



HAL
open science

Les Biotechnologies chez les arbres forestiers.

Gilles Pilate, Marc Pâques, Jean-Charles Leple, Christophe Plomion

► **To cite this version:**

Gilles Pilate, Marc Pâques, Jean-Charles Leple, Christophe Plomion. Les Biotechnologies chez les arbres forestiers.. *Revue forestière française*, 2002, 54 (2), pp.161-180. 10.4267/2042/4910 . hal-03449350

HAL Id: hal-03449350

<https://hal.science/hal-03449350>

Submitted on 25 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

LES BIOTECHNOLOGIES CHEZ LES ARBRES FORESTIERS

GILLES PILATE - MARC PÂQUES - JEAN-CHARLES LEPLÉ - CHRISTOPHE PLOMION

NDLR

Les biotechnologies tout à la fois ouvrent des voies de progrès et posent de délicates questions. À l'heure actuelle où elles suscitent un certain nombre de passions dans le domaine agricole, cet article présente une analyse complète, approfondie et prudente de leurs applications à la foresterie, qui permettra à ses lecteurs de mieux saisir les enjeux scientifiques, techniques, économiques et politiques de leur mise en œuvre.

Quels que soient ses objectifs, l'amélioration génétique des arbres forestiers est confrontée à quatre contraintes majeures :

- les principaux caractères cibles de la sélection (vitesse de croissance, qualité du bois, rectitude du tronc, résistance aux stress biotiques et abiotiques) ne peuvent être évalués que tardivement, généralement après 10 ans ;
- la longueur des générations liée à la floraison tardive des espèces forestières contraint le sélectionneur à attendre l'âge de la maturité sexuelle pour recombinaison des meilleurs génotypes par croisements contrôlés ;
- les caractères cibles sont souvent complexes, polygéniques, et faiblement héréditaires, car ils sont soumis à de forts effets du milieu environnant ;
- la relation souvent inverse existant entre la maturation des arbres et leur aptitude à la propagation végétative limite la diffusion rapide de nouvelles variétés.

Si les améliorateurs sont en mesure d'offrir aux professionnels, avec les techniques classiques de sélection, des gains génétiques au fil des générations, ils cherchent de nouvelles méthodes plus efficaces pour accélérer à la fois l'amélioration des espèces et la diffusion rapide de nouvelles variétés par voies végétative et sexuée. Les biotechnologies, définies comme l'ensemble des techniques d'intervention sur le vivant, semblent offrir les meilleurs outils pour déboucher plus rapidement sur les variétés performantes indispensables au maintien de la compétitivité de la filière-bois française. Les principaux axes de recherches développés en France et à l'étranger sont :

- la multiplication végétative *in vitro* par embryogénèse somatique ou microbouturage pour la diffusion plus rapide des nouvelles variétés ;
- la transformation génétique pour l'obtention d'une amélioration dirigée de génotypes sélectionnés pour des caractères mono- ou oligogéniques à dominance élevée ;
- la sélection assistée par marqueurs (SAM) pour accumuler dans un même génotype les gènes favorables. Le terme marqueur est pris ici dans le sens de marqueur génétique, qui renseigne sur le génotype d'un locus voisin.

LA MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE *IN VITRO*

De tout temps, la multiplication végétative a été utilisée pour accélérer les programmes d'amélioration mais aussi pour hâter les sorties variétales des arbres fruitiers et forestiers. Ainsi, les arbres sélectionnés pour des propriétés qui ne sont détectables qu'à l'âge adulte peuvent être mobilisés par greffage. Il est dès lors possible d'installer rapidement des vergers permettant la production de fruits et de graines mais aussi l'obtention de nouvelles familles par croisements contrôlés. La multiplication végétative par bouturage et marcottage est également fréquemment utilisée pour l'évaluation multi-sites des familles obtenues. Cette évaluation est indispensable, d'une part pour connaître la valeur des parents à partir desquels on pourra produire des variétés par voie sexuée, mais aussi, d'autre part, pour identifier les individus remarquables au sein de chaque famille et ainsi diffuser rapidement les variétés clonales du futur.

Actuellement, les ligneux fruitiers et ornementaux sont essentiellement propagés par voie végétative. Toutefois, la multiplication végétative des arbres forestiers reste relativement limitée. Elle concerne essentiellement le Peuplier, les Eucalyptus, le Merisier, l'Épicéa et certains Pins. Pourtant, depuis les travaux de Beauschesne et Gautheret, il y a 50 ans environ, l'efficacité des techniques de régénération et de multiplication *in vitro* a fortement été améliorée. Ces techniques commencent à être utilisées industriellement en amélioration forestière et sont particulièrement efficaces en association avec les méthodes de clonage horticoles. L'utilisation encore limitée de ces techniques est liée :

- à la méconnaissance de celles-ci par les professionnels ;
- à leur coût encore relativement élevé ;
- et aussi à un succès variable, dépendant fortement du génotype.

Les techniques de multiplication *in vitro*

Le microbouturage et l'embryogénèse somatique sont les deux principales techniques de clonage *in vitro* utilisées efficacement pour la propagation des ligneux.

Le microbouturage consiste à produire, en conditions stériles, de nombreux bourgeons axillaires à partir d'un bourgeon ou plus précisément d'un méristème. Les bourgeons sont multipliés, allongés en tigelles de quelques centimètres et enracinés en présence d'une auxine, puis utilisés soit en plantation directe, soit en pieds-mères. La micropropagation permet l'amplification du matériel sélectionné sur une petite surface indépendamment des saisons. Les *in vitro*-boutures sont de qualité : elles sont exemptes de bactérie et de virus et présentent une vigueur juvénile souvent recherchée pour l'établissement de pieds-mères destinés au bouturage horticole. À titre d'exemple, le succès du bouturage des pieds-mères d'Eucalyptus établis à partir de *in vitro*-plants est augmenté de 40 % par rapport à des pieds-mères classiques.

De nombreux ligneux forestiers feuillus sont aujourd'hui amplifiés par microbouturage. Toutefois, cette technique reste coûteuse car elle est peu mécanisable et nécessite l'intervention d'un personnel spécialisé. La valorisation de cette technique aux potentialités énormes d'amplification passe obligatoirement par son intégration au sein de structures industrielles associant à la fois laboratoire, pépinière de production, vente des plants ou utilisation directe de ceux-ci en plantation. La combinaison des techniques de micropropagation et de bouturage horticole constitue le meilleur moyen pour accélérer les sorties variétales à un coût acceptable.

La qualité des plants forestiers issus directement ou indirectement de la multiplication *in vitro* peut être appréciée au travers de multiples essais dont le recul est d'environ une dizaine d'années pour l'Eucalyptus au Brésil, le Peuplier, le Merisier et le Noyer en France, le Bouleau

en Suède et les Chênes en Norvège. Pour ce qui est des Pins, les plus grandes plantations clonales à partir de vitro-plants de Pin radiata ont été réalisées par Fletcher Challenge en Nouvelle-Zélande depuis plus de 10 ans. L'ensemble de ces essais permet de conclure à une bonne croissance des clones et à une homogénéité intraclonale souvent remarquable.

La micropropagation, relativement aisée à partir de feuillus juvéniles ou âgés, est nettement plus difficile chez les conifères. **L'embryogénèse somatique**, c'est-à-dire l'obtention d'embryons à partir de cellules somatiques, apparaît comme la technique de prédilection pour l'amplification des conifères. Cette technique se décompose en plusieurs étapes :

- une phase d'initiation qui consiste à rendre un tissu somatique capable de se différencier en embryons. Ces embryons sont appelés somatiques par opposition aux embryons zygotiques obtenus à partir des cellules germinales ;
- une phase de multiplication en masse de ces embryons qui reste à un stade très peu différencié, précoce, immature, sous forme de masses embryogènes ;
- une phase de maturation de ces masses embryogènes que l'on peut comparer à ce qui se passe chez l'embryon zygotique lors de la dessiccation de la graine ;
- une phase de conversion de l'embryon somatique mature en plantule comparable à la germination de la graine.

Découverte initialement sur l'Épicéa par I. Hakmann dans les années 1985, l'embryogénèse somatique permet maintenant d'obtenir un nombre illimité de copies d'embryons immatures pour de nombreuses espèces. Les clones d'embryons ainsi obtenus sont génétiquement et morphologiquement conformes aux cellules de départ et, après un stade de maturation, se développent en plantules équivalentes à des semis.

La multiplication en masse de ces embryons est possible en milieu liquide et en conditions contrôlées dans des bioréacteurs. En utilisant ce système, il est aujourd'hui possible de produire plusieurs milliers d'embryons par litre de milieu de culture à des coûts bien inférieurs à ceux de la micropropagation. En effet, les embryons produits en milieu liquide peuvent en principe être étalés simplement sur un support de germination sans être manipulés un à un comme c'est le cas pour le microbouturage.

Les principales limites de l'embryogénèse somatique sont les suivantes :

- **au sein d'une espèce, la proportion de génotypes permettant d'initier des embryons est limitée.** Elle est de l'ordre de 20 %. Cette valeur semble être indépendante des familles au sein d'une espèce, mais davantage liée aux espèces elles-mêmes. Par ailleurs, il a été montré que la capacité à initier des embryons somatiques n'était pas liée à d'autres caractères génétiques connus.

- **l'embryogénèse somatique n'est possible, à quelques exceptions près, qu'à partir de matériels extrêmement juvéniles, le plus souvent des tissus prélevés sur des embryons zygotiques immatures.** Récemment, cependant, plusieurs auteurs ont présenté des résultats intéressants sur la possibilité de régénérer des embryons somatiques à partir de matériel âgé de quelques années chez l'Épicéa (Pâques *et al.*, 1998) et de 20 ans chez le Pin radiata (Smith, 1999). Les plants régénérés, en observation sur le terrain depuis deux ans, présentent une vigueur juvénile comparable à celle des semis. Bien sûr, ces observations devront être poursuivies pendant plusieurs années, afin de s'assurer du bon développement de ces plants. Ces résultats indiquent la possibilité de cloner des conifères âgés. Toutefois, des recherches complémentaires sont encore nécessaires pour généraliser cette possibilité à un grand nombre de génotypes et d'espèces.

- **la maîtrise de l'étape de maturation des embryons somatiques immatures en embryon cotylédonaire reste insuffisante.** Bien qu'il soit possible de produire des milliers d'embryons par

litre de milieu de culture, parfois quelques dizaines seulement sont capables de se développer en plantes.

Ces résultats illustrent bien les potentialités de l'embryogénèse somatique, mais aussi la nécessité de recherches complémentaires tant sur le contrôle de l'initiation et de la maturation, que du suivi des embryons somatiques sur le terrain. Toutefois, cette technique associée à la congélation à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou cryoconservation, est déjà, dans l'état actuel de l'art, largement utilisée par toutes les grandes compagnies forestières internationales comme outil intégré aux programmes d'amélioration génétique.

De nombreux tests d'évaluation d'embryons somatiques de conifères sont en cours en Europe, aux États-Unis et en Nouvelle-Zélande. Bien que le recul n'excède pas 10 ans, il apparaît que le mode de développement des "plantes somatiques" est comparable à celui du semis. L'homogénéité intraclonale est grande même si quelques cas de variations somaclonales, c'est-à-dire les variations se produisant durant certaines étapes de culture *in vitro*, ont été décrits dans des situations de multiplication atypiques.

Comment et pourquoi utiliser les techniques de clonage *in vitro* ?

L'intérêt de la multiplication végétative *in vitro* est le clonage d'individus exceptionnels exprimant un ensemble de caractères peu héréditaires et donc peu représentés dans des familles issues de croisements contrôlés. **Les techniques de clonage *in vitro* associées à la cryoconservation** sont utilisées pour la sélection de ces individus remarquables pour plusieurs caractères et leur diffusion dans le cadre de plantations spécialisées. Cette stratégie, mise en œuvre depuis plusieurs années par Weyerhaeuser, International Paper, Fletcher Challenge Forest et Westwaco, est illustrée dans la figure 1 (p. 165).

Les embryons zygotiques obtenus à partir de croisements contrôlés sont amplifiés par embryogénèse somatique et congelés dans l'azote liquide : les tissus produits *in vitro* peuvent être conservés en principe indéfiniment de cette manière, tout en maintenant leurs caractéristiques juvéniles. Quelques-uns de ces embryons sont régénérés pour des tests au champ. Après plusieurs années d'évaluation sur le terrain, les embryons des meilleurs individus sélectionnés seront décongelés puis amplifiés, soit pour l'établissement de haies de bouturage horticole, soit encore pour une multiplication massive par embryogénèse somatique lorsque la technique aura été améliorée.

Dans un avenir plus lointain, les individus des familles issues de croisements contrôlés seront triés à l'aide des marqueurs moléculaires discriminants pour des propriétés intéressant l'industriel. Dès lors, l'effort de cryoconservation pourrait être plus réduit et les individus intéressants pourront, le cas échéant, être amplifiés directement.

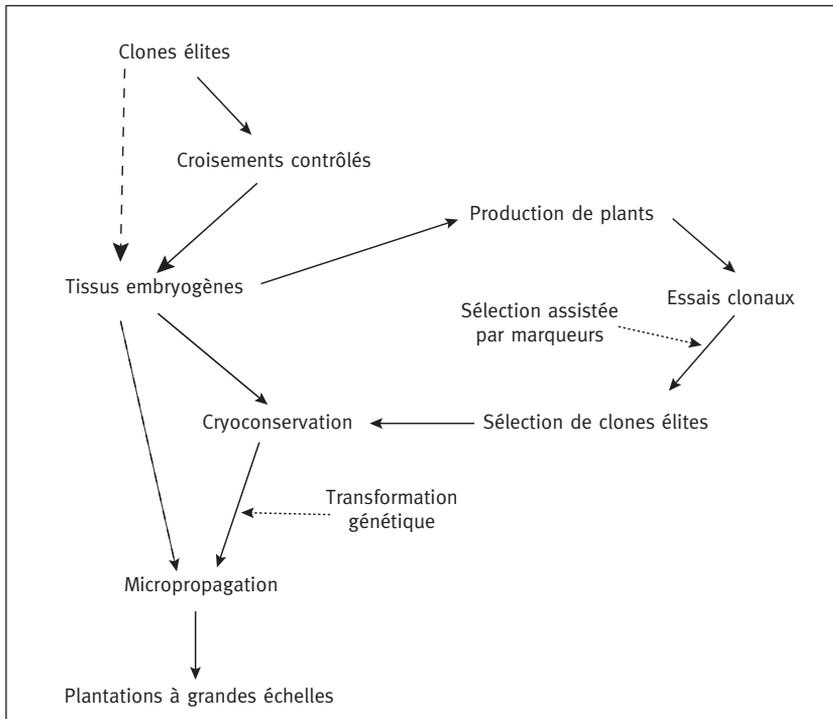
Les retombées les plus intéressantes du clonage seront liées à la valorisation immédiate d'individus sélectionnés à l'âge adulte en test multi-sites. Pour certains feuillus tels que les Peupliers ou les Eucalyptus, l'amplification clonale par micropropagation est possible. Pour les résineux âgés, l'initiation d'embryons somatiques à partir de matériel sélectionné semble une réelle opportunité comme illustré dans la figure 1 (p. 165).

Les grandes capacités de régénération des embryons somatiques produits *in vitro* en font une cible idéale pour la transformation génétique. Les individus sélectionnés pourront dès lors être transformés génétiquement avec des gènes leur conférant des caractères particuliers en termes de production quantitative (la tolérance aux stress, aux pathogènes, rendement photosynthétique...) mais aussi en termes de production qualitative (qualité du bois au sens large).

FIGURE 1 POSSIBILITÉS D'INTÉGRATION DES BIOTECHNOLOGIES
DANS LE PROGRAMME D'AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE D'UN ARBRE FORESTIER

Première possibilité (flèche unie) : clonage *in vitro* et conservation à 196 °C des génotypes à l'état juvénile pendant la sélection des individus remarquables.

Seconde possibilité (flèche tiret) : multiplication directe par embryogénèse somatique des clones élites à partir de matériel adulte. Les niveaux où peuvent s'insérer la sélection assistée par marqueurs et la transformation génétique sont également indiqués.



Notons que la cryoconservation associée à la multiplication *in vitro* offre aussi des perspectives intéressantes dans le cadre de la conservation d'arbres forestiers précieux menacés de disparition.

Conclusions

Les techniques de clonage offrent, dès aujourd'hui, la possibilité d'accélérer les programmes d'amélioration et les sorties variétales. Il apparaît urgent de les intégrer dans le cadre des programmes d'amélioration d'espèces à intérêt économique évident telles que le Peuplier et le Pin maritime.

Un effort particulier devrait être porté sur les perspectives de "rajeunissement" par embryogénèse somatique de conifères âgés sélectionnés pour des caractéristiques exceptionnelles. Les clones régénérés constitueraient rapidement un matériel de choix pour le reboisement raisonné en fonction des contraintes industrielles et environnementales.

Le développement des techniques de clonage *in vitro*, pratiquées selon les règles de l'art, ne trouvera sa justification que si le matériel végétal proposé rencontre l'intérêt de tous les acteurs de

la filière-bois. L'identification des clones remarquables passera par l'utilisation des marqueurs moléculaires et une valeur ajoutée supplémentaire sera possible grâce à la transformation génétique.

La maîtrise du clonage des feuillus et des conifères présente un intérêt majeur pour accroître la compétitivité des acteurs de la filière-bois installés en France. Elle concerne particulièrement le Pin maritime, le Peuplier et l'Eucalyptus.

Les actions de recherche à mener en matière de biotechnologies concernent l'accélération des sorties variétales en tirant parti des techniques modernes de clonage qui restent bien sûr à améliorer. Ceci suppose une recherche constante de la qualité des plants produits tant au laboratoire que sur le terrain et ceci en étroite concertation avec les professionnels. Dans cet esprit, il sera nécessaire de mettre en œuvre les outils modernes de la biologie moléculaire garantissant la qualité du matériel proposé dans le respect des normes de diversité génétique qui seront en vigueur.

Une attention particulière doit être portée au contrôle de la régénération de plantes à partir de tissus différents prélevés sur des clones de plus en plus âgés. La réactivité des tissus devra être mise en relation avec les mécanismes moléculaires et métaboliques régissant le vieillissement cellulaire. Ces recherches plus fondamentales nécessitent un financement relativement important qui devrait être pris en charge par les pouvoirs publics et au moins en partie par l'industrie.

LA TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE ET LES ARBRES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS

La transformation génétique ou transgénèse est le nom générique donné aux différentes techniques de génie génétique qui permettent d'obtenir, par transfert asexué de gènes, des organismes génétiquement modifiés, les fameux OGM. Par analogie, le nom d'AGM a été proposé récemment pour Arbre génétiquement modifié (Bérenger, 2000).

Ainsi, un OGM est un organisme vivant dont l'expression du patrimoine génétique a été modifiée ou dont le génome a été enrichi d'un ou plusieurs gènes. Toutes les cellules, y compris les cellules reproductrices, portent cette transformation qui sera, de ce fait, transmise à la descendance (voir par exemple Bizet, 1997^(*)).

La transformation génétique des arbres forestiers n'a été possible que récemment : la production du premier arbre transgénique, un Peuplier, a été obtenue en 1987 aux États-Unis (Fillatti *et al.*, 1987). Chez les feuillus forestiers, les techniques de transformation génétique ne sont efficaces que pour un petit nombre d'espèces : principalement le Tremble, le Peuplier, le Noyer, le Liquidambar, l'Eucalyptus, le Châtaignier. Chez ces espèces, les recherches ont été presque exclusivement limitées à la démonstration des potentialités de la transgénèse sur un petit nombre de génotypes faciles à transformer. Selon la bibliographie, seuls quelques gènes gouvernant des caractères simples, d'intérêts agronomiques (résistance à un herbicide, tolérance aux insectes) ou technologiques (visant à modifier la qualité du bois), ont été introduits et des arbres transgéniques sont présentement en cours d'évaluation au champ (Leplé *et al.*, 1999). Si les premiers essais au champ d'arbres transgéniques effectués en Europe remontent pour les feuillus à 1988, il faut attendre 1997 avant de trouver la mention de tels essais pour les conifères. Il semble que la technique en soit encore à une phase d'optimisation et que seuls des gènes marqueurs soient utilisés (Pilate *et al.*, 1999). Là aussi, seules quelques espèces sont concernées, notamment les Pins, les Mélèzes et les Épicéas.

(*) Les numéros renvoient à la liste des adresses Internet annexée en p. 179.

Cependant, pour des raisons liées à la propriété industrielle, tout n'est pas publié sur le sujet, surtout en ce qui concerne les espèces d'arbres présentant un intérêt économique : ainsi, des Eucalyptus transgéniques modifiés pour des caractères agronomiques sont en cours d'évaluation au champ, alors même que le succès de l'obtention d'Eucalyptus transgéniques n'a été publié que sous forme de brevets (MacRae, 1997).

Si, aujourd'hui, la transformation génétique s'avère être un outil de recherche puissant pour cerner la fonction de gènes particuliers, son utilisation est également très sérieusement envisagée pour la production de variétés améliorées destinées à des plantations spécialisées. À titre d'exemple, citons l'activité intense dans ce domaine de International Paper sur le Pin taeda et de Fletcher Challenge sur certains Eucalyptus. L'annonce par International Paper de la création d'un consortium essentiellement focalisé sur la production d'arbres forestiers transgéniques illustre les espoirs basés sur cette technologie pour la création de variétés nouvelles en complément aux programmes d'améliorations classiques.

Les différentes étapes menant à la production d'un AGM (arbre génétiquement modifié) se décomposent comme suit :

- 1) identification du gène capable d'améliorer un caractère intéressant ou de conférer une ou plusieurs propriétés nouvelles ;
- 2) isolement de ce gène ;
- 3) réalisation d'une construction génique comportant le gène d'intérêt et les séquences de régulation nécessaires à son expression dans l'organisme receveur ; un gène de "sélection" est également présent sur cette construction (résistance à un antibiotique ou à un herbicide particuliers...) ;
- 4) introduction de cette construction dans le génome de la cellule, par un vecteur biologique (une agrobactérie) ou par un procédé mécanique, tel que la projection de particules portant la construction génique ;
- 5) sélection des cellules végétales transformées sur un milieu contenant l'antibiotique ou l'herbicide particuliers mentionnés en 3) ;
- 6) régénération d'un arbre entier à partir de ces cellules sélectionnées par des techniques de culture *in vitro* ;
- 7) sélection des plantules (on parle également de transclones ou de lignées transgéniques) sur la base du niveau d'expression du gène d'intérêt introduit.

L'évaluation finale des performances de ces AGM sera généralement réalisée sur des arbres adultes, notamment lorsque l'effet de la transformation porte sur la modification de caractères ne s'exprimant que très tardivement comme, par exemple, la stérilité. Les arbres étant des espèces pérennes, il est également important de vérifier la stabilité d'expression des transgènes (gènes introduits par transformation génétique) dans des dispositifs au champ.

La plupart des recherches sur les AGM se sont concentrées jusqu'à aujourd'hui sur les premières étapes du processus, notamment sur les techniques de transfert de gènes (Pilate, 1999) et sur l'identification de gènes contrôlant des caractères tels que la qualité du bois. Beaucoup de recherches restent à faire sur la régénération de plantules à partir des tissus transformés, qui est souvent dépendante du génotype. Dès lors, peu d'études ont été réalisées sur le comportement au champ des AGM et l'impact éventuel de ceux-ci utilisés en plantations spécialisées. Un nombre croissant d'essais au champ d'AGM sont cependant mis en place chaque année. D'après une étude menée par le WWF (Fonds mondial pour la Nature) en 1999, il en existait 116 répartis dans 27 pays et concernant 24 espèces d'arbres (Asante Owusu, 1999). Les sept essais au champ réalisés en France ont tous été installés après obtention des autorisations nécessaires de la part de la Commission du Génie biomoléculaire⁽²⁾.

Potentialités et limites à l'utilisation de la transgénèse chez les arbres forestiers

La transformation génétique offre sans conteste de nouvelles possibilités à l'améliorateur. Mais, les études sur ces différentes possibilités n'en sont encore qu'à un stade exploratoire et des obstacles techniques restent à surmonter avant de pouvoir utiliser de façon raisonnée les AGM dans des cultures spécialisées.

L'avantage majeur de la transgénèse est qu'elle permet **d'introduire rapidement, dans une variété améliorée, un caractère dominant nouveau, peu héritable ou non existant, c'est-à-dire peu ou pas transmissible par reproduction sexuée**. Ainsi, la transgénèse permet le franchissement de la barrière d'espèce : un cas typique concerne des gènes de la bactérie *Bacillus thuringiensis* capables de conférer une résistance vis-à-vis des insectes. Un autre exemple plus spécifique aux arbres serait d'introduire, dans une espèce de Gymnosperme, certains gènes d'Angiospermes contrôlant certaines propriétés du bois. Les conifères transgéniques pourraient alors présenter un bois dont les propriétés seraient proches de celles des feuillus. La transgénèse permet également la modification de l'expression de gènes existants. L'introduction de copies supplémentaires d'un gène existant naturellement dans l'espèce pourra conduire à l'expression de phénotypes très marqués. Cette stratégie de transformation est applicable à un large éventail de gènes cibles, dès lors que des gènes potentiellement intéressants auront été identifiés. Aujourd'hui, ce sont surtout les gènes codant des enzymes du métabolisme des lignines qui ont été la cible de ce type d'expérimentation principalement chez le Peuplier.

Si elle présente des atouts incontestables, l'utilisation de la transgénèse recèle également des contraintes.

Actuellement, la transgénèse n'est développée que sur un très petit nombre d'espèces et de génotypes à l'intérieur de ces espèces pour lesquelles la régénération de plantules à partir de tissus transformés est possible. La mise au point de méthodes plus efficaces de régénération de plantes à partir des tissus transformés et de l'amplification de celles-ci est indispensable pour l'intégration réaliste de la transgénèse dans les programmes d'amélioration. Les perspectives dans ce domaine sont cependant encourageantes au vu des progrès récents dans la maîtrise de la régénération et de la multiplication en masse pour plusieurs espèces de conifères par embryogénèse somatique.

Un défaut inhérent à la transgénèse chez les plantes est que l'insertion du transgène n'est pas contrôlée : aussi, le site d'intégration du transgène peut éventuellement affecter une région du génome également importante pour d'autres aspects du développement de l'arbre. Cela implique que, pour chaque gène introduit, plusieurs lignées transgéniques devront être soigneusement évaluées afin de détecter et d'éliminer celles présentant des effets secondaires indésirables.

Jusqu'à maintenant, l'expression des transgènes introduits n'est généralement pas ciblée ; au contraire, afin d'obtenir un effet maximum, le transgène est exprimé dans toutes les parties de l'arbre. Pour limiter d'éventuels effets secondaires non désirés, il conviendrait de développer des constructions géniques permettant un ciblage de l'expression du gène dans le temps et dans l'espace, par exemple au moment et au lieu de l'attaque du pathogène pour un gène de résistance. Pour cela, il est nécessaire de disposer des séquences régulatrices permettant le ciblage de cette expression.

L'utilisation de la transgénèse à des fins appliquées pose des problèmes d'acceptabilité par le public. Concernant les AGM, ces problèmes sont liés principalement au manque de données sur l'évaluation au champ d'AGM et sur les effets potentiels de ces cultures sur l'environnement. Il est en effet nécessaire de réaliser de telles études d'impact et, à l'issue de ces évaluations, de définir des réglementations adéquates. Cette démarche devrait être effectuée pour chaque caté-

gorie d'AGM puisque, selon le gène introduit et donc selon le caractère modifié, les impacts environnementaux pourront être différents.

Il semble également nécessaire d'améliorer la communication avec le public. Le déploiement potentiel de plantations d'arbres transgéniques ne manque pas de poser des problèmes spécifiques exposés par exemple dans un rapport récent du WWF, voire un rejet par des groupements anti-biotechnologie (cf. destruction en Angleterre d'un dispositif de peupliers transgéniques au champ en juillet 1999). Dans un souci de communication, un document sur la position de chercheurs travaillant dans le domaine des biotechnologies forestières a été publié dans la revue *Nature Biotechnology* (Strauss *et al.*, 1999)⁽³⁾.

Il est intéressant de rappeler ici les principaux points de ce document :

- **les cultures d'AGM se limiteront à des plantations à courtes révolutions à des fins de production de bois**, c'est-à-dire dans le cadre d'une culture intensive avec ce que l'on pourra appeler des "champs d'arbres".

- les plantations d'AGM permettront d'améliorer la production de bois, en quantité comme en qualité, et de ce fait devraient contribuer à diminuer la surexploitation des forêts naturelles.

- **la discussion sociale sur les avantages et les inconvénients des AGM doit évoluer** de considérations générales sur les AGM vers des considérations plus spécifiques sur les mérites de modifier un arbre pour un caractère donné dans un environnement donné avec une sylviculture donnée.

- si l'utilisation d'AGM entraîne des risques pour les plantations ou les écosystèmes, des solutions doivent être développées afin de réduire au minimum ces mêmes risques. Pour cela, il existe différentes voies de recherche :

- utilisation de constructions différentes afin de conférer le caractère voulu sans effet indésirable sur le développement de l'arbre ou sur l'écosystème ;

- études de stratégies de gestion de résistance (pour les AGM résistants aux ravageurs) ;

- déploiement de méthodes de transformation plus efficaces afin de ne pas réduire inconsidérément la diversité génétique par la capacité de produire un éventail large de génotypes transgéniques ;

- déploiement de méthodes efficaces pour modifier la floraison et ainsi permettre un contrôle fiable de la dissémination de transgènes hors des plantations.

Projets d'utilisation de la transgénèse à des fins appliquées

Pour les grandes compagnies nord-américaines investissant dans les biotechnologies sur les arbres forestiers, un objectif prioritaire accessible par transgénèse est d'augmenter la productivité des plantations d'arbres à courtes révolutions. Cet objectif peut être atteint soit directement, par modification d'un métabolisme important pour la croissance de l'arbre, soit indirectement en augmentant la tolérance aux insectes et aux pathogènes, ou encore en induisant la stérilité, l'idée étant que l'énergie dépensée à produire des graines serait chez un arbre stérile redirigée vers la croissance végétative. Actuellement, la majorité des caractères qui ont été modifiés chez les arbres par transgénèse sont la résistance aux herbicides, la résistance aux insectes, la stérilité et la modification des caractéristiques du bois. Par contre, la transgénèse n'a pas encore permis d'améliorer des caractères complexes tels que la vigueur ou la plasticité qui restent des cibles privilégiées de l'amélioration classique.

Des gènes conférant une résistance aux herbicides ou une tolérance aux insectes sont déjà largement utilisés en Amérique du Nord dans les cultures commerciales de pomme de terre, de coton ou de soja. L'utilisation de ces gènes, qui ont potentiellement des effets importants sur l'environnement, est également envisagée dans les plantations d'arbres aux États-Unis. Cependant,

l'expérience acquise avec les plantes transgéniques de grandes cultures n'est que partiellement transposable aux AGM du fait des spécificités des arbres forestiers (espèces pérennes à vie longue, existence de populations naturelles importantes, etc.) et, avant qu'une utilisation commerciale d'AGM modifiés pour ces caractères puisse être raisonnablement envisagée, leur évaluation doit être réalisée. C'est ce qui est en cours en Oregon, où des peupliers transgéniques résistants au glyphosate menés en taillis à courte révolution sont évalués sur plusieurs sites (Meilan *et al.*, 2002). En France, des taillis à courte révolution de peupliers transgéniques résistants au Basta ont également été évalués pendant plusieurs années.

La tolérance aux insectes est un caractère difficile à évaluer dans un pool génétique. En revanche, les pertes de production résultant de l'attaque d'insectes peuvent s'avérer importantes. Jusqu'à présent, les études de tolérance aux insectes d'arbres transgéniques se sont concentrées sur des insectes défoliateurs. Des arbres transgéniques transformés avec différents gènes de *Bacillus thuringiensis* codant des δ -endotoxines efficaces contre des lépidoptères ou des coléoptères (figure 2A, ci-dessous) sont actuellement évalués en champ aux États-Unis et en Chine, tandis que des études sont en cours, en France et aux États-Unis, sur le contournement possible d'une telle résistance monogénique par l'insecte cible. Cet aspect est primordial quand on considère la différence très importante existant entre les temps de génération des arbres et ceux des insectes. Il est probable que, comme pour les plantations de grandes cultures, le déploiement de zones refuges pour les insectes sensibles soit à considérer. Enfin, des arbres transgéniques apparus comme très résistants aux attaques d'insectes défoliateurs pourront également se révéler plus résistants vis-à-vis d'autres classes d'insectes tels que les xylophages.

FIGURE 2 A PEUPLIERS TRANSGÉNIQUES RÉSISTANTS AUX CHRYSOMÈLES

Toutes les chrysmèles nourries avec du feuillage transgénique exprimant une endotoxine Bt de type cry3A décèdent au bout de quelques jours (Génissel *et al.*, manuscrit en préparation).

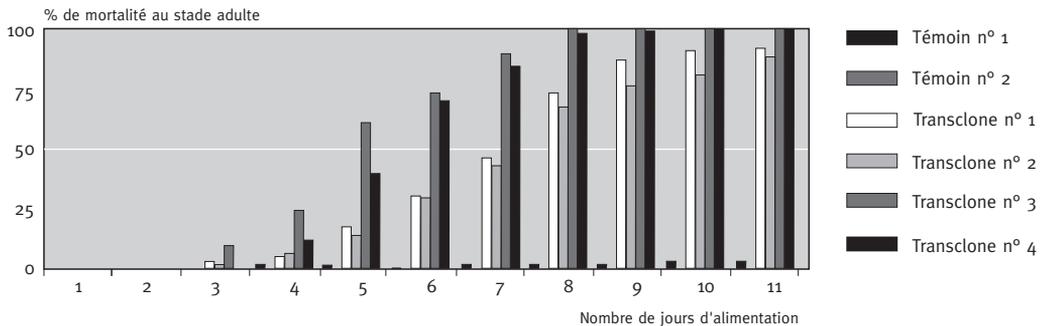


FIGURE 2 B PEUPLIERS TRANSGÉNIQUES SOUS EXPRIMANT LA CAD, UNE ENZYME CLÉ DU MÉTABOLISME DES LIGNINES, PRÉSENTANT DES MODIFICATIONS IMPORTANTES AUX NIVEAUX DES PROPRIÉTÉS PAPIÈRIÈRES

Le nombre kappa, indice du taux de lignine résiduelle après l'étape d'extraction, est beaucoup plus faible, tandis que le degré de polymérisation de la cellulose n'est pas affecté (Pilate *et al.*, résultats non publiés).

	Témoins		Transclones		
	N° 1	N° 2	N° 1	N° 2	N° 3
Kappa	42	44,5	27	31	30,2
Cellulose DP	2 260	2 165	2 120	2 180	2 170

L'utilisation de la transgénèse est potentiellement applicable à la résistance aux pathogènes. Des études sont en cours sur le sujet aux États-Unis et en Belgique afin de transférer des gènes de résistance aux rouilles chez le Peuplier. Il apparaît en effet difficile de trouver une résistance durable aux rouilles chez cette espèce et le recours à une solution biotechnologique pourrait être envisagée dans le futur. Enfin, il faut signaler des études, menées chez les arbres, concernant la tolérance au stress hydrique (en Israël) et au stress oxydatif (en Allemagne).

À côté des aspects de résistance aux stress biotiques et abiotiques, une seconde voie d'investigation intéressante pour augmenter la productivité des arbres forestiers est d'obtenir la stérilité. En effet, il est possible que l'énergie investie dans la reproduction soit, chez un arbre stérile, déviée vers le développement végétatif, entraînant un gain de croissance potentiel. De plus, nous l'avons vu, la production d'arbres incapables de produire des fleurs fonctionnelles permettra de prévenir des flux de gènes indésirables des plantations transgéniques vers les populations naturelles. Des gènes impliqués dans la transition de l'état végétatif à l'état floral ont été isolés par une équipe américaine, qui développe un programme visant à obtenir une stérilité totale chez le Peuplier par transgénèse. La stratégie est d'introduire deux transgènes différents, tous deux capables de conférer la stérilité mais par des voies différentes, afin d'éliminer un risque de rétablissement de fertilité par une extinction de l'expression d'un des transgènes. Des arbres transgéniques sont actuellement plantés en champ pour évaluation mais n'ont, semble-t-il, pas encore atteint le stade mature nécessaire à l'évaluation de l'efficacité de cette stratégie.

Une deuxième cible pour la transformation génétique est de **modifier des caractères liés à la qualité du produit**. Chez les arbres, l'amélioration de la qualité du bois par transgénèse n'en est encore qu'à ses débuts. Du fait de la rareté des gènes disponibles, les études se sont concentrées principalement sur la modification du **métabolisme des lignines**, un des constituants majeurs du bois. L'objectif de cette démarche est de produire des arbres contenant moins de lignine ou une lignine modifiée plus facile à ôter durant le processus de fabrication de la pâte à papier, de façon à diminuer la pollution et les coûts de fabrication. Des trembles transgéniques, présentant un contenu en lignine réduit de plus de 50 % avec une augmentation conséquente du contenu en cellulose, ont été obtenus à l'Université technologique de Michigan et plusieurs milliers de ces arbres sont actuellement évalués en champ pour leurs performances agronomiques. De même, le bois de peupliers transgéniques à lignine modifiée obtenus à l'INRA d'Orléans donne, par traitement Kraft, avec un rendement accru, une pâte à papier contenant moins de lignine (figure 2B, p. 170). Les analyses papetières réalisées sur des peupliers transgéniques plantés au champ depuis 1995 confirment les résultats obtenus précédemment sur des jeunes plants élevés en serre (Pilate *et al.*, 2002). D'une façon générale, l'ensemble des études menées sur l'altération du métabolisme des lignines par transformation génétique laisse penser que la synthèse de ce polymère est très plastique. De ce fait, cette approche présente de grandes potentialités pour adapter des propriétés technologiques du bois à des applications spécifiques de l'industrie. Il reste toutefois à évaluer l'impact que ces modifications pourraient avoir sur le développement de l'arbre et sur sa résistance aux pathogènes.

Afin d'identifier de nouveaux gènes chez les arbres forestiers, des projets à grande échelle de **génomique fonctionnelle** (c'est-à-dire un inventaire des gènes, de leurs profils d'expression et de leurs fonctions) se développent actuellement dans plusieurs pays, notamment sur le Peuplier, le Pin et l'Eucalyptus. En France, les équipes travaillant dans le domaine de la biologie moléculaire chez les arbres (notamment à l'INRA) se regroupent en réseau, afin de mettre en commun les efforts nécessaires au développement de cette nouvelle approche. Dans un avenir proche, de nombreuses données seront disponibles sur l'expression coordonnée d'un large éventail de gènes dans les différents tissus et organes de l'arbre. De nouveaux gènes seront utilisables pour modifier par transgénèse la qualité du bois chez les arbres et produire un bois mieux adapté,

par ses propriétés et son uniformité, à des applications industrielles spécifiques. Déjà, des gènes de régulation, spécifiquement exprimés dans le bois, ont été identifiés par une équipe suédoise et des arbres transgéniques sont en cours de production.

Une prise en compte de la transformation génétique dans le programme d'amélioration génétique d'un arbre forestier nécessite certainement des modifications importantes de la stratégie d'amélioration qui, à notre connaissance, ne sont encore que rarement envisagées. Quelques essais relativement infructueux ont été publiés sur la transformation génétique du pollen. Par contre, l'utilisation de la transformation génétique est clairement envisagée dans le programme néo-zélandais d'amélioration du *Pin radiata* : dans ce schéma, une partie de la population d'amélioration est cryoconservée sous forme de tissus embryogéniques, pendant l'évaluation en champ de ce matériel et l'identification des variétés performantes par une sélection assistée par marqueurs. Dans un second temps, ces variétés performantes seront multipliées en masse à partir des stocks de matériel cryoconservés pour déploiement en culture à grande échelle. Parallèlement, la transformation génétique est optimisée sur ce matériel embryogénique. Il est envisagé de transformer les meilleurs génotypes avant le stade de multiplication en masse.

Actuellement, l'utilisation de la transgénèse chez les arbres forestiers est envisagée pour quelques espèces, pour lesquelles :

- la transformation génétique est au point,
- la plantation d'un nombre relativement réduit de clones en champ est envisageable voire déjà effective,
- le contrôle de la dissémination de transgènes dans les populations naturelles est possible, au plan théorique comme au plan pratique.

C'est le cas pour des plantations de peupliers menées en taillis à courte révolution envisagées aux États-Unis. C'est le cas également pour des espèces exotiques dans les lieux où elles sont plantées, telles que, par exemple, l'*Eucalyptus* au Brésil et le *Pin radiata* en Nouvelle-Zélande. Pour ces espèces, il semble réaliste de pouvoir produire, tester, amplifier et déployer relativement rapidement un nombre important de clones transgéniques.

Conclusions

La transformation génétique apparaît comme une voie rapide pour conférer un caractère nouveau, complémentaire de l'amélioration génétique classique. Cette technique ouvre des voies de développement novatrices pour la création de variétés améliorées. Avec le développement récent de la génomique chez les arbres, il est probable que les applications de la transgénèse connaîtront des développements importants dans un futur proche. Des limites existent encore actuellement pour la mise en œuvre de cette technique chez les arbres, mais elles semblent surmontables si des moyens adéquats sont déployés à cette fin. Des études complémentaires sont nécessaires pour :

- améliorer les techniques de transfert de gènes ;
- mettre au point les techniques de régénération à partir des tissus transformés prélevés sur des individus sélectionnés ;
- étudier la stabilité de l'expression des transgènes chez les arbres et évaluer leurs performances dans un contexte sylvicole précis ;
- évaluer l'incidence de plantations spécialisées à base d'AGM sur l'environnement.

Actuellement, l'utilisation commerciale d'AGM (comme des autres plantes transgéniques) est sujet à controverse dans l'opinion publique, mais l'acquisition d'un nombre croissant de connaissances permettra, espérons-le, de faire la part des choses et de déterminer au cas par cas et de façon raisonnée les conditions de l'exploitation économique d'AGM.

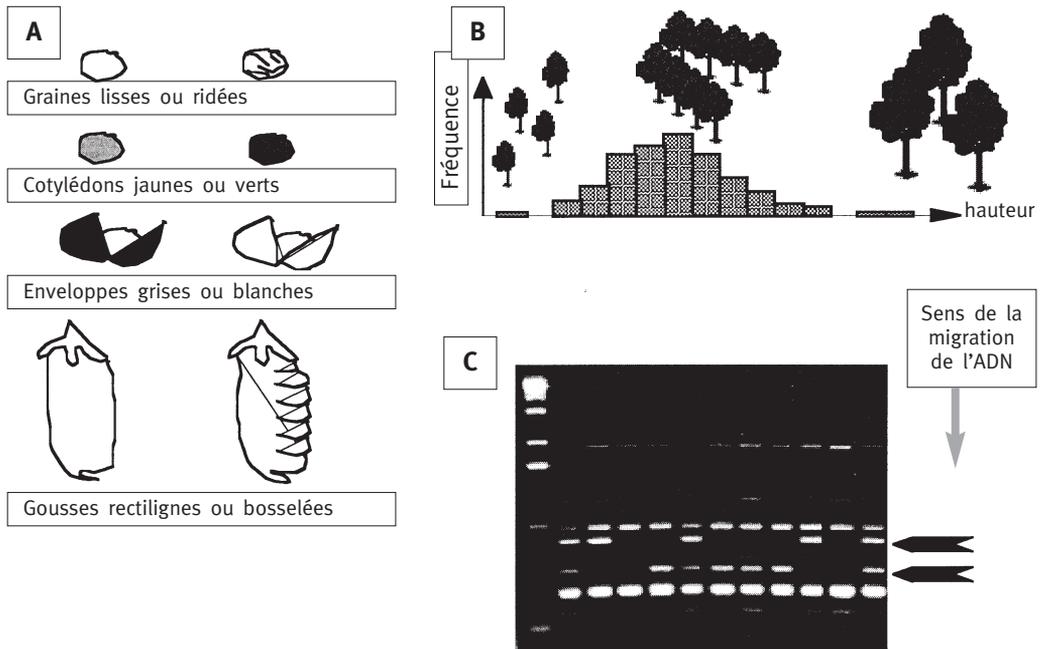
LA SÉLECTION ASSISTÉE PAR MARQUEURS CHEZ LES ARBRES FORESTIERS

Variation biologique des caractères

Des individus appartenant à une même espèce (un peuplement de Chênes, une plantation de Pins, etc.), présentent des caractères qualitatifs très visibles. Il s'agira, par exemple dans le cas des arbres, de la couleur du fruit, de l'absence ou de la présence de poils sur les feuilles, de la longueur du pétiole ou du pédoncule. La transmission héréditaire de tels caractères a été établie par le moine autrichien Johann Mendel (1822-1884) à la fin du XIX^e siècle. D'autres différences sont plus discrètes, car elles sont de nature quantitative : c'est le cas du poids des graines, de la hauteur totale d'arbres mesurés à un âge donné. La majorité des caractères économiquement importants en sélection végétale sont des caractères quantitatifs qui présentent une distribution continue (figure 3A et 3B, ci-dessous). Ce type de distribution exprime que le phénotype (l'apparence) est sous la dépendance d'un grand nombre de gènes et de facteurs environnementaux. La valeur phénotypique mesurable peut ainsi se décomposer en une valeur génotypique induite par les facteurs génétiques et une valeur environnementale induite par les facteurs du milieu. Chez les arbres forestiers, les caractères cibles de la sélection tels que le volume du fût ou la densité du bois sont fortement à moyennement influencés par le milieu : on dit aussi qu'ils sont peu héréditaires. La modélisation mathématique de la transmission héréditaire de ces caractères

FIGURE 3 VARIATION BIOLOGIQUE DES CARACTÈRES

Les variations observées sur les caractères phénotypiques peuvent être de deux types : caractères qualitatifs ou quantitatifs. Un exemple bien connu de caractères quantitatifs est celui des caractères morphologiques du pois étudiés par Mendel (A). Un grand nombre de caractères présentent cependant des distributions continues (caractères quantitatifs) comme par exemple la hauteur totale d'un arbre d'une espèce donnée à un âge donné (B). Il est également utile de caractériser les individus par leur empreinte génétique (C). La première piste est un marqueur de l'ADN. Les pistes 2 à 12 correspondent à une empreinte génétique de 11 arbres. Parmi les quelques fragments d'ADN amplifiés par la technique PCR, deux d'entre eux (indiqués par une flèche) sont polymorphes : la présence ou l'absence d'un tel fragment marqueur traduit une différence dans la séquence d'ADN entre les individus.



quantitatifs s'est développée à travers la théorie de la génétique quantitative. Les modèles développés dans le cadre de cette discipline possèdent un pouvoir prédictif remarquable dont l'efficacité a été vérifiée à partir de résultats expérimentaux et dont témoignent les succès en sélection végétale (y compris chez les arbres forestiers) et animale. Cependant, la génétique quantitative ne permet pas d'accéder à des informations importantes pour le sélectionneur telles que le nombre de gènes intervenant effectivement dans l'expression d'un caractère quantitatif, leur localisation sur les chromosomes, leurs contributions relatives et leurs modes d'actions. Si une telle information était connue, elle pourrait permettre théoriquement d'améliorer l'efficacité de la sélection.

La sélection indirecte

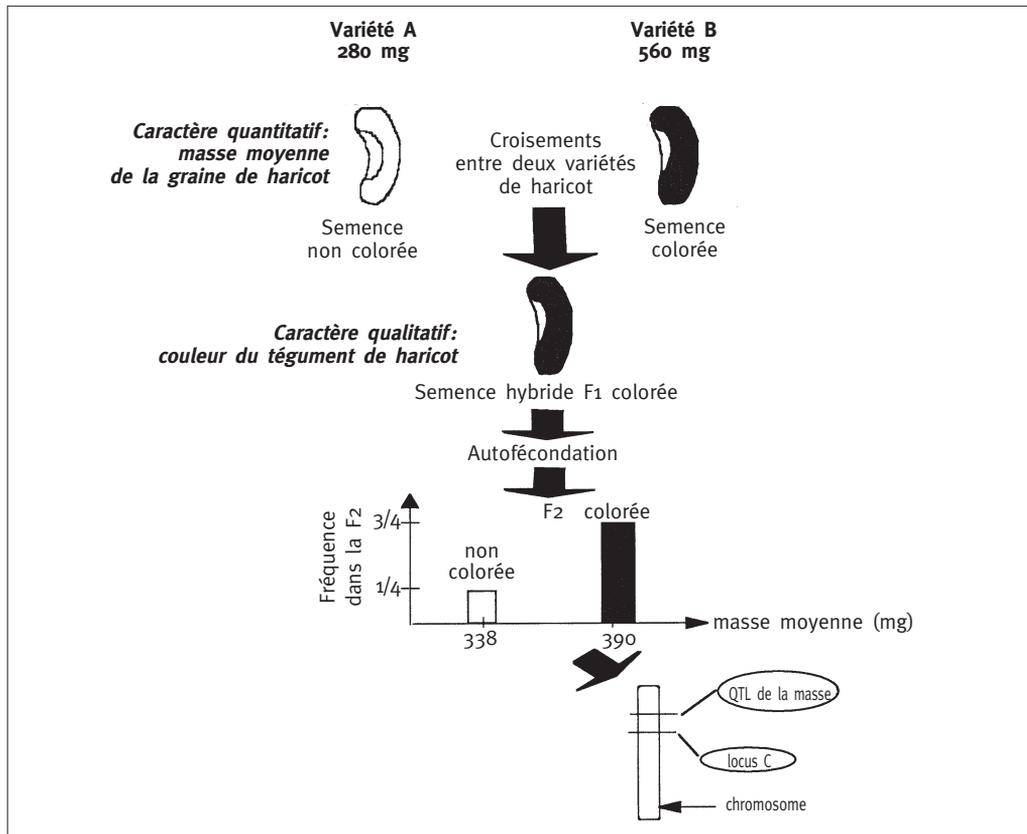
Chez les arbres forestiers, la sélection est toujours indirecte car elle s'effectue bien avant l'âge de la récolte définitive. L'efficacité, E , de cette sélection précoce est, d'une part, proportionnelle à l'héritabilité h_j du critère prédicteur, évaluée au stade juvénile, et à la corrélation génétique, r_{Aj} , entre le caractère prédicteur (exemple : hauteur totale à 12 ans chez le Pin maritime) et le caractère prédit mesuré au stade adulte (volume de bois à 50 ans chez le Pin maritime) ; elle est, d'autre part, inversement proportionnelle à l'héritabilité du caractère prédit, h_A . Dans le cas simple d'une sélection massale, E s'écrit : $E = h_j \times r_{Aj} / h_A$. L'héritabilité du caractère prédit étant fixée, l'augmentation de E passe par le choix d'un critère prédicteur très héritable montrant une bonne corrélation génétique avec le caractère prédit. Cependant, la sélection indirecte sera d'autant moins efficace que h_A sera plus élevée. On demandera aussi à un critère prédicteur d'être fiable, de mise en œuvre rapide et bon marché, des milliers d'individus devant être mesurés chaque année. Les marqueurs moléculaires, 100 % héritables, semblent *a priori* répondre à ces critères, si tant est qu'ils puissent être associés aux caractères cibles. La recherche de tels critères indirects de sélection et leur utilisation dans un programme d'amélioration rentrent dans le cadre de la sélection assistée par marqueurs.

Associer un caractère qualitatif à une variation quantitative

En 1923, un chercheur américain, Karl Sax, proposa d'utiliser des marqueurs morphologiques ou caractères qualitatifs à hérédité monogénique (c'est-à-dire contrôlée par un seul gène), pour localiser sur les chromosomes les facteurs génétiques impliqués dans les variations quantitatives et également pour quantifier leurs effets. Dans une expérience célèbre menée sur le haricot (figure 4, p. 175), il trouva en effet une association entre la pigmentation des téguments de la graine (caractère qualitatif contrôlé génétiquement par un gène unique) et la taille du grain (caractère quantitatif contrôlé par de nombreux gènes), qu'il attribua à la liaison entre l'un des facteurs génétiques responsables de la taille du grain et le locus (la position dans le génome) du gène déterminant sa couleur. À partir des années 1980, le développement des techniques de biologie moléculaire a permis de mettre au point des marqueurs de l'ADN (figure 3C, p. 173). Ces caractères qualitatifs ont été utilisés pour construire des cartes génétiques, et identifier (par des méthodes statistiques) les zones chromosomiques contenant les gènes contrôlant les caractères cibles de la sélection. Ces zones ont été appelées QTL pour "Quantitative Trait Locus". L'étude de l'architecture génétique (nombre, position et mode d'action des QTL) des caractères continus est alors devenue un important axe de recherches en génétique, visant à mieux connaître le fonctionnement des génomes végétaux et animaux. Au niveau de l'application, les marqueurs génétiquement liés à de tels QTL permettent de sélectionner, parmi un grand nombre de plantes, les individus les plus performants. Ils peuvent ainsi être utilisés pour construire un génotype idéal par croisements successifs ou pour améliorer l'évaluation de la valeur des individus. Cependant, si une telle sélection assistée par marqueurs est déjà opérationnelle chez certains animaux d'éle-

FIGURE 4

PRINCIPE DE LA SÉLECTION ASSISTÉE PAR MARQUEURS



vage et plantes de grande culture, son application aux arbres reste problématique. En effet, ces organismes longévifs n'atteignent leur maturité sexuelle que tardivement, par exemple entre 5 et 20 ans chez la plupart des conifères utilisés en plantations industrielles. Construire par croisements un génotype idéal correspondant au caractère recherché devient donc extrêmement long et fastidieux. Chez les espèces pour lesquelles les programmes d'amélioration génétique ont été initiés à partir d'une base génétique relativement restreinte (c'est le cas des animaux d'élevage et des plantes de grande culture), des associations préférentielles entre marqueurs et gènes (QTL) sont toujours possibles. En revanche, il n'en est rien chez les arbres. Chez ces espèces non domestiquées à pollinisation croisée, les recombinaisons entre locus ont progressivement rompu de telles associations, si bien qu'il est probablement impossible d'identifier une association préférentielle, sauf si le marqueur est égal au QTL. L'identification directe des gènes impliqués dans le contrôle des caractères d'intérêt est donc une étape incontournable pour l'application de la sélection assistée par marqueurs chez les arbres forestiers. En outre, elle permettra de caractériser biologiquement ces fameux QTL.

Identification des gènes d'intérêt

Plusieurs types de gènes candidats peuvent être proposés au titre de QTL. Tout d'abord, des candidats "fonctionnels" peuvent l'être *a priori* sur la base de connaissances moléculaires et

physiologiques du caractère étudié. Il paraît par exemple pertinent d'évaluer si les gènes de la voie de biosynthèse des lignines ont une influence sur la qualité chimique et rhéologique du bois ainsi que sur les propriétés papetières. C'est la voie dans laquelle se sont engagés plusieurs laboratoires dans le monde, dont des laboratoires français, pour le Pin maritime (*Pinus pinaster*) et certains Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* et *Eucalyptus urophylla*) dans un projet de recherche financé par le ministère de l'Éducation nationale, de la Recherche et de la Technologie et pour un Peuplier (*Populus tremula* x *P. alba*) dans un projet européen maintenant achevé⁽⁴⁾.

Sur la base d'études physio-moléculaires où l'on compare l'expression des ARN messagers (ou ARNm, les acides nucléiques résultant de la transcription des gènes) ou des protéines (résultant de la traduction des ARNm) en réponse à des traitements particuliers, un stress hydrique par exemple, ou lors des différentes étapes de développement, on peut aussi identifier d'autres gènes candidats, qualifiés cette fois d'"expressionnels". Ici, la caractérisation de l'état fonctionnel des cellules via l'étude du "protéome" (ensemble des protéines synthétisées dans des conditions données, révélées par électrophorèse bidimensionnelle, puis identifiées par microséquençage ou spectrométrie de masse) est particulièrement pertinente. En effet, s'intéressant directement aux acteurs des fonctions cellulaires que sont les protéines, cette méthode permet de s'affranchir du biais éventuel d'une relative déconnexion entre les quantités d'ARNm mesurées et les quantités des protéines correspondantes et donne accès aux modifications post-traductionnelles des protéines.

Enfin, des gènes candidats "positionnels" (gènes porteurs d'une mutation, marqueurs géniques de fonction connue ou non) peuvent être proposés si leur position chromosomique semble correspondre, sur la carte génétique, à celle de QTL. Une telle coïncidence peut cependant résulter du simple fait du hasard. En effet, l'"intervalle de confiance" d'un QTL, c'est-à-dire le segment chromosomique qui peut l'inclure, peut atteindre plusieurs centimorgans. Le centimorgan est la distance séparant deux locus entre lesquels l'espérance du nombre de recombinaisons génétiques est de un centième : une telle distance correspond à plusieurs centaines de gènes ! Cette approche nécessite donc des étapes ultérieures de validation. Par exemple, une étude des relations existant entre le niveau d'expression de ce gène et la variabilité du caractère cible est informative. Mais, la confirmation de la correspondance entre un gène candidat et un QTL passera par l'utilisation de la transformation génétique, qui est actuellement le seul outil à notre disposition pour explorer de manière directe la fonction *in planta* d'un gène donné.

À l'INRA, la sélection assistée par marqueurs (SAM) est essentiellement développée sur deux espèces pilotes : le Peuplier et le Pin maritime. Les approches méthodologiques sont semblables pour ces deux modèles : réalisation de cartes génétiques "fonctionnelles" (basées sur des gènes de fonctions connues), détection de QTL pour des caractères cibles de la sélection (croissance, résistance aux rouilles, qualité du bois chez le Peuplier ; croissance, résistance à un déficit d'alimentation en eau, qualité du bois chez le Pin maritime). La recherche de gènes impliqués dans le contrôle génétique des caractères quantitatifs s'appuie sur des technologies lourdes qui permettent de dresser un catalogue exhaustif des gènes et protéines d'un organisme, puis de comprendre leur régulation, leurs fonctions et leurs interactions notamment par des analyses d'expression au niveau de l'ensemble des ARNm (appelé transcriptome) et de l'ensemble des protéines (appelé protéome⁽⁵⁾).

Pour affronter ce déluge d'informations, il nous faudra accroître notre potentiel en bioinformatique et acquérir des équipements lourds (puces à ADN). L'approche protéomique, lourde à mettre en œuvre mais ô combien pertinente, continuera à être développée. Face à cet excitant changement d'échelle, il nous faudra toujours nous appuyer sur des compétences externes en physiologie, afin de mieux comprendre la fonction des gènes et leurs rôles au niveau de la plante entière.

Conclusions

La sélection assistée par marqueurs ne supprimera en rien la nécessité de conduire des programmes d'amélioration traditionnels. En effet, c'est en combinaison avec l'analyse quantitative de dispositifs bien établis de descendance d'arbres au champ, que l'utilisation des gènes d'intérêt comme marqueurs moléculaires devrait permettre la sélection précoce des arbres d'élite qui constitueront, d'une part, les géniteurs des futures populations d'amélioration, et, d'autre part, les variétés aux performances accrues dont le déploiement rapide en plantation sera rendu possible grâce aux techniques de micropropagation les plus pointues. En outre, les marqueurs moléculaires constituent également un excellent outil pour la gestion des ressources génétiques, car ils permettent de décrire l'organisation de la diversité indépendamment des influences du milieu. Enfin, en utilisant l'information contenue dans les gènes, les variétés sélectionnées tiendront compte des critères de gestion durable tels que ceux prônés par le FSC (Forest Stewardship Council) ou par le PEFC (Pan European Forest Certification).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Aujourd'hui, les applications des biotechnologies aux arbres forestiers en sont encore au stade des investigations au niveau du laboratoire. Ces investigations ont permis de démontrer les grandes potentialités des approches biotechnologiques pour résoudre les problèmes spécifiques à l'amélioration génétique des arbres et de lever les principaux obstacles qui s'opposaient à une extension de leur utilisation chez les arbres. Pour les espèces à fort intérêt commercial et où l'effort de recherche sur les biotechnologies a été important, les techniques de multiplication végétative et de transformation génétique sont au point sur un nombre important de génotypes, des populations d'amélioration de qualité ont été créées, des cartes génétiques denses existent, des projets de génomiques sont lancés et des milliers de gènes sont en cours de caractérisation. Aujourd'hui, nous sommes probablement à un tournant qui va conduire, tout du moins pour un nombre réduit d'espèces (Eucalyptus, Pin taeda, Pin radiata, Pin maritime, Peuplier...), au déploiement dans un futur proche de variétés forestières améliorées qui auront été créées, identifiées et multipliées grâce à l'utilisation des biotechnologies. Pour mettre en œuvre cette stratégie, des regroupements et une mise en commun des moyens s'effectuent dans plusieurs pays (États-Unis, Australie, Nouvelle-Zélande...) : ainsi, récemment, des intérêts privés se sont regroupés en consortium et ont effectué des investissements très importants dans les biotechnologies forestières : Fletcher Challenge, International Paper, Monsanto Co, Westwaco Corporation et Genesis Research and Development Corporation se sont associés en 1999. Ce groupement d'intérêt prévoit un investissement de 60 millions de dollars sur 5 ans, pour améliorer par transformation génétique la qualité des fibres pour la pâte à papier chez l'Eucalyptus, le Pin radiata, le Peuplier, le Pin taeda et le Liquidambar. Ce cas n'est pas unique : Monsanto et ForBio ont formé Monfori Nusantra tandis que Fundacion Chile (Chili), Interlink Associates (États-Unis) et CellFor Inc. (Canada) ont fondé GenForSA. Aux États-Unis, il existe également des coopératives réunissant des laboratoires universitaires, des compagnies de biotechnologies et des industriels impliqués dans la filière-bois : par exemple, pour le Peuplier, le "Tree Genetic Engineering Research Cooperative" (TGERC)⁽⁶⁾ conduit des recherches sur l'utilisation de peupliers transgéniques en plantation. Parallèlement, le "Poplar Molecular Genetics Cooperative" (PMGC)⁽⁷⁾ a pour but d'augmenter le savoir sur les mécanismes génétiques et moléculaires responsables des variations des caractères de productivité et de qualité chez les hybrides de Peupliers et d'utiliser ce savoir pour accélérer les progrès dans l'amélioration des peupliers. Cette coopérative regroupe également des universités, des agences fédérales américaines et des industriels du bois. D'autres

coopératives existent sur le même modèle pour les Pins. De même, des structures assez similaires existent en Nouvelle-Zélande et en Suède.

Bien sûr, la situation en France est différente notamment du fait de la structure morcelée de la filière-bois française. Cependant, il paraît possible et nécessaire d'établir, avec les pays voisins, un réseau structuré de recherches autour de la filière-bois. Cela permettra à nos espèces forestières installées dans nos conditions européennes de bénéficier des progrès biotechnologiques indispensables pour que la filière-bois reste compétitive.

La France est actuellement en bonne place dans le domaine des biotechnologies forestières pour quelques espèces de grande importance économique objet d'une sylviculture intensive à courte révolution (Peuplier, Eucalyptus et Pin), que ce soit pour l'existence de cartes génétiques, de techniques de transformations génétiques ou de micropropagation végétative. Cependant, il est nécessaire d'intensifier les efforts sur différents aspects :

- les approches de génomique fonctionnelle pour identifier et caractériser de nouveaux gènes, utilisables comme candidats pour des QTL ou comme cible pour la transformation génétique ;
- l'amélioration des techniques de transformation génétique afin de pouvoir les appliquer à un large éventail de génotype ;
- le contrôle de la régénération et l'efficacité des techniques de clonage pour valoriser rapidement les variétés performantes de demain ;
- l'évaluation des variétés forestières améliorées qu'elles soient ou non transgéniques et de leurs éventuels impacts sur l'environnement.

Dans un contexte international de plus en plus compétitif, il semble indispensable que les pouvoirs publics participent de façon plus importante, tant en moyens humains que financiers, au développement des activités dans ce domaine, si l'on veut que, en France aussi, les biotechnologies contribuent aux sorties des variétés forestières améliorées du futur, pour produire un bois de qualité adapté à chaque type de fabrication, et, finalement, pour permettre à la filière-bois de rester compétitive face aux productions des autres pays.

Gilles PILATE

Unité Amélioration, Génétique et Physiologie forestières
INRA-Orléans
BP 20619
ARDON
F-45166 OLIVET CEDEX
(pilate@orleans.inra.fr)

Marc PÂQUES

Station des Ressources du Futur
AFOCEL
Domaine de l'Étançon
F-77370 NANGIS
(mpaques@club-internet.fr)

Jean-Charles LEPLÉ

Unité Amélioration, Génétique et Physiologie forestières
INRA-Orléans
BP 20619
ARDON
F-45166 OLIVET CEDEX
(leple@orleans.inra.fr)

Christophe PLOMION

Unité de Recherches forestières
INRA-Pierroton
BP 45
F-33610 CESTAS
(christop@pierroton.inra.fr)

Adresses internet pour plus d'informations

- (1) Rapport d'information 440 (97-98) de la Commission des Affaires économiques :
 "Transgéniques : pour des choix responsables" (Jean Bizet, Sénat) :
<http://www.senat.fr/rap/r97-440/r97-440.html>
 Dossier OGM à l'INRA (Environnement, Agriculture et Alimentation) :
<http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/OGM/OGM.htm>
- (2) Commission du Génie biomoléculaire :
<http://www.agriculture.gouv.fr/alim/ogm/welcome.html>
- (3) http://www.fsl.orst.edu/tgerc/iufro_posstatm.htm
- (4) http://www.pierroton.inra.fr/MENRT_Lignine
 et <http://www.nf-2000.org/secure/Fair/S343.htm>
- (5) Projet de génomique sur les ligneux développé en France :
<http://www.pierroton.inra.fr/Lignome/>
- (6) Tree Genetic Engineering Research Cooperative :
<http://www.fsl.orst.edu/tgerc/currproj.htm>
- (7) <http://poplar2.cfr.washington.edu/pmgc/>

BIBLIOGRAPHIE

- ASANTE OWUSU (R.). — An overview of GM technology in the forest sector. A scoping study for WWF-UK (International Conservation Programme) & WWF International (Forest for Life Program). — 1999. — 34 p. disponible sur : www.panda.org/forests4life/
- BÉRENGER (E.). — Les AGM : un nouveau risque pour les forêts. Dossier "Les forêts ont-elles besoin des biotechnologies?". — *Biofutur*, n° 199, 2000, pp. 19-21.
- CORNU (D.), LEPLÉ (J.-C.), PILATE (G.). — Y aura-t-il bientôt des forêts transgéniques ? *In* : Organismes génétiquement modifiés à l'INRA : Environnement, Agriculture et Alimentation / C. Sabbagh et P. Tallon Eds. — Versailles : INRA-DIC, 1998. — pp. 45-47.
- DE VIENNE (D.). — Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. — Versailles : INRA Éditions, 1998. — 200 p.
- HAKMAN (I.), FOWKE (L.), ARNOLD (S. von), ERIKSSON (T.). — The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). — *Plant Science*, 38, 1985, pp. 53-59.
- LEPLÉ (J.-C.), PILATE (G.), JOUANIN (L.). — Transgenic poplar trees (*Populus* species). *In* : Biotechnology in Agriculture and Forestry / Y.P.S. Bajaj Ed. . — Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo : Springer-Verlag, 1999. — pp. 221-244 (vol. 44).
- MAC RAE (S.). — Prospects for eucalyptus transformation. TAPPI Proceedings 1997, Biological Sciences Symposium 19-23 octobre, San Francisco. — pp. 313-328.
- MEILAN (R.), HAN (K.-H.), MA (C.), EATON (J.A.), HOIEN (E.A.), STANTON (B.J.), CROCKETT (R.P.), TAYLOR (M.L.), JAMES (R.R.), SKINNER (J.S.), JOUANIN (L.), PILATE (G.), STRAUSS (S.H.). — The CP₄ transgene provides high levels of tolerance to Roundup herbicide in field-grown hybrid poplars. — *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 32, 2002, pp. 967-976.

- PÂQUES (M.), BERCETCHE (J.). — Multiplication végétative : micropropagation - embryogénèse somatique / P. Boxus Ed. . — Rennes : CNED-Aupelf-Uref, 1995. — pp. 117-179.
- PÂQUES (M.), BERCETCHE (J.). — Procédé de rajeunissement des gymnospermes par embryogénèse somatique. — PCT/FR98/03381, 1998.
- PILATE (G.). — Transformation des végétaux par *Agrobacterium tumefaciens*. In : Principes des techniques de biologie moléculaire / D. Tagu Ed. . — Paris : INRA Éditions, 1999. — pp. 77-80.
- PILATE (G.), GUINEY (E.), HOLT (K.), PETIT-CONIL (M.), LAPIERRE (C.), LEPLÉ (J.-C.), POLLET (B.), MILA (I.), WEBSTER (E.A.), MARSTORP (H.G.), HOPKINS (D.W.), JOUANIN (L.), BOERJAN (W.), SCHUCH (W.), CORNU (D.), HALPIN (C.). — Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. — *Nature Biotechnology*, vol. 20, 2002, pp. 607-612.
- PILATE (G.), LEPLÉ (J.-C.), CORNU (D.), LELU (M.-A.). — Transformation in larch (*Larix* species). In : Biotechnology in Agriculture and Forestry / Y.P.S. Bajaj Ed. . — Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo : Springer-Verlag, 1999. — pp. 125-141.
- PLOMION (C.). — La Sélection assistée par marqueurs chez les arbres forestiers. — *Informations Forêt*, n° 83, fiche n° 8536, 1996.
- PLOMION (C.), DUREL (C.-E.), VERHAEGEN (D.). — Utilisation des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration génétique des arbres forestiers : exemple du Pin maritime et de l'Eucalyptus. — *Annales des Sciences forestières*, vol. 53, n° 8, 1996, pp. 819-848.
- SMITH (R.D.). — Successful Rejuvenation of Radiata pine. — 25th Southern forest tree improvement conference, IUFRO Working Party 2.02.20, New Orleans, Louisiana, USA, 1999. — p. 21.
- STRAUSS (S.) *et al.* . — Forest Biotechnology makes its position known. — *Nature Biotechnology*, 1999, p. 1145.

LES BIOTECHNOLOGIES CHEZ LES ARBRES FORESTIERS [Résumé]

Le développement actuel des biotechnologies ouvre des potentialités importantes en matière d'amélioration génétique des arbres forestiers. Notamment, celles-ci devraient permettre de diffuser rapidement les nouvelles variétés aux performances accrues nécessaires au maintien de la compétitivité de la filière-bois. Cette revue fait le point sur les possibilités et les limitations de l'utilisation des biotechnologies chez les arbres forestiers : multiplication végétative *in vitro* par embryogénèse somatique et par microbouturage, transformation génétique et sélection assistée par marqueurs.

BIOTECHNOLOGIES AND FOREST TREES [Abstract]

The current development of biotechnologies opens up major potential in the area of genetic improvement of forest tree species. In particular, they should enable new improved varieties that are needed to maintain competitiveness of the timber industry to be disseminated. This article reviews the possibilities and limitations of using biotechnologies for forest trees – *in vitro* vegetative propagation by cell embryogenesis and microcutting, genetic transformation and marker-assisted selection.
