

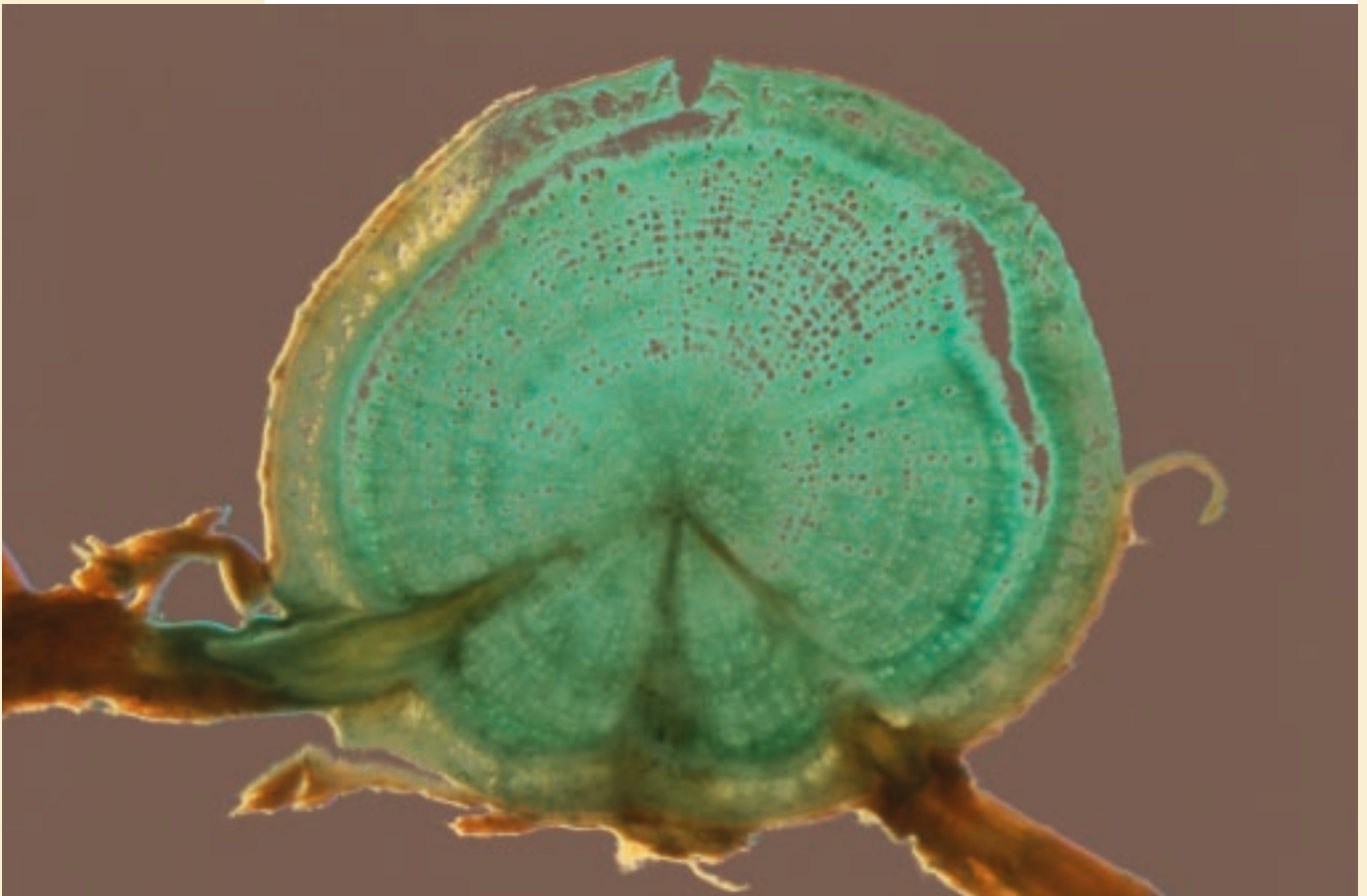
Antoine GALIANA¹
Claudine FRANCHE²

¹ Cirad-forêt
Programme arbres
et plantations
TA 40/01
34398 Montpellier Cedex 5
France

² Institut de recherche
pour le développement
(Ird)
Laboratoire rhizogenèse
symbiotique
(UR 142, Umr 1098)
BP 64501
911, avenue Agropolis
34394 Montpellier Cedex 5
France

La transformation génétique chez les arbres forestiers : principales stratégies utilisées et leurs applications

Les auteurs présentent un bilan des acquis dans le domaine de la transformation génétique des arbres forestiers. Cet état de l'art englobe les méthodes de transformation, les gènes introduits (tolérance aux herbicides, résistance aux insectes, modification de la floraison ainsi que de la qualité ou de la quantité de lignine...), les bénéfices et les risques liés aux arbres transgéniques.



Expression du gène rapporteur de la β -glucuronidase dans une coupe transversale de tige d'une plante transgénique d'*Allocasuarina verticillata* 35S-gus âgée de deux ans.

*Expression of the β -glucuronidase reporter gene in a section of the stem of a two year-old transgenic 35S-gus *Allocasuarina verticillata* plant.*

Photo C. Franche.

RÉSUMÉ

LA TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE CHEZ LES ARBRES FORESTIERS : PRINCIPALES STRATÉGIES UTILISÉES ET LEURS APPLICATIONS

La transformation génétique est l'une des biotechnologies les plus prometteuses pour contourner certains des obstacles majeurs rencontrés dans les programmes d'amélioration génétique des plantes par la voie sexuée, notamment chez les arbres aux longs cycles de reproduction. La transformation génétique permet en effet d'introduire un ou plusieurs gènes conférant aux plantes cibles des caractères nouveaux sans globalement perturber l'architecture génomique de la plante. Les différentes étapes de la transformation, allant de l'introduction d'Adn étranger dans une cellule jusqu'à son expression par la plante, sont d'abord dépendantes du degré d'aptitude d'une espèce végétale donnée à la régénération *in vitro*, c'est-à-dire de sa capacité à produire des plantes entières à partir de différents tissus ou organes par caulogénèse adventive ou par embryogénèse somatique. Ceci explique les progrès plus lents obtenus dans l'obtention de plantes transformées chez les espèces ligneuses par rapport aux espèces herbacées. Entre les deux méthodes majeures de transformation, celle utilisant *Agrobacterium* a donné le plus de résultats positifs chez les arbres, surtout chez les angiospermes, tandis que la microprojection reste un outil privilégié chez les espèces peu sensibles à la transformation bactérienne comme les gymnospermes. De nombreux gènes d'intérêt ont pu être ainsi introduits chez les arbres, comme ceux conférant une résistance aux herbicides ou aux insectes. Actuellement, les recherches portent principalement sur la modification et l'introduction de gènes de la chaîne de biosynthèse des lignines dans le but d'améliorer le rendement d'extraction de la pâte à papier.

Mots-clés : *Agrobacterium*, biosynthèse lignines, culture de tissus, microprojection, organogénèse adventive, transgénèse.

ABSTRACT

GENETIC TRANSFORMATION IN FOREST TREES: MAIN STRATEGIES AND APPLICATIONS

Genetic transformation holds out particular promise as a means of overcoming some of the main obstacles encountered in programmes for genetic improvement in plants by sexual reproduction, especially in trees with long reproductive cycles. Genetic transformation enables one or more genes to be introduced in order to confer new characters to the target species without causing any overall disruption in the architecture of the plant's genome. The different stages in transformation, from the introduction of foreign DNA into a cell up to its expression by the plant, depend first of all on the ability of a given plant species to regenerate *in vitro*, in other words on its capacity to produce whole plants from different tissues or organs by *de novo* caulogenesis or somatic embryogenesis. This accounts for the slower rate of progress in obtaining genetically transformed plants in woody species, compared to herbaceous species. Of the two main transformation methods, the use of *Agrobacterium* has produced more positive results in trees, especially angiosperms, while microprojection is still the best method for species that are less sensitive to bacterial transformation, such as the gymnosperms. Many useful genes have thus been introduced into trees, including genes for resistance to herbicides or to insects. Current research is mainly focused on modifying and introducing genes from the lignin biosynthesis chain, in order to improve paper pulp extraction yields.

Keywords: *Agrobacterium*, lignin biosynthesis, tissue culture, microprojection, *de novo* organogenesis, transgenesis.

RESUMEN

LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA EN LOS ÁRBOLES FORESTALES: PRINCIPALES ESTRATEGIAS EMPLEADAS Y SUS APLICACIONES

La transformación genética es una de las biotecnologías más prometedoras para evitar algunos de los principales obstáculos encontrados en los programas de mejora genética de las plantas mediante reproducción sexual, particularmente, en árboles con largos ciclos de reproducción. La transformación genética permite introducir uno o más genes que confieren a las plantas elegidas caracteres nuevos sin alterar globalmente la estructura genómica de la planta. Las distintas etapas de la transformación que van de la introducción de ADN extraño en una célula hasta su expresión por la planta dependen, primeramente, del grado de aptitud de una especie vegetal determinada para su regeneración "in vitro", es decir, de su capacidad para producir plantas enteras a partir de distintos tejidos u órganos mediante caulogénesis adventicia o embriogénesis somática. Esto explica que los adelantos sean más lentos en la obtención de plantas transformadas en las especies leñosas que en las herbáceas. De los dos métodos principales de transformación, el que utilizaba *Agrobacterium* arrojó más resultados positivos en los árboles, sobre todo en angiospermas, mientras que la microproyección sigue siendo una herramienta excelente en las especies poco sensibles a la transformación bacteriana como las gimnospermas. De esta forma, se pudieron introducir numerosos genes interesantes en los árboles, como los que confieren resistencia a los herbicidas o a los insectos. Actualmente, las investigaciones se dirigen principalmente a la modificación e introducción de genes de la cadena de biosíntesis de las ligninas para mejorar el rendimiento de extracción de la pasta de papel.

Palabras clave: *Agrobacterium*, biosíntesis ligninas, cultivo de tejidos, microproyección, organogénesis adventicia, transgénesis.

Introduction

La transformation génétique est l'une des biotechnologies les plus prometteuses pour lever certains des obstacles majeurs rencontrés dans le cadre de programmes d'amélioration génétique des plantes par la voie sexuée. Chez les arbres, ces obstacles sont notamment liés aux longs cycles de reproduction, à une pollinisation contrôlée souvent difficile à mettre en œuvre, aux cycles saisonniers de dormance et au manque d'informations sur la génétique et l'hérédité de caractères importants. La transformation génétique permet ainsi d'introduire un ou plusieurs gènes conférant aux plantes cibles des caractères nouveaux, sans globalement perturber l'architecture génomique de la plante.

L'introduction et l'expression d'Adn étranger dans la cellule végétale nécessitent plusieurs étapes : introduction d'Adn exogène dans la cellule, intégration de cet Adn dans le génome hôte et expression des transgènes (c'est-à-dire des gènes transférés), croissance et division de cette cellule, et régénération d'une plante entière à partir des cellules transformées. De nombreux résultats positifs ont été obtenus chez les espèces herbacées, tandis que les progrès restent beaucoup plus lents chez les espèces ligneuses, principalement en raison d'une aptitude à la régénération généralement faible chez ces dernières. En effet, le degré d'aptitude d'une espèce végétale à la régénération *in vitro*, consistant en une production de plantes entières à partir de différents tissus ou organes par caulogenèse adventive ou par embryogenèse somatique, est un facteur déterminant dans l'efficacité du processus de transformation.

La première régénération d'un arbre forestier transgénique a été obtenue en 1986 (PARSONS *et al.*, 1986) sur le peuplier, qui est resté depuis lors l'espèce ligneuse modèle pour la transformation génétique et sur laquelle les études sont les plus avancées. Le premier gymnosperme transgénique, l'épicéa, a été régénéré en 1993, grâce

aux progrès réalisés avec la mise au point de la technique de transfert direct par microprojection. La transgénèse végétale représente pour les arbres forestiers un moyen d'accélérer les programmes d'amélioration génétique, grâce à l'introduction de gènes d'intérêt ; elle est également un outil de recherche fondamentale qui va permettre de comprendre les bases moléculaires de la physiologie des arbres, comme par exemple la formation du bois, ou les phénomènes de dormance (AHUJA, 2000 ; MINOCHA, WALLACE, 2000 ; PENA, SÉGUIN, 2001). La plupart des travaux de transformation génétique entrepris avec succès chez les arbres forestiers l'ont été à partir de matériel juvénile, souvent d'explants issus de jeunes germinations qui sont beaucoup plus aptes à régénérer que du matériel plus âgé. Les exemples de transformation de matériel adulte sélectionné sont très rares, sauf chez le peuplier, en raison précisément de son aptitude élevée à la régénération.

Espèces forestières transformées génétiquement

Depuis les premiers résultats publiés sur le peuplier, la régénération d'arbres forestiers transformés de façon stable a été obtenue majoritairement chez les angiospermes et chez quelques gymnospermes (tableau I). Bien qu'il soit difficile d'établir une liste exhaustive de tous les travaux réalisés chez les arbres, on constate que le peuplier recouvre à lui seul presque la moitié des publications consacrées à l'ensemble des espèces ligneuses forestières. Entre les deux grandes méthodes de transformation utilisées, celle employant *Agrobacterium* a donné largement plus de résultats positifs, du moins chez les angiospermes. Chez les gymnospermes, moins sensibles à la transformation bactérienne, la microprojection a été l'outil de transformation privilégié jusqu'à la mise au point des souches hypervirulentes d'*Agrobacterium tumefaciens*.

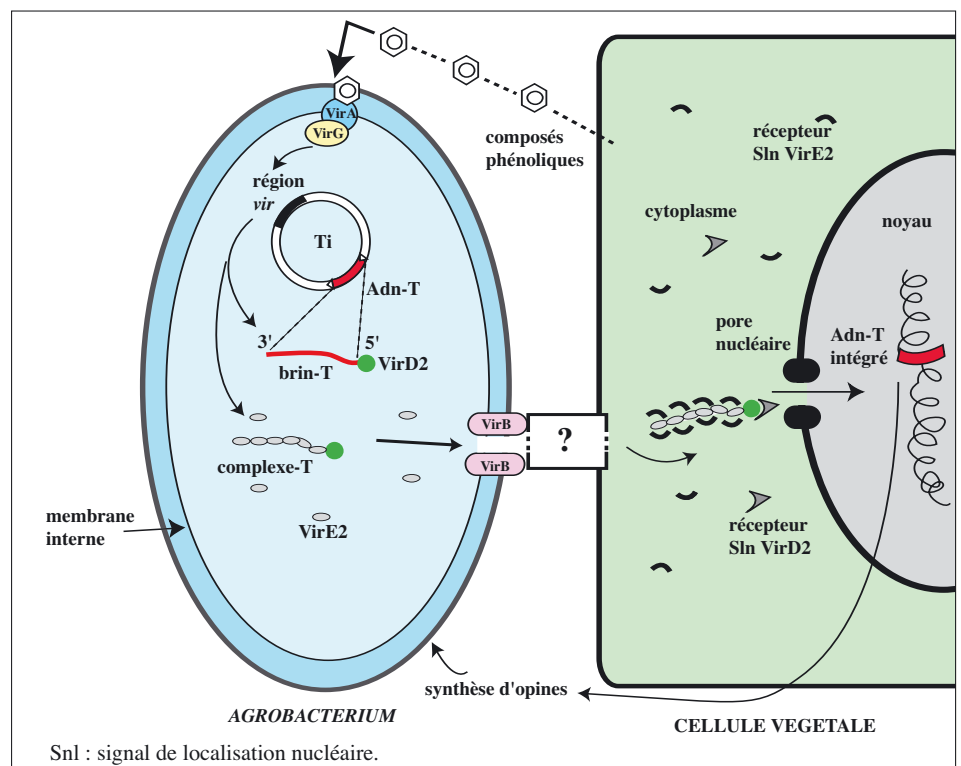


Figure 1. Principales étapes de la transformation génétique d'une cellule végétale par *Agrobacterium* (d'après FRANCHE, DUHOIX, 2001).
Main stages in the genetic transformation of a plant cell using *Agrobacterium* (from FRANCHE, DUHOIX, 2001).

Transformation par les agrobactéries

Les résultats de transformation génétique les plus nombreux et avancés ont été obtenus chez les peupliers (hybrides en particulier), en raison de leur très bonne aptitude à la régénération de plantes entières à partir d'explants variés et de leur grande sensibilité aux agrobactéries. La plupart des peupliers transgéniques ont été obtenus par transformation avec *A. tumefaciens*. Seul *Populus tremula* x *P. alba* a été transformé par *A. rhizogenes*. Toutes les autres espèces d'angiospermes transformées à ce jour, à l'exception du tulipier, ont pu l'être grâce à des souches désarmées d'*A. tumefaciens*, soit par ordre chronologique d'obtention : le noyer (*Juglans regia*),

le neem (*Azadirachta indica*), le liquidambar (*Liquidambar styraciflua*), *Allocasuarina verticillata*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus*, le bouleau (*Betula pendula*), le châtaignier (*Castanea sativa*) et le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia*). Parmi ces dernières espèces, seuls *Allocasuarina verticillata* et le robinier faux-acacia ont aussi été transformés par *A. rhizogenes*.

Le faible nombre de résultats positifs de transformation obtenus chez les eucalyptus, malgré le grand nombre de travaux entrepris chez de nombreuses espèces du genre, s'explique surtout par leur faible aptitude à régénérer (MAC RAE, VAN STADEN,

1999). Cependant, plusieurs travaux entrepris par de grands groupes privés (Shell, ATC, Forbio, Ence, Aracruz cellulose, Nippon Paper Industries...), mais dont les résultats détaillés ne sont pas accessibles car déposés dans le cadre de brevets, ont abouti à l'obtention de plantes transformées chez différentes espèces d'eucalyptus non citées dans le tableau I.

Chez les conifères, l'obtention d'une transformation stable via l'utilisation de souches désarmées d'*A. tumefaciens* n'a été acquise que récemment, trois espèces étant concernées : le mélèze (*Larix kaempferi* x *L. decidua*), l'épicéa (*Picea abies*) et *Pinus strobus* (tableau I).

Tableau I a.
Résultats de transformation stable obtenus chez les arbres forestiers.

Espèces	Méthode	Gènes transférés	Explants	Résultats
Gymnospermes				
<i>Larix decidua</i> (mélèze)	<i>A. rhizogenes</i>	Adn-T	Germinations	Arbres transgéniques régénérant un chevelu racinaire
<i>Larix decidua</i> (mélèze)	-	<i>nptII</i> , <i>aroA</i>	-	Régénération de plantes Km ^R et Glyphosate ^R
<i>Larix kaempferi</i> x <i>L. decidua</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII</i>	Tissus embryogènes	Régénération de plantes Kanamycine ^R
<i>Larix laricina</i>	Microprojection	<i>nptII</i> , <i>uidA</i>	Tissus embryogènes	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Picea abies</i>	Microprojection	-	Tissus embryogènes	-
<i>Picea abies</i>	<i>A. tumefaciens</i>	-	-	-
<i>Picea abies</i>	Microprojection	<i>bar</i>	Tissus embryogènes	Régénération de plantes Phosphinothricine ^R (Basta)
<i>Picea abies</i>	Microprojection	<i>nptII</i> , <i>uidA</i> , <i>bar</i>	Tissus embryogènes	Régénération de plantes Généticine ^R , exprimant Gus et Glufosinate ^R
<i>Picea abies</i>	Microprojection	<i>bar</i> , <i>spi 2</i>	Tissus embryogènes	Régénération de plantes Phosphinothricine ^R à activité peroxydasique accrue
<i>Picea glauca</i>	Microprojection	<i>nptII</i> , <i>uidA</i> , <i>cryIA</i>	Embryons somatiques	Plantes Km ^R exprimant Gus et gènes de toxine Bt
<i>Picea mariana</i>	Microprojection	-	Tissus embryogènes	-
<i>Picea mariana</i>	Microprojection	<i>hpt</i> , <i>uidA</i>	Embryons somatiques	Plantes Hygromycine ^R exprimant Gus
<i>Pinus pinaster</i>	Microprojection	<i>hpt</i> , <i>uidA</i>	Embryons somatiques	Plantes Hygromycine ^R exprimant Gus
<i>Pinus pinaster</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>hpt</i> , <i>uidA</i>	Embryons somatiques	Plantes Hygromycine ^R exprimant Gus
<i>Pinus radiata</i>	Microprojection	<i>nptII</i> , <i>uidA</i>	Tissus embryogènes	Plantes Généticine ^R exprimant Gus
<i>Pinus radiata</i>	Microprojection	<i>nptII</i> , <i>uidA</i> , <i>bar</i>	Tissus embryogènes	Régénération de plantes Généticine ^R , exprimant Gus et Glufosinate ^R
<i>Pinus radiata</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII</i> , <i>uidA</i>	Tissus embryogènes	Plantes Généticine ^R exprimant Gus
<i>Pinus strobus</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII</i> , <i>uidA</i> ou gGfp	Tissus embryogènes	Plantes Km ^R exprimant Gus ou Gfp
<i>Pinus taeda</i>	Microprojection	<i>nptII</i> , <i>uidA</i> , <i>cryIA</i>	Embryons zygotiques	Plantes Km ^R exprimant Gus et gènes de toxine Bt
<i>Pinus taeda</i>	<i>A. tumefaciens</i>	-	-	-

Abréviations. *als* : gène de l'acétyl lactate synthase conférant la résistance au chlorosulfuron ; *aroA* : gène de la 5-enopyruvyl shikimate synthase ; *bar* : gène codant pour la phosphinothricine acétyltransférase ; *gCad* : gène codant pour la cinnamyl alcool déshydrogénase ; *cat* : gène de la chloramphénicol acétyltransférase ; *g4CL* : gène de la 4-coumarate CoA ligase (biosynthèse lignines) ; *gComt* : gène codant pour la Caffeic-O-méthyltransférase ; *cryIA* : gène de la toxine Bt (= endotoxine de *Bacillus thuringiensis*) ; GA-20 oxydase : *gibberellic acid-20 oxydase* ; gGfp : gène de *green fluorescent protein* ; *hpt* : gène de l'hygromycine phosphotransférase ; *ipt* : gène de l'isopentenyl transférase (enzyme de biosynthèse des cytokinines) ; Km^R : résistance à la kanamycine ; *luxAB* : gène marqueur de la luciférase ; *nptII* : gène de la néomycine phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine ; *pin 2* (= IP) : gène d'inhibiteur de protéase (*potato proteinase inhibitor II*) ;

Transformation par les méthodes directes

La méthode de microprojection est peu utilisée chez les angiospermes. Ainsi, une seule espèce de peuplier hybride semble avoir été transformée avec succès par cette méthode, après bombardement de protoplastes régénérants (tableau I). Chez les autres angiospermes, le tulipier et le liquidambar ont pu être transformés de façon stable par cette méthode.

En revanche, chez les gymnospermes, la majorité des espèces transformées de façon stable ont été obtenues par microprojection (tableau I).

Parmi les autres méthodes de transformation directe possibles, seule l'électroporation de protoplastes a abouti à l'obtention d'arbres transgéniques et chez une seule espèce hybride de peuplier (*Populus tremula* x *P. alba*) (CHUPEAU *et al.*, 1994).

Références

HUANG <i>et al.</i> , In Vitro Cell Dev. Biol., 1991
SHIN <i>et al.</i> , Can. J. For. Res., 1994
LEVÉE <i>et al.</i> , Plant Cell Rep., 1997
KLIMASZEWSKA <i>et al.</i> , Can. J. For. Res., 1997
WALTER <i>et al.</i> , Can. J. For. Res., 1999
WENCK <i>et al.</i> , Plant Mol. Biol., 1999
BRUKHIN <i>et al.</i> , Plant Cell Rep., 2000
BISHOP-HURLEY <i>et al.</i> , Plant Cell Rep., 2001
ELFSTRAND <i>et al.</i> , Plant Cell Rep., 2001
ELLIS <i>et al.</i> , Bio/Technol., 1993
CHAREST <i>et al.</i> , In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant, 1996
TIAN <i>et al.</i> , Plant Cell Rep., 2000
TRONTIN <i>et al.</i> , Ann. For. Sci., 2002
TRONTIN <i>et al.</i> , Ann. For. Sci., 2002
WALTER <i>et al.</i> , Plant Cell Rep., 1998
BISHOP-HURLEY <i>et al.</i> , Plant Cell Rep., 2001
CERDA <i>et al.</i> , Plant Cell Tissue Organ Cult., 2003
LEVÉE <i>et al.</i> , Mol. Breed., 1999
TANG et TIAN, J. Exp. Bot., 2003
WENCK <i>et al.</i> , Plant Mol. Biol., 1999

spi 2 : gène de la peroxydase anionique de tabac ;
uidA (= Gus) : partie codante du gène de la β -glucuronidase.

Encadré 1.

Transformation génétique par *Agrobacterium*.

La transformation génétique des arbres forestiers, comme celle des espèces herbacées, est réalisable suivant deux grands types de méthodes : l'une, dite de transfert par des vecteurs biologiques, utilise le pouvoir pathogène d'*Agrobacterium tumefaciens* et d'*Agrobacterium rhizogenes*, deux bactéries du sol ; l'autre, dite de transfert direct, consiste à introduire de l'Adn étranger dans le noyau de la cellule à l'aide de systèmes physiques (encadré 2) (AHUJA, 2000). L'infection par *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* se traduit par l'intégration d'un fragment d'Adn bactérien simple brin dans le génome de la plupart des plantes dicotylédones et de quelques monocotylédones (pour revues, voir ZUPAN *et al.*, 2000 ; FRANCHE, DUHOIX, 2001). L'intégration et l'expression de ces fragments d'Adn sont responsables des maladies de la « galle du collet » pour *A. tumefaciens* et du « chevelu racinaire » pour *A. rhizogenes*, qui se manifestent respectivement par l'apparition d'une tumeur et d'une prolifération racinaire au niveau des sites d'infection.

Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium tumefaciens contient un mégaplasmide de 150 à 250 kilopaires de bases, appelé plasmide Ti¹ (« *Tumor inducing plasmid* » = pTi). Ce plasmide Ti porte cinq régions principales : une région de virulence (région *vir*), une région T (Adn de transfert ou Adn-T), une région où sont situés les gènes de dégradation des opines (*opc*), l'origine de répllication² (*ori*) et une région responsable du transfert par conjugaison³ du plasmide.

L'Adn-T, sous sa forme simple brin (« *T-strand* » = brin T), est le seul segment du plasmide Ti transféré dans la cellule végétale. Chez les souches sauvages d'*A. tumefaciens*, cette région porte des gènes (dits oncogènes) impliqués dans la synthèse de phytohormones (auxines et cytokinines) qui sont à l'origine de la prolifération des cellules tumorales. Les tissus tumoraux synthétisent une classe spécifique de molécules de faible masse moléculaire, les opines. Ce sont des dérivés de sucres et d'acides aminés dont la synthèse est déterminée par des gènes de l'Adn-T. La nature des opines dépend du plasmide Ti présent dans la souche d'*Agrobacterium*, ce qui a permis une classification des bactéries (souches à nopaline, octopine ou succinamopine). La région de virulence (région *vir*) comporte différents opérons⁴ qui codent pour des enzymes intervenant dans le transfert du brin T.

Agrobacterium rhizogenes

Comme *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* contient un mégaplasmide d'environ 250 kpb, appelé plasmide Ri (« *Root inducing plasmid* » = pRi), qui porte un Adn-T, une région *vir* et une région de catabolisme des opines analogues à celles des pTi. Les pRi sont également répartis en différentes classes selon le type d'opine qu'ils codent (souches à agropine, mannopine et cucumopine).

Les fonctions codées par l'Adn-T du plasmide Ri sont moins connues que celles du plasmide Ti, la plus grande différence entre les deux types de plasmides résidant dans la présence de gènes *rol* (« *Root loci* ») au sein de l'Adn-T du pRi, lesquels interviennent dans la synthèse de phytohormones et la formation du chevelu racinaire.

Transfert de l'Adn-T chez *Agrobacterium* et utilisation pour la transformation génétique

La figure 1 présente les principales étapes de l'interaction entre *Agrobacterium* et la plante. Les cellules végétales blessées sécrètent des composés phénoliques tels que l'acétosyringone, qui vont attirer les agrobactéries et agir sur deux gènes de virulence, *virA* et *virG*, lesquels induisent l'expression des autres opérons *vir*. Une copie simple brin de la région T est synthétisée. Des protéines (VirD2 et VirE2) s'associent au brin T avant son passage de la bactérie à la cellule végétale, qui s'effectue selon un mécanisme qui s'apparente à une conjugaison de type bactérien. L'opéron *virB* a un rôle déterminant dans ce transfert. L'adressage du brin T vers le noyau de la cellule végétale serait ensuite le résultat de la présence sur les protéines VirD2 et VirE2 de signaux de localisation nucléaire (Sln) qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques présents dans la cellule hôte. Le brin T est ensuite intégré de façon aléatoire dans l'Adn de la cellule végétale. L'étape ultime est l'expression des gènes transférés ; ceux-ci doivent donc être placés sous le contrôle de séquences dites promotrices qui sont reconnues par la machinerie de transcription de la cellule végétale.

Au niveau du plasmide Ti, aucune autre séquence que l'Adn-T, hormis les bordures, n'est transférée à la cellule hôte. Il est donc possible de remplacer les gènes présents au sein de l'Adn-T par un fragment d'Adn choisi contenant des gènes d'intérêt. Une souche d'*Agrobacterium* déléetée des oncogènes qui interviennent dans la biosynthèse d'auxine et de cytokinine est dite « désarmée ». Elle permet la régénération de plantes transgéniques présentant un phénotype identique à celui des plantes sauvages.

¹ Plasmide : molécule d'Adn extrachromosomique présente dans les bactéries.

² Répllication : processus de duplication à l'identique d'une molécule d'Adn en deux molécules filles grâce à des enzymes.

³ Conjugaison : transfert d'Adn d'une cellule bactérienne à une autre par un mécanisme impliquant un contact entre cellules.

⁴ Opéron : unité d'expression et de régulation des gènes bactériens incluant plusieurs séquences codantes. Ces gènes ont une régulation commune et contribuent généralement à la même voie métabolique.

⁵ Transcription : désigne la synthèse d'Arn à partir d'une matrice d'Adn.

Tableau I b.
Résultats de transformation stable obtenus chez les arbres forestiers.

Espèces	Méthode	Gènes transférés	Explants	Résultats
Angiospermes				
<i>Acacia mangium</i>	<i>tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Bourgeons axillaires et apex de tiges d'arbres adultes	Plantes Généticine ^R exprimant Gus
<i>Allocasuarina verticillata</i>	<i>rhizogenes</i>	Adn-T	Épicotyles, hypocotyles, cotylédons	Arbres transgéniques régénérant un chevelu racinaire
<i>Allocasuarina verticillata</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Embryons zygotiques	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Azadirachta indica</i> (neem)	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII</i>	Germinations	Plantes Km ^R
<i>Betula pendula</i> (bouleau)	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Segments nodaux et internodaux de tiges et feuilles (clones)	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Castanea sativa</i> (châtaignier)	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Hypocotyles	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Casuarina glauca</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Épicotyles	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Feuilles de plantes micropropagées	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Segments d'hypocotyle	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	-	-
<i>Juglans regia</i> (noyer)	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII</i>	Embryons somatiques	Plantes Km ^R
<i>Liquidambar styraciflua</i> (sweegtum)	Microprojection	<i>hpt, uidA</i>	Hypocotyles	Plantes Hygromycine ^R exprimant Gus
<i>Liquidambar styraciflua</i> (sweegtum)	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA, spi 2, cryIA</i>	Fragments foliaires	Plantes Km ^R exprimant Gus et ayant intégré les gènes de toxine Bt et de la peroxydase anionique du tabac
<i>Liriodendron tulipifera</i> (tulipier)	Microprojection	<i>nptII, uidA</i>	Suspension cellulaire embryogène	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>A. rhizogenes</i>	Adn-T, <i>nptII</i>	Segments d'hypocotyle	Plantes Km ^R avec chevelu racinaire
<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>hpt, uidA</i>	Segments de tiges et feuilles	Plantes Hygromycine ^R exprimant Gus
<i>Populus alba</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, bar</i>	Segments internodaux de tiges (sur clones sélectionnés)	Régénération de plantes Km ^R et Phosphinothricine ^R (Basta)
<i>Populus alba</i> x <i>P. grandidentata</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, aroA</i>	Segments de feuilles	Régénération de plantes Km ^R et Glyphosate ^R
<i>Populus alba</i> x <i>P. grandidentata</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, cat, pin 2</i>	Disques foliaires	Plantes Km ^R et Chloramphénicol ^R exprimant IP (gène d'inhibiteur de protéase actif)
<i>Populus alba</i> x <i>P. tremula</i> (peuplier faux-tremble)	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, bar</i>	Segments de tiges	Régénération de plantes Km ^R et Phosphinothricine ^R
<i>Populus deltoides</i> x <i>P. nigra</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Entre-nœuds de tiges et disques foliaires	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Populus nigra</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Disques foliaires (clones)	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Populus nigra</i> x <i>P. trichocarpa</i>	Microprojection	<i>nptII, uidA, cryIA</i>	Protoplastes	Plantes Km ^R exprimant Gus et gènes de toxine Bt
<i>Populus</i> sp.	-	g4CL (biosynthèse lignines)	-	Baisse du taux de lignine, augmentations du taux de cellulose et de croissance des plantes
<i>Populus</i> sp.	-	Gène de la férulate 5-hydroxylase (biosynthèse lignines)	-	Modification dans la composition chimique des lignines facilitant leur extractibilité
<i>Populus</i> sp.	-	Gène de la GA-20 oxydase	-	Biosynthèse gibbérélines, croissance, biomasse et longueur fibres xylème accrues
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	-	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, als</i>	-	Plantes Km ^R et Chlorsulfuron ^R
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>nptII, bar</i>	Germinations	Régénération de plantes Km ^R et Phosphinothricine ^R
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Segments de tiges et feuilles	Plantes Km ^R exprimant Gus
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, ipt</i>	Entre-nœuds de tiges micropropagées	Augmentation des teneurs en cytokinines endogènes (entre-nœuds courts)
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	Électroporation	<i>nptII, als, bar</i>	Protoplastes (clone)	Régénération de plantes Paromomycine ^R , Chlorsulfuron ^R et Phosphinothricine ^R
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Constructions anti-sens de gCad et gComt (biosynthèse lignines)	-	Baisse des activités Cad et Comt avec modification dans composition chimique des lignines facilitant leur extractibilité
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Constructions sens de gComt (biosynthèse lignines)	-	Variation de l'expression Comt selon lignées dont certaines avec baisse du taux de lignine et modification de composition chimique
<i>Populus tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, luxAB</i>	-	Plantes Km ^R exprimant le gène de la luciférase
<i>Populus tremuloides</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Constructions sens ou antisens de gComt (biosynthèse lignines)	-	Variation de l'activité Comt dans le xylème avec modification dans la composition chimique des lignines
<i>Populus trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, bar</i>	Segments de tiges	Régénération de plantes Km ^R et Phosphinothricine ^R
<i>Populus trichocarpa</i> x <i>P. deltoides</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>nptII, uidA</i>	Entre-nœuds de tiges et disques foliaires	Plantes Km ^R exprimant Gus

Abréviations. *als* : gène de l'acétolactate synthase conférant la résistance au chlorosulfuron ; *aroA* : gène de la 5-enopyruvyl shikimate synthase ; *bar* : gène codant pour la phosphinothricine acétyltransférase ; *gCad* : gène codant pour la cinnamyl alcool déshydrogénase ; *cat* : gène de la chloramphénicol acétyltransférase ; *g4CL* : gène de la 4-coumarate CoA ligase (biosynthèse lignines) ; *gComt* : gène codant pour la Caffeic-O-méthyltransférase ; *gcr/IA* : gène de la toxine Bt (= endotoxine de *Bacillus thuringiensis*) ; *GA-20 oxydase* : *gibberellic acid-20 oxydase* ; *gGfp* : gène de *green fluorescent protein* ; *hpt* : gène de l'hygromycine phosphotransférase ; *ipt* : gène de l'isopentenyl transférase (enzyme de biosynthèse des cytokinines) ; Km^R : résistance à la kanamycine ; *luxAB* : gène marqueur de la luciférase ; *nptII* : gène de la néomycine phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine ; *pin 2* (= IP) : gène d'inhibiteur de protéase (*potato proteinase inhibitor II*) ;

Références

- XIE et HONG, Plant Cell Rep., 2002
- PHELEP *et al.*, Bio/Technol., 1991
- FRANCHE *et al.*, Plant J., 1997
- NAINA *et al.*, Curr. Sci., 1989
- KEINONEN-METTÄLÄ *et al.*, Plant Cell Rep., 1998
- SEABRA et PAIS, Plant Cell Rep., 1998
- SMOUNI *et al.*, Funct. Plant Biol., 2002
- MULLINS *et al.*, Plant Cell Rep., 1997
- Ho *et al.*, Plant Cell Rep., 1998
- MORALEJO *et al.*, Aust. J. Plant Physiol., 1998
- Mc GRANAHAN *et al.*, Bio/Technol., 1988
- KIM *et al.*, In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant, 1999
- SULLIVAN et LAGRIMINI, Plant Cell Rep., 1993
- WILDE *et al.*, Plant Physiol., 1992
- HAN *et al.*, Plant Sci., 1993
- IGASAKI *et al.*, Plant Cell Rep., 2000
- CONFALONIERI *et al.*, Plant Cell Rep., 2000
- FILLATTI *et al.*, Mol. Gen. Genet., 1987
- KLOPFENSTEIN *et al.*, Can. J. Forest Res., 1991
- DE BLOCK, Plant Physiol., 1990
- HAN *et al.*, Plant Cell Rep., 2000
- CONFALONIERI *et al.*, Plant Cell Rep., 1994
- Mc COWN *et al.*, Plant Cell Rep., 1991
- Hu *et al.*, Nat. Biotechnol., 1999
- FRANKE *et al.*, Plant. J., 2000
- ERIKSSON *et al.*, Nat. Biotechnol., 2000
- BRASILEIRO *et al.*, Plant Mol. Biol., 1991
- BRASILEIRO *et al.*, Transgenic Res., 1992
- DEVILLARD, C. R. Acad. Sci. Ser. 3, Sci. Vie, 1992
- LEPLÉ *et al.*, Plant Cell Rep., 1992
- SCHWARTZENBERG *et al.*, Tree Physiol., 1994
- CHUPEAU *et al.*, Transgen. Res., 1994
- LAPIERRE *et al.*, Plant Physiol., 1999
- JOUANIN *et al.*, Plant Physiol., 2000
- NILSSON *et al.*, Transgen. Res., 1992
- TSAI *et al.*, Plant Physiol., 1998
- DE BLOCK, Plant Physiol., 1990
- HAN *et al.*, Plant Cell Rep., 2000

spi 2 : gène de la peroxydase anionique de tabac ;
uidA (= Gus) : partie codante du gène de
 la β -glucuronidase.

Encadré 2.

Transfert direct d'Adn.

En raison du spectre d'hôte limité d'*Agrobacterium*, divers traitements physiques et chimiques ont été recherchés au début des années 1980, afin de forcer la pénétration de matériel génétique dans les cellules végétales. Ces techniques ont permis de grandes avancées dans la transformation génétique des végétaux, en particulier des céréales et des gymnospermes. Elles ont aussi contribué à faire progresser la connaissance des mécanismes de régulation des gènes, grâce à la mise au point des systèmes d'expression transitoire (pour revues, voir SANFORD, 2000 ; FRANCHE, DUHOUE, 2001).

Microprojection

Parmi les différentes techniques de transfert direct possibles, la microprojection (ou biolistique) est celle qui a permis de transformer le plus grand nombre d'espèces forestières récalcitrantes à *Agrobacterium*. Cette technique, mise au point en 1984 aux États-Unis, consiste à bombarder des tissus à l'aide de microparticules métalliques (en or ou tungstène) sphériques (de 0,4 à 5 μ m de diamètre) recouvertes d'Adn ou d'Arn. Ces microprojectiles sont accélérés par un appareil appelé canon à particules dont la propulsion est assurée par du gaz, de la poudre ou une impulsion électrique. Le canon à particules présente de nombreux avantages : c'est une méthode simple, rapide qui nécessite peu d'Adn (moins de 1 μ g par traitement), et il n'y a pas de problème de sensibilité (ou susceptibilité) du végétal comme pour la transformation avec les agrobactéries. Les tissus ou cellules cibles (des plantes entières peuvent être même utilisées) n'ont besoin d'aucun traitement préalable et un grand nombre d'explants peuvent être traités simultanément.

La figure 2 présente un appareil à hélium (Pds-1000-He, Biorad) et son principe de fonctionnement. Les microparticules d'or ou de tungstène sont déposées sur une membrane. Une chambre fermée par un disque dit « de rupture » est remplie d'hélium. À l'obtention d'une pression déterminée, le disque se rompt, libérant l'hélium. La décompression du gaz conduit à projeter à grande vitesse la membrane sur une grille d'arrêt métallique. Les microparticules sont dispersées par le choc et pénètrent le noyau des cellules végétales. Les molécules d'Adn ainsi introduites vont se détacher des microbilles et, dans leur majorité, les gènes portés par ces molécules vont s'exprimer transitoirement, c'est-à-dire pendant un à plusieurs jours. L'Adn exogène reste extrachromosomique et sera détruit au cours du temps par les systèmes de dégradation des cellules végétales. Néanmoins, à ce stade, il est possible de tester rapidement l'expression des constructions géniques qu'on souhaite introduire, et particulièrement le comportement des promoteurs, séquences responsables de l'expression spatiotemporelle des transgènes. Cette approche permet également de déterminer le type d'explant le plus apte à l'expression des gènes introduits. Ces informations sont particulièrement utiles dans la phase de mise au point de la méthode chez une nouvelle espèce.

Parmi les cellules capables d'exprimer transitoirement les transgènes, seules 0,1 à 1 % vont intégrer de façon stable le matériel génétique exogène. Cette faible efficacité de transformation stable est vraisemblablement liée à de multiples facteurs tels que la difficulté à pénétrer des cellules physiologiquement aptes à intégrer l'Adn, puis à régénérer des plantes entières, ou encore la forte mortalité cellulaire liée aux stress occasionnés par les tirs. Un autre inconvénient de cette technique a été révélé lors de l'analyse moléculaire des plantes transgéniques. Contrairement aux plantes régénérées après transformation par *Agrobacterium*, le nombre de copies des transgènes est mal maîtrisé et les profils d'intégration très complexes traduisent des réarrangements chromosomiques indésirables. On a donc assisté, après les espoirs considérables suscités par cette approche, à un retour vers *Agrobacterium* ; la mise au point de souches dites hypervirulentes, dans lesquelles certains gènes *vir* sont dupliqués, a en particulier permis d'étendre le spectre d'hôte d'*Agrobacterium* aux céréales et aux gymnospermes.

Électroporation

Cette technique s'applique principalement à des protoplastes (cellules végétales dépourvues de paroi après digestion enzymatique) mis en suspension en présence de l'Adn à transférer et soumis à des impulsions électriques brèves et intenses. Ce traitement crée temporairement des pores dans la membrane plasmique des cellules et permet le transfert de l'Adn dans leur cytoplasme. Cette méthode s'est avérée efficace dans certains cas, mais ne s'applique qu'aux rares espèces pouvant régénérer en plantes entières à partir de protoplastes, comme le peuplier chez les arbres.

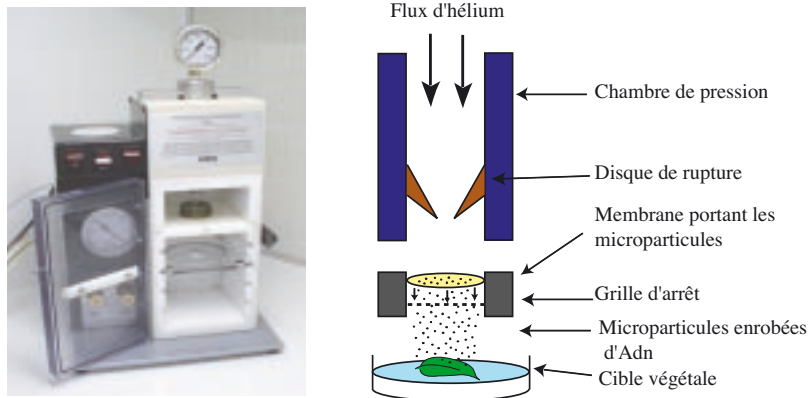


Figure 2.
Canon à particules à hélium (Pds-1000-He, Biorad) et représentation schématique de son principe de fonctionnement (d'après FRANCHE, DUHOUX, 2001).
A helium particle gun (PDS-1000-He, Biorad) and diagram of the principle of operation (from Franche, Duhoux, 2001).

Les gènes introduits chez les arbres forestiers

Dans les premières années qui ont suivi la mise au point d'une méthode de transfert de gènes chez le peuplier, les laboratoires ont introduit des gènes d'intérêt ayant prouvé leur potentiel chez les espèces annuelles : gènes de résistance aux herbicides ou aux insectes. Dans les années 1990 ont commencé à se développer des programmes plus spécifiques aux espèces forestières, avec en particulier les projets visant à modifier la quantité de lignine pour faciliter l'extraction de la pâte à papier. La fin des années 1990 est marquée par le développement des programmes de génomique qui devrait, à terme, diversifier les applications de la transgénèse pour les arbres.

Tolérance aux herbicides

Deux stratégies ont été principalement employées pour conférer aux végétaux une tolérance aux herbicides (pour revue, voir LEWELLYN, 2000).

La première consiste à introduire un gène muté codant pour l'enzyme cible de l'herbicide. Elle concerne chez les arbres forestiers deux herbicides : le glyphosate (ou round-up), herbicide à large spectre qui empêche la synthèse des acides aminés aromatiques

(tryptophane, tyrosine et phénylalanine) en inhibant dans les plantes l'activité 5-énopyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (Epsps) ; le chlorosulfuron, une molécule qui agit sur l'acétolactate synthase pour bloquer la biosynthèse de leucine, isoleucine et valine. La résistance au glyphosate est obtenue après introduction du gène *aroA* originaire de *Salmonella typhimurium* ; cette séquence détermine la biosynthèse d'une Epsps qui n'est plus sensible à l'herbicide. Les espèces transformées génétiquement présentant une résistance au glyphosate sont les suivantes : *P. alba* x *P. grandidentata*, *P. trochocarpa* x *P. deltoides*, *Eucalyptus grandis*, *Larix decidua* et *Pinus radiata*. Le gène *cr1-1* originaire d'*Arabidopsis thaliana* code pour une acétolactate synthase qui confère une résistance au chlorosulfuron. Il a été introduit chez deux espèces forestières, *P. tremula* et *Pinus radiata*.

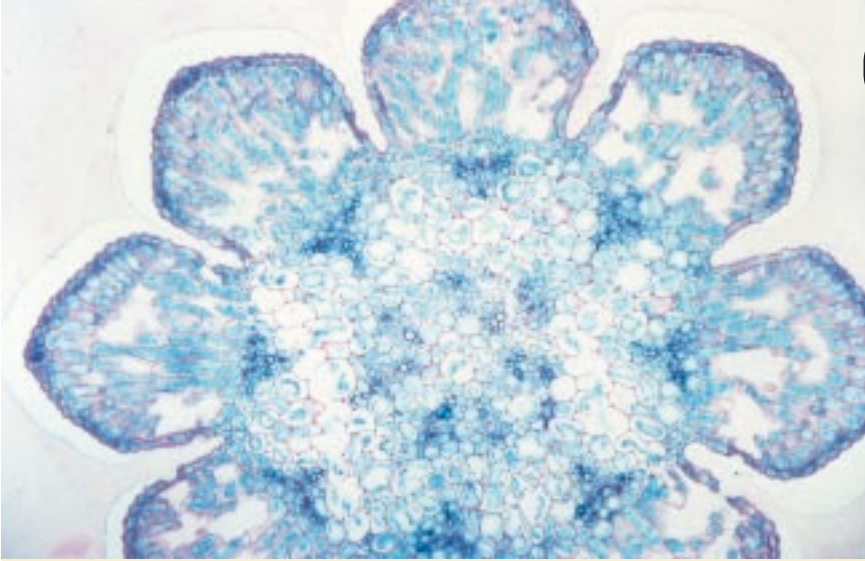
Dans la seconde stratégie, beaucoup plus utilisée, l'herbicide est détoxifié par une enzyme codée par un gène d'origine microbienne, introduit dans l'arbre. Quatre espèces différentes de peuplier dont trois hybrides (*P. alba*, *P. alba* x *P. tremula*, *P. tremula* x *P. alba* et *P. trichocarpa* x *P. deltoides*) ainsi que *Eucalyptus camaldulensis*, *Pinus radiata* et *Picea abies* ont ainsi été transformés avec le gène *bar* (tableau I). Ce gène code pour la phosphinothricine acétyl transférase qui inactive la phosphinothricine (Basta) en l'acétylant.

Résistance aux insectes

Deux stratégies sont utilisées pour conférer aux arbres une résistance aux insectes (pour revues, voir MINOCHA, WALLACE, 2000 ; PENA, SÉGUIN, 2001).

La première consiste à introduire un gène codant pour une endotoxine de la bactérie *Bacillus thuringiensis*, qui se fixe sur des récepteurs de l'intestin des lépidoptères, coléoptères et diptères, provoquant la lyse de cet organe, puis la mort des insectes. Mc COWN *et al.* (1991) ont transféré dans des peupliers hybrides (*P. alba* x *P. grandidentata*), par microprojection, une séquence codante de l'endotoxine de *Bacillus thuringiensis cryIA* (gène *Bt*) placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif, la séquence 35S originaire du virus de la mosaïque du chou-fleur. Des peupliers transgéniques exprimant la toxine *Bt* ont été obtenus. Lors d'essais sur ces arbres, le pourcentage de chenilles survivantes qui se sont nourries de la toxine *Bt* contenue dans les tissus transgéniques était nettement inférieur à celui des témoins et leur vitesse de développement larvaire très ralentie. Des résultats très similaires ont été obtenus chez *P. tremula* x *P. tremuloides* (CORNU *et al.*, 1996) et *Picea glauca* (ELLIS *et al.*, 1993).

La seconde stratégie consiste à introduire un gène codant pour un inhibiteur de protéase qui perturbe la digestion des insectes et peut entraîner leur mort. Le gène *pin 2* de la pomme de terre qui code pour un inhibiteur de protéase a été introduit chez le même peuplier hybride que précédemment (*P. alba* x *P. grandidentata*) via *A. tumefaciens* (KLOPFENSTEIN *et al.*, 1991). Les effets négatifs de la toxine sur le développement larvaire de deux insectes, *Chrysomela scripta* et *Plagiodera versicolora*, sont sensibles. Un gène d'inhibiteur de protéase de riz, *oci*, codant pour l'oryzacystatine, a été également transféré chez *P. tremula* x *P. tremuloides* (HEUCHELIN *et al.*, 1997) ; les arbres transgéniques présentent une résistance à deux coléoptères, *Chrysomella tremulae* et *Chrysomella populi*.



Expression du gène rapporteur de la β -glucuronidase, sous contrôle du gène promoteur 35S, dans une coupe transversale de tige d'*Allocasuarina verticillata*.
*Expression of the β -glucuronidase gene, controlled by gene 35S, in a section of an *Allocasuarina verticillata* stem.*
 Photo C. Franche.

Dans le cas de *Liquidambar styraciflua*, une autre stratégie a été utilisée : deux cassettes d'expression, l'une comprenant le promoteur 35S et la séquence codante de la peroxydase anionique du tabac, l'autre le promoteur 35S et une séquence codante pour une endotoxine Bt, ont été transférées dans cet arbre via *A. tumefaciens*. La peroxydase anionique est une enzyme impliquée dans la croissance cellulaire et le développement de la paroi, qui, lorsqu'elle est surexprimée dans des tabacs transgéniques, semble avoir des effets sur la résistance aux insectes. La présence de deux gènes différents devrait contribuer à limiter l'apparition d'insectes résistants. Ces deux constructions sont exprimées dans les *Liquidambar* transgéniques (SULLIVAN, LAGRIMINI, 1993).

Modification de la floraison

Les recherches concernant la modification de la floraison chez les arbres forestiers ont deux objectifs différents : soit raccourcir le temps nécessaire pour atteindre la floraison afin d'accélérer les programmes d'amélioration génétique, soit au contraire obtenir des arbres qui ne fleuriront plus (SKINNER *et al.*, 2000). Dans ce dernier cas, l'absence de fleurs permet d'éviter une dispersion des transgènes dans l'environnement, et conduit à une augmentation de la croissance et de la production de bois.

L'accélération de la floraison a été obtenue chez le peuplier grâce à l'expression du gène *Leafy* d'*Arabidopsis thaliana* (ROTTMAN *et al.*, 2000). Ce gène est nécessaire et suffisant chez *Arabidopsis* pour permettre la floraison. Lorsqu'il est exprimé constitutivement chez *P. tremula*, les arbres transgéniques fleurissent au bout de quelques semaines, alors que les arbres témoins non transformés le font après huit années de croissance. Cette stratégie n'a en revanche pas donné de résultat positif lorsqu'elle a été tentée sur le pin. Des recherches sont en cours afin d'isoler des gènes équivalents au gène *Leafy* dans différentes espèces forestières.

Pour rendre les arbres stériles, une approche fondée sur l'ablation génétique a été entreprise chez le peuplier (SKINNER *et al.*, 2000). Cette technique consiste à exprimer un gène cytotoxique sous le contrôle d'un promoteur très spécifique des inflorescences. Le gène *DT-A* originaire de *Corynebacterium diphtheriae* code pour une toxine diphtérique dont l'action est d'inhiber la synthèse des protéines chez les eucaryotes. Ce gène a été placé sous le contrôle d'un promoteur originaire d'un gène homéotique floral, puis introduit dans le peuplier ; 90 % des lignées obtenues n'ont plus de structures florales. D'autres approches fondées sur l'extinction de gènes clés de floraison propres aux espèces forestières sont en cours.

Modification de la quantité ou de la qualité de la lignine

Les lignines sont des polymères tridimensionnels qui résultent de l'association répétitive de trois unités monomères : l'alcool coumarylique (H), coniférylique (G) et sinapilique (S). Ces polymères hydrophobes sont difficilement biodégradables ; leur association à la cellulose et l'hémicellulose améliore la résistance mécanique et la rigidité de la paroi des cellules. Si ces lignines ont des fonctions biologiques importantes, elles constituent en revanche un obstacle majeur à la transformation du bois en pâte à papier par traitement chimique (procédé Kraft). L'extraction de la pâte à papier va dépendre du rapport S/G, celle-ci étant d'autant plus facile que la quantité d'unités S est élevée.

L'utilisation de la transformation génétique pour modifier la quantité ou la qualité de la lignine constitue l'un des axes majeurs de recherche chez les espèces papetières. L'objectif est d'obtenir une réduction de la teneur du bois en lignine (une réduction limitée à 5 % serait suffisante) ou une lignine plus facilement hydrolysable, ce qui réduirait le temps, le coût et la pollution liés à l'extraction de la cellulose. On cherchera donc à augmenter la quantité de sous-unités S et le rapport S/G, en modulant l'activité d'enzymes clés de la voie de biosynthèse des lignines. Après isolement et caractérisation, le niveau d'expression de certains de ces gènes a pu être altéré dans les plantes transgéniques en utilisant des stratégies dites antisens, qui permettent de diminuer l'expression du gène, ou des stratégies sens qui, au contraire, conduisent à surexprimer le gène étudié (CHEN *et al.*, 2001).

La phényl ammonia-lyase (Pal)

C'est l'enzyme qui transforme la phénylalanine en acide cinnamique. Par stratégie antisens, il est possible de réduire l'activité enzymatique jusqu'à 0,2 % de l'activité initiale. On obtient une quantité de lignine accrue, caractérisée par une plus faible quantité d'unités G. Grâce à l'augmentation du rapport S/G, la lignine est extraite plus facilement. Cependant, les plantes voient leur croissance affectée, et deviennent plus sensibles aux pathogènes.

La cinnamate-4-hydroxylase (C₄H)

Des plantes transgéniques présentant une réduction de 80 % de l'activité C₄H ont été obtenues. Le contenu en lignine est diminué d'un facteur 5 et la composition de la lignine est altérée de façon importante. La quantité de sous-unités S et le rapport S/G diminuent de façon significative.

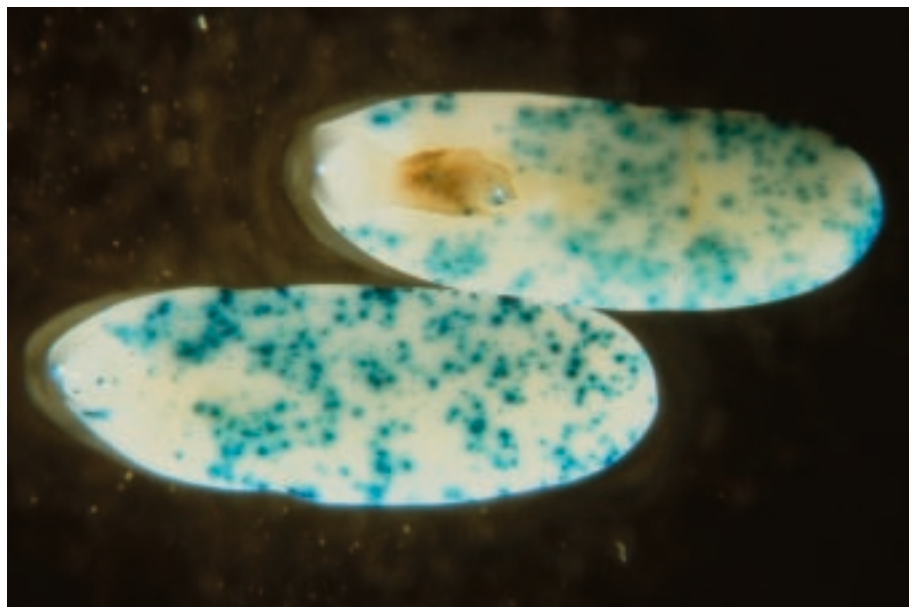
La 4-coumarate CoA ligase (4CL)

Le gène de la 4CL a été placé en orientation antisens sous le contrôle d'un promoteur constitutif, puis introduit chez *Populus tremuloides*. L'analyse des plantes transgéniques a mis en évidence une réduction de l'activité enzymatique de 90 % dans le xylème. Les peupliers transgéniques analysés à dix mois présentent une diminution de la teneur en lignine qui peut atteindre 55 % ; en revanche, la composition de la lignine n'est pas altérée. Les plantes sont également caractérisées par des altérations phénotypiques importantes : les tiges sont plus épaisses, les feuilles sont plus larges, les racines sont plus longues, le poids frais est augmenté d'un facteur 20 et le rapport cellulose/lignine est doublé. Une étude ultrastructurale a révélé que les cellules de ces peupliers transgéniques ne sont pas plus larges ; il semble que les modifications phénotypiques soient liées à une vitesse de prolifération accrue des cellules (Hu *et al.*, 1999).

La caffeic O - méthyl transférase (Comt)

La lignine diffère d'un végétal à l'autre par l'association de ses monomères. Chez les conifères, la lignine est surtout composée d'unités guaiacyl. La lignine des espèces feuillues contient à la fois des unités de guaiacyl et de syringyl, ce qui la rend plus facilement hydrolysable que celle composée uniquement d'unités guaiacyl (WHETTEN, SEDEROFF, 1991). Cette différence est notamment due à l'absence de férulate 5'-hydroxylase et à la spécificité des substrats de la Comt chez les gymnospermes. La caractérisation et l'isolement des gènes de la Comt et de la férulate 5'-hydroxylase des feuillus ouvrent de nouvelles perspectives de recherche, leur introduction dans le génome des conifères pouvant rendre ces derniers aptes à synthétiser de l'alcool syringyl et donc faciliter l'hydrolyse de leur lignine lors de la fabrication de la pâte à papier. À l'heure actuelle, seul le peuplier a été transformé par ces derniers gènes. Ainsi, différentes constructions antisens de gènes codant pour la Comt ont été introduites chez *Populus tremula x P. alba* (LAPIERRE *et al.*, 1999). La baisse de l'activité Comt observée dans les tissus transformés entraîne une production accrue d'uni-

tés guaiacyl, laquelle réduit l'extractibilité des lignines. On note également l'apparition d'un nouveau composé, le 5-hydroxyconiféryl alcool (5OHG), qui améliore la digestibilité des tissus végétaux par les animaux. Dans d'autres travaux réalisés chez le même peuplier hybride, l'intégration de constructions sens de Comt s'est traduite par l'obtention de différentes lignées à faible sur-expression ou sans expression de la Comt, entraînant une baisse du taux de lignines. Cependant, ces dernières étaient plus difficiles à hydrolyser en raison de l'absence d'unités syringyl et l'incorporation d'unités guaiacyl (JOUANIN *et al.*, 2000). Enfin, chez *Populus tremuloides* transformé par des constructions sens de gènes de Comt, il a été observé que l'activité Comt était surexprimée dans les feuilles et le sclérenchyme. À l'inverse et simultanément, cette activité était totalement réprimée dans le xylème, entraînant ainsi l'accumulation de résidus de coniféryl aldéhyde dans les lignines donnant une coloration rouge-brun au bois, phénotype caractéristique souvent observé chez d'autres espèces herbacées transformées avec les mêmes constructions (TSAI *et al.*, 1998).



Expression du gène rapporteur de la β -glucuronidase, après le bombardement de cotylédons d'*Acacia mangium* par la construction e35S-gus.
 Expression of the β -glucuronidase gene, after bombardment by *Acacia mangium* cotyledons by means of the e35S-gus construction.
 Photo C. Franche.

La férulate-5-hydroxylase (F5H)

Le rôle majeur de cette enzyme dans la voie de biosynthèse de la lignine a été mis en évidence grâce à l'existence d'un mutant d'insertion chez *Arabidopsis thaliana* qui surexprime cette activité F5H. Ce mutant présente une lignine composée presque uniquement de résidus S, ce qui, appliqué aux espèces forestières, devrait être particulièrement favorable à l'extraction de la pâte à papier. L'introduction du gène de la férulate 5-hydroxylase chez le peuplier induit effectivement un enrichissement en unités S (FRANKE *et al.*, 2000).

La cinnamyl-CoA-réductase (Ccr)

La diminution de cette activité enzymatique entraîne chez *P. tremula* x *P. alba* à la fois une réduction de la quantité de lignine et une altération de sa composition, marquée par une quantité plus faible de composés G (MELLEROWICZ *et al.*, 2001). L'augmentation du rapport S/G est favorable à l'extraction de la lignine. La couleur du bois des peupliers transgéniques est modifiée en raison de la synthèse de nouveaux composés phénoliques.

La cinnamyl alcool déshydrogénase (Cad2)

La Cad catalyse une des dernières étapes de la voie de synthèse des monomères de lignine. Elle permet la formation de l'alcool 4-coumaryl à partir du 4-coumaraldéhyde. FEUILLET *et al.* (1994) ont transformé un peuplier hybride (*Populus tremuloides* x *P. alba*) avec un gène fusionné contenant le promoteur du gène Cad d'*Eucalyptus gunnii* et la séquence codante du gène Gus, à l'aide d'*A. tumefaciens*. Le promoteur du gène Cad s'exprime spécifiquement dans les cellules entourant les fibres lignifiées du phloème et dans les cellules du xylème en développement. Chez *Populus tremula* x *P. alba*, différentes constructions antisens de gènes Cad ont pu être intégrées de façon stable par la voie biolistique.

La baisse de l'activité Cad observée au sein des tissus transformés s'est traduite par une synthèse accrue de groupements phénoliques libres et de lignines dont la solubilité et la fragmentation étaient ainsi améliorées (LAPIERRE *et al.*, 1999). Le bois obtenu est caractérisé par une coloration rosée liée à une augmentation de la quantité d'aldéhydes.

Autres gènes d'intérêt

Dans quelques cas, et toujours chez le peuplier, certains gènes codant pour des enzymes impliqués dans la synthèse des phytohormones ont été intégrés par transgénèse. C'est le cas, par exemple, du gène de la gibberellic acid-20 oxydase, dont l'expression dans les tissus s'est traduite par une augmentation de la longueur des fibres du xylème mais aussi de la croissance et de la biomasse des plants (ERIKSSON *et al.*, 2000). Chez le peuplier faux-tremble, l'intégration du gène *ipt*, codant pour l'isopentenyl transférase (enzyme permettant de synthétiser deux cytokinines : l'isopentényl-adénine ou l'isopentényl-adénosine), a pour effet d'augmenter la teneur des tissus en cytokinines, ce qui provoque la formation de rameaux à entre-nœuds courts et à enracinement réduit (SCHWARTZENBERG *et al.*, 1994). L'insertion de ce dernier gène permet de repérer visuellement les organes transformés, mais son utilisation s'inscrit en fait dans le cadre d'une méthode de transformation qui nécessite son élimination ultérieure pour rendre à la plante transformée son phénotype normal (encadré 3).

Certains laboratoires développent également des projets de phytoremédiation visant à obtenir des arbres transgéniques pour réhabiliter des sols pollués. Des gènes d'origine bactérienne ont été introduits dans des peupliers, et des arbres transgéniques pouvant pousser sur des sols pollués par du mercure ou des chlorophénols ont été obtenus.

Bénéfices et risques des arbres transgéniques

Actuellement, les surfaces couvertes par les essais au champ des arbres forestiers transgéniques sont extrêmement faibles par rapport à celles utilisées pour les plantes transgéniques d'intérêt agronomique (moins de 1 % à l'échelle mondiale et environ 1 % en France ; figure 5). Ce phénomène résulte, d'une part, du faible nombre de laboratoires qui s'investissent dans la transgénèse des espèces forestières et, d'autre part, du temps nécessaire à l'obtention puis à l'évaluation au champ des arbres transgéniques. Plus d'une vingtaine d'espèces d'arbres génétiquement modifiés seraient concernées par ces essais au champ (MULLIN, BERTRAND, 1998 ; OWUSU, 1999).

Comme pour les espèces annuelles, l'impact à court et long terme des arbres transgéniques suscite de nombreuses interrogations qui sont résumées dans le tableau II (THOMPSON, STRAUSS, 2000). Ces interrogations sont d'autant plus légitimes que ces arbres vont rester de nombreuses années dans le même environnement. Certains pays, comme l'Australie, ont ainsi pris la décision de n'effectuer aucun essai au champ d'arbres transgéniques, afin d'éviter toute dispersion de transgènes ; de telles expériences ne seront entreprises que sur des arbres stériles. D'autres pays, comme les États-Unis, le Canada, la France, la Finlande, la Belgique, l'Espagne et l'Allemagne, ont au contraire choisi de procéder à des essais au champ (MULLIN, BERTRAND, 1998). Les États-Unis et le Canada regroupent à eux seuls environ 60 % de ces expériences et, à l'échelle européenne, la France est l'un des pays les plus actifs dans ce domaine. Il faut noter qu'on trouve également des arbres transgéniques dans certains pays, comme la Chine, le Chili et l'Indonésie.

Encadré 3.

La sélection des plantes transformées.

Dans la majorité des cas, le transfert de gènes est un processus peu efficace, et il est nécessaire de sélectionner les quelques cellules transformées au sein d'une large population de cellules non transformées (FRANCHE, DUHOUX, 2001). Simultanément au(x) gène(s) d'intérêt, on va donc introduire un gène de sélection. Le gène de sélection idéal devra permettre l'élimination des cellules non transformées, sans compromettre la régénération et la fertilité des plantes transgéniques ; il sera en général placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif⁶.

Gènes de sélection et gènes rapporteurs

Les gènes de sélection se divisent en plusieurs groupes : certains confèrent une résistance aux antibiotiques, comme par exemple le gène *nptII* de la néomycine phosphotransférase, qui assure une résistance à la kanamycine et à la généticine ; d'autres vont permettre aux cellules transformées de pousser en présence d'herbicide (les gènes *bar* et *aroA* confèrent, par exemple, une tolérance à la phosphinotricine (Basta) ou au glufosinate et au glyphosate, respectivement).

Dans certains cas, l'utilisation d'antibiotiques ou d'herbicides n'est pas possible. On peut alors faire appel aux gènes rapporteurs pour suivre le transfert des gènes et repérer les cellules transformées. C'est le cas du gène *uidA* de la β -glucuronidase (ou gène *gus*), dont le produit conduit à l'apparition de cristaux bleu-indigo en présence d'un substrat communément appelé X-gluc (figure 3A). L'inconvénient principal de ce gène est lié au caractère léthal de la mise en évidence de l'activité enzymatique β -glucuronidase. L'incubation des tissus transformés en présence de X-gluc conduit en effet à leur destruction. Récemment, un gène rapporteur non léthal a été identifié. Il s'agit du gène codant pour la protéine fluorescente verte, ou Gfp. L'expression de cette séquence originaire d'une méduse peut être détectée après irradiation des tissus transformés avec une lumière bleue ou ultraviolette (figure 3B). Ce mode de détection non léthal, qui permet donc de repérer même une très petite population de cellules transformées, s'est avéré précieux pour la transformation d'espèces forestières récalcitrantes comme les gymnospermes.

Prévention des risques environnementaux

En raison des risques environnementaux liés à l'utilisation des gènes de sélection conférant des résistances à des antibiotiques et à leur possible interdiction en Europe, des vecteurs de transformation particuliers (vecteurs Mat) ont été mis au point chez les arbres forestiers. Ils comportent des gènes de biosynthèse d'hormones tels que le gène *ipt* de l'isopentényl transférase d'*A. tumefaciens*, ou les gènes *rol* d'*A. rhizogenes*, qui vont conférer aux cellules transformées un phénotype particulier. Dans le cas du gène *ipt*, une expression constitutive conduit au développement d'un cal, puis à la prolifération de tiges adventives dépourvues de dominance apicale ; dans le cas des gènes *rol*, des racines de type chevelu racinaire vont croître et des tiges également dépourvues de dominance apicale vont se différencier.

Le cas du peuplier

La figure 4 présente l'un de ces vecteurs, utilisé avec le peuplier. L'Adn-T, situé entre les bordures droite et gauche, contient les gènes d'intérêt et le système de recombinaison R/RS originaire d'une levure. R code pour une recombinaison qui excise spécifiquement la portion d'Adn encadrée par les séquences RS. Lorsque les entre-nœuds de peuplier sont mis en contact avec la souche d'*Agrobacterium* contenant le vecteur Mat, on a donc transféré de l'Adn-T. Ne peuvent se développer sur le milieu non sélectif dépourvu de phytohormone que les cellules végétales ayant reçu le gène *ipt*. Les cellules végétales vont proliférer et des rameaux de phénotype anormal vont se différencier. Lorsque la quantité de recombinaison sera optimale, les gènes *ipt* et R seront excisés et des tiges possédant un phénotype normal vont apparaître sur le cal. Des peupliers transgéniques possédant les gènes d'intérêt, mais dépourvus de gènes de sélection, sont ainsi obtenus (EBINUMA *et al.*, 2000).

⁶ Constitutif : état d'un gène qui demeure en permanence actif ou inactif, selon le mode de régulation en cause.

Tableau II.

Arguments pour ou contre l'utilisation des arbres transgéniques (d'après THOMPSON, STRAUSS, 2000).

Caractères des arbres transgéniques	Arguments pour	Arguments contre
Généralités	Amélioration génétique plus rapide Connaissances fondamentales Valeur économique accrue	Coût de production et d'évaluation Réduction de la diversité
Gènes antibiotiques	Amélioration de la sélection Facilitation du suivi des transgènes	Transfert à des micro-organismes pathogènes de l'homme ou des écosystèmes forestiers
Gènes de résistance aux insectes	Réduction du coût des insecticides Réduction de l'utilisation des insecticides	Apparition d'insectes résistants Flux de gènes Impact sur d'autres insectes
Gènes de résistance aux herbicides	Contrôle des mauvaises herbes Amélioration de la reforestation Augmentation de la production de bois	Flux de gènes Adaptation à l'herbicide
Gènes de synthèse de lignine	Réduction du coût d'extraction de la lignine Réduction de la pollution Amélioration de la croissance	Effets sur l'intégrité de l'arbre Sensibilité accrue aux pathogènes Impact sur la décomposition et la structure des sols
Gènes de floraison (stérilité)	Pas de flux de transgènes Rendement en bois accru Réduction des allergies	Croisement impossible Impact sur les populations qui se nourrissent sur les tissus reproducteurs

Conclusion

Bien que peu d'espèces d'arbres forestiers aient été transformées depuis la première obtention de plantes transgéniques chez le peuplier, il y a une quinzaine d'années, on note une augmentation significative des recherches dans ce domaine, puisque environ trois quarts du nombre total d'espèces transformées l'ont été au cours des cinq à dix dernières années écoulées. Les espèces transformées testées *in situ* sont majoritairement des feuillus et des conifères de forêts tempérées (peuplier, pin...), mais quatre espèces tropicales sont également citées : *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus*, *E. grandis* et *Acacia mangium*. Malgré ces dernières évolutions, de nombreux progrès restent à faire dans la recherche de méthodes de transformation plus efficaces chez les arbres, en améliorant notamment leur aptitude à la régénération *in vitro* et en élargissant cette aptitude au plus grand nombre possible de génotypes ou de clones, puisqu'elle est souvent réduite à un faible nombre d'individus chez une espèce donnée. Cette étape préliminaire est loin d'être maîtrisée, rarement obtenue à partir de matériel mature et en fait assez peu étudiée chez de nombreuses espèces ligneuses.

Avec le développement des programmes internationaux de génomique chez les espèces ligneuses telles que le peuplier, le pin et l'eucalyptus, on devrait, dans les prochaines années, à la fois disposer de promoteurs spécifiques plus adaptés à l'expression des transgènes dans les arbres, et caractériser des gènes d'intérêt spécifiques : gènes impliqués dans l'architecture des arbres, la floraison, la biosynthèse de la lignine ou de la cellulose... Des études sont également en cours pour déterminer la stabilité d'expression des transgènes lors de la croissance des arbres soumis au stress de l'environnement, ainsi que leur impact environnemental. On peut donc s'attendre, dans les prochaines années, à voir émerger de nouvelles générations d'arbres transgéniques plus adaptés aux besoins des forestiers et prenant en compte les interrogations légitimes des citoyens face aux problèmes soulevés par les organismes génétiquement modifiés.

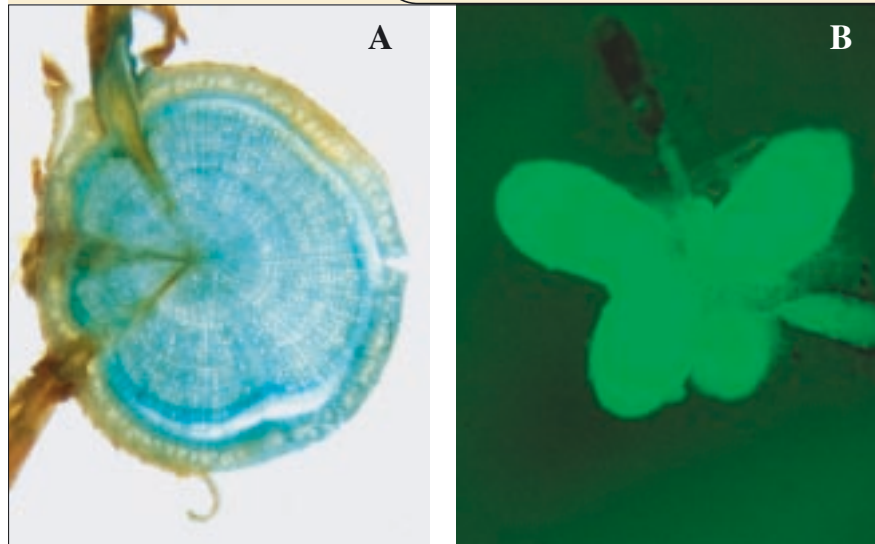


Figure 3.

Expression des gènes rapporteurs de la β -glucuronidase dans une coupe transversale d'un tronc de *Casuarina glauca* (A) et de la protéine fluorescente verte (Gfp) dans des nodules fixateurs d'azote d'*Alcasuarina verticillata* (B) (d'après FRANCHE, DUHOUX, 2001).

Expression of β -glucuronidase reporter genes in a section of a *Casuarina glauca* trunk (A) and of the fluorescent green protein (Gfp) in the nitrogen-fixing nodules of *Alcasuarina verticillata* (B) (from FRANCHE, DUHOUX, 2001).

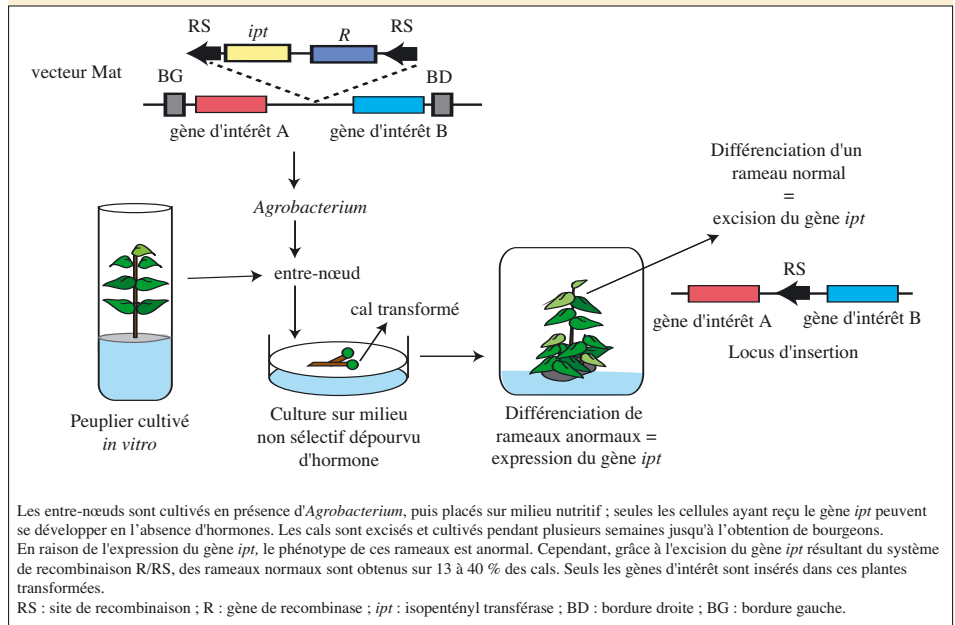


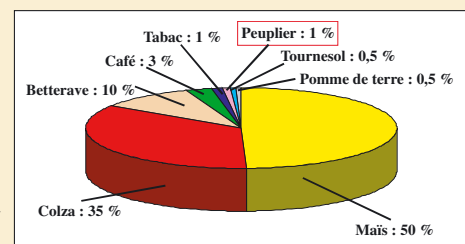
Figure 4.

Vecteur de transformation Mat utilisé pour éviter la sélection par les antibiotiques des cellules transformées (d'après FRANCHE, DUHOUX, 2001).
Mat transformation vector used to avoid selection by antibiotics of transformed cells (from Franche, Duhoux, 2001).

Figure 5.

Répartition 2001 des essais Ogm par espèce, en France (39 ha au total), en pourcentage des surfaces de culture (d'après le ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

Distribution in 2001 of the GM tests per species in France (39 ha altogether), as a percentage of arable areas (source: Ministry of Agriculture and Fisheries).



Références bibliographiques

- AHUJA M. R., 2000. Genetic engineering in forest trees : state of the art and future perspectives. *In* : Molecular biology of woody plants. Jain S. M., Minocha S. C. (éd.). Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, vol. 1, p. 31-49.
- CHEN C., BAUCHER M., CHRISTENSEN J. H., BOERJAN W., 2001. Biotechnology in trees : Towards improved paper pulping by lignin engineering. *Euphytica*, 118 : 185-195.
- CHUPEAU M. C., PAUTOT V., CHUPEAU Y., 1994. Recovery of transgenic trees after electroporation of poplar protoplasts. *Transgen. Res.*, 3 : 13-19.
- CORNU D., LEPLÉ J.-C., BONADÉ-BOTTINO M., ROSS A., AUGUSTIN S., DELPLANQUE A., JOUANIN L., PILATE G., 1996. Expression of a proteinase inhibitor and a *Bacillus thuringiensis* endotoxin in transgenic poplars. *In* : Somatic cell genetics and molecular genetics of trees. Ahuja M. R., Borjan W., Neale D. B. (éd.). Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, p. 131-136.
- EBINUMA H., SUGITA K., MATUNAGA E., ENDO S., KASAHARA T., 2000. Selection of marker-free transgenic plants using the oncogenes (*ipt*, *rol A*, *B*, *C*) of *Agrobacterium* as selectable markers. *In* : Molecular biology of woody plants. Jain S. M., Minocha S. C. (éd.). Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, vol. 2, p. 25-46.
- ELLIS D. D., MCCABE D., MCINNIS S., RAMACANDRAN R., RUSSEL D. R., WALLACE K., MARTINELL B. J., ROBERTS D. R., RAFFAR K. F., MCCOWN B. H., 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Bio/Technol.*, 11 : 84-89.
- ERICKSSON M. E., ISRAELSSON M., OLSSON O., MORITZ T., 2000. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat. Biotechnol.*, 18 : 784-788.
- FEUILLET C., PILATE G., BOUDET A. M., GRIMA-PETTENATI J., 1994. Tissue and cell specific expression of a *Eucalyptus* CAD promoter in transgenic poplar. *In* : Abstracts 4th international congress of Plant Mol. Biol., Amsterdam, June, 19-24, organised by the International Society for Plant Molecular Biology.
- FRANCHE C., DUHOUX E., 2001. La transgénèse végétale. Paris, France, Elsevier, coll. Biocampus, 191 p.
- FRANKE R., MCMICHAEL C. M., MEYER K., SHIRLEY A. M., CUSUMANO J. C., CHAPPLE C., 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants overexpressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J.*, 22 : 223-234.
- HEUCHELIN S. A., JOUANIN L., KLOPFENSTEIN N. B., MCNABB H. S., 1997. Potential of proteinase inhibitors for enhanced resistance to *Populus* arthropod and pathogen pests. *In* : Micropropagation, genetic engineering, and molecular biology of *Populus*. Klopfenstein N. B., Chun Y. W., Kim M. S., Ahuja M. R. (éd.). Fort Collins, États-Unis, US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, p. 173-177 (Gen. Tech. Rep. RM-GTR-297).
- HU W. J., HARDING S. A., LUNG J., POPKO J. L., RALPH J., STOKKE D. D., TSAI C. J., CHIANG V. L., 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nat. Biotechnol.*, 17 : 808-812.
- JOUANIN L., GOUJON T., DE NADAÏ V., MARTIN M. T., MILA I., VALLET C., POLLET B., YOSHINAGA A., CHABBERT B., PETIT-CONIL M., LAPIERRE C., 2000. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid-*O*-methyltransferase activity. *Plant Physiol.*, 123 : 1363-1373.
- KLOPFENSTEIN N. B., SHI N. Q., KERNAN A., MCNABB H. S., HALL R. B., HART E. R., THORNBURG R. W., 1991. Transgenic *Populus* hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor II-CAT gene fusion. *Can. J. For. Res.*, 21 : 1321-1328.
- LAPIERRE C., POLLET B., PETIT-CONIL M., TOVAL G., ROMERO J., PILATE G., LEPLÉ J. C., BOERJAN W., FERRET V., DE NADAÏ V., JOUANIN L., 1999. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid *O*-methyltransferase activity has an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol.*, 119 : 153-163.
- LLEWELLYN D. J., 2000. Herbicide tolerant forest trees. *In* : Molecular biology of woody plants. Jain S. M., Minocha S. C. (éd.). Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, vol. 2, p. 439-466.
- MAC RAE S., VAN STADEN J., 1999. Transgenic *Eucalyptus*. *In* : Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 44 : Transgenic trees. Bajaj Y. P. S. (éd.). Heidelberg, Berlin, Allemagne, Springer-Verlag, p. 88-114.
- MCCOWN B. H., MCCABE D. E., RUSSEL D. R., ROBISON D. J., BARTON K. A., RAFFA K. F., 1991. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Rep.*, 9 : 590-594.

- MELLEROWICZ E. J., BAUCHER M., SUNDBERG B., BOERJAN W., 2001. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Mol. Biol.*, 47 : 239-274.
- MINOCHA S. C., WALLACE J. C., 2000. Gene transfer techniques and their relevance to woody plants. *In* : Molecular biology of woody plants. Jain S. M., Minocha S. C. (éd.). Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, vol. 2, p. 1-24.
- MULLIN T. J., BERTRAND S., 1998. Environmental release of transgenic trees in Canada. Potential benefits and assessment of biosafety. *Forestry Chron.*, 74 : 203-219.
- OWUSU R. A., 1999. GM technology in the forest sector. A scoping study for WWF. <http://www.panda.org/resources/publications/forest/gm-overview.html>
- PARSONS T. J., SINKAR V. P., STETTLER R. F., NESTER E.W., GORDON M. P., 1986. Transformation of Poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *Bio/Technol.*, 4 : 533-536.
- PENA L., SÉGUIN A., 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotechnol.*, 19 : 500-506.
- ROTTMANN W. H., MEILAN R., SHEPPARD L. A., BRUNNER A. M., SKINNER J. S., MA C., CHENG S., JOUANIN L., STRAUSS S. H., 2000. Diverse effect of overexpression of *LEAFY* and *PTLF*, a poplar (*Populus*) homolog of *LEAFY/FLORICAULA*, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant J.*, 22 : 235-245.
- SANFORD J. C., 2000. The development of the biolistic process. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36 : 303-308.
- SCHWARTZENBERG K., DOUMAS P., JOUANIN L., PILATE G., 1994. Enhancement of the endogenous cytokinin concentration in poplar by transformation with *Agrobacterium* T-DNA gene *ipt*. *Tree Physiol.*, 14 : 27-35.
- SKINNER J. S., MEILAN R., BRUNNER A. M., STRAUSS S. H., 2000. Options for genetic engineering of floral sterility in forest trees. *In* : Molecular biology of woody plants. Jain S. M., Minocha S. C. (éd.). Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, vol. 1, p. 135-153.
- SULLIVAN J., LAGRIMINI L. M., 1993. Transformation of *Liquidambar styraciflua* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 12 : 303-306.
- THOMPSON P. B., STRAUSS S. H., 2000. Research ethics for molecular silviculture. *In* : Molecular biology of woody plants. Jain S. M., Minocha S. C. (éd.). Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers, vol. 2, p. 485-511.
- TSAI C. J., POPKO J. L., MIELKE M. R., HU W. J., PODILA G. K., CHIANG V. L., 1998. Suppression of *O*-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen causes red-brown wood phenotypes. *Plant Physiol.*, 117 : 101-112.
- WHETTEN R., SEDEROFF R., 1991. Genetic engineering of wood. *For. Ecol. Manag.*, 43 : 301-316.
- ZUPAN J., MUTH T. R., DRAPER O., ZAMBRYSKI P. C., 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium* into plants : a feast of fundamental insights. *Plant J.*, 23 : 11-28.

Synopsis

GENETIC TRANSFORMATION IN FOREST TREES: MAIN STRATEGIES AND APPLICATIONS

Antoine GALIANA,
Claudine FRANCHE

Genetic transformation

holds out particular promise as a means of overcoming some of the main obstacles encountered in programmes for genetic improvement in plants by sexual reproduction, especially in trees with long reproductive cycles. Genetic transformation enables one or more genes to be introduced to confer new characters to the target species without causing any overall disruption in the architecture of the plant's genome. The introduction and expression of foreign DNA in a plant cell occurs in several stages: introduction of exogenous DNA in the cell, incorporation of the DNA in the host genome and expression of the resulting transgenes, growth and division of the cell and regeneration of a whole plant from genetically transformed cells. Progress with woody species is much slower than with herbaceous species, mainly because of lower regeneration capacities in the former. The ability of a given species to regenerate *in vitro*, or to produce whole plants from different tissues or organs by *de novo* caulogenesis or somatic embryogenesis, is a determining factor in the effectiveness of the transformation process. Besides the applications of plant transgenesis, the technique is also a tool in fundamental research that helps to increase our understanding of the molecular basis of the physiology of trees, such as the formation of wood.

Genetically transformed forest species

Since the first published results with poplars, in 1986, stable genetically transformed forest trees have been obtained in about ten other angiosperm species and as many gymnosperms. Of the two main methods, the use of *Agrobacterium tumefaciens* has produced many more positive results in angiosperms. In gymnosperms, which are less sensitive to bacterial transformation, microprojection proved to be the best means of transformation. Stable transformations in gymnosperms using new hypervirulent *A. tumefaciens* strains have only recently been obtained, with larch, spruce and pine for example. Of the other possible methods of transformation, only protoplast electroporation has resulted in transgenic trees, and only in a hybrid poplar species.

Genes introduced into forest trees

In the first years that followed the successful development of a method for transferring genes in poplars, laboratories began to introduce genes that had proved their usefulness in annual species, such as genes for resistance to herbicides or insects. The 1990s saw the development of programmes that were more specific to forest species, especially with projects aiming to modify the quantity or quality of lignin to facilitate pulp extraction. After isolating and characterising the genes, their degree of expression has been successfully altered in transgenic plants through the use of so-called antisense strategies that reduce the expression of a gene, or, sense strategies that, conversely, cause the relevant gene to be over-expressed.

Among the other genes of interest, some which are involved in determining flowering have been introduced in poplars in order to reduce their time to maturity or, conversely, to obtain sterile trees and thus avoid the dispersal of transgenes in the environment. Some genes coding for enzymes that are involved in phytohormone synthesis have been introduced in poplars as part of efforts to develop new genetic transformation methods. Finally, some laboratories are also working on phytoremediation projects with the aim of obtaining transgenic trees to rehabilitate polluted soils.

Advantages and risks of transgenic trees

At present, the areas covered by field tests of transgenic forest trees are very small compared to those used for transgenic plants of agronomic interest (less than 1% worldwide), with some twenty trees species involved in these field tests. As in annual species, the short and long term impacts of transgenic trees on the environment are raising a great many questions, and the establishment of field tests of transgenic trees is strictly regulated in all the industrialised countries. However, data on the establishment of tests in developing countries are much less accessible.

Conclusion

A significant increase in research on transgenesis in trees has been observed in the last five to ten years, since about three quarters of the total number of species concerned were transformed during this period. Much progress remains to be made in research on the most effective methods of transformation in trees, in particular by improving their capacity for *in vitro* regeneration and by extending these capacities to the largest possible number of genotypes or clones. Current studies *in situ* are aiming to determine the stability of transgene expression during tree growth as well as environmental impacts.