

Impact de colzas transgéniques exprimant des inhibiteurs de protéases sur coléoptères phytophages et sur abeilles

Lise Jouanin, Cécile Girard, Michel Bonadé-Bottino, Martine Le Métayer, Anne-Lorraine Picard Nizou, Jacques Lerin, Minh-Ha Pham Delègue

Le colza (*Brassica napus*) est une plante très cultivée en Europe (2 687 000 ha en 1996 dont 865 000 ha en France). Une grande partie de cette culture est destinée à des usages alimentaires (huile, tourteaux, etc.). La nécessité de laisser une partie des surfaces agricoles en jachère a stimulé la culture du colza à usage industriel (580 000 ha en 1996 pour l'Union européenne). Le colza héberge de nombreux insectes qui ne sont pas tous nuisibles, toutefois les plus importants phytophages nécessitent un contrôle des populations [1]. Certains de ces insectes (mouche du chou, charançon du bourgeon terminal, altise) sont actifs en automne. D'autres (charançons de la tige et des siliques, méléghètes, etc.) se développent au printemps (tableau 1). Aucun de ces insectes (principalement des coléoptères) ne peut être considéré comme le ravageur principal du colza. C'est pourquoi la lutte systématique (traitements chimiques répétés) est de plus en plus souvent remplacée par une lutte raisonnée (traitements effectués quand le seuil de nuisibilité de l'insecte considéré est atteint). Cette dernière stra-

tégie exige une surveillance continue de la culture puisque les insectes attaquent le colza à différents stades de son développement. De plus, comme le colza est une plante mellifère, très visitée par les abeilles en période de floraison [2], il est primordial d'utiliser des insecticides non nocifs pour cet insecte. Il serait très intéressant à différents niveaux (protection de l'environnement, coût culturel, simplification de la conduite de la culture, etc.) de cultiver des variétés de colza plus résistantes aux insectes phytophages. La création de colzas transgéniques exprimant des protéines entomopathogènes pourrait contribuer à la protection de cette culture, tout en limitant l'emploi d'insecticides. La principale stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux insectes consiste à introduire, et à exprimer dans le génome des plantes, des

delta-endotoxines de la bactérie *Bacillus thuringiensis* [3]. Des colzas exprimant la toxine CRÿIA active sur *Plutella xylostella* (un lépidoptère) sont en cours d'étude au Canada [4]. Toutefois, cette voie d'approche n'est pas adaptée en Europe pour les coléoptères du colza car aucune toxine suffisamment active sur ces insectes n'a été identifiée. Une autre voie d'approche consiste à introduire et à exprimer dans les plantes des gènes codant pour des inhibiteurs de protéases (IP) capables d'interférer avec la protéolyse digestive des insectes [5-7]. L'ingestion de ces protéines par les insectes se traduit par des retards de développement et/ou une mortalité larvaire accrue. Cette stratégie a été décrite pour la première fois en 1987 sur un lépidoptère [8]. Nous avons essayé d'adapter cette stratégie à la lutte contre les coléoptères

Tableau 1

Principales caractéristiques des coléoptères ravageurs du colza

Nom commun	Altise	Baris	Charançon de la tige	Charançon des siliques
Nom latin	<i>Psylliodes chrysocephala</i>	<i>Baris coerulescens</i>	<i>Ceutorhynchus napi</i>	<i>Ceutorhynchus assimilis</i>
Stades nuisibles	Larves et adultes	Larves	Larves	Larves et adultes (surinfestation par des cécidomyies)
Périodes nuisibles	Automne	Printemps	Printemps	Printemps
Parties attaquées	Feuilles	Pivots	Tiges	Graines/siliques
Protéases digestives	Sérine + cystéine	Sérine + cystéine	Sérine + cystéine	Sérine + cystéine

Main characteristics of coleopteran pests feeding on oilseed rape

L. Jouanin, C. Girard, M. Bonadé-Bottino : Laboratoire de biologie cellulaire, INRA, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex, France.

M. Le Métayer, A.-L. Picard Nizou, M.-H. Pham Delègue : Laboratoire de neurobiologie comparée des invertébrés, INRA, BP 23, 91440 Bures-sur-Yvette, France.

J. Lerin : Laboratoire de zoologie, INRA, 86600 Lusignan, France.

Tirés à part : L. Jouanin

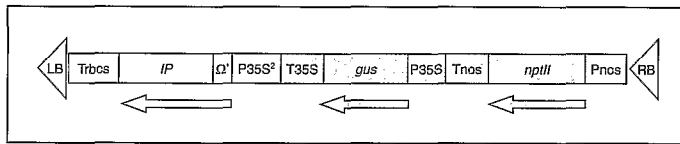


Figure 1. Schéma des régions-T des plasmides binaires utilisés pour exprimer CII ou OCI dans le colza. LB et RB : frontières gauche et droite ; Pnos et Tnos : promoteur et terminateur du gène de la nopaline synthase ; *nptII* : gène de la néomycine phosphotransférase conférant la résistance à la kanamycine aux cellules transformées ; P35S et T35S : promoteur et terminateur de l'ARN 35S du CaMV ; *gus* : séquence codante du gène de la β -glucuronidase (gène rapporteur) ; P35S² : promoteur de l'ARN 35S du CaMV avec séquence activatrice doublée ; Ω' : séquence leader du TMV ; IP : ADNc des inhibiteurs de protéases ; Trbcs : terminateur du gène de Rubisco de pois.

Figure 1. Schematic representation of T-regions of binary plasmids used to express CII or OCI in oilseed rape. LB and RB: left and right borders ; Pnos and Tnos : promoter and terminator of the nopaline synthase gene ; *nptII* : neomycin phosphotransferase gene for selection of kanamycin-resistant transformed cells ; P35S and T35S : CaMV 35S promoter and terminator ; *gus* : β -glucuronidase gene (reporter gene) ; P35S² = CaMV 35S promoter with a double enhancer sequence ; Ω' : TMV leader sequence ; PI = proteinase inhibitor cDNA ; Trbcs : pea RuBisCo terminator.

ravageurs du colza en utilisant deux inhibiteurs de protéases différents. Comme il n'est pas possible d'élever en laboratoire la plupart des insectes et que les larves sont souvent foreuses, des essais avec des régimes alimentaires artificiels n'étaient pas envisageables. Dans une première étape, nous avons déterminé la nature des protéases digestives de ces insectes et examiné la possibilité de les inhiber *in vitro* par différents IP. Des vecteurs contenant les ADNc correspondant à des IP actifs dans ces essais ont été construits et introduits dans le colza. Les lignées exprimant les IP au niveau le plus élevé ont été sélectionnées et utilisées pour tester l'effet de leur ingestion sur les insectes ravageurs. Le colza étant une plante mellifère, il était important de vérifier que l'expression de ces protéines n'avait pas d'effet délétère sur la survie et le comportement de l'abeille. C'est pourquoi, les protéases digestives des abeilles ont été déterminées et les effets de l'ingestion de différentes doses d'IP à court et long termes étudiés.

Détermination des protéases digestives de coléoptères ravageurs du colza

Les activités protéasiques totales du tube digestif de larves de quatre coléoptères considérés comme des ravageurs importants pour

le colza en Europe (tableau 1), le baris (*Baris coerulescens*), l'altise (*Psylliodes chrysocephala*), le charançon de la tige du colza (*Ceutorhynchus napi*) et le charançon des siliques (*Ceutorhynchus assimilis*), ont été déterminées en présence d'azocaséine sur une large gamme de pH en présence ou en l'absence d'agent réducteur (DTT, β -mercaptoéthanol) et caractérisées sur gels d'activité. La capacité d'inhibition des protéases par des IP spécifiques des différentes classes (sérine, cystéine, etc.) a été déterminée [9-13]. Deux pics d'activité protéasique sont observés pour chaque insecte. Le premier pic à pH 6 ou 5 correspond à des protéases à cystéine. Cette activité est fortement réduite en présence d'OCI, un IP à cystéine isolé du riz [14]. Le second pic détecté à pH 9 ou 10 correspond à des protéases à sérine et est inhibé par un IP à sérine de type Bowman Birk de soja, BBI. Ces résultats montrent que les larves de ces quatre coléoptères ravageurs du colza possèdent les deux types d'activité protéasique, sérine et cystéine. Toutefois, le pic correspondant à l'activité de protéases à cystéine est souvent majoritaire [9, 11-13].

Construction des vecteurs et obtention de colzas transgéniques

Des vecteurs binaires contenant l'ADNc d'un IP à sérine CII possédant une activi-

té antitrypsine et antichymotrypsine de type Bowman Birk isolé de graine de soja [15] et de l'IP à cystéine OCI [14] ont été construits [9]. Ces ADNc sont exprimés sous le contrôle du promoteur de l'ARN 35S du virus du chou fleur dont la séquence activatrice a été doublée. Le vecteur comprend également le gène de la néomycine phosphotransférase (*nptII*) conférant la résistance à la kanamycine aux cellules transformées et le gène de la β -glucuronidase (*gus*) pour la sélection précoce des plantules transformées (figure 1).

Ces deux vecteurs ont été introduits via *Agrobacterium tumefaciens* dans le génotype de colza de printemps 00 Drakkar par une technique dérivée de celle publiée par Moloney *et al.* [16] utilisant des pétioles de cotylédons de colza puis ces explants sont mis à régénérer [9]. Plus d'une dizaine de lignées ont été obtenues par construction. Les lignées comportant un seul site d'insertion et exprimant à un fort niveau le gène introduit ont été identifiées et autofécondées afin d'avoir des lignées homozygotes. Les essais sur insectes ont été réalisés sur les descendants de ces lignées. Pour les plantes exprimant l'IP à cystéine OCI, des expériences de type Western et ELISA réalisées avec un anticorps anti-OCI [17] ont permis de déterminer le niveau de production de la protéine dans les différents tissus consommés par les insectes ravageurs [18]. La capacité d'OCI à inhiber la papaïne a été montrée dans les plantes obtenues.

La caractérisation des plantes exprimant l'IP à sérine CII s'est avérée beaucoup plus délicate car il n'a pas été possible de fabriquer un anticorps anti-CII, et le colza présente une activité antiprotéase à sérine endogène qui interfère avec la mesure de l'activité antitrypsine. La production de la protéine due au transgène n'induit pas une très forte augmentation de cette activité. Des lignées contenant OCI et CII ont été obtenues par croisement et quelques bioessais ont été réalisés avec ces doubles transformants.

Tests sur plantes

Comme les coléoptères ravageurs du colza ne peuvent pas être élevés en laboratoire, il est nécessaire de récolter des adultes dans les champs au moment opportun et de faire pondre les femelles. Les œufs ou les jeunes larves sont déposés sur les plantes de colza normal ou transgénique cultivées en conditions contrôlées. À part l'altise adulte qui consomme des feuilles, seules les larves

Tableau 2

Caractéristiques de différentes larves d'insectes après ingestion du colza exprimant OCI

	Poids (mg) des larves en fin d'expérience		Activité protéasique sur OCI (NT = 100 %)		Induction de nouvelles protéases
	Sur NT	Sur OCI	pH 6 (%)	pH 9 (%)	
Altise	0,64	1,1	167	240	Non
Baris	10,6	9,8	21	181	Non
Charançon (CP ¹)	2,0	4,9	40	75	Non
des siliques (CR ¹)	3,5	3,0	94	127	Non
Charançon L2 ²	1,35	1,2	nd	nd	nd
des tiges L3 ²	13,7	13,7			

NT : plante non transformée ; nd : non déterminé.

¹ CP : larves issues d'insectes récoltés dans la région parisienne. CR : larves issues d'insectes récoltés dans la région de Rennes.

² L2 : 2^e stade larvaire. L3 : 3^e stade larvaire.

Behaviour of different insect larvae-fed OCI-expressing oilseed rape

foreuses causent des dégâts (collet pour le baris, tige pour le charançon de la tige, graine pour le charançon des siliques). Vers la fin du développement larvaire, les larves sont récoltées sur plantes témoins et transformées, pesées et leur contenu en protéases est déterminé aux pics correspondant aux maxima d'activité.

Chez les quatre insectes testés, les résultats ont montré que contrairement à ce qui avait été observé pour les larves de *Chrysomela tremulae* élevées sur des peupliers transgéniques exprimant OCI [17], aucune mortalité et aucun retard dans le développement larvaire n'ont été observés. Au contraire, dans le cas de certains insectes du colza, les larves consommant les plantes transgéniques sont plus grosses. Les analyses sur gels montrent des perturbations des profils de protéases digestives. Ainsi pour l'altise, une augmentation des deux types de protéases est observée [12] mais aucune nouvelle protéase n'est induite. Pour le charançon des siliques, des résultats différents ont été obtenus en fonction de la provenance des adultes. Pour un site donné (région de Rennes), aucune différence de poids n'a été observée par rapport au témoin alors que, pour l'autre (région parisienne), une augmentation du poids est obtenue pour les larves élevées sur colza transgénique [11]. Pour le baris, une forte diminution des protéases à cystéine est bien observée, mais elle est compensée par une augmentation des protéases à sérine [19]. Pour le charançon de la tige, une diminu-

tion transitoire du poids des larves au deuxième stade larvaire est notée mais elle est rapidement compensée et, au troisième stade larvaire, elle n'est plus observée [13]. Les principaux résultats de ces expérimentations sont résumés dans le tableau 2. Les bioessais réalisés sur les doubles transformants (OCI + CII) donnent des résultats identiques à ceux obtenus avec les plantes exprimant OCI seul. Ceci n'est pas surprenant car le niveau de production de la protéine CII obtenue dans les plantes transgéniques est très faible.

Effets sur abeille

OCI n'a pas été détecté dans le pollen et dans le nectar des colzas transgéniques [18]. Le promoteur 35S du CaMV ne permet pas l'expression du transgène dans le pollen chez le colza comme chez *Arabidopsis thaliana* [20]. Les risques d'ingestion des IP par les abeilles au cours de leurs visites sont

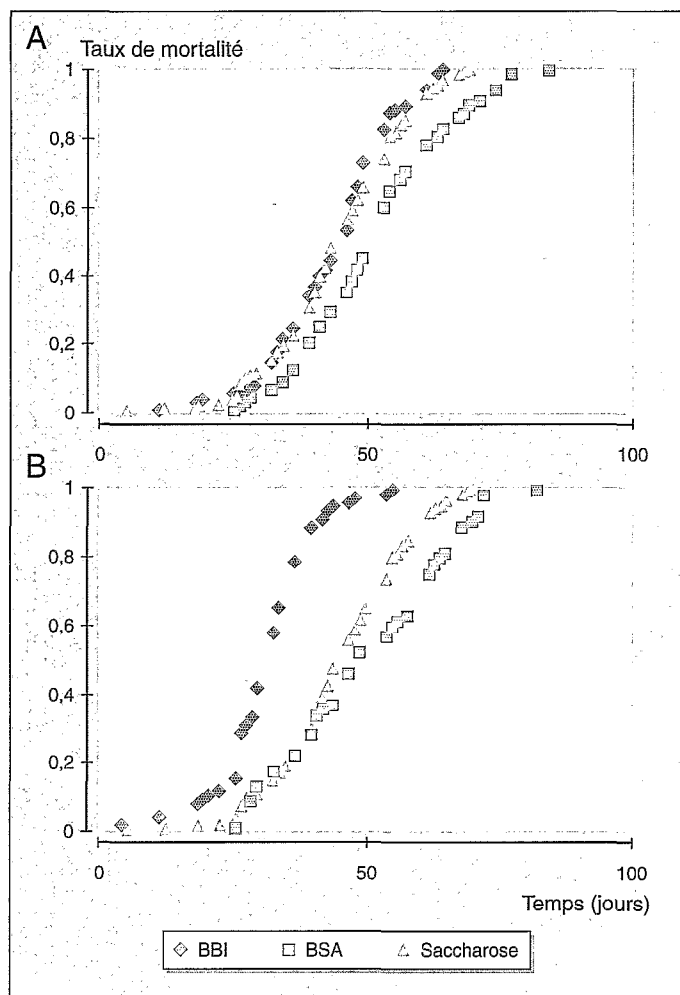


Figure 2. Durée de vie des abeilles nourries avec des solutions sucrées contenant de la BSA (serum bovine albumine) ou BBI à 0,1 (A) ou 1 mg/ml (B).

Figure 2. Lifespan of bees fed sugar solutions containing BSA or BBI at 0.1 (A) or 1 mg/ml (B).

Transgénèse et estimation des risques

donc réduits. Toutefois, ce n'est pas le cas pour toutes les plantes et d'autres promoteurs peuvent être utilisés dans l'avenir. Il est donc important d'évaluer l'impact des IP sur l'abeille (*Apis mellifera*). L'abeille possède essentiellement des protéases digestives à sérine [21] et il est donc probable que des IP à cystéine ne soient pas nocifs. Les essais ont été conduits en utilisant BBI (à la place de CII, non disponible sous forme de protéine purifiée) et OCI. Différentes expériences ont d'abord été réalisées avec des doses d'IP voisines de celles produites dans les feuilles des plantes transgéniques (26 µg/ml). L'ingestion d'OCI ou de BBI n'induit aucune toxicité à court terme. L'apprentissage olfactif des abeilles n'est pas perturbé et, en situation de choix entre plante normale et transgénique, aucune différence n'a été décelée au niveau du butinage. À cette dose, aucune modification du profil protéasique du tube digestif de l'abeille n'est observée [22].

Afin d'établir un seuil de toxicité des IP, des études ont été réalisées avec trois différentes doses de BBI et d'OCI (0,01/0,1/1 mg/ml). Les deux premières doses (0,01 et 0,1 mg/ml) correspondent à des niveaux d'expression compatibles avec une production *in planta*. Aucun effet d'OCI n'a été observé sur la mortalité à long terme, les performances d'apprentissage et le profil protéasique de l'abeille, quelle que soit la dose. Ces résultats sont tout à fait compatibles avec le fait que l'abeille ne possède pas de protéase à cystéine. En revanche, BBI dès 0,1 mg/l perturbe les protéases digestives mais n'induit pas de mortalité sur le long terme. Les abeilles consommant BBI à 1 mg/ml ont une durée de vie réduite (figure 2), des performances d'apprentissage olfactif perturbées (analysées par des expériences d'extension conditionnée du probocis en réponse à une odeur) et une forte augmentation des protéases digestives à sérine [18, 23] (tableau 3).

Des études sont en cours afin de déterminer si des perturbations peuvent être observées au niveau de la ruche, dans le cas où les IP seraient concentrés dans le miel qui sert à nourrir les larves.

Conclusion

De nombreux travaux ont montré que différents inhibiteurs de protéases incorporés dans des substrats de nourrissage artificiels pouvaient induire des retards de développement larvaire et une mortalité accrue. La plupart de ces travaux concernent des lépidoptères possédant des protéases digestives

de type sérine en utilisant des IP à sérine [24]. Les coléoptères possèdent souvent des protéases à cystéine [25] et quelques essais sur milieu artificiel ont également montré un effet des IP à cystéine sur ces insectes [26, 27]. Plusieurs publications montrent l'intérêt de l'expression d'IP à sérine pour l'obtention de plantes résistantes à différents lépidoptères phytophages [6, 7]. Pour les IP à cystéine, un seul (OCI) a été exprimé dans des plantes transgéniques et a permis l'obtention de peupliers et de pommes de terre respectivement plus résistants à une chrysomèle [17] et au doryphore [28]. Nous avons obtenu des colzas exprimant un IP à sérine (CII de soja) ou à cystéine (OCI de riz) et évalué leur impact sur différents coléoptères ravageurs. Ces coléoptères possèdent un système digestif complexe comportant des protéases de type sérine et cystéine. Le niveau d'expression d'OCI dans les colzas transgéniques est semblable à ce qui a été rapporté dans la littérature pour d'autres transgènes, mais celui de CII est très faible. Les bioessais réalisés avec les larves de quatre insectes ravageurs du colza montrent que l'ingestion des colzas exprimant OCI (et dans certains cas, des colzas exprimant OCI + CII) ne provoque pas de mortalité ni de retard dans le développement larvaire. Dans certains cas (altise) une augmentation du poids des larves a même été observée. Nous avons montré que ces coléoptères sont capables de compenser l'inactivation d'un type de protéase par une hyperproduction des protéases ou par l'induction d'autres protéases. Des résultats semblables ont été observés chez le doryphore [29]. De plus, une étude fine des effets de l'ingestion d'un autre IP à sérine (MTI-2 originaire de la moutarde) a mis en évidence des effets différents de l'ingestion de cet IP produit dans

des plantes transgéniques par un lépidoptère, *Spodoptera littoralis*, en fonction du niveau d'expression. Ainsi, à faible taux, les larves grossissent plus vite en consommant plus de feuillage tandis que, à fort taux, le développement larvaire est ralenti, les larves meurent et les dégâts sur la plante sont réduits. Une adaptation des protéases a également été observée avec surproduction dans le premier cas, inhibition des protéases existantes et induction de nouvelles dans le second cas [30]. En comparant ces résultats à ceux obtenus sur le colza, il semble probable que le niveau d'expression (0,1 à 0,3 % dans les feuilles) corresponde au premier cas et donc que les insectes soient capables de surmonter l'ingestion de l'IP. Il faudrait donc obtenir un niveau plus élevé d'expression des IP dans les plantes transgéniques ou introduire des IP possédant une affinité plus grande pour les protéases d'insectes. Cette stratégie implique la recherche de nouveaux IP de plante mais également d'autres origines (insectes, animaux...) ou la modification d'IP connus afin d'augmenter leur capacité d'inhibition par mutagenèse ou *phage display* [31-33]. En outre, les capacités d'adaptation des insectes font qu'il sera difficile d'obtenir une résistance stable en exprimant un seul transgène comme il a déjà été mentionné pour l'utilisation des toxines de *B. thuringiensis*. Dans cette optique, il est nécessaire d'identifier de nouvelles protéines insecticides afin d'exprimer dans les plantes plusieurs protéines à activité entomopathogène possédant des modes d'action différents [34].

Les abeilles possèdent des protéases à sérine, qui peuvent être inhibées *in vitro* par des IP du même type. Il était donc important d'évaluer les effets directs ou indirects de l'ingestion de ce type d'IP exprimé dans des plantes

Tableau 3

Activités protéasiques digestives de l'abeille après ingestion de différentes doses de BBI, un IP à sérine*

Concentration de BBI (mg/ml)	Activité protéasique totale	Trypsine	Chymotrypsine	Élastase	Leucine aminopeptidase
0,01	93	116	96	92	83
0,1	270**	888**	189	43	129
1	180**	324**	345**	95	128

* Les résultats sont rapportés en pourcentage avec 100 % correspondant à l'activité mesurée pour les abeilles nourries avec une solution sucrée contenant la même quantité de BSA (*serum albumine bovine*) que BBI.

** Différence statistiquement significative.

Gut proteolytic activities of honeybees feeding on different amounts of BBI (a serine PI)

transgéniques. Nous avons montré que, sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV, aucune expression des transgènes n'était observée dans le pollen et le nectar. Toutefois, d'autres promoteurs pouvant être utilisés dans l'avenir, il était important d'évaluer le seuil de risque. Pour cela nous avons étudié les effets de l'ingestion d'un IP à sérine (BBI) en alimentation artificielle, à des doses similaires ou plus élevées que celles produites dans les parties vertes des plantes transgéniques. BBI à faible dose ne provoque pas de mortalité à court et long terme [22]. En revanche, si des IPP à sérine étaient présents à des doses supérieures à 50-100 µg/g de pollen, des effets délétères sur la survie et le comportement de l'abeille pourraient être observés [23]. Ces travaux devront être réalisés pour d'autres toxines insecticides exprimées dans des plantes transgéniques dans le cas où le promoteur utilisé conduirait à la présence de cette toxine dans le pollen ■

Remerciements

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

Références

- Colza d'hiver : le contexte économique, les techniques culturales, les débouchés. Paris : Éditions CETIOM. 1997 ; 26-31.
- Mesquida J, Marilleau R, Pham-Delègue PH, Rénard M. A study of rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera* Metzger) flower nectar secretion. *Apidologie* 1988 ; 19 : 307-18.
- Mazier M, Pannetier C, Tourneur J, Jouanin L, Giband M. The expression of *Bacillus thuringiensis* toxin genes in plant cells. *Biotechnol Ann Rev* 1997 ; 3 : 313-47.
- Stewart CN, Adang MJ, All JN, et al. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIIAc gene. *Plant Physiol* 1996 ; 112 : 115-20.
- Ryan CA. Proteinase inhibitors in plants : genes for improving defenses against insect and pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 1990 ; 28 : 939-43.
- Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci* 1998 ; 131 : 1-11.
- Schuler TH, Poppy GM, Kerry BR, Denholm L. Insect resistant transgenic plants. *Tibtech* 1998 ; 16 : 168-73.
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sherman SE, Barker RF, Boulter D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 1987 ; 330 : 160-3.

- Bonadé Bottino M. *Défense du colza contre les insectes phytophages déprédateurs : étude d'une stratégie basée sur l'expression d'inhibiteurs de protéases dans la plante*. Thèse de doctorat, Université Paris-XI, 1993 ; 155 p.

- Bonadé Bottino M, Girard C, Le Métayer M, et al. Effects of transgenic oilseed rape expressing proteinase inhibitors on pests and beneficial insects. *Acta Horticulturae* 1998 ; 459 : 235-9.

- Girard C, Bonadé-Bottino M, Pham-Delègue MH, Jouanin L. Two strains of cabbage seed weevil (*Coleoptera : Curculionidae*) exhibit differential susceptibility to a transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. *J Insect Physiol* 1998 ; 44 : 569-77.

- Girard C, Le Métayer M, Zaccomer B, et al. Growth stimulation of beetle reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. *J Insect Physiol* 1998 ; 44 : 263-70.

- Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Lerin J, Pham Delègue MH. *Recombinant protease inhibitors in plants : Plant protection. The case of rapeseed*. In : Michaud D, ed. *Biotechnology intelligence unit*. Austin, Tx. Academic press, 1999 (sous presse).

- Abe K, Emori Y, Kondo H, Suzuki H, Arai S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 16793-7.

- Joudrier PE, Foard DE, Floener LA, Larkins BA. Isolation and sequence of cDNA encoding the soybean protease inhibitors PI IV and CII. *Plant Mol Biol* 1987 ; 10 : 35-42.

- Moloney MM, Walker JM, Sharma KK. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep* 1989 ; 8 : 238-42.

- Leplé JC, Bonadé-Bottino M, Augustin S, et al. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (*Coleoptera : Chrysomelidae*) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol Breeding* 1995 ; 1 : 319-28.

- Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Zaccomer B, Picard-Nizou AL, Lerin J, Pham-Delègue MH. Impact de colzas transgéniques exprimant des inhibiteurs de protéases sur coléoptères phytophages et sur abeilles. Actes Aupelf, Paris : Estem, 1998 (sous presse).

- Bonadé Bottino M, Lerin J, Zaccomer B, Jouanin L. Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. *Insect Biochem Mol Biol* 1999 (sous presse).

- Wilkinson JE, Twell D, Lindsey K. Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen : implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot* 1997 ; 48 : 265-75.

- Moritz B, Crailsheim K. Physiology of protein digestion in the midgut of tyhe honeybee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* 1987 ; 33 : 923-31.

- Girard C, Picard-Nizou AL, Grallien E, Zaccomer B, Jouanin L, Pham-Delègue MH. Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. *Transgenic Res* 1998 ; 7 : 239-46.

- Pham Delègue MH, Girard C, Le Métayer M, et al. Could transgenic plants expressing proteinase inhibitors be deleterious to honeybees ? (soumis).

- Christeller JT, Laing WA, Markwick NP, Burgess EPJ. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae. Dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem Mol Biol* 1992 ; 22 : 735-46.

- Murdock LL, Brookhart G, Dunn PE, et al. Cysteine digestive proteinase in coleoptera. *Comp Biochem Physiol* 1987 ; 87 : 783-7.

- Liang C, Brookha G, Feng GH, Reek GR, Kramer KJ. Inhibition of digestive proteinase of the stored grain coleoptera by oryzacystatin, a cysteine protease inhibitor from rice seeds. *FEBS Lett* 1991 ; 278 : 139-42.

- Edmonds HS, Gatehouse LN, Hilder VA, Gatehouse JA. The antimetabolic effects of oryzacystatin on larvae of the Southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howard*) ; use of a bacterial expression system for oryzacystatin. *Entomol Exp Appl* 1996 ; 78 : 83-94.

- Lecardonnel A, Chauvin L, Jouanin L, Swangan B. Oryzacystatin expression in transgenic potato improves resistance against the Colorado potato beetle. *Plant Science* 1999 (sous presse).

- Bolter CJ, Jongsma MA. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapts to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *J Insect Physiol* 1995 ; 12 : 1071-8.

- De Leo F, Bonadé-Bottino M, Ceci LR, Gallerani R, Jouanin L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* of low and high levels of expression of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiol* 1998 ; 118 : 997-1004.

- Jongsma MA, Stiekema WJ, Bosch D. Combating inhibitor-insensitive proteases of insect pests. *Tibtech* 1996 ; 14 : 331-3.

- Michaud D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Tibtech* 1996 ; 15 : 4-6.

- Jongsma MA, Bolter C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J Insect Physiol* 1997 ; 43 : 885-95.

- Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW, Koziel MG. Transgenic plants : an emerging approach to pest control. *Nature Biotech* 1997 ; 15 : 137-41.

Résumé

Impact de colzas transgéniques exprimant des inhibiteurs de protéases sur coléoptères phytophages et sur abeilles

L. JOUANIN, ET AL.

Des lignées de colza transgéniques exprimant un inhibiteur de protéases (IP) à sérine (CII du soja) ou à cystéine (OCI de riz) sous le contrôle du promoteur de l'ARN 35S du CaMV ont été obtenues. Ces IP ont été choisis à la suite de la détermination du type de protéases digestives présentes chez les larves des coléoptères ravageurs du colza. Un système digestif complexe comprenant des protéases de type sérine et cystéine a été observé et les IP choisis sont capables d'inhiber *in vitro* les protéases correspondantes. Toutefois, au cours de bioessais réalisés sur les plantes exprimant ces IP, aucun effet délétère sur le développement des larves de ces insectes n'a été obtenu. Des perturbations des protéases digestives sont bien observées chez les larves se nourrissant sur plantes transformées mais ces insectes sont capables de compenser le blocage d'un type de protéases par surexpression d'autres protéases. Le colza étant une plante mellifère et les abeilles possédant essentiellement des protéases à sérine, l'impact potentiel à court ou long terme de l'ingestion d'IP à faibles ou fortes doses a été étudié sur ces insectes. Même avec un IP à sérine, aucun effet négatif n'a été observé sur la durée de vie, le comportement, et la physiologie digestive des abeilles, à des doses similaires à celles pouvant être produites dans des plantes transgéniques.

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

L. JOUANIN, ET AL.

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

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

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

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 531-6.

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

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

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

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

La famille des *Casuarinaceae* comprend quatre genres, *Casuarina*, *Allocasuarina*, *Ceuthostoma* et *Gymnostoma*, et plus de 90 espèces d'arbres et d'arbustes dont l'aire d'origine s'étend de l'Australie aux îles du Pacifique et au sud-est de l'Asie [1]. Les *Casuarinaceae* possèdent des rameaux chlorophylliens à activité photosynthétique et des feuilles réduites à des écailles membraneuses verticillées, limitant les pertes en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs. En association avec *Frankia* et des champignons mycorrhiziens,

les *Casuarina* peuvent croître sur des sols marginaux carencés en azote et en phosphore. La famille des *Casuarina* comprend des essences tropicales, sub-tropicales ou méditerranéennes, adaptées à différents climats (arides à humides), à différentes altitudes (0 à 3 000 m) et à différents types de sols (acides à alcalins). L'ensemble de ces propriétés facilite l'introduction de ces arbres en zone tropicale, en dehors de leur aire d'origine. Les *Casuarina* sont largement utilisées dans les régions tropicales pour enrichir les sols, fixer les terrains érodés et les dunes mobiles, et produire du fourrage et de la biomasse [2]. Le bois de *Casuarina* possède également un pouvoir calorifique très élevé et constitue une source importante de charbon de bois ; il est également utilisé pour fabriquer des outils agricoles ou plus rarement pour produire de la pâte à papier.

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

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

Tirés à part : C. Franche