français de recherche pour le développement en coopération), du CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) et d'un contrat européen de la DGXII (ERTBTS3\*CT940278).

### Références

1. National Research Council. *Casuarinas : nitrogen-fixing trees for adverse sites*. Washington D.C. : National Academy Press, 1984 ; 118 p.

2. Diem HG, Dommergues YR. Current and potential uses and management of *Casuarina* in the tropics and subtropics. In : Schwintzer RC, Tjepkema JD, eds. *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. San Diego : Academic Press Inc., 1990 : 317-42.

3. Duhoux E, Diouf D, Gherbi H, Franche C, Ahée J, Bogusz D. Le nodule actinorhizien. *Acta Bot Gallica* 1996 ; 143 : 593-609.

4. Potrykus I. Gene transfer to plants : assessment of published approaches and results. *Annu Rev Plant Mol Biol* 1991 ; 42 : 205-25.

5. Vancanneyt G, Schmidt R, O'Conner-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M. Construction of an intron-containing marker gene : splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 1990 ; 220 : 245-50.

6. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusion :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 1987 ; 6 : 3901-7.

7. Franche C, Diouf D, Le QV, et al. Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocasuarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J* 1997 ; 11 : 897-904.

8. Franche C, Bogusz D, Smouni A, Diouf D, Gherbi H, Duhoux E. Transformation in *Casuarina glauca*. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 1998 : 44 (sous presse).

9. Finnegan J, McElroy D. Transgene stability. In : Owen MRL, Pen J, eds. *Transgenic plants : a production system for industrial and pharmaceutical products*. New York : John Wiley and Sons Ltd, 1996 : 169-86.

10. Le QV, Bogusz D, Gherbi H, Lappartient A, Duhoux E, Franche C. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to *Casuarina glauca*, a tropical nitrogen-fixing tree. *Plant Sci* 1996 ; 118 : 57-69.

11. Bogusz D, Franche C, Gherbi H, et al. La symbiose *Casuarina-Frankia* : approche moléculaire du rôle de la plante-hôte. *Acta Bot Gallica* 1996 ; 143 : 621-35.

12. Pawlowski K, Bisseling T. Rhizobial and actinorhizal symbioses : what are the shared features ? *Plant Cell* 1996 ; 6 : 1899-913.

13. Appleby CA. The origins and functions of haemoglobin in plants. *Sci Progress* 1992 ; 76 : 365-98.

14. Stougaard J, Sandal NN, Gron A, Kuhle A, Marker KA. 5' analysis of the soybean *lbc3* gene : regulatory elements required for promoter activity and organ specificity. *EMBO J* 1987 ; 6 : 3565-9.

15. Bogusz D, Llewellyn DJ, Craig S, Dennis ES, Appleby CA, Peacock WJ. Nonlegume leghemoglobin genes retain organ-specific expression in heterologous transgenic plants. *Plant Cell* 1990 ; 2 : 633-41.

16. Franche C, Diouf D, Laplaze L, et al. The soybean (*lbc3*), *Parasponia* and *Trema* hemoglobin gene promoters retain their symbiotic and non-symbiotic specificity in transgenic *Casuarina*. Implications for the evolution of hemoglobin genes and root nodule symbioses. *Mol Plant Microbe Interaction* 1998 ; 11 : 887-94.

17. Sederoff RR. Forest trees. In : Wang K, Herrera-Estrella A, van Montagu M, eds. *The transformation of plants and soil microorganisms*. Cambridge : Cambridge University Press, 1995 : 150-63.

18. Baucher M, Monties B, van Montagu M, Boerjan W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev Plant Sciences* 1998 ; 17 : 125-97.

19. Franche C, Laplaze L, Duhoux E, Bogusz D. Actinorhizal symbioses : recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Crit Rev Plant Sci* 1997 ; 17 : 1-28.

## Résumé

**Transformation génétique des arbres tropicaux fixateurs d'azote de la famille des casuarinacées**

C. FRANCHE, ET AL.

Les arbres tropicaux de la famille des casuarinacées sont capables d'établir une symbiose avec un actinomycète du sol, *Frankia*. La relation plante-micro-organisme se traduit par la différenciation de nodules racinaires qui ont la propriété de fixer l'azote atmosphérique. Grâce à leurs faibles exigences nutritionnelles et à leur remarquable tolérance à la sécheresse, ces arbres jouent un rôle important dans les régions tropicales, à la fois pour la protection des sols et la production de bois ou de biomasse.

L'utilisation d'un vecteur biologique naturel, *Agrobacterium tumefaciens*, a permis la mise au point d'une technique de transformation génétique chez deux espèces de casuarinacées : *Allocauarina verticillata* et *Casuarina glauca*. Des plantes transgéniques ont été régénérées, caractérisées et leur aptitude à développer des nodules fonctionnels après inoculation par *Frankia* a été montrée.

La maîtrise d'une technique de transfert génétique, alliée à l'utilisation des outils de la biologie moléculaire, permettra d'obtenir de nombreuses informations sur les échanges moléculaires entre *Casuarina* et *Frankia*, et d'améliorer les performances de ce système symbiotique. Par une bonne connaissance des mécanismes contribuant à la régulation de l'expression chez *Casuarina*, l'introduction de gènes d'intérêt dans ces ligneux tropicaux peut être envisagée et devrait contribuer à accélérer les programmes d'amélioration génétique de ces arbres.

## Summary

**Genetic transformation of tropical nitrogen-fixing Casuarinaceae tree species**

C. FRANCHE, ET AL.

Tropical trees of the Casuarinaceae family develop a symbiotic association with a soil actinomycete (*Frankia*) that fixes nitrogen in root nodules. Based on this symbiotic association and their natural drought tolerance, Casuarinaceae species are multipurpose pioneer trees - they are currently used in tropical and subtropical areas with poor forest resources for sand stabilization, soil rehabilitation, fuelwood and timber production, shelter belts and field crop protection. The biological vector *Agrobacterium tumefaciens* was used to develop a genetic transformation procedure for two species, *Allocauarina verticillata* and *Casuarina glauca*. Transgenic trees were regenerated, characterized, and their ability to develop nitrogen-fixing nodules was demonstrated.

*A. verticillata* and *C. glauca* are the first actinorhizal trees ever to have been genetically transformed. It is quite likely that transgenic Casuarinaceae will provide a major tool for investigating regulatory mechanisms that control actinorhizal gene expression and for comparison of legume and actinorhizal symbiotic genes. A better understanding of gene expression in these tropical trees will also pave the way to the introduction of agronomically useful traits.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 536-41.

**Plantes transgéniques : de l'estimation à la gestion des risques**

Fabrice D. Pessel, Jane Lecomte, Pierre-Henri Gouyon

**Cadre et contexte des études sur les risques**

Le génie génétique est une technologie qui, 15 ans après les premiers travaux expérimentaux en laboratoire, trouve des applications dans divers domaines, en particulier celui de l'amélioration des plantes cultivées. Aujourd'hui, les grandes firmes semencières disposent d'une large gamme d'espèces végétales transgéniques d'intérêts économiques exprimant différents caractères comme des tolérances aux herbicides, aux ravageurs (insectes, nématodes), aux pathogènes (virus, champignons) ou présentant de nouvelles caractéristiques alimentaires (production d'acides aminés ou d'acides gras spécifiques), ornementales (couleur des fleurs) voire pharmaceutiques (production de lipase, albumine, hémoglobine).

Articles de presse polémiques, publicités provoquantes, prises de position politiques contradictoires, manifestations violentes, publications pseudo-scientifiques, mise en place de débats parlementaires, d'une Conférence de Citoyens, d'un Comité de Biovigilance, proposition de moratoire... tout est dit, tout est entrepris aujourd'hui lorsqu'il est question des plantes génétiquement modifiées, ou plus largement d'organismes génétiquement modifiés. Ainsi, au nom de la « transparence », voulue par tous, mais bien souvent pour servir des intérêts divergents, ce dossier déjà difficile à appréhender à la base ne cesse de se

complexifier aux yeux du grand public alors que, parallèlement, les connaissances scientifiques et techniques progressent, même si cette progression est lente et que plus les connaissances s'affinent, plus les inconnues s'accumulent.

Cet étonnant paradoxe trouve en partie son explication dans le contexte social actuel. Les affaires du sang contaminé et de la vache folle, pour ne citer que les plus voyantes, remettent aujourd'hui en cause la confiance que pouvait accorder notre société au système de décision [1], en particulier celui chargé d'autoriser la dissémination des plantes transgéniques. De plus, dès que se sont mis en place les protocoles d'estimation *a priori* des impacts potentiels de ces nouveaux organismes sur notre environnement, nous avons très rapidement constaté que la diversité, à la fois des caractères introduits et des espèces modifiées par transgénèse, rendait impossible une évaluation globale de ces risques. Seules des études au cas par cas pouvaient être mises en place, pour une espèce donnée, pour un caractère donné et dans un environnement donné. Il semble que le caractère non généralisable du discours ait été très mal perçu par la société qui s'accommode plus volontiers de concepts globalisants et normatifs : « c'est tout bien ou tout mal ». Cet aspect relatif des réponses scientifiques s'accompagne souvent d'un discours complexe et technique qui contribue au rejet des biotechnologies, plus souvent par incompréhension (parfois justifiée d'ailleurs) qu'en réelle connaissance de cause. Le recours à l'irrationnel est alors un mécanisme de défense très efficace qui, relayé par les médias porte-parole de l'opinion, l'emporte bien souvent sur le discours rationnel des scientifiques. Ces comportements irrationnels sont légitimes et ne peuvent être condamnés tant qu'ils demeurent individuels et

F.D. Pessel, J. Lecomte, P.-H. Gouyon : Laboratoire Evolution et Systématique, CNRS-URA 2154, Bâtiment 362, Université Paris XI-Orsay, 91405 Orsay cedex, France.

Tirés à part : F.D. Pessel

d'études et de recherches francophones

# Agricultures

*Le rôle de l'agriculture dans le développement durable*

*Le rôle de l'agriculture*  
Les biotechnologies,  
pour quoi faire ?  
Didier Spire

Emmanuel Picard

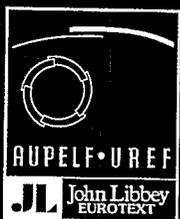
Gérard Azoulay Sylvie Bonny

Georges Ducreux, et al. Michel Delseny

Ismail El Hadrami, et al. Robert Haïcour, et al. Erik Auboiron, et al. Serge Hamon, et al. Orlando Lopez-Baez, et al. Alain Rival, et al. Valérie Hocher, et al. Jean-Marie Kinet, et al. Miloudi Nachit, et al. Jeanne Zoundjihékon, et al. Florent Engelmann

*Le rôle de l'agriculture dans le développement durable*  
Anne-Marie Chèvre, et al. Lise Jouanin, et al. Claudine Franche, et al. Fabrice D. Pessel, et al. Éric Lainé, et al. André Charrier, et al.

*Le rôle de l'agriculture dans le développement durable*  
Philippe Monneveux



Prix du numéro :  
120 FF pays  
du Nord  
60 FF pays  
du Sud

PM 267

Volume 7 Numéro 6 pages 423 à 574 Novembre-Décembre 1998

ISSN n° 1166-7699

