Rapport de mission Nicaragua

Mai 2007

Appui scientifique et technique

Hervé Etienne
Micropropagation et génomique fonctionnelle du caféier
UMR 98 RPB
CIRAD-BIOS
TA A-98/IRD, 34398 Montpellier, Cedex 5, France

Neuvième rapport technique du projet ECOM/CIRAD
Mission Mai 2007
Frédéric Georget – Hervé Etienne

Préambule :

Cette mission conjointe avait pour but de préparer F. Georget à son poste en lui présentant in situ *le projet et lui permettre d'identifier le plus tôt possible les points à améliorer. Son rapide retour en France a été mis à profit pour qu'il puisse voir ce qui est fait par Nestlé sur une méthode similaire, visiter des pépiniéristes industriels en quête d'idées et d'optimisations techniques, et enfin passer différentes commandes d'équipements destinés au projet ECOM/CIRAD.*

Objectifs de la mission

A/ Présentation de l'ensemble du projet ECOM/CIRAD à F. Georget
B/ Visite du laboratoire ECOM (Sebacco, Nicaragua)
C/ Visite des structures de pépinières à la finca 'la Cumplida'
D/ Etablir la lettre de mission de F. Georget

Personnes rencontrées lors de la mission

- Clément-Marie Ponçon, Pdt de Atlantic – ECOM/Nicaragua
- Eduardo Malo, Responsable production labo ECOM/Nicaragua
- Eric Ponçon, Adjoint au directeur général du groupe ECOM pour le café
- Christophe Montagnon, Project Manager

A) Présentation de l'ensemble du projet ECOM/CIRAD à F. Georget et préparation à son affectation au Nicaragua (tout le mois de mai)

F. Georget a été recruté au CIRAD le 2/05/2007. Tout le mois de mai a été consacré à sa familiarisation avec le projet de micropropagation ECOM/CIRAD et à une formation sur le procédé d'embryogenèse somatique chez le caféier.
Cette formation rapide destinée à préparer son affectation, qui sera bien sûr complétée ultérieurement, s'est traduite de différentes manières :

- Nombreuses discussions techniques sur les procédures d'embryogenèse avec H. Etienne,
- Mission au Nicaragua incluant les visites du laboratoire et des pépinières,
- Commandes d'équipements en France,
- Visite du laboratoire de micropropagation du Centre Nestlé-Tours en compagnie de V. Pétiard (directeur du centre) et JP Ducos (chercheur en charge de la micropropagation du caféier),
- Visite des pépinières 'Régent' en Bretagne.

B) Visite du laboratoire ECOM (Sebacco, Nicaragua)

La mise en place de l'ingénieur Eduardo Malo en tant que nouveau responsable de production a permis d'améliorer significativement la qualité du matériel végétal présent au laboratoire.
Depuis son arrivée, en collaboration avec H. Etienne, il a été possible d'optimiser les procédures déjà existantes et d'autre part, de réduire de façon très significative le pourcentage de contamination (< 5% depuis le mois de décembre alors qu'il était depuis plusieurs années de 80%). Les conditions de culture (éclairage, surfaces d'étagère, aseptie) sont satisfaisantes et permettent aujourd'hui d'envisager plus sereinement une reprise d'activité du laboratoire.

Le personnel actuel constitué de six techniciennes, un responsable de la préparation des milieux de culture, une responsable de la laverie et un responsable de l'autoclavage, est compétent, intéressé et motivé par le projet.

Il reste cependant un certain nombre de points à améliorer afin d'être en mesure de produire, à l'échelle industrielle, et de façon continue et sécurisée des centaines de milliers de plants de café.
Voici une liste non exhaustive des observations qui ont été faites lors de notre dernier passage. Pour plus de lisibilité, nous reprendrons point par point les aspects abordés dans le précédent rapport de H. Etienne.

B-1. Equipements de laboratoire

- ***Adoucisseur*** : Le problème de l'eau persiste au laboratoire. Lorsque nous sommes arrivés, l'adoucisseur ne fonctionnait pas et l'approvisionnement des appareils d'autoclavage se faisait avec de l'eau endurcie à 300 ppm, ce qui est bien au dessus des normes acceptables. Les conséquences sont multiples : i) à chaque autoclavage, les résistances s'encrassent ce qui diminue considérablement leur durée de vie. Nous avons d'ailleurs constaté qu'un grand nombre de résistances avait été changées au

cours de ces deux premières années (5 en tout !) ; ii) à chaque cycle d'autoclavage, un dépôt calcaire se forme sur les récipients Rita ce qui a pour conséquence de les rendre opaques à la lumière. Or nous savons que la lumière joue un rôle prépondérant dans la phase de conversion des embryons au stade torpille en embryons pré-germés (capacité photosynthétique des embryons). Ce manque de lumière a d'ailleurs fait fortement défaut à l'ensemble de la production car les embryons, mis en situation de conversion, se sont maintenus en multiplication au lieu de se convertir en embryons torpille puis cotylédonaires chlorophyliens.

Suite à ce constat, nous avons donc pris contact avec l'entreprise responsable de l'installation de l'adoucisseur. Un technicien est venu réviser l'appareil et désaturer la résine. Un kit colorimétrique a été commandé de façon à contrôler en routine la dureté de l'eau. A ce jour, depuis notre dernière mission, l'adoucisseur fonctionne correctement et fournit au laboratoire de l'eau dépourvue de calcium.

Un certain nombre de mesures ont également été prises par rapport au réseau d'eau afin d'économiser la quantité d'eau adoucie utilisée. La capacité de l'adoucisseur (6 m^3) était inférieure aux besoins en eau d'arrosage de la pépinière des pieds mères d'une part et des arbres aux alentours du laboratoire. Aujourd'hui, seul le laboratoire reste alimenté par de l'eau adoucie. Le reste étant alimenté par le réseau normal. L'expérience de SEBACCO nous montre bien que le problème de la qualité et de la quantité d'eau disponible sera toujours la contrainte majeure à prendre en considération avant toute implantation d'un laboratoire dans quelque lieu que ce soit.

- ***Bioréacteurs Rita®*** : Pour les raisons invoquées précédemment, les dépôts successifs de calcaire ont eu un effet négatif et délétaire sur les cultures. L'observation que nous avons faite de l'ensemble de la production au laboratoire a été la suivante : 90 % de la production était bloquée en phase de multiplication. Aucune conversion d'embryons n'avait pu s'opérer dans les récipients faute de lumière. Le système tournait en circuit fermé sans possibilité de sortie de plants (aux phases de multiplication succédaient des phases de nécroses des embryons qui favorisaient à leur tour des phases de multiplication).

  Notre priorité a donc été de nettoyer la totalité des Rita présents au laboratoire (environ 4.000 unités complètes). Pour ce faire, le polish et le dentifrice, avec beaucoup d'huile de coude, se sont révélés d'une efficacité redoutable. Nous avons embauché provisoirement 8 personnes pour aider au nettoyage des ritas. A présent, tous les bioréacteurs sont transparents ... et les lots d'embryons ont immédiatement verdi et germé. Les sorties massives en acclimatation peuvent enfin commencer ! Il faut noter qu'aucune vague de contamination n'a été enregistrée malgré la manipulation des ritas lors de leur nettoyage pour éliminer les dépôts de calcaire.

- ***Climatiseurs et contrôle de la température*** : Eduardo Malo s'est rendu compte qu'il y avait des difficultés pour contrôler la température au bon niveau dans les salles de culture. D'une part les climatiseurs ont du mal à refroidir, d'autre part il y a un gradient de température important entre le haut et le bas de la salle de culture (2-3°C). Les sondes de température qui contrôlent les climatiseurs sont placées trop bas. Il vaudrait mieux qu'elles soient placées sur l'étagère du haut. Comme on le lui a demandé eduardo a inversé la photopériode, ça va mieux (plus stable pendant la journée à l'obscurité) mais toujours ce gradient et des températures trop élevées sur l'étagère du haut (jusqu'à 29,5°C) pendant la nuit avec la lumière. Ces températures sont trop proches de la température maximale pour la croissance de l'arabica (30°C). Nous avons demandé s'il était possible de mettre les climatiseurs partiellement en

recirculation interne ; pas complètement car il faut bien créer une surpression dans les salles de culture et brasser l'air des salles pour casser le gradient vertical de température. Ceci a été possible.

Enfin, un saran a été placé par dessus les climatiseurs pour baisser la température à l'endroit où l'air est capté. Pour casser le gradient de température dans les salles, il faudra probablement installer des ventilateurs en hauteur.

Les problèmes de contrôle de la température sont à présent réglés. Cette stabilisation de la température à des niveaux optimaux pour le caféier Arabica va sensiblement améliorer la croissance des embryons dans les salles de culture.

- ***Manque de petits équipements*** : Il manque un certain nombre de petits matériels indispensables au suivi et au contrôle du laboratoire : conductimètre, réfractomètre, thermomètre haute température pour contrôler les stérilisateurs à billes, pH mètre (un second appareil est indispensable pour sécuriser le poste de préparation des milieux de culture), plusieurs 'pipette-aid' pour le coulage des milieux en boîtes de Pétri, thermomètre et humidimètre pour contrôler les salles de culture, étiqueteuse à ruban pour la traçabilité des milieux et du matériel végétal etc…

B-2. Organisation du laboratoire

B-2.1 Modification des infrastructures

Les améliorations décidées lors des missions antérieures se poursuivent.

- L'aménagement des deux récentes bodégats en salles de culture demandé par H. Etienne a commencé. L'air conditionné a été installé et la porte déplacée dans une salle. L'électricien est en train d'installer les éclairages des cultures.
- L'ancienne porte d'entrée en bois du laboratoire a été remplacée par une porte en verre.
- L'organisation du jardin de pied-mères par groupes d'un même clone sollicitée par B. Bertrand a été réalisée.
- Toutes les modifications demandées par H. Etienne dans les 4 tunnels de la pépinière ont été menées à bien. Les tuyaux d'eau ('mur froid') sur les parois ont été éliminés, les tablars ont été repositionnés horizontalement et alignés. Les plastiques des tunnels ont été nettoyés des algues qui s'y étaient déposées.

Par ailleurs de nouvelles modifications ont été initiées ou décidées lors de cette mission.

- Installation d'un quatrième tube de lumière pour les étagères des salles de culture 1 et 3 pour favoriser la germination des embryons.
- Dérivation d'une partie de l'eau à destination du laboratoire qui était auparavant adoucie. Seule l'eau alimentant les autoclaves et le distillateur passe maintenant par l'adoucisseur pour ne pas saturer celui-ci.
- Installation d'un toit au dessus de l'adoucisseur pour le protéger du soleil.
- Installation de saran au dessus des climatiseurs des salles de culture.
- Installation d'une citerne de récupération des eaux pluviales près du 'cuarto frio' de Sebacco.

B-2.2 Organisation du travail

- ***Besoin d'une auxiliaire de culture*** : il manque une auxiliaire de culture. La personne occupant ce poste organise les repiquages, sort le matériel des chambres de culture, prépare le travail des repiqueuses. Elle procède également à l'étiquetage des lots, replace le matériel dans les chambres. Elle optimise et simplifie le travail des repiqueuses. Elle établit de façon hebdomadaire les bilans des cultures (entrées / sorties).

- ***Suivi des lots de production*** : un gros travail de traçabilité des lots est à mettre en œuvre sur la production avec la mise en place d'une traçabilité des milieux de culture ainsi que celle du matériel végétal. Actuellement, la traçabilité des milieux de culture est approximative et celle du matériel végétal n'est pas sécurisée. En effet, seule une gommette de couleur permet de différencier les hybrides entre eux. Une double traçabilité est obligatoire afin d'éviter tout mélange des clones.

- ***Rapports et bilans de production*** : les fichiers ne sont pas envoyés régulièrement et ne sont pas clairs. Les fichiers excell actuels doivent être optimisés pour être facilement interprétables par les différentes personnes impliquées dans le projet. Il est impératif que des critères qualitatifs affectés à chaque lot soient inclus en plus des critères quantitatifs. Ils doivent permettre d'évaluer le stade de développement de chaque lot (proliférations d'amas embryogènes, production d'embryons globulaire, torpille, batonnets, pré-germés) ainsi que le degré d'hétérogénéité de chaque lot.

- ***Responsable qualité*** : il est urgent d'identifier et de mettre en place un responsable qualité au sein du laboratoire.

- ***Préparatrice des milieux*** : La préparatrice des milieux de culture doit pouvoir s'appuyer sur des fiches préparation de milieux de culture, des fiches de préparation des solutions mères, des fiches de contrôle de la préparation des milieux, sur un étiquetage des solutions mères dans le réfrigérateur etc... Toutes ces mesures permettront de sécuriser la fabrication des milieux.

- ***Mise en place d'une cellule R&D*** : E. Malo a commencé des recherches il y a 2 mois sur l'établissement de lignées embryogènes en suspension et sur la régénération en masse d'embryons au stade torpille. Ces travaux ont pour objectif d'appliquer à l'Arabica le procédé mis au point par Nestlé sur Robusta au niveau de ces deux phases. Eduardo a été formé sur ce procédé par Nestlé. L'introduction dans le procédé de ces deux étapes en milieu liquide agité permettra de fortement augmenter sa productivité et d'améliorer l'homogénéité du matériel végétal lors des étapes de production d'embryons et de germination.

  Les premiers essais de germination en ritas d'embryons torpille d'Arabica produits en fioles d'Erlenmeyers sont encourageants. Le verdissement est immédiat mais la qualité des embryons n'est pas optimale. Il est probable que le manque de lumière soit en partie responsable de cette mauvaise qualité. Par ailleurs, comme attendu, le taux de prolifération des suspensions d'Arabica est plus faible que chez Robusta. Des essais d'introduction dans le milieu de prolifération de faibles concentrations de 2,4-D (0,3-0,7 mg/l) vont être faits pour stimuler cette prolifération. Un autre effet de l'auxine attendu est de bloquer les suspensions à un stade uniquement proliferatif et d'éviter la production prématurée

d'embryons. Cela permettrait d'améliorer la qualité des embryons obtenus lors de l'étape ultérieure de régénération en fioles d'Erlenmeyers. Nous ne pensons pas que cette faible concentration en 2,4-D soit mutagène sur une durée assez courte de 6 mois et cette durée nous suffirait pour multiplier assez. Par la suite, nous nous imposerons de repartir avec du cal embryogène neuf.

Il faut acheter très vite 4 grandes plateformes d'agitation et commencer à travailler dans des Erlenmeyers de 1 litre. La maîtrise de la production d'embryons 'torpille' en Erlens permettra de réaliser un saut d'échelle de production. L'utilisation de gros bioréacteurs en verre nous paraît secondaire et compliquerait considérablement le transfert technologique.

- *D'autres expérimentations sont en cours ou vont se faire soit au laboratoire soit en pépinière afin d'optimiser le procédé d'embryogenèse somatique (obtention de tissus embryogènes, stockage et endurcissement des embryons pré-germés, acclimatation à l'étouffée, type de substrat..). Les résultats obtenus et un programme de recherche établi sur la base des résultats de production 2007 (préalable indispensable pour identifier les forces et faiblesses du procédé actuel) seront présentés en début d'année 2008. Les activités R&D pour le laboratoire sont conduites par E. Malo et F. Georget. Au niveau de la pépinière, elles sont conduites par le responsable de pépinière (restant à identifier) et F. Georget. Les orientations et l'analyse des résultats se font en étroite collaboration avec H. Etienne (labo et pépinières) et B. Bertrand (pépinières).*

C) Visite des pépinières à ' la Cumplida'

C-1. Infrastructures

Les quatre premiers tunnels ont été optimisés et sont à présent tout à fait fonctionnels. Il reste cependant beaucoup de travaux pour qu'une pépinière d'une capacité d'un million de plants soit terminée.
Les travaux les plus urgents concernent :

- La construction d'un atelier de préparation de substrats, remplissage et repiquage à la Cumplida (pour les phase 1 et 2),
- La construction d'un cinquième tunnel tel que l'avait programmé B. Bertrand, après aplanissement de la zone (pour la phase 2).
- L'installation d'un système Fog sous tunnel plastique en confinement total pour la phase d'acclimatation et de sevrage des plants en particulier en phase 1.

Peut être moins urgent (nécessité pour fin octobre), il reste à aménager complètement les pépinières de croissance des phases 3 et 4 (aplanissement, installation des sarans/ombrières, mise en place des tablars et irrigation).

C-2. Protocoles

Les phases 3 et 4 (croissance) sont bien maîtrisées. Les plantes en tubetes sont magnifiques. Même les plantes ayant passé plus d'un an en tubetes restent saines, vigoureuses et ne présentent pas d'enroulement de la racine pivotante. Par contre les phases 1 (acclimatation) et 2 (transfert en tubetes) doivent être optimisées rapidement. Le substrat utilisé n'est pas assez drainant et l'introduction de lombricompost même stérilisé dans le substrat en phase deux est probablement responsable de brûlures racinaires, de maladies et de pertes. Il est décidé d'éliminer le lombricompost à cette étape et de réaliser des essais d'incorporation de sable de puzzolane en différentes proportions dans du terreau.

Les tunnels d'acclimatation (phase 1) ne sont pas suffisamment étanches et trop en hauteur. Un dessèchement rapide est observé. Il faudra mettre en place des tunnels au sol permettant un confinement total, ce qui permettra de ne pas arroser pendant toute la période d'acclimatation et de réduire les pertes liées aux maladies. Un système de fog permettra de maintenir l'humidité saturante sans excès d'eau. F. Georget est en train de mettre en place ces installations avec l'aide du pépiniériste Régent.

L'arrosage est mal pratiqué. Il est noté un excès d'arrosage sur les mini-tunnels (plusieurs heures consécutives !) et un excès ou un manque d'arrosage à l'intérieur de ces tunnels. Les critères permettant de définir le besoin d'arrosage n'ont pas été compris.

C-3. Organisation du travail

Le principal problème de la pépinière est en fait l'absence d'un véritable responsable. Le personnel est mal managé et les décisions ne sont pas prises. Il est urgent qu'un responsable rigoureux, dynamique et capable de gérer du personnel technique soit identifié. Un appel d'offre a été lancé au niveau du Nicaragua. Rafael Rais possède toutes les qualités pour occuper ce poste. Nous sollicitons qu'il soit nommé au plus vite responsable des pépinières à la Cumplida.

D) Lettre de mission de F. Georget (rédigée le18/06/2007)

« Frédéric Georget est affecté à l'UMR RPB (Résistance des Plantes aux Parasites) du Département CIRAD-BIOS. Par délégation du directeur de l'UMR, il est placé sous la responsabilité administrative du directeur adjoint de l'UMR RPB (Benoît Bertrand, Cirad-BIOS). Il développe ses activités de recherche dans le cadre de l'équipe DIVA (DIVersité génétique et Amélioration variétale) de l'UMR RPB au sein du programme de recherche dirigé par Hervé Etienne (CIRAD-BIOS).

Frédéric Georget est affecté au Nicaragua à partir du 3 mai 2007 dans le cadre du partenariat ECOM-CIRAD pour le transfert industriel du procédé d'embryogenèse somatique mis au point par le CIRAD chez le caféier (*Coffea arabica*). Dans ce projet, il occupe le poste de 'Technical Manager for planting material production and propagation'. Il travaille en étroite collaboration avec C. Montagnon (CIRAD-BIOS, UMR RPB) et avec la direction de ECOM au Nicaragua et au Mexique.

Les activités de recherche de F. Georget ont pour premier objectif d'optimiser les protocoles d'embryogenèse somatique en vigueur en conduisant un programme de recherches finalisées. Il s'agit de réussir le changement d'échelle avec ce procédé pour assurer la diffusion à grande échelle de nouvelles variétés hybrides d'Arabica très productives, résistantes aux principales maladies et ravageurs, et d'excellente qualité organoleptique. Ces recherches viseront à :

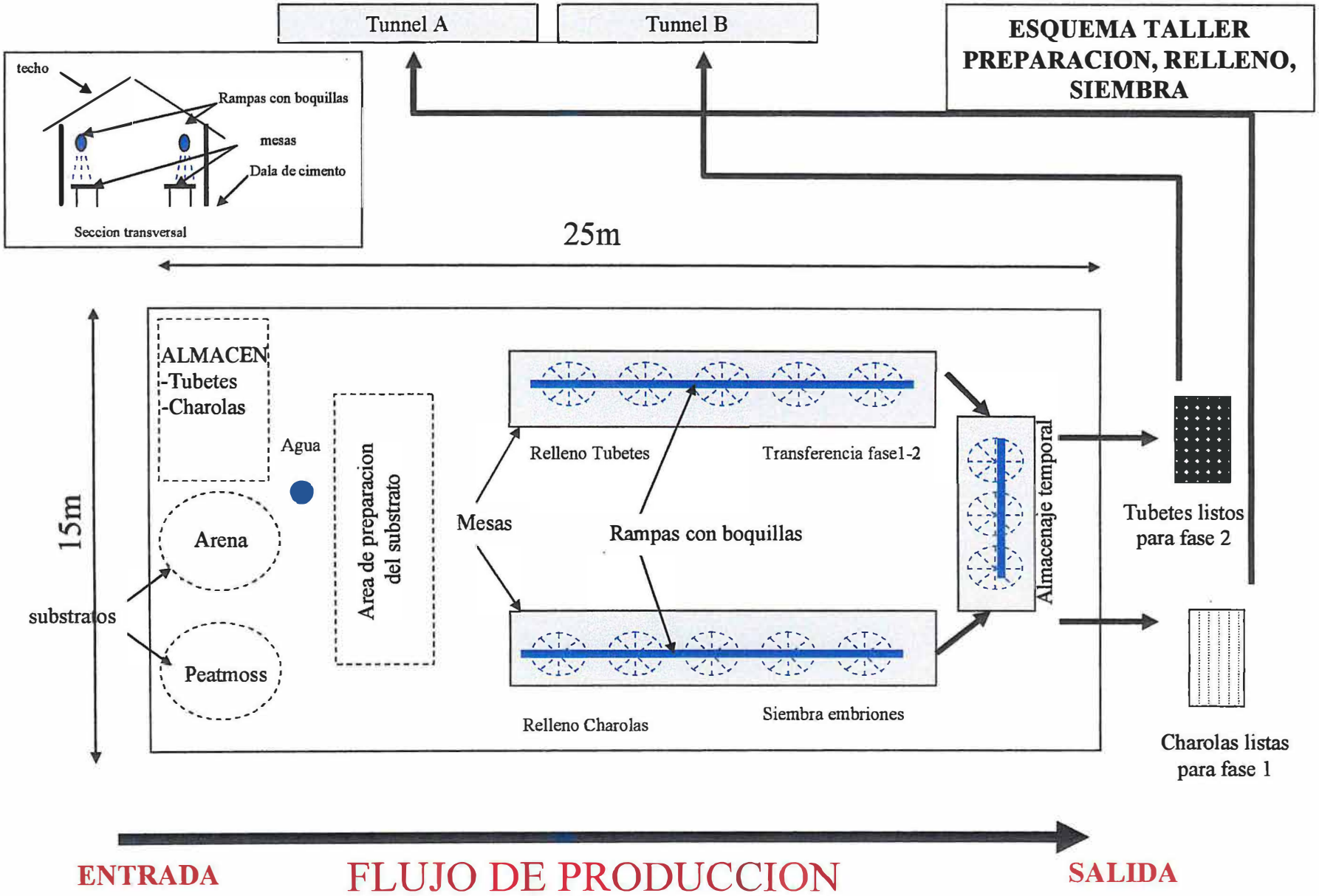
- Améliorer l'homogénéité morphologique du matériel végétal à tous les stades de développement,
- Contrôler les variations somaclonales soit en jouant sur les conditions de culture soit en mettant en place des tests de détection des variants en pépinière,
- Mettre au point des conditions d'endurcissement des embryons pré-germés pour les préparer au transfert *ex vitro* (optimisation de la photo-autotrophie,

du contrôle des échanges en eau, de la mise en place de réserves amylacées et lipidiques..),
  - Etablir les conditions de stockage sur plusieurs mois et de transport des embryons pré-germés.

En parallèle, l'agent développera un projet de recherche sur la compréhension et la prédiction du phénomène d'hétérosis chez *C. arabica*. Deux approches seront utilisées : i) la comparaison des parents par rapport aux F1, ii) le développement, le clonage et l'étude d'une population F2 pour ce caractère. Des outils biotechnologiques seront développés pour mener à bien ce projet. Des marqueurs biologiques de l'hétérosis seront recherchés au cours des différentes étapes du procédé d'embryogenèse somatique. Ce modèle biologique *in vitro* servira par la suite de support pour étudier les variations des niveaux d'expression de certains gènes en liaison avec le niveau d'hétérosis en utilisant les outils de génomique.

Dans le cadre du contrat avec ECOM, l'agent a la responsabilité du transfert technologique à l'échelle industrielle du procédé d'embryogenèse somatique. Ce transfert industriel porte à la fois sur les étapes de laboratoire et de pépinière, et doit conduire à terme à la production annuelle de plusieurs millions de vitroplants de variétés hybrides F1 de *Coffea arabica* en Amérique Centrale. L'objectif est d'obtenir au Nicaragua un prototype qui permettra d'établir d'autres unités de production en Amérique Centrale.
Pour mener à bien l'objectif de ce contrat, F. Georget a les responsabilités suivantes :

- Responsable du personnel : manager et organiser le travail d'une équipe d'une quinzaine de personnes au laboratoire et d'une vingtaine de personnes en pépinière,
- Responsable du budget et des achats de produits et équipements, du laboratoire et des unités d'acclimatation,
- Responsable de la production, la chaîne de production allant des pieds-mères à la livraison aux planteurs (transport exclu). Cette responsabilité sous-entend :
  - Mettre en place une organisation du travail garantissant le respect des protocoles, un gain d'efficacité et une sécurisation de la production,
  - Mettre en place un système de traçabilité parmi les lots de production,
  - Proposer des objectifs de production en accord avec le Manager Général du projet,
  - Organiser la communication autour des activités du projet et s'assurer du respect des règles de confidentialité.
- Responsable technique des infrastructures : améliorer les infrastructures du laboratoire de Sebacco et de pépinière à la Finca 'La Cumplida',
- Responsable sécurité : cette fonction peut être déléguée sur place aux personnes compétentes,
- Responsable Recherche et Développement. »


Tunnel A
Tunnel B
ESQUEMA TALLER PREPARACION, RELLENO, SIEMBRA
techo
Rampas con boquillas
mesas
Dala de cimento
Seccion transversal
25m
15m
ALMACEN
-Tubetes
-Charolas
Agua
Arena
Peatmoss
substratos
Area de preparacion del substrato
Mesas
Relleno Tubetes
Transferencia fase1-2
Rampas con boquillas
Relleno Charolas
Siembra embriones
Almacenaje temporal
Tubetes listos para fase 2
Charolas listas para fase 1
ENTRADA
FLUJO DE PRODUCCION
SALIDA