

Génie génétique appliqué

à l'amélioration des espèces fourragères

B. Verdaguer, M.H. Bonnacuelle, C. Balardelle, M. Romestant, P. Lacaze

Biogemma, 5 rue St Germain-L'auxerrois, F-75001 Paris ; bverdaguer@ragt.fr

Résumé

Les principaux efforts de la recherche dans le domaine des biotechnologies ont été initialement réalisés sur les espèces de grandes cultures. Les plantes fourragères ne sont pas pour autant oubliées et des méthodes de transformation génétique ont pu être développées pour la plupart des espèces. Ainsi, dix ans après la commercialisation des premières plantes transgéniques, 2005 devrait voir arriver sur le marché américain des variétés de luzernes tolérantes au glyphosate. De nombreux programmes ciblés sur la qualité nutritionnelle des fourrages ont aussi été développés. Dans cette thématique, les travaux concernant l'amélioration de la digestibilité sont particulièrement avancés et des plantes de luzerne et de fétuque élevée hypolignifiées ont été obtenues. D'autres approches de transgénèse portant sur valeur alimentaire des espèces fourragères s'intéressent à des gènes impliqués dans la synthèse de tannins condensés (protoanthocyanidines), de fructanes et de protéines riches en acides aminés soufrés (cystéines, méthionines). Des thématiques liées à la tolérance aux maladies, aux stress environnementaux et à la modification du cycle de développement de la plante sont aussi développées. Les plantes transgéniques et les fourrages en particulier peuvent aussi être utilisés pour la production à faible coût de molécules à intérêt industriel ou pharmaceutique. Des exemples liés à la synthèse de vaccins et à la production de phytase dans la luzerne seront présentés.

Introduction

Plus de 20 ans après l'obtention de la première plante génétiquement modifiée, le génie génétique végétal reste une technologie émergente dans l'amélioration des plantes. Aujourd'hui la quasi-totalité des cultures transgéniques dans le monde concerne deux gènes bactériens de tolérance à un herbicide et de résistance aux insectes. En Europe, l'acceptation sociétale de ces plantes transformées est une controverse ininterrompue depuis les premières demandes d'implantation dans les années 90. Ce constat montre la nécessité de développer de nouvelles plantes transgéniques dont les bénéfices pour l'agriculture et l'environnement seront clairement établis. Les progrès constants réalisés dans la connaissance des voies métaboliques chez les végétaux apportent de nouvelles cibles pour la transgénèse. De plus, la dernière décennie a vu l'essor de la génomique avec le développement de grands programmes internationaux de décryptage du génome de plantes modèles, *Arabidopsis* et riz, mais aussi *Medicago truncatula*. Les génomes du ray-grass, du trèfle blanc et de la fétuque sont aussi étudiés par plusieurs organismes nationaux (AGResearch en Nouvelle-Zélande, AgVictoria en Australie et Fondation Noble aux USA). L'ensemble de ces travaux va accroître notre connaissance des génomes et offrira de nombreux gènes candidats pour les approches transgéniques. Ces nouvelles ressources seront utilisées pour créer des plantes transgéniques de « deuxième génération » pour lesquelles des caractères de qualité ou de meilleure adaptabilité à l'environnement seront améliorés. Des plantes fourragères génétiquement modifiées possédant une meilleure valeur nutritive rentrent dans cette catégorie

A ce jour, **la transformation génétique de la plupart des espèces de prairie est maîtrisée**. Les premières luzernes transgéniques ont été obtenues par *Agrobacterium tumefaciens* en 1988 (CHABAUD *et al.*, 1988). Les premières graminées transgéniques de ray-grass et de fétuque élevée, longtemps récalcitrantes à la culture *in vitro*, ont été obtenues en 1995 par micro-bombardements (SPANGENBERG *et al.*, 1995a et b). Une méthode utilisant *Agrobacterium* a été récemment développée pour ces espèces (BETTANY *et al.*, 2003). Les **contraintes spécifiques des espèces fourragères** résident d'une part dans l'absence de matériel hautement régénérable et adapté à la culture *in vitro* et d'autre part dans un schéma de sélection basé sur la création de variétés synthétiques. La création d'une variété transgénique implique dans un premier temps l'obtention d'une plante transformée exprimant le gène d'intérêt et dans un deuxième temps le transfert de celui-ci par croisements à l'ensemble des composants génétiques constituant la variété. De nombreux travaux concernent l'obtention de plantes fourragères génétiquement modifiées. Cet article fait un état des lieux des différents programmes aboutis ou en cours sur ces espèces. On pourra noter la prédominance de la luzerne qui reste la plante la plus ciblée par ces programmes. Ces efforts de recherche sont conduits essentiellement aux USA et dans l'hémisphère sud (Australie et Nouvelle-Zélande), traduisant un très fort différentiel de recherche avec l'Europe. La société Biogemma est une des seules en Europe à s'intéresser à ce type d'approche à travers un programme concernant la modulation de la lignification chez la fétuque élevée.

1. Tolérance aux herbicides

La tolérance aux herbicides est historiquement un des premiers caractères transgéniques transféré aux plantes. C'est typiquement ce que l'on appelle maintenant un caractère transgénique de première génération pour lequel l'expression du gène étranger est directement responsable de la plus-value agronomique. L'herbicide ayant suscité le plus de travaux est le glyphosate, matière active de l'herbicide non sélectif Roundup®. Le glyphosate est un inhibiteur de la 5-enol pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), une enzyme clé de la synthèse des acides aminés aromatiques essentiels pour le développement de la plante. C'est une cible herbicide particulièrement intéressante car cette voie métabolique est absente chez les mammifères. Dès le début des années 1990 on pu montrer que la sur-expression d'un gène de EPSPS dans une plante transgénique permettait un bon niveau de tolérance à l'herbicide. En 1994, la société Monsanto mettait au point les premières plantes de soja transgéniques tolérantes au glyphosate après intégration du gène de l'EPSPS de la souche CP4 d'*Agrobacterium*. Cette enzyme a la particularité de présenter une forte activité catabolique avec une faible inhibition par le glyphosate. En 1996, les premiers sojas transgéniques étaient commercialisés sous l'appellation "Roundup Ready®". Cette technologie est devenue depuis l'image de marque de la société Monsanto et a été transférée à la plupart des plantes économiquement importantes : coton, maïs, soja, colza... La dernière espèce en date devrait être la luzerne qui attend **courant 2005 les autorisations permettant sa commercialisation**. Les premières **luzernes transgéniques contenant le gène CP4 EPSPS** ont été obtenues en 1997 par la société Monsanto. Différents matériels élites contenant le transgène ont été obtenus et ont été utilisés par la société Forage Genetic International pour créer plusieurs variétés transgéniques (VAN DEYNZE *et al.*, 2004). A ce jour, 63 autorisations d'essais au champ couvrant plusieurs états des USA sont effectives pour la luzerne Roundup Ready®.

Les avantages des plantes transgéniques tolérantes à un herbicide total sont maintenant bien connus. Ils permettent une **meilleure gestion de l'ensemble des mauvaises herbes** et en particulier des espèces pérennes parfois difficiles à contrôler en prairies. L'application de l'herbicide n'est plus strictement dépendante d'un stade végétatif précis, autorisant ainsi **plus de flexibilité** dans les traitements. Par ailleurs, un herbicide comme le glyphosate est globalement **moins rémanent** et moins toxique que la plupart des autres herbicides sélectifs utilisés. Ce type de culture transgénique devrait contribuer à baisser substantiellement la quantité totale d'intrants chimiques.

Les questions liées aux cultures tolérantes aux herbicides sont aussi bien identifiées : **apparition de résistance, modification durable des populations de mauvaises herbes, pollution génétique et acceptation sociétale**. Dans le cas spécifique des plantes de prairies, la problématique majeure concerne **les flux de pollen transgénique**. Ce problème pourrait être cependant plus limité chez les espèces entomophiles comme la luzerne. Des travaux récents utilisant des abeilles pollinisatrices déterminent les distances minimales permettant d'observer des taux de pollution croisée inférieurs à 1% (FITZPATRICK *et al.*, 2003). Ce problème sera particulièrement sensible dans le cadre de

productions de graines qui devront être réalisées avec des contraintes d'isolement bien définies. Dans le cadre de fourrages, une récolte précoce, avant ou au début de la floraison, permettra de limiter les flux de pollen.

2. Valeur alimentaire du fourrage et de l'ensilage

2.1. Amélioration de la digestibilité et voie de synthèse de la lignine

Les éleveurs veulent être plus autonomes pour l'alimentation de leur bétail tout en maintenant un bon niveau de production. Deux objectifs qui ne sont pas contradictoires à la condition qu'ils puissent disposer de fourrages plus énergétiques et mieux consommés. La digestibilité est la composante essentielle de la valeur alimentaire d'un fourrage. Celle-ci est définie comme l'aptitude d'un aliment à être dégradé dans le rumen par la flore microbienne pour libérer les hydrates de carbone et les protéines assimilables par l'animal. **La teneur en lignine des parois végétales, les différences dans sa composition, ainsi que la nature des liaisons la liant aux hémicelluloses, constituent les facteurs majeurs limitant la digestibilité des fourrages.** Les lignines sont des hétéropolymères complexes formés de trois unités structurales ou monolignols, l'alcool p-coumarylique, l'alcool conifénilique et l'alcool sinapilique qui produisent respectivement les unités phénylpropanoïdes H (p-hydroxyphényl), G (guaiacyl) et S (syringyl) une fois incorporés dans le polymère. La voie de synthèse de la lignine, qui a pour point de départ la phénylalanine, est relativement bien caractérisée (BOERJAN *et al.*, 2003), et les gènes des enzymes clés intervenant dans la formation des monolignols ont été clonés chez la plupart des espèces importantes. **La digestibilité est déterminée par la teneur totale en lignine mais aussi par la part respective des unités G, S et H dans le polymère.** Chez les légumineuses fourragères, les lignines sont constituées essentiellement de monomères S et G alors que l'on trouve une proportion significative de résidus H chez les espèces monocotylédones. De plus, les lignines sont un composé "vivant" qui va évoluer selon les conditions de l'environnement et selon le stade de développement. On observe que le rapport S/G augmente généralement avec la maturité de la plante tandis que la digestibilité diminue. De nombreux programmes de génie génétique ont été entrepris dans le but de diminuer les teneurs en lignines ou modifier le rapport S/G avec pour objectif final d'augmenter la digestibilité des fourrages. Les travaux les plus aboutis chez les espèces de prairies concernent la fétuque élevée et la luzerne. Pour ces deux espèces, des programmes sont en cours pour produire **des plantes hypolignifiées** en altérant l'expression d'enzymes clés de la voie de la biosynthèse de la lignine.

– La fétuque élevée

C'est une graminée très largement utilisée dans les prairies pour sa productivité et son caractère rustique. Sa digestibilité très moyenne limite cependant sa valeur alimentaire. La société **Biogemma conduit actuellement des travaux sur des fétuques élevées à activité cinnamoyl-coenzyme A-réductase (CCR) réduite.** Ces plantes ont été obtenues après transformation avec une construction génétique permettant la sur-expression d'un ARN antisens de CCR de fétuque. Les différents transformants primaires (issus de la régénération *in vitro* de cellules transformées) présentent des taux d'activité CCR variables : les plantes les plus inhibées possèdent en moyenne une activité 50% inférieure à celle des témoins non transformés. Un premier criblage des transformants primaires a été réalisé en mesurant la digestibilité de la matière sèche *in vitro* de plantes en serre. Les résultats obtenus montrent que les digestibilités les plus fortes sont obtenues pour les transformants les plus inhibés. Un gain maximal de 5% de digestibilité a été mesuré par rapport à un groupe de plantes témoins. Depuis 2002, Biogemma conduit en France un essai de recherche en plein champ pour évaluer et comparer des fétuques transgéniques issues de différents événements de transformation génétique. Ces plantes ont intégré dans leur génome la même construction génétique mais diffèrent par la localisation et le nombre d'insertions du transgène. L'essai est constitué de descendants F1 transgéniques et non transgéniques issus de croisements entre transformant primaire et composants d'une variété commerciale. Des mesures de digestibilité seront effectuées sur trois saisons et sur la totalité des coupes réalisées. La digestibilité est évaluée par des analyses NIRS ou enzymatique "pepsine cellulase" de la matière sèche récoltée. Sachant le rôle majeur du métabolisme des phénylpropanoïdes dans le développement de la plante, l'essai au champ est aussi essentiel pour évaluer le comportement agronomique ou pour détecter un phénotype anormal dans les conditions de culture.

D'autres travaux sur des fétuques hypolignifiées sont conduits par la fondation Noble aux USA. Des stratégies ARN antisens et de co-suppression ont été appliquées pour obtenir des plantes dont **l'expression du gène codant l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD) a été diminuée** (CHEN *et al.*, 2003). Sur l'ensemble des transformants primaires obtenus, deux plantes se sont révélées particulièrement intéressantes. Des inhibitions enzymatiques de l'ordre de 30 à 50% associées à une diminution de la teneur en lignine de 15% ont été mesurées. L'analyse fine de la lignine des plantes transgéniques montre une composition altérée avec une diminution significative du rapport S/G. Au final, ces auteurs ont pu montrer que **la digestibilité de la matière sèche de ces plantes à activité CAD réduite avait augmenté de 7,2 et 9,5% pour les deux événements de transformation sélectionnés**. Un essai en champ réalisé en 2002 a pu montrer que les caractéristiques agronomiques des plantes transformées étaient normales (caractéristiques de pousse, architecture, date de floraison, nombre d'épis, production de graines). Un projet analogue, ciblé sur **l'acide caféique 3-o-méthyltransférase (COMT)**, a aussi été entrepris par la même équipe de recherche (CHEN *et al.*, 2004). Des plantes de fétuques élevées ont été obtenues avec une activité enzymatique COMT diminuée de l'ordre de 40 à 50%. Cette altération métabolique entraîne une diminution de la teneur en lignines de 28% ainsi qu'une modification de la composition de la lignine qui voit son rapport S/G diminué. Ces modifications ont pour conséquence **d'augmenter la digestibilité de la matière sèche d'environ 10%**. Ces plantes sont actuellement testées en champs aux USA.

– La luzerne

Elle constitue aussi une espèce très importante dans l'alimentation du bétail. Très riche en protéines, en minéraux et vitamines, sa valeur alimentaire peut cependant être limitée en particulier dans la fraction tige par une mauvaise digestibilité. Cette digestibilité sera d'autant plus limitée que le stade de récolte est tardif. Plusieurs travaux ont été entrepris pour obtenir des variétés hypolignifiées. Des plantes de luzerne ont été transformées avec **une séquence antisens de gène CAD** (BAUCHER *et al.*, 1999). La sur-expression de cette séquence conduit à une diminution de l'activité enzymatique de 70% tandis que la composition de la lignine est largement altérée par une diminution importante des résidus de type S. Une amélioration de la digestibilité de la matière sèche a été observée pour les plantes présentant les niveaux d'activité CAD les plus faibles. La fondation Noble a aussi développé des programmes ciblés sur **les activités COMT et CCoAOMT (caffeyl Coenzyme A 3-o-méthyltransférase)**. Des stratégies ARN antisens et de co-suppression ont été appliquées aux séquences codantes des gènes COMT et CCoAOMT de la luzerne (GUO *et al.*, 2001a). Dans ce projet, l'expression des gènes est contrôlée par le promoteur PAL2 du gène codant la phénylalanine-ammonia-lyase du pois, qui est actif préférentiellement dans les zones de lignification et en particulier dans les tissus vasculaires. Dans les deux cas, des transformants primaires de luzerne ont pu être obtenus avec des taux de lignines diminués de 30%. Les plantes à activité COMT réduite avaient une diminution plus importante des unités S tandis que les plantes transgéniques CCoAOMT avaient une réduction du nombre d'unités G traduisant les implications différentes de ces enzymes dans la voie de biosynthèse des monolignols. Les plantes les plus intéressantes ont été croisées avec une variété commerciale et les descendances transgéniques et non transgéniques ont été évaluées au champ sur trois lieux différents. Ces essais ont pu montrer que les plantes transgéniques présentaient une meilleure digestibilité par rapport aux plantes témoins. En particulier, on peut noter **une augmentation de l'ordre de 5% de la digestibilité dans le rumen de veaux fistulés** (GUO *et al.*, 2001b). *WL Research* et *Forage Genetic International*, deux des plus importants acteurs du marché de la luzerne aux USA, testent déjà depuis trois ans des plantes de luzerne à activité COMT réduite, montrant ainsi qu'une **valorisation commerciale** de ces produits est envisageable dans un proche avenir.

Ces travaux montrent donc qu'il est possible par la voie du génie génétique d'obtenir des plantes fortement hypolignifiées avec une digestibilité significativement améliorée. S'il est vérifié qu'un gain de 10% de la digestibilité de la matière sèche peut être obtenu, cela constituerait une rupture dans la courbe de progrès génétique de ces dernières années. Il est aussi remarquable de constater que, dans les cas cités, des modifications importantes de la teneur ou/et de la composition en lignine **n'affectent pas significativement le phénotype et le comportement de la plante**, témoignant ainsi de la grande plasticité de la lignine.

2.2. Tannins condensés

Un autre axe de recherche sur la valeur nutritionnelle des fourrages concerne les tannins condensés (CTs) ou protoanthocyanidines. Ce sont des polymères de flavan-3-ol, ou catéchines, produits du métabolisme des flavonoïdes. Leur voie de synthèse est largement commune avec celle des anthocyanes. Ces polymères présentent un grand intérêt dans l'amélioration de la valeur alimentaire des légumineuses comme la luzerne et le trèfle blanc. En effet il est démontré que, présents en faible quantité dans la ration, les CTs se fixent sur les protéines et en ralentissent la dégradation dans le rumen. Ainsi, ils **diminuent les phénomènes de météorisation** et augmentent la quantité des protéines passant dans l'intestin. Les CTs peuvent aussi diminuer la protéolyse lors de l'ensilage. L'apport de CTs améliore **donc la nutrition azotée en favorisant l'absorption des acides aminés essentiels**. Les effets bénéfiques des CTs disparaissent cependant à concentration élevée où ils diminuent fortement l'appétence et influent négativement sur la valeur nutritionnelle. Les CTs sont cependant absents dans les tissus végétatifs des légumineuses cultivées. Le génie génétique, par sa capacité à modifier les voies métaboliques, offre des perspectives prometteuses pour autoriser une production de protoanthocyanidines dans les feuilles de légumineuses. On a ainsi pu montrer pour la première fois chez la luzerne que la synthèse de CTs dans les parties aériennes de la plante était possible suite à la sur-expression d'un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la voie de biosynthèse des anthocyanes (RAY *et al.*, 2003). L'approche transgénèse est cependant limitée par la méconnaissance des étapes enzymatiques spécifiques conduisant à la synthèse des protoanthocyanines. Récemment, l'étude de mutants d'*Arabidopsis* a permis d'isoler le gène *Ban* codant une **anthocyanidine réductase**, enzyme clé qui catalyse la conversion des précurseurs leucoanthocyanidines en flavan-3-ol, unité de base des polymères de CTs. Des travaux récents chez le tabac montrent que la manipulation des niveaux d'activité de cette enzyme pourrait permettre la synthèse de protoanthocyanidines dans les feuilles de plantes transgéniques (XIE *et al.*, 2003 ; DIXON *et al.*, 2005). Ces résultats encourageants sont une première étape vers l'obtention d'une luzerne n'entraînant pas de phénomène de météorisation.

2.3. Protéines riches en résidus soufrés, cystéine et méthionine

Les **carences en acides aminés soufrés** (méthionine et cystéine) dans l'alimentation des ruminants peuvent être extrêmement limitantes pour la productivité animale. Ceci est particulièrement vrai pour la production de laine mais aussi dans une moindre mesure pour le lait et la viande. Ces carences sont fréquentes dans la mesure où les protéines de la ration sont rapidement dégradées par les microorganismes du rumen et converties en protéines microbiennes pauvres en résidus soufrés. Des programmes de transformation génétique ont donc été entrepris pour répondre à ce problème. La stratégie choisie est de sur-exprimer dans les fourrages une **protéine de réserve de graine naturellement riche en acides aminés soufrés et résistante à la dégradation dans le rumen**. Un gène codant une albumine du tournesol a ainsi été introduit dans le trèfle (CHRISTIANSEN *et al.*, 2000) et la fétuque élevée (WANG *et al.*, 2001), ainsi qu'un gène de zeïne de maïs dans la luzerne (BELLUCI *et al.*, 2003) et dans le trèfle (SHARMA *et al.*, 1998). Une séquence signal de rétention dans le réticulum endoplasmique est associée au transgène pour permettre à la protéine de s'accumuler en grande quantité dans ce compartiment cellulaire. Malgré cela, les taux de production de ces protéines de réserve dans les feuilles des plantes transformées sont en deçà des seuils nécessaires pour réellement avoir un impact nutritionnel (environ 4% des protéines solubles totales). De nouveaux systèmes d'expression plus efficaces (nouveaux promoteurs, intégration et expression du transgène dans les chloroplastes par exemple) doivent donc être envisagés pour valider ce type de stratégie.

2.4. Sucres solubles

Les fructanes sont des polyfructoses qui constituent la principale forme de sucre de stockage chez de nombreuses espèces et chez les graminées fourragères en particulier. La teneur en carbohydrates solubles détermine en partie la densité énergétique de la ration et constitue donc une composante essentielle de la valeur nutritive d'un fourrage. Chez le ray-grass, on a pu constater que la diminution de la valeur nutritive durant l'été, due à la lignification, était en partie compensée par une accumulation de fructanes. Il est par ailleurs suggéré que les fructanes jouent un rôle dans la tolérance au froid et à la sécheresse. Pour toutes ces raisons, les fructanes constituent une cible intéressante pour l'amélioration des fourrages.

L'approche choisie vise à **augmenter la teneur en fructanes** en sur-exprimant une enzyme impliquée dans leur synthèse. Le gène candidat peut être d'origine végétale, comme dans le cas du ray-grass sur-exprimant la fructosyltransférase du blé (HISANO *et al.*, 2004), ou d'origine microbienne. Les bactéries synthétisent en effet un analogue du fructane, ou levane, et des gènes codant la levanesucrase de *Bacillus subtilis* et la fructosyltransférase de *Streptococcus salivarius* ont été transférés respectivement chez le raygrass (YE *et al.*, 2001) et le trèfle blanc (JENKINS *et al.*, 2002). Les travaux réalisés à ce jour ne permettent pas de conclure quant aux améliorations nutritionnelles de ces plantes transgéniques mais une tolérance accrue au froid a pu être constatée chez le raygrass (HISANO *et al.*, 2004). Plusieurs indications semblent suggérer cependant qu'une trop forte accumulation de fructanes pourraient avoir un effet négatif sur la croissance et le développement des plantes (CAIRNS, 2003).

3. Stress biotique et abiotique

3.1. Résistance aux maladies

Les progrès de la recherche durant cette dernière décennie permettent une meilleure compréhension des mécanismes de défense des plantes vis-à-vis des pathogènes. L'identification de nombreux gènes de défense, l'exploration des voies de transduction, l'identification de mécanismes de défense contre les virus offrent de nombreux candidats pour une approche de transformation génétique des espèces cultivées. Cependant, les exemples de valorisation au champ de ce type d'approches sont encore assez rares. Les relations entre plantes et micro-organismes sont par nature évolutives et l'efficacité d'une stratégie transgénique de tolérance efficace et stable reste un vrai challenge. Par ailleurs, et chez les espèces fourragères en particulier, la plupart des problèmes liés aux pathogènes sont contrôlés convenablement par la sélection classique.

Le seul vrai succès commercial du génie génétique dans ce type de thématique provient de l'utilisation **des gènes *Cry* issus de *Bacillus thuringiensis*** sur maïs et coton. L'expression des gènes *Cry* permet d'apporter une réponse très efficace et spécifique contre certains lépidoptères ravageurs. Ce type de gène a aussi été utilisé chez la luzerne et le trèfle blanc pour lutter contre les noctuelles et les *Hepialidae* (STRIZHOV *et al.*, 1996 ; SPANGENBERG *et al.*, 2001). Une autre approche dans la lutte contre les insectes consiste à faire produire aux plantes génétiquement modifiées des **inhibiteurs de protéinase**. L'ingestion de ces enzymes inhibe la capacité digestive des insectes. On a pu montrer ainsi que la sur-expression d'une antiprotéinase de *Manduca sexta* (sphinx du tabac) pouvait diminuer les attaques de thrips sur la luzerne (THOMAS *et al.*, 1994).

Une infestation par un champignon pathogène induit souvent chez la plante l'expression de **β 1-3 glucanases et de chitinases**. Ces enzymes attaquent directement la paroi des champignons et permettent la libération de signaux moléculaires activateurs des réactions de défense de la plante. Une protection contre le pourrissement des racines de la luzerne, causée par le champignon pathogène *Phytophthora megasperma* f. sp. *Medicaginis*, a ainsi pu être mesurée sur des plantes de luzernes transgéniques sur-exprimant une β 1-3 glucanase (MASOUD *et al.*, 1996). Une approche intéressante est proposée par TESFAYE et coll. (2004) qui ont associé le gène d'endochitinase *ech42* à un peptide signal d'une phosphatase du lupin permettant l'exsudation de l'enzyme dans la rhizosphère de luzernes transgéniques. L'expression d'une chitinase du riz dans le ray-grass améliore aussi au laboratoire la résistance à la rouille couronnée, *Puccinia coronata* (TAKAHASHI *et al.*, 2004).

Des stratégies de **résistances dérivées du pathogène** (*pathogen derived resistance*) **pour lutter contre les virus** ont aussi été appliquées sur les espèces fourragères. Dans ces stratégies, l'expression d'une séquence d'origine virale, protéines de capsid ou réplicases, induit une protection contre les viroses. On peut ainsi citer les travaux sur la résistance à la mosaïque du ray-grass (XU *et al.*, 2001) et sur la résistance du trèfle blanc au virus de la mosaïque de la luzerne, ou AMV (SPANGENBERG *et al.*, 2001). Pour ce dernier cas, des plantes transgéniques contenant la capsid du virus ont été croisées avec du matériel élite pour permettre la création de la première variété tolérante à l'AMV (Emmerling *et al.*, 2003).

Le seul exemple de plante fourragère testée actuellement au champ aux USA pour une résistance aux maladies concerne une luzerne transformée avec un gène d'arachide codant la **resvératrol**

synthase, RS (HIPSKIND et PAIVA., 2000). Il s'agit d'une enzyme absente chez la luzerne dont l'expression va permettre la synthèse d'une nouvelle molécule antimicrobienne végétale, le resvératrol. Cette molécule considérée comme **une phytoalexine** est un stilbène, normalement absent de la luzerne et connu pour son action antimicrobienne à large spectre. L'expression du gène RS permet donc la synthèse d'une nouvelle molécule complexe, pouvant renforcer les défenses de la plante. Des inoculations expérimentales de feuilles de luzerne par *Phoma medicaginis*, champignon pathogène responsable de la maladie des tiges noires, ont montré une diminution significative de la taille des lésions et du nombre de structures reproductives du champignon dans les plantes transformées en comparaison aux plantes témoins. Dans la même thématique, l'équipe de R. DIXON (HE et DIXON., 2000) s'est appliquée à **augmenter les niveaux de phytoalexines naturelles de la luzerne** par la sur-expression du gène de la isoflavone 7-o-méthyl transférase (IOMT). Cette enzyme est impliquée dans la synthèse d'isoflavones à caractère antimicrobien : la médicarpine et la formononétine. Une diminution des symptômes est observée chez les plantes transgéniques suite à l'inoculation par *Phoma medicaginis*.

3.2. Les stress abiotiques

Les stress liés à l'environnement tel que sécheresse, froid et gel, excès d'eau ainsi que les pollutions sont responsables de baisses de productions, de mauvaise implantation et d'altération de la persistance des cultures fourragères. La tolérance au stress est donc une thématique de recherche importante. La plupart des stress liés à l'environnement, en particulier le froid et la sécheresse, produisent dans la plante un choc oxydatif qui va se traduire par la production de radicaux libres et de formes activées de l'oxygène. Ces molécules actives dégradent les lipides membranaires et sont responsables de dégâts irréversibles dans la plante. **La tolérance au stress oxydatif peut être considérée comme une stratégie globale pour lutter contre les stress abiotiques.** La plante possède des systèmes de détoxification des molécules actives de l'oxygène, en particulier enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, peroxydase), mais ceux-ci deviennent insuffisants en cas de stress important. Une stratégie d'amélioration consiste donc à élever cette capacité naturelle de la plante. Cette approche a été appliquée sur la luzerne par D. MCKERSIE et coll. (1996 ; 1999 ; 2000) de l'université de Guelph (Canada). L'objectif était de pouvoir améliorer la production de la luzerne dans l'Ontario où sa persistance est limitée par la rigueur de l'hiver. Pour cela, un gène codant **une superoxyde dismutase** a été isolé chez le tabac et chez *Arabidopsis* et introduit dans le génome de la luzerne. Des plantes transgéniques sur-exprimant l'une ou l'autre enzyme ont été obtenues et testées à la fois en chambres de culture et dans des expérimentations pluriannuelles au champ. L'ensemble des données obtenues montre que les plantes de luzernes transgéniques ont une tolérance au froid, au gel et à la dessiccation supérieure aux témoins non transformés. Ceci se traduit par **une persistance améliorée et une meilleure production de biomasse** au champ, traduisant une meilleure adaptation à l'environnement.

D'autres travaux moins avancés concernent la **tolérance à l'aluminium et au stress salin**. L'acidité des sols limite la production de nombreuses espèces de fourrages et en particulier la culture de la luzerne. Un problème récurrent des sols acides concerne la toxicité de l'aluminium. A pH acide, l'aluminium du sol devient soluble et est absorbé par la plante dont il inhibe la croissance et l'absorption racinaire. On a pu remarquer que beaucoup de plantes tolérantes exsudaient dans leur rhizosphère nombre d'acides organiques (citrate, malate, oxalate) qui en se fixant sur l'aluminium lui font perdre sa phytotoxicité. Cette propriété a été utilisée pour améliorer le comportement de la luzerne en sol acide. Des plantes ont été modifiées pour sur-exprimer une malate déshydrogénase permettant une augmentation d'un facteur 7 de la quantité d'acides organiques excrétés par les racines (TESFAYE *et al.*, 2001). Cette modification a pu être associée avec une tolérance accrue à l'aluminium et à une meilleure croissance racinaire en sol acide.

La salinité des sols est aussi un problème croissant dans certaines régions du monde où l'irrigation est importante. La présence de sels est directement responsable de baisses de rendement et peut rendre à terme les sols impropres à la culture. Des plantes de luzernes transgéniques tolérantes aux sels ont pu être obtenues par la sur-expression du facteur de transcription Alfin1 qui a une fonction probable dans la régulation de l'expression de gènes dans les racines et lors de stress salin. Les plantes produites se caractérisent en particulier par une meilleure croissance racinaire en condition stressée mais aussi en condition normale de culture (WINICOV et BASTOLA, 1999 ; 2000).

4. Développement de la plante

4.1. Sénescence

Le génie génétique peut être utilisé pour moduler des processus physiologiques du développement de la plante. Les travaux les plus intéressants concernant cette thématique sont ceux de la société *CalWest Seeds* aux USA qui s'intéresse aux processus de **sénescence foliaire chez la luzerne**. Une sénescence foliaire chronique et non létale peut être déclenchée par toute une série de stress de l'environnement (froid, sécheresse, pathogène, carence...) entraînant une baisse importante de la biomasse récoltée. Dans la série des événements menant à la sénescence, les facteurs de croissance jouent un rôle important : activateur de sénescence pour l'éthylène, l'acide abscissique et méthyl jasmonate ou **répresseur pour les cytokinines**. La stratégie de *CalWest* consiste à utiliser cette propriété des cytokinines pour bloquer la sénescence foliaire chez la luzerne. Une enzyme clé de la voie de biosynthèse des cytokinines, **l'isopentényl transférase**, est ainsi exprimée chez les plantes sous le contrôle du promoteur SAG12 dont l'expression est spécifique de la sénescence. Ceci permet de retarder les phénomènes de la mort cellulaire se produisant lors de la sénescence tout en évitant une surproduction de cytokinines non contrôlée qui aurait des effets adverses sur le développement de la plante. Les plantes de luzerne transgénique obtenues se caractérisent par **la persistance d'un feuillage vert en condition de stress et par des qualités agronomiques globalement supérieures** aux plantes non transformées (SANDMAN *et al.*, 2003). Plusieurs essais au champ concernant ce matériel sont en cours aux USA. Une stratégie identique a aussi été appliquée à des ray-grass (LI *et al.*, 2004).

4.2. Floraison

La floraison est aussi un processus du développement ciblé par des approches de génie génétique. La société *DLF Trifolium* et le laboratoire national danois RISOE s'intéressent aux gènes impliqués dans la transition des méristèmes végétatifs en méristèmes floraux. Un gène du ray-grass homologue du gène *terminal flower1* (TFL1) d'*Arabidopsis* a ainsi été isolé. Sa fonction est de bloquer les méristèmes apicaux à un stade végétatif ; il réprime donc la floraison. Le gène Lp TFL1 a été sur-exprimé chez la féтуque rouge utilisée ici comme modèle (JENSEN *et al.*, 2004). Après vernalisation, **un retard de floraison** est observé chez les plantes transformées, en corrélation avec le niveau d'expression du transgène. Les plantes présentant les niveaux d'expression les plus élevés ne fleurissent pas. Ces résultats expérimentaux démontrent donc que **les mécanismes contrôlant l'induction florale peuvent être modulés par transgénèse**. Ce type de stratégie peut avoir un double avantage: l'allongement de la phase végétative de la plante permet d'augmenter la productivité en fourrage et une modification de la phase de floraison peut constituer un moyen pour contrôler les flux de pollen transgénique.

Le gène barnase codant une ribonucléase est souvent utilisé associé à un promoteur pollen-spécifique pour induire par transgénèse une stérilité mâle génique. Cette stratégie a aussi été développée sur la luzerne (ROSELLINI *et al.*, 2001) avec pour objectif principal une utilisation dans la production d'hybrides. Cette approche peut être aussi appliquée pour limiter les flux de pollen transgénique et des systèmes fonctionnels ont déjà été mis en place dans des espèces de gazons (Luo *et al.*, 2003).

5. Production de nouveaux composés

Le génie génétique peut permettre la synthèse dans des plantes transformées de molécules à intérêt industriel ou pharmaceutique. Cette perspective séduit les industriels pour produire en grande quantité et à bas coût des protéines à haute valeur ajoutée. La plante la plus utilisée dans ce type d'approche est le maïs et plusieurs produits commerciaux existent déjà. Les fourrages sont aussi utilisés et plusieurs exemples montrent que la luzerne est un modèle particulièrement adapté à ces applications. La transformation et la régénération de luzernes transgéniques sont complètement maîtrisées et c'est une plante pérenne qui produit beaucoup de biomasse. D'autre part, la luzerne peut être multipliée par bouturage, permettant ainsi d'obtenir rapidement la population clonale d'un événement d'intégration sélectionné. La luzerne est ainsi utilisée pour produire des anticorps thérapeutiques ou de diagnostic destinés à la médecine humaine (KHOUDI *et al.*, 1999). Mais ce type

d'approche a aussi un intérêt dans l'agriculture pour produire des molécules préservant la santé des animaux ou la qualité de l'environnement.

La luzerne étant une composante importante de l'alimentation du bétail, elle peut être utilisée comme **une source de vaccins comestibles destinés aux animaux**. L'approche de la transgénèse associée aux techniques de biologie moléculaire permet en effet de faire synthétiser à la plante un antigène recombinant qui, une fois ingéré par l'animal, pourra produire une réaction immunitaire. Le fourrage peut donc devenir une source de vaccin peu coûteuse et facilement administrable. Cette approche reste à ce jour encore expérimentale mais la validité du concept est déjà acquise. Le gène codant la protéine de capsid VP1 du virus de la fièvre aphteuse (FMDV : "*foot and mouth disease virus*") a ainsi été introduit dans le génome de la luzerne (WIGDOROVITZ *et al.*, 1999). La protéine VP1 sans pouvoir pathogène mais contenant des épitopes très immunogènes va s'accumuler dans les plantes transgéniques. Des feuilles de luzerne ont été utilisées pour nourrir des souris sur lesquelles la réaction immunitaire produite ainsi que la protection contre une infection au FMDV ont été étudiées. Toutes les souris nourries de luzerne génétiquement modifiée ont développé une réponse immunitaire spécifique contre le virus et 70% des animaux se sont montrés protégés contre une infection virale. La difficulté de cette approche réside cependant dans la difficulté de quantifier la dose d'antigène administré oralement à l'animal. Par ailleurs, le niveau d'antigène produit dans la plante reste encore trop faible pour envisager une vaccination effective du bétail. La même approche a aussi été appliquée pour produire un vaccin contre le rotavirus bovin dans la luzerne et contre *Manheima haemolytica*, agent pathogène responsable de la pasteurellose, dans le trèfle blanc (WIGDOVOVITZ *et al.*, 2004 ; LEE *et al.*, 2001). Dans tous les cas, une réponse immunitaire a été détectée chez les animaux traités, démontrant que le fourrage transgénique peut être une source de vaccins.

Les plantes transgéniques peuvent être utilisées comme "bioréacteur" pour permettre la synthèse d'enzymes, normalement produites industriellement en fermenteur. Un exemple intéressant pour l'agriculture concerne **la production de phytase dans des luzernes transgéniques**. La pollution de l'eau par des rejets de phosphate issus des élevages d'animaux non ruminants (porcs et volailles essentiellement) est un des challenges que doivent résoudre les mondes scientifique et agricole. Les animaux monogastriques sont incapables de solubiliser l'acide phytique, source majeure de phosphates dans les céréales et le soja, constituants importants de leur alimentation. Une large proportion de ce phosphate d'origine végétale n'est donc pas utilisée et est excrétée dans les fèces. L'ajout de phosphate inorganique dans la ration pour répondre aux besoins des animaux augmente encore le phénomène. L'addition de phytase dans la ration, enzyme d'origine microbienne qui hydrolyse les acides phytiques, fait diminuer de moitié les rejets de phosphate. Le coût de cet apport limite cependant l'intérêt de ce procédé. Des programmes de recherche ont donc été développés pour produire cette enzyme dans des plantes transgéniques. Des chercheurs de l'USDA s'attachent depuis plusieurs années à produire des luzernes transgéniques sur-exprimant un gène de phytase d'*Aspergillus ficuum*. Ces chercheurs ont ainsi pu montrer que ces luzernes transformées produisaient une enzyme stable et active dans les feuilles de luzerne (ULLAH *et al.*, 2002). La phytase peut être récupérée simplement dans un jus de feuilles et utilisée telle quelle dans la ration. Cette approche constitue donc une alternative économiquement viable pour la production de phytase. Le développement de variétés de maïs et de soja à faible teneur en acide phytique pourrait cependant mettre un frein à ce type d'approche transgénique. En effet, l'utilisation de ces variétés dans la ration augmente de manière importante l'assimilation du phosphate d'origine végétale et fait diminuer de 30 à 40% les rejets animaux (CROMWELL *et al.*, 2000).

Conclusion

L'ensemble des travaux présentés montre que le génie génétique est maîtrisé chez les variétés fourragères. Ces approches peuvent être **une source d'amélioration importante** pour des caractères difficilement accessibles aux méthodes classiques de sélection. L'ensemble des programmes présentés vise à une amélioration de la valeur alimentaire des fourrages et de la persistance des prairies. Ces avancées peuvent constituer un atout dans les systèmes de production en donnant une place plus importante aux prairies et en favorisant l'autonomie alimentaire des exploitations.

Des plantes transgéniques exprimant différents caractères (résistance au glyphosate, hypolignification, tolérance aux pathogènes, sénescence retardée) ont été testées au champ et les

premières commercialisations de variétés de luzerne sont envisagées. **Les progrès agronomiques de ces plantes sont réels et le génie génétique peut avoir un impact considérable sur la création variétale.** Néanmoins, la valorisation dans l'agriculture de ces plantes transformées sera dépendante de **la réponse apportée aux problèmes de flux de gènes entre cultures et avec les espèces sauvages.** L'impact possible d'un transgène doit être évalué au cas par cas selon le caractère transféré. Un transgène d'origine végétale n'apportant pas d'avantage sélectif particulier ne représente pas un risque supérieur à un gène non transgénique. Pour les caractères apportant un avantage sélectif ou pour des gènes exprimant des herbicides ou des médicaments, des mesures d'isolement, des pratiques culturales ou l'utilisation de stérilité pourront être envisagés.

Références bibliographiques

- BAUCHER M., BERNARD-VAILHE M., CHABBERT B., BESLE J.M., OPSOMER C., VAN MONTAGU M., BOTTERMAN J. (1999) : "Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility », *Plant Mol. Biol.*, 39 (3), 437-447.
- BELLUCI M., DE MARCHIS F., MANNUCCI R., ARCIONI S. (2003) : "Jellyfish green fluorescent protein as a useful reporter for transient expression and stable transformation of *Medicago sativa*", *Plant Cell Rep.*, 22, 328-337.
- BETTANY A., DALTON S., TIMMS E., MANDERYCK B., DHANOA M., MORRIS P. (2003) : "Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.)", *Plant Cell Rep.*, 21, 437-444.
- BOERJAN W., RALPH J., BAUCHER M. (2003) : "Lignin biosynthesis", *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 519-546.
- CAIRNS A. (2003) : « Fructan biosynthesis in transgenic plants », *Journal of Experimental Botany*, 54 (382), 549-567.
- CHABAUD M., PASSIATORE J., CANNON F., BUCHANAN-WOLLASTON V. (1988): "Parameters affectig the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation", *Plant Cell Rep.*, 7, 512-516.
- CHEN L., AUH C., DOWLING P., BELL J., CHEN F., HOPKINS A., DIXON R., WANG ZY (2003) : « Improved forage digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea*) by transgenic down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase », *Plant Biotechnology J.*, 1, 437-449.
- CHEN L., AUH C., DOWLING P., BELL J., LEHMANN D., WANG ZY (2004) : « Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*) », *Functional Plant Biology*, 31, 235-245.
- CHRISTIANSEN P., GIBSON J.M., MOORE A., PEDERSEN C., TABEL., LARKIN P. (2000) : « Transgenic *Trifolium repens* with foliage accumulating the high sulphur protein , sunflower seed albumin », *Transgenic Research*, 9(2), 103-113.
- CROMWELL, G., TRAYLOR S., WHITE L., XAVIER E., LINDEMANN M., SAUBER T., RICE D. (2000) : « Effects of low-phytate corn and low-oligosaccharide, low-phytate soybean meal in diets on performance, bone traits, and phosphorus excretion by growing pigs", *J. Anim. Sci.*, 78(Suppl. 2):72.
- DIXON R., XIE D., SHARMA S. (2005) : "Proanthocyanidins, a final frontier in flavonoid research", *New Phytologist*, 165, 9-28
- EMMERLING M., CHU P., SMITH K., KALLA R., SPANGENBERG G. (2003) : "Field evaluation of transgenic white clover with AMV immunity and development of elite transgenic germplasm", *Molecular breeding of forage and turf, Proc. IIIrd International symposium* (Hopkins A., Wang ZY., Mian R., Sledge M. and Barker R. eds), 359-366
- FITZPATRICK S., REISEN P., MCCASLIN M. (2003) : "Pollen-mediated gene flow in alfalfa: a three-year summary of field research" *Proceedings of the 2003 central alfalfa conference*, <http://www.foragegenetics.com/pdf/3RRA2003CAICAAbstractGeneFlow.pdf>
- GUO D., CHEN F., INOUE K., BLOUNT J., DIXON R. (2001a) : « Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa : impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin », *Plant Cell*, 13, 73-88.
- GUO D., CHEN F., WHEELER J., WINDER J., SELMAN S., PETERSON M., DIXON R. (2001b) : « Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases », *Transgenic Research*, 10 (5), 457-464.

- HE X., DIXON R. (2000) : « Genetic manipulation of isoflavone 7-*O*-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-*O*-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa », *Plant Cell*, 12, 1689-1702.
- HIPSKIND J., PAIVA N. (2000) : “Constitutive accumulation of a resveratrol glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*”, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13, 551-562.
- HISANO H., KANAZAWA A., KAWAKAMI A., YOSHIDA M., SHIMAMOTO Y., YAMADA T. (2004) : « Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing », *Plant Science*, 167 (4), 861-868.
- JENKINS C., SNOW A., SIMPSON R., HIGGINS T., JACQUES N., PRITCHARD J., LARKIN P. (2002) : « Fructan formation in transgenic white clover expressing a fructosyltransferase from *Streptococcus salivarius* », *Functional Plant Biology*, 29 (11), 1287-1298.
- JENSEN C., SALCHERT K., GAO C., ANDERSEN C., DIDION T., NIELSEN K. (2004) : “Floral inhibition in red fescue (*Festuca rubra*) through expression of a heterologous flowering repressor from *Lolium*”, *Molecular breeding*, 13,37-48.
- KHOUDI H., LABERGE S., FERULLO J., BAZIN R., DARVEAU A., CASTONGUAY Y., ALLARD G., LEMIEUX R., VEZINA L. (1999) : “Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants”, *Biotechnol. Bioeng.*, 64,135-143.
- LEE R., STROMMER J., HODGINS D., SHEWEN P., NIU Y., LO R. (2001) : “Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein “, *Infect. Immun.*, 69,5786-5793.
- LI Q., ROBSON R., BETTANY A., DONNISON L., THOMAS H., SCOTT I. (2004) : “Modification of senescence in ryegrass transformed with IPT under the control of a monocot senescence-enhanced promoter”, *Plant cell Rep*, 22, 816-821.
- LUO H., HU Q., NELSON K., LONGO C., KAUSCH A. (2003) : “Controlling transgene escape in genetically modified grasses”, *Molecular breeding of forage and turf, Proc. IIIrd International symposium* (Hopkins A., Wang ZY., Mian R., Sledge M. and Barker R. eds), 245-254
- MASOUD S., ZHU Q., LAM C., DIXON R. (1996) : « Constitutive expression of an inducible β 1, 3 glucanase in alfalfa reduces the disease severity caused by the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma f.sp.medicaginis*, but does not reduced disease severity of chitine-containing fungi », *Trans. Res.*, 5, 313-323.
- MCKERSIE B., BOWLEY S., HARJANTO E., LEPRINCE O. (1996) : “Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase”, *Plant Physiol*, 111,1177-1181.
- MCKERSIE B., BOWLEY S., JONES K. (1999), “Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase” , *Plant Physiol.*, 119,839-848.
- MCKERSIE B., MURNAGHAN J., JONES K., BOWLEY S. (2000), “Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance” , *Plant Physiol.*, 122:1427-1437.
- RAY H., YU M., AUSER P., BLAHUT-BEATTY L., MCKERSIE B., BOWLEY S., WESTCOTT N., COULMAN B., LLOYD A., GRUBER M. (2003) : « Expression of anthocyanins and proanthocyanidins after transformation of alfalfa with maize *Lc1,2* », *Plant Physiol.*, 132, 1448-1463.
- ROSELLINI D., PEZZOTI M., VERONESI F. (2001) : “Characterization of transgenic male sterility in alfalfa”, *Euphatica*, 118, 313-319.
- SANDMAN J., JOHNSON D., JOHNSON L., REICH J. (2003) : “Maximizing growth and productivity of alfalfa through biotechnology”, *The Central Alfalfa Conference*, <http://www.naaic.org/Meetings/Central.html>.
- SHARMA S., HANCOCK K., EALING P., WHITE D. (1998), “Expression of a sulphur rich maize seed storage protein , δ zein, in white clover to improve forage quality”, *Molecular Breeding*, 4, 435-448.
- SPANGENBERG G., WANGZY., WU XL., NAGEL J., IGLESIAS V, POTRYKUS I. (1995a) : “Transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) and red fescue (*F.rubra*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells”, *J.Plant Physiol.*, 145, 693-701.
- SPANGENBERG G., WANG ZY, WU X., NAGEL J., POTRYKUS I. (1995b) : “Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells”, *Plant Science*, 108, 209-217.
- SPANGENBERG G., KALLA R., LIDGETT A., SAWBRIDGE T., ONG E., JOHN U. (2001) : “Transgenesis and genomics in molecular breeding of forage plants”, *Proceedings of the XIX International Grassland Congress*, 615-625.
- STRIZHOV N., KELLER M., MATHUR J., KONCZ-KALMAN Z., BOSCH D., PRUDOVSKY E., SCHELL J., SNEH B., KONCZ C., ZILBERSTEIN A. (1996) : « A synthetic *cryIC* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco », *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 15012-15017.

- TAKAHASHI W., FUJIMORI M., MIURA Y., KOMATSU T., NISHIZAWA Y., HIBI TAKAMIZO T. (2004) : « Increased resistance to crown rust disease in transgenic italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) expressing the rice chitinase gene », *Plant Cell Rep.*, 15, *en cours de publication*.
- TESFAYEM., TEMPLE S., ALLAN D., VANCE C., SAMAC D. (2001) : « Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminium », *Plant Physiol.*, 127, 1836-1844.
- TESFAYEM., DENTON D., SAMAC., VANCE C. (2004) : "A white lupin acid phosphatase signal peptide directs a fungal endochitinase protein to the alfalfa rhizosphere". Soumis à *Plant Biotech.* (www1.umn.edu/arspsru/abstracts/msamac.htm)
- THOMAS J., WASMANN C., ECHT C., DUNN R., BOHNERT H., MCCOY T. (1994) : « Introduction and expression of an insect proteinase inhibitor in alfalfa (*Medicago sativa* L.) », *Plant Cell Rep.*, 14, 31-36.
- ULLAH A., SETHUMADHAVAN K., MULLANEY E., ZIEGELHOFFER T., AUSTIN PHILLIPS S. (2002) : "Cloned and expressed fungal phytase phyA gene in alfalfa produces a stable phytase", *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 290, 1343,1348.
- VAN DEYNZE A., PUTNAM D., ORLOFF S., LANINI T., CANAVARI M., VARGAS R., HEMBREE K., MUELLER S., TEUBER L. (2004) : "Roundup ready alfalfa: an emerging technology", *ANR pub.*, <http://anrcatalog.ucdavis.edu/merchant.ihml?pid=5655&step=4>
- WANG Y, YE X.D., NAGEL J., POTRYKUS I., SPANGENBERG G. (2001) : « Expression of a sulphur-rich sunflower albumin gene in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants », *Plant Cell Rep.*, 20, 213-219.
- WIGDOROVITZ A., CARRILLO C., DUS SANTOS M., TRONO K., PERALTA A., GOMEZ M., RIOS R., FRANZONE P., SADIR A., ESCRIBANO J., BORCA M. (1999) : "Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1", *Virology*, 255,347-353.
- WIGDOROVITZ A., MOZGOVOJ M., SANTOS M., PARRENO V., GOMEZ C., PEREZ-FILGUEIRAD., TRONO K., RIOS R., FRANZONE P., FERNANDEZ F., CARRILLO C., BABIUK L., ESCRIBANO J., BORCA M. (2004) : "Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants", *J. Gen. Virol.*, 85,1825-1832.
- WINICOV I., BASTOLA D. (1999) : « Transgenic overexpression of the transcription factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants », *Plant Physiology*, 120, 473-480.
- WINICOV I. (2000) : « *Alfin1* transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa », *Planta*, 210(3), 416-422.
- XIEDY, SHARMA S., PAIVA N., FERREIRA D., DIXON R. (2003) : « Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis », *Science*, 299, 396-399.
- XU J., SCHUBERT J., ALTPETER F. (2001) : « Dissection of RNA-mediated ryegrass mosaic virus resistance in fertile transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) », *Plant J.*, 26(3), 265-274.
- YE X.D., WU XL., ZHAO H., FREHNER M., NOSBERGER J., POTRYKUS I., SPANGENBERG G. (2001) : "Altered fructan accumulation in transgenic *Lolium multiflorum* plants expressing a *Bacillus subtilis sacB* gene », *Plant Cell Rep.*, 20, 205-212.