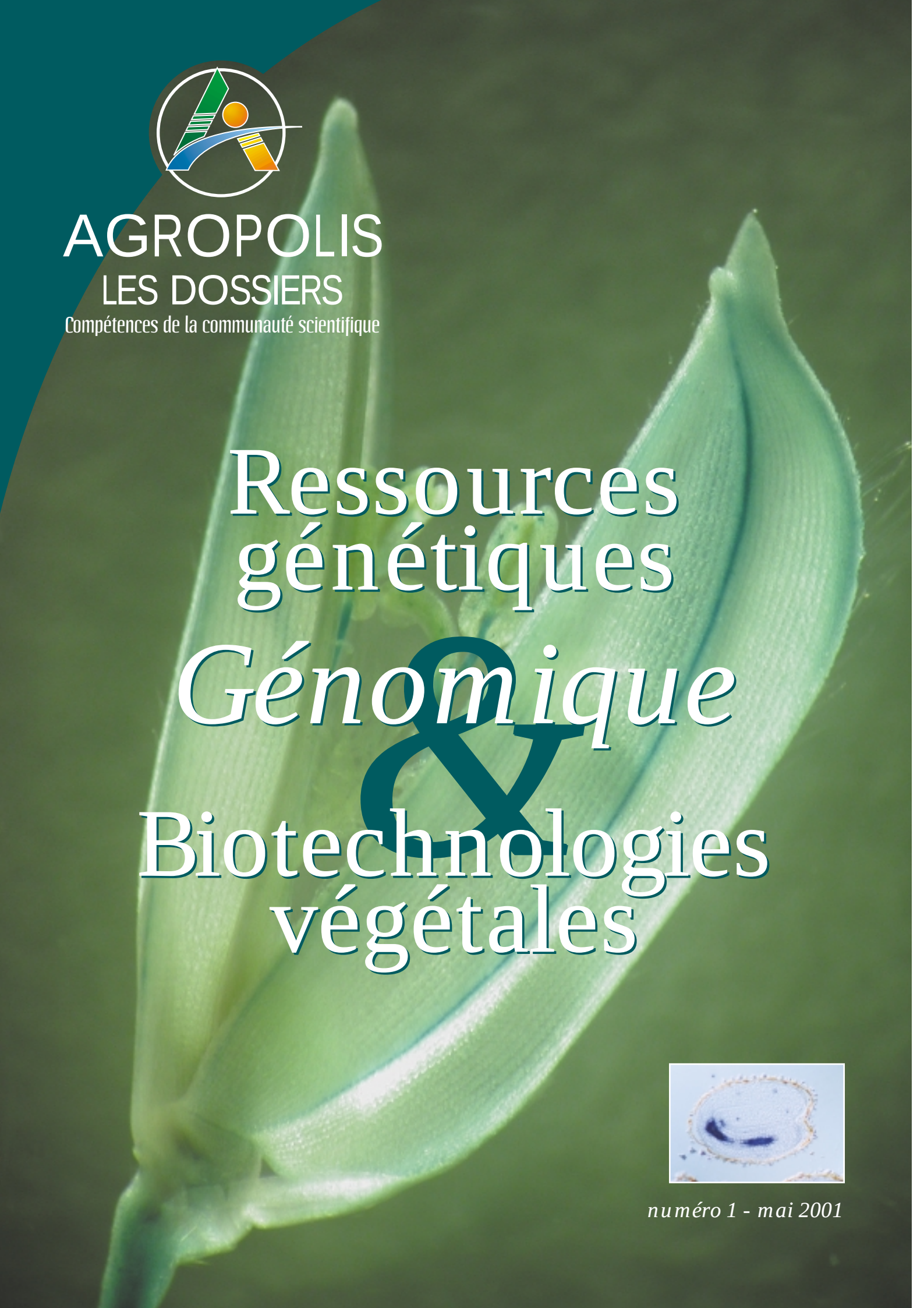


AGROPOLIS
LES DOSSIERS
Compétences de la communauté scientifique

Ressources génétiques *Génomique* & Biotechnologies végétales

numéro 1 - mai 2001

Agropolis,

pôle international de recherche et d'enseignement supérieur agronomiques

Agropolis associe les institutions de recherche et d'enseignement supérieur de Montpellier et du Languedoc-Roussillon, en partenariat avec les collectivités territoriales, des sociétés et entreprises régionales, en liaison avec des institutions internationales, autour d'un objectif principal : le développement économique et social des régions méditerranéennes et tropicales.

Cet ensemble à vocation d'Université agronomique internationale représente un potentiel de compétences scientifiques et techniques exceptionnel : 3000 chercheurs, enseignants et techniciens dans plus de 200 unités de recherche à Montpellier et en Languedoc-Roussillon, ainsi que 600 scientifiques à l'étranger répartis dans 60 pays.

S'appuyant sur ses pôles de compétences thématiques, Agropolis apporte des réponses aux grands enjeux scientifiques, technologiques et économiques du développement :

- Gestion de la biodiversité et valorisation des ressources génétiques,
- Approche intégrée des systèmes agraires et du développement,
- Gestion durable des ressources naturelles et lutte contre la faim,
- Transformation agro-alimentaire en liaison avec les problèmes de nutrition, de qualité et de sécurité des aliments.

Lieu de capitalisation et de valorisation des savoirs, espace de formation et de transfert technologique, plate-forme d'accueil et d'échanges internationaux, Agropolis développe des actions d'expertise collective et contribue à fournir des éléments scientifiques et techniques permettant l'élaboration et la mise en place de politiques de développement.

La satisfaction des besoins alimentaires et l'amélioration qualitative des productions agricole et agro-industrielle, souhaitées par les consommateurs, passent par l'obtention de variétés nouvelles, adaptées à des systèmes de production économes en ressources naturelles et respectueux de l'environnement. Pour produire ces variétés, les chercheurs disposent aujourd'hui d'une gamme d'outils diversifiés associée à une connaissance de plus en plus fine du fonctionnement de la plante. Les possibilités d'amélioration variétale sont plus grandes que jamais.

Au sein d'Agropolis, plus de 400 personnes, dont environ 300 scientifiques, chercheurs et ingénieurs, sont impliqués dans l'étude des ressources génétiques, de la génomique et des biotechnologies végétales. Dans l'espace de recherche européen qui se développe, le pôle Agropolis apparaît ainsi comme une référence en matière de génomique végétale, tout particulièrement pour ce qui concerne la recherche de solutions aux facteurs limitant les productions en zones méditerranéennes et tropicales. Les acteurs de cette recherche travaillent dans divers organismes membres d'Agropolis : Agro.M, Cirad, CNRS, INRA, IRD, Université de Montpellier et Université de Perpignan.

Ce "Dossier Agropolis" présente les grands axes de recherches menées au sein du pôle, avec des exemples significatifs visant à illustrer les compétences de la communauté scientifique concernée.

Ressources génétiques
Génomique
Biotechnologies végétales

"Mieux connaître, conserver et utiliser les ressources génétiques" *Serge Hamon* — Page 4

"Génomique appliquée aux caractères agronomiques" *Jean-Christophe Glaszmann* — Page 8

"Génomique et développement des plantes" *Michel Delseny* — Page 12

"La Génopole Montpellier Languedoc-Roussillon" *Michel Delseny* — Page 16

"Adaptation des plantes à des environnements perturbés" *Claude Grignon* — Page 18

"Biologie du développement des plantes pérennes" *Françoise Dosba* — Page 22

"Construire des plantes résistantes à la sécheresse ?" *François Tardieu* — Page 26

"Interactions plantes-parasites : des perspectives pour la protection intégrée" *Jean-Loup Notteghem* — Page 29

"Diffusion de l'innovation : de la recherche à ses applications" *Jacques Meunier* — Page 32

"La formation à Agropolis" *André Charrier* — Page 36

Mieux connaître, *conserver et utiliser* les ressources *génétiques*

Pour répondre aux besoins d'une agriculture durable, plus respectueuse de l'environnement et capable d'assurer la sécurité alimentaire d'une population mondiale qui atteindra 8 milliards d'habitants en 2020, la recherche agronomique doit continuer à produire de nouvelles variétés.

L'intensification de la production agricole, durant la deuxième moitié du 20ème siècle, a entraîné une réduction sensible du nombre des espèces utilisées par l'homme et une perte de leur diversité génétique, avec pour conséquence l'augmentation de la vulnérabilité des cultures aux maladies et ravageurs.

L'essentiel des progrès que fera la recherche agronomique pour mettre au point des variétés nouvelles, plus productives et de meilleure qualité, dans le cadre d'une agriculture plus soucieuse de l'environnement viendra d'une utilisation correcte et responsable de la biodiversité mais aussi de sa conservation et de sa compréhension afin de préserver l'avenir. En agriculture, il s'agit notamment de ce qu'on appelle les ressources génétiques, ensemble des espèces végétales cultivées et sauvages qui peuvent servir de réservoir pour trouver les gènes d'intérêt agronomique nécessaires aux programmes d'amélioration : résistance aux maladies, à la sécheresse, à une mauvaise qualité des sols, ou encore, facteurs d'une croissance accélérée, d'un rendement supérieur, d'une meilleure qualité nutritive…

Pour pouvoir exploiter efficacement et de manière raisonnée la diversité génétique des plantes cultivées et de leurs apparentées sauvages, il est nécessaire d'en avoir au préalable une bonne connaissance et de maîtriser les outils permettant le transfert de

L'équipe

L'Unité mixte de recherche "Diversité et Génome des Plantes Cultivées" (UMR DGPC) est composée de 50 chercheurs provenant des diverses institutions, Agro.M, Cirad, INRA, IRD et Universités de Montpellier.

Responsable : Serge Hamon, IRD, serge.hamon@mpl.ird.fr
fax : +33(0)4 67 41 62 22

Stéphane Dussert, © IRD

Des graines de café conservées à -196°C

Températures plus que polaires pour conserver les graines récalcitrantes

Les ressources génétiques de très nombreuses plantes ne peuvent être conservées dans les conditions classiquement utilisées dans les banques de gènes (stockage de semences déshydratées en chambres froides). En effet, soit les semences de ces plantes ne supportent pas la déshydratation et/ou le froid (par exemple les caféiers), soit elles sont multipliées végétativement (telle la vigne). Pour toutes ces espèces, la cryoconservation, c'est à dire le stockage de matériel végétal vivant à très basse température (-196°C), est la seule technologie disponible pour la sauvegarde à long terme de leur diversité. Les recherches entreprises au sein de l'UMR DGPC dans le cadre de cette problématique visent tant à la mise au point de méthodes de cryoconservation utilisables en routine dans les centres de conservation qu'à l'étude des mécanismes biophysiques et physiologiques sous-jacents.

Contact : Stéphane Dussert, stephane.dussert@mpl.ird.fr

Des huiles de tournesol de meilleure qualité

André Bervillé, © INRA

Utiliser des espèces sauvages pour améliorer la qualité des huiles

Grâce à sa qualité nutritionnelle et à ses nombreuses propriétés, l'huile de tournesol intéresse les consommateurs et les industriels. Naturellement riche en acide linoléique et en vitamine E dont le pouvoir anti-oxydant protège contre le vieillissement et le stress, dépourvue d'acide linolénique (ce qui permet une utilisation sans danger à haute température), contenant des phytostérols dont l'effet contre le mauvais cholestérol a été démontré… l'huile de tournesol possède un certain nombre de qualités que l'on ne retrouve pas à l'identique chez les autres oléagineux. Les recherches menées dans le cadre de l'UMR DGPC visent à mieux exploiter la qualité de ces huiles à travers, d'une part, la recherche, dans les formes sauvages *d'Helianthus annuus,* de nouvelles sources d'amélioration et, d'autre part, la mise au point de nouvelles variétés de tournesol.

Les objectifs sont :

- de produire des huiles aussi riches que possible en acide linoléique ou acide oléique, afin d'être en mesure de réaliser des mélanges qui puissent répondre à la demande ;
- d'augmenter la teneur en vitamine E de manière à ce que les consommateurs puissent trouver les doses quotidiennes recommandées dans de faibles quantités d'huile (comme celle présente, par exemple, dans une portion de vinaigrette pour salade) ;
- d'augmenter la quantité et la qualité des phytostérols.

Contact : André Bervillé, berville@ensam.inra.fr

caractères d'intérêt agronomique. Les recherches menées par l'UMR Diversité et génome des plantes cultivées (DGPC) visent à étudier les ressources génétiques des plantes tropicales et méditerranéennes dans une optique double d'utilisation en amélioration des plantes et de conservation.

De la diversité des **plantes au repérage** *des gènes…*

Jusqu'au début des années 90, les recherches menées sur la diversité génétique ont utilisé une approche descriptive, privilégiant les aspects "évolution" et "histoire" des ressources. Cette approche a conduit les chercheurs à collecter de très nombreuses espèces et variétés de plantes et à les organiser en collections. Elle a également permis d'acquérir une bonne connaissance des complexes d'espèces que forment les plantes cultivées avec leurs apparentées sauvages, de leur structuration en sous-ensembles, et des flux de gènes se produisant entre ces différents compartiments.

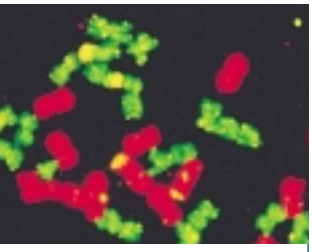
Depuis quelques années, ces recherches sont marquées par une approche plus fonctionnelle, orientée vers l'étude des mécanismes qui contrôlent et caractérisent la diversité et vers l'exploration du génome. L'amélioration des outils de la biologie moléculaire et l'utilisation de plantes modèles permettent aujourd'hui de travailler au niveau des gènes qui contrôlent les caractéristiques agronomiques. Ces outils permettent une mise en évidence de la diversité des gènes (allèles), leur localisation et l'étude de leur expression dans divers fonds génétiques ou environnements.

Les caractères agronomiques, prioritaires pour le sélectionneur, sont parfois difficiles à évaluer et leur déterminisme génétique est souvent complexe. Les outils moléculaires et les techniques de marquage permettent de repérer les zones chromosomiques comportant le ou les gènes impliqués dans l'expression d'une caractéristique d'intérêt. Les même outils peuvent ensuite se transformer en outils efficaces de criblage et d'aide à la sélection.

La sélection assistée par marqueurs a pour principe l'association de marqueurs moléculaires à une caractéristique agronomique précise. Elle permet de s'assurer qu'un hybride issu du croisement entre une plante cultivée et une plante sauvage a bien récupéré le ou les gènes qui contrôlent l'expression de la caractéristique agronomique recherchée et ceci de manière très précoce, dès le stade plantule. Cette technique évite de passer par des tests en champs ou en condition contrôlée, comme par exemple ceux pour les résistances aux maladies, qui sont difficiles, coûteux et longs à réaliser. •••

Des chromosomes de couleur pour connaître l'origine des espèces

La cytogénétique moléculaire est développée pour étudier la structure des génomes. La FISH *(Fluorescent In Situ Hybridization)* permet de localiser des séquences précises qui seront marquées par fluorescence directement sur les chromosomes. La GISH *(Genomic In Situ Hybridization)* permet de différencier les chromosomes des espèces parentales chez les hybrides interspécifiques. Ces techniques sont particulièrement utiles chez les plantes cultivées possédant un nombre important de chromosomes (polyploïde) et/ou les plantes d'origine hybride interspécifique, ou dont l'exploitation des ressources génétiques implique des hybridations interspécifiques comme la canne à sucre, le bananier, le caféier, le citrus ou le cotonnier. Les techniques plus fines d'hybridation de BAC *(Bacterial Artificial Chromosome)* sur chromosomes et sur fibre d'ADN déroulé viennent assister la cartographie physique et en particulier les travaux de clonage positionnel de gènes d'intérêt agronomique.



Angélique D'Hont, © Cirad-CA

La fluorescence permet de reconnaître les chromosomes de chacun des parents

Contact : Angélique D'Hont, angelique.dhont@cirad.fr

Des techniques policières pour identifier les cépages

La vigne est une espèce très diversifiée puisque 5000 à 6000 cépages ont été répertoriés dans le monde. Le conservatoire du domaine INRA de Vassal représente la plus grande collection de vigne au monde : elle maintient environ 2300 cépages identifiés et un millier de cépages en cours d'identification. Les chercheurs de l'INRA procèdent à l'analyse de la diversité génétique de cette collection à l'aide de marqueurs moléculaires (microsatellites et marqueurs chloroplastiques). Ces analyses ont pour objectif principal la caractérisation et la gestion des ressources génétiques de la vigne. Des empreintes génétiques vont être développées pour l'ensemble des cépages. Les résultats de l'analyse d'un premier sous-échantillon ont permis de démontrer l'utilité de ces empreintes :

- pour une aide à l'identification : l'analyse de l'ADN extrait de feuilles, de bois, de racines, ou encore de rafles peut permettre l'identification sans ambiguïté d'échantillons inconnus,
- pour l'analyse de l'origine des cépages actuels: il a ainsi été démontré que des cépages prestigieux tels Chardonnay, Gamay, Aligoté étaient issus de pépins obtenus par un croisement naturel entre les cépages Pinot et Gouais.

Contact : Patrice This, this@ensam.inra.fr

Savoir conserver **les ressources** *génétiques…*

Pour pouvoir répondre aux besoins prévisibles et imprévisibles de l'agriculture de demain, il est indispensable de conserver des ressources les plus diversifiées possibles. Le souci de préserver de manière exhaustive les ressources s'est traduit au cours des trois dernières décennies par la constitution de **collections *ex situ***, dans lesquelles la diversité est conservée hors du milieu naturel, généralement sous la forme de semences placées en chambre froide, mais également sous forme de plantes vivantes au champs (dans le cas, notamment, des plantes pérennes). Les ***core collections***, dont le principe est de représenter la diversité d'une collection à travers un nombre réduit de plantes, permettent de faciliter la gestion et l'utilisation des collections de base.

Ces méthodes de conservation se sont avérées très utiles mais elles présentent un certain nombre d'inconvénients :
- elles " figent " la diversité,
- elles ne sont pas adaptées aux espèces à semences non-orthodoxes,
- elles peuvent être exposées à des aléas climatiques ou parasitaires.

En effet, ces méthodes ne permettent pas au matériel conservé de co-évoluer en même temps que son milieu ; ainsi, après 20 ou 30 ans, les plantes de ces collections risquent de ne plus être en mesure de faire face aux nouveaux stress de l'environnement. Ensuite, un certain nombre de plantes, notamment d'origine tropicale, supportent mal la conservation en chambre froide.

J.-P. Bruno- © INRA-Domaine de vassal

Cépages : une diversité parfois difficile à identifier

La relance du caoutchouc naturel passe par la résistance à un champignon

La culture de l'hévéa est fondée sur des plantations industrielles et villageoises de variétés sensibles à la maladie sud-américaine des feuilles, provoquée par le champignon *Microcyclus ulei.* Après plus d'un demi-siècle d'efforts, les recherches pour l'obtention de variétés qui soient à la fois résistantes à cette maladie et à haut rendement en latex ont échoué. De ce fait, l'Amérique latine, bien que région d'origine de l'hévéa, ne réalise aujourd'hui que 1 % de la production mondiale de caoutchouc naturel.
Pour connaître le déterminisme génétique des résistances identifiées dans les ressources génétiques amazoniennes, les chercheurs du Cirad ont développé l'approche cartographie du génome appliquée à l'analyse des QTL *(Quantitative Trait Loci)* ou zones chromosomiques impliquées dans la résistance.
Les résultats originaux obtenus ont conduit à infirmer les hypothèses antérieurement retenues sur l'origine génétique de la résistance des hévéas à la maladie des feuilles. On sait maintenant que :
- le déterminisme génétique de cette résistance, qu'elle soit partielle ou totale, est de type complexe, " multigénique " (elle est contrôlée par plusieurs gènes) ;
- 8 QTL de résistance ont été identifiés sur 7 chromosomes
- 1 QTL à effet majeur est commun à toutes les variétés d'hévéa et aux deux types de résistance, partielle et totale.
Ces travaux permettent de disposer des connaissances indispensables à la définition d'une stratégie d'amélioration, ainsi que de nouveaux outils pour la sélection de variétés résistantes à *Microcyclus ulei.*

Contact : Marc Seguin, seguin@cirad.fr

Denis Lespinasse,© Cirad-CP

Aider le Brésil à devenir un grand producteur de caoutchouc

Enfin, les semences perdent peu à peu leur pouvoir germinatif et doivent être régulièrement régénérées, ce qui représente une contrainte importante en termes de coût et de main d'œuvre.

Deux alternatives approfondies par l'UMR DGPC apportent chacune des solutions à ces divers inconvénients :
- la conservation des plantes dans leur milieu naturel, ou **conservation *in situ***, a pour objectif de conserver leur diversité mais surtout de maintenir leurs capacités d'évolution et d'adaptation. C'est en étant soumises aux contraintes de l'environnement (maladies, ravageurs…) et en restant au contact d'autres individus avec lesquels elles peuvent interagir et échanger du matériel génétique, que ces plantes peuvent continuer à "créer", de manière dynamique, de la diversité ;
- la **cryoconservation**, c'est-à-dire le stockage du matériel à une température ultra-basse, généralement celle de l'azote liquide (-196°C), est la seule technique qui puisse assurer aux semences récalcitrantes une conservation à long terme et à coût réduit.

Elle pourrait également être appliquée à la conservation de bourgeons de plantes à multiplication végétative.

Répondre aux *besoins de demain*

Les recherches menées sur les ressources génétiques par les chercheurs de l'Agro-Montpellier, du Cirad, de l'INRA, de l'IRD et de l'Université de Montpellier préparent les réponses aux besoins futurs de l'ensemble des acteurs de la chaîne agro-alimentaire, du producteur au consommateur, en y intégrant, pour les espèces tropicales, les besoins et les contraintes de l'agriculture des pays du Sud.
De plus en plus, les recherches s'orientent vers l'étude de la "diversité d'expression", c'est-à-dire vers une meilleure compréhension des déterminants génétiques de la diversité et du fonctionnement des gènes.
Grâce au développement d'outils de recherche plus performants, une approche de plus en plus fine et précise du génome est entreprise. Les recherches menées par l'UMR DGPC s'orientent principalement vers trois grands types d'applications :
- la **qualité des produits** avec, à titre d'exemples, des applications sur la qualité de la baie et l'apyrénie (absence de pépin) chez la vigne, la qualité "à la tasse" (arôme) chez les caféiers, la qualité des huiles (stabilité de la teneur en acide oléique) chez les tournesols ;
- les **sources de résistance aux maladies** comme celles liées aux virus (ex : le virus de la panachure jaune du riz), aux champignons (ex : l'*oïdium* de la vigne ou la fusariose chez le palmier à huile…) mais aussi **aux parasites animaux** (ex : les nématodes chez le riz, le bananier et les solanées ou certaines espèces vectrices de viroses graves chez la vigne). La recherche de sources de résistance et l'étude des interactions plantes-pathogènes visent à l'identification de résistances les plus durables possibles ;
- l'**évaluation des risques liés aux flux de gènes** (risques de pollution génétique et de diffusion de transgène) qui pourraient se produire entre les variétés nouvelles et des plantes se trouvant au voisinage de leur lieu de culture. ■

La génomique appliquée *aux caractères* agronomiques

L'amélioration génétique repose sur une meilleure compréhension des caractéristiques et du fonctionnement d'une plante individuelle ainsi que sur une perception plus fine de la diversité présente dans les ressources génétiques des espèces cultivées. En tant qu'ensemble de technologies visant à caractériser les gènes et leur fonction, la génomique devrait largement contribuer à accéder à ces avancées.

L'équipe

L'unité mixte de recherche " Génomique appliquée aux caractères agronomiques " (UMR GACA) est composée de 13 chercheurs provenant de l'Agro.M, du Cirad et de l'INRA.

Responsable : Jean-Christophe Glaszmann, Cirad, jean-christophe.glaszmann@cirad.fr
fax : +33 (0)4 67 61 56 05

Schématiquement, la génomique trouve différents prolongements qui servent la connaissance et l'amélioration des plantes cultivées :

• la physiologie moléculaire, qui permet de mieux comprendre comment s'élaborent les caractères d'intérêt agronomique en s'appuyant sur la génomique fonctionnelle,

• le brassage génétique, qui permet de créer de nouvelles variétés en s'appuyant sur une meilleure représentation cartographique des agencements des facteurs utiles (contrôlant des caractères agronomiques) le long des génomes.

Appliquée aux caractères agronomiques, la génomique se décline selon :

• des caractères génériques, qui peuvent être étudiés sur des plantes modèles comme le riz (plante modèle pour les monocotylédones),

• des caractères spécifiques qui doivent être étudiés sur les différentes espèces d'intérêt agronomique, comme cela est fait sur une vingtaine de plantes méditerranéennes et tropicales faisant l'objet d'études spécifiques.

La génomique repose sur les progrès récents de la biologie moléculaire qui ont permis la mise au point de toute une gamme de méthodes d'investigation nouvelles et l'amélioration de la précision des méthodes existantes.

Cartographie et **séquençage** *des génomes*

• **La cartographie génétique** a pour objet la localisation, sur une carte, des facteurs génétiques responsables de certains caractères agronomiques intéressants (comme la résistance à une maladie ou un critère de qualité technologique de la plante, par exemple) à travers un balisage par des marqueurs moléculaires.

Cirad-Flhor

Des bananes sauvages à graines pour améliorer les espèces cultivées

Une banque BAC pour l'étude de la structure des chromosomes de bananier

Le bananier est une herbe géante qui peut mesurer de 1,5 à 8 mètres. Les fruits des bananiers cultivés (cultivars) sont les seuls à être consommés. Ils sont dépourvus de graines, alors que les fruits des bananiers sauvages contiennent des graines d'environ 5 mm de diamètre (photo). Les cultivars se divisent en deux sous-groupes : celui des bananes douces (ou bananes dessert) et celui des bananes à cuire, parmi lesquelles les plantains occupent une place prépondérante.

Les cultivars, d'origine interspécifique, sont classés selon leur niveau de ploïdie (nombre de chromosomes) et la contribution relative des espèces *Musa acuminata* (génome A) et *Musa balbisiana* (génome B) aux caractéristiques du clone considéré. Toutes les formes sauvages *acuminata* et *balbisiana* sont diploïdes, $2n=2x=22$.

Il existe six groupes génomiques principaux : AA, AAA, AB, AAB, ABB, ABBB. A côté de la contribution (doses différentes) en génomes A et B, on sait qu'il existe également des translocations, des échanges et des inversions au sein de chacun des deux génomes, sans qu'on en connaisse précisément l'importance. La disponibilité de grands fragments d'ADN, associée à l'hybridation in situ sur chromosomes (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*), doit permettre de caractériser les variations de structure des génomes chez le bananier. Une banque BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) faite à partir du cultivar Calcutta 4 (AA) est utilisée dans cette perspective. Ces recherches devraient permettre de mieux comprendre la structure relative des cultivars de bananiers, l'impact des translocations sur leur diversité et d'ouvrir de nouvelles perspectives d'amélioration.

Contact : Pierre Lagoda, pierre.lagoda@cirad.fr

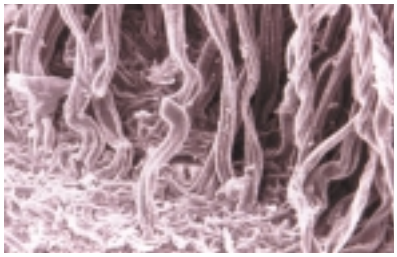
Bernard Hau, © Cirad-CA

Qualité de la fibre chez le cotonnier

La fibre de coton est la fibre naturelle la plus utilisée par l'industrie textile. C'est une structure unicellulaire qui se développe à partir de cellules épidermiques du tégument de la graine. À l'heure actuelle, on dispose de très peu de données moléculaires qui permettraient d'établir une corrélation entre l'expression de gènes et l'élaboration de la qualité technologique des fibres (longueur, ténacité, résistance à l'allongement…). Il est aujourd'hui possible d'identifier quels gènes sont à l'origine des différentes qualités de fibres chez divers mutants, variétés et espèces de cotonniers. Pour ce faire, on réalise des patrons d'expression d'ADNc (ADN complémentaire) et d'EST (*Expressed Sequence Tag*) pendant la phase de développement des fibres du cotonnier ; ceci permet de déterminer quels sont les gènes impliqués dans cette caractéristique agronomique et, pour chacun d'entre eux, d'identifier les allèles qui y sont favorables. Il sera ainsi possible de repérer des gènes importants dont l'expression déterminera *in fine* la qualité intrinsèque de la fibre, et éventuellement d'assigner à ces gènes une fonction biologique. Les gènes candidats ainsi identifiés constituent donc des gènes d'intérêt agronomique et peuvent également être testés en cartographie génétique dans le cadre de l'analyse de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) impliqués dans la qualité technologique des fibres.

Contact : Marc Giband, marc.giband@cirad.fr

Quels gènes contrôlent les qualités technologiques du coton (longueur, ténacité, résistance…)?



J.-L. Chanselme, © Cirad-CA

Pour réaliser ces cartes, on produit une ou des descendance(s) par croisements contrôlés puis on analyse les descendants, d'une part au moyen de marqueurs moléculaires, d'autre part par des évaluations agronomiques au champ. Cette caractérisation moléculaire permet de construire une carte génétique détaillée du génome de l'espèce. Une cartographie génétique plus fine, reposant sur l'analyse de plus grandes descendances, vient ensuite encadrer ces facteurs génétiques d'assez près pour pouvoir passer à la cartographie physique.

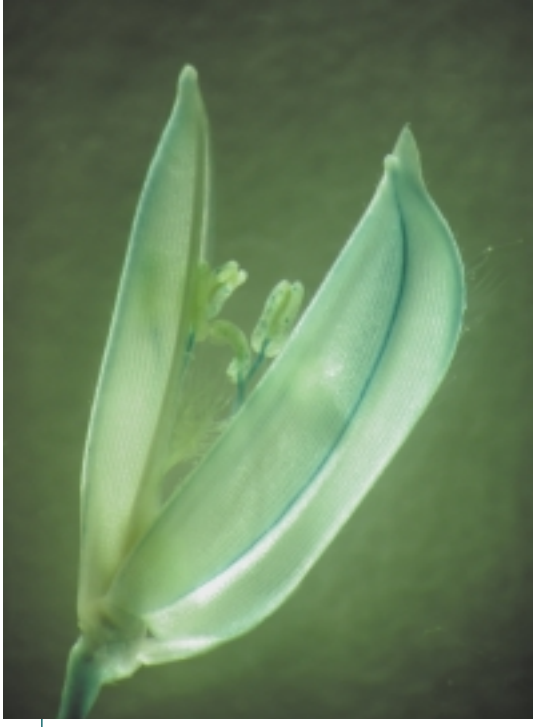
Tout ceci sous-entend d'avoir accès à des ressources génétiques, à des terrains d'expérimentation et à des laboratoires ainsi qu'une capacité à produire des descendances en ségrégation.

• **La génomique structurale** se concentre sur l'organisation physique du génome sous forme de chromosomes portant des séquences de types divers, parmi lesquelles les gènes constituent la cible principale des recherches.

- la cartographie physique du génome consiste à construire une réplique d'un génome entier sous la forme de grands fragments d'ADN clonés (à l'intérieur des bactéries dans le cas des clones BAC, *Bacterial Artificial Chromosome*), et ordonnés les uns par rapport aux autres. Cette cartographie sert en particulier à traduire une carte génétique -qui localise des zones du génome impliquées dans l'expression de caractères particuliers- en fragments d'ADN qui contiennent les gènes contrôlant ces caractères. Elle trouve son application typique avec le clonage positionnel (voir page 11 " *Synténie et marche chromosomique parallèle chez les graminées* ") des gènes d'intérêt agronomique. Elle sert également à récupérer la version complète de gènes détectés au moyen de leur séquence transcrite, les EST ou *Expressed Sequence Tags* ;

- le séquençage systématique du génome donne accès à tous les gènes qui font une plante, c'est-à-dire entre 20 et 50.000. Ce type d'information est produit sur quelques plantes modèles par de grands groupes industriels ou des réseaux de laboratoires, à l'exemple de l'*Arabidopsis* et du riz. Les laboratoires de la région Languedoc-Roussillon ont participé à la mise en place d'une telle initiative en France pour le chromosome 12 du riz (voir page 16 "*La Génopole de Montpellier et Languedoc Roussillon*"). •••

Riz : des mutants pour identifier la fonction des gènes



Emmanuel Guiderdoni,© Cirad-Amis

Identification d'un gène exprimé dans les vaisseaux conducteurs de la fleur de riz (en bleu)

Le génome du riz comprend environ 30 000 gènes dont la moitié n'a pas de rôle encore connu. La fonction de l'ensemble des gènes sera sans doute élucidée par l'analyse d'une grande population de plantes affectée aléatoirement dans chacun de ses gènes par l'insertion d'un mutagène, petite séquence qui constitue un outil de repérage et d'isolement des gènes (sorte d' "étiquette moléculaire").

Dans le cadre de l'initiative nationale de génomique végétale Génoplante (voir p. 16), une équipe pluri-institutionnelle Cirad-CNRS-INRA-IRD / Université de Perpignan basée à Montpellier, crée une collection de mutants d'insertion de riz de taille suffisante (100 000 individus) pour que chaque gène ait une bonne probabilité d'être interrompu au moins une fois par un mutagène insertionnel, ici l'ADN-T issu d'*Agrobacterium tumefaciens*.

La collection de mutants sera progressivement criblée sous diverses contraintes en environnement contrôlé (serre de confinement, phytotrons) afin d'identifier des plantes présentant une modification de leur morphologie, de leur physiologie ou de leur tolérance vis-à-vis de contraintes environnementales et permettant ainsi d'isoler les gènes affectés intervenant dans le contrôle du caractère (génétique directe). Par ailleurs, les séquences du génome adjacentes aux sites d'insertion de l'ADN-T obtenues à partir de chacun des mutants et rassemblées au sein d'une base de données permettront d'étudier précisément la fonction de tout gène dont on connaît la séquence mais pas le rôle, par recherche puis évaluation du mutant correspondant affecté dans la séquence (génétique inverse). Cette ressource permettra d'isoler des gènes du riz intervenant dans les processus fondamentaux de la morphogénèse végétale (architecture, floraison, embryogenèse…) et dans la tolérance aux agressions biotiques (maladies et ravageurs) et abiotiques (sécheresse, salinité, carence ou toxicité minérale..). La localisation de ces gènes sur des cartes moléculaires conduira à la compréhension du contrôle des caractères à déterminisme complexe et à renforcer considérablement l'efficacité de l'amélioration variétale du riz et des céréales en général (blé, orge, maïs, sorgho…).

Contact : Emmanuel Guiderdoni, emmanuel.guiderdoni@cirad.fr

Caractériser la fonction des gènes

• La **génomique fonctionnelle** vise à caractériser l'expression du génome et son intégration dans l'élaboration des grandes fonctions métaboliques.

- la mutagénèse insertionnelle (voir ci-dessus " *Riz : des mutants pour identifier la fonction des gènes*") permet de créer des mutants en insérant au hasard, dans le génome, un segment d'ADN repérable. Lorsque celui-ci s'intègre dans un gène, il en altère la fonction et provoque la modification du caractère correspondant donc une mutation. Le gène muté est localisé grâce à l'élément inséré, et sa fonction est identifiée grâce au caractère affecté. Cette technique est développée sur différentes plantes modèles (*Arabidopsis*, *Medicago truncatula* par exemple) ; les équipes de Montpellier se concentrent sur le riz comme modèle pour les graminées ;

- le séquençage partiel de gènes exprimés (Expressed Sequence Tags ou EST) permet la caractérisation de "patrons" d'expression du génome. L'analyse des ARN extraits sur certains organes de plantes cultivées, dans des conditions données et à un moment donné, permet d'obtenir une image de l'ensemble des gènes qui s'expriment dans ces conditions. Parmi ces gènes se trouvent certains gènes d'intérêt agronomique que l'on souhaite cloner. En fonction de caractéristiques de séquence ou de patrons d'expression, on pourra attribuer à certains de ces EST une fonction hypothétique qui en fera des "gènes candidats". Ceci est actuellement développé sur les plantes modèles et commence à s'étendre aux principales plantes d'intérêt agronomique.

La caractérisation des fonctions précises des gènes candidats, identifiés grâce aux approches de la génomique, fait intervenir plusieurs étapes :

- la transformation génétique permet de tester l'effet d'un gène ou d'une séquence candidate sur le phénotype d'une plante, grâce à son insertion au sein du génome et/ou à la modification de son expression dans la plante;

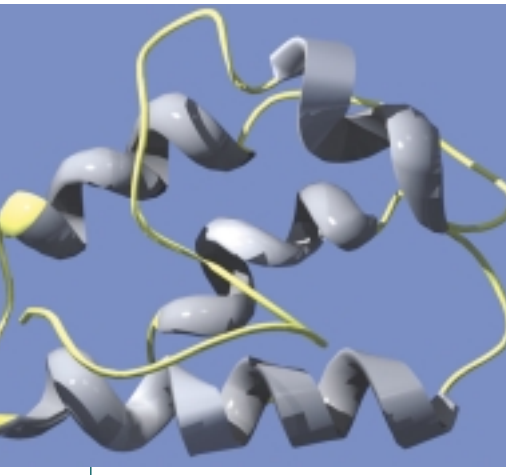
- l'évaluation fine du matériel transformé est nécessaire pour apprécier toutes les facettes de la fonction d'un gène. Elle met en jeu des outils de biologie cellulaire et moléculaire et de physiologie.

Ces technologies, appliquées à quelques plantes modèles et à une gamme de plantes cultivées plus complexes, conduisent à développer des ponts entre les génomes. Ainsi, la conservation au fil de l'évolution de certains éléments de l'organisation générale des génomes, comme la similitude de la répartition des gènes entre chromosomes (conservation de la "synténie", voir ci-contre " *Synténie et marche chromosomique parallèle chez les graminées* ") ou la colinéarité entre les chromosomes homologues, permet des transferts d'information entre plusieurs espèces. C'est toute une dynamique collective que la génomique produit, rapprochant les équipes auparavant spécialisées sur des plantes cultivées différentes.

Gènes, protéines du grain et qualité des blés

Les recherches conduites sur le blé dur et le blé tendre visent à améliorer la qualité des produits à base de céréales (pâtes alimentaires, pains, biscuits…) et à fournir de nouveaux outils pour l'amélioration variétale, comme les marqueurs moléculaires. Les stratégies mises en place consistent essentiellement à identifier les protéines impliquées dans un caractère donné, à les caractériser au niveau biochimique et ainsi à obtenir des données pour isoler les gènes codant ces protéines. Il devient alors possible d'étudier ces gènes (régulation, structure), de les localiser sur des cartes génétiques et/ou de les utiliser comme marqueurs en sélection.

Fréderic de Lamotte, © UBBMC-INRA



Connaître les protéines intervenant dans la qualité des blés pour développer de nouveaux outils d'amélioration variétale.

Dans le cadre du programme national Génoplante, une approche génomique est actuellement développée : 100 000 EST (*Expressed Sequence Tag*) seront produits à partir de différentes banques d'ADNc (complémentaire) issues d'ARNm (messager) extraits de graines en cours de maturation. L'objectif est de mettre en évidence toutes les protéines de la graine qui sont impliquées dans la qualité des blés et également d'utiliser ces EST pour des programmes de cartographie génétique en vue de mettre en évidence des QTL (*Quantitative Traits Loci*) utilisables en sélection.

Le système thiorédoxine pour améliorer la qualité boulangère des variétés de blé qualifiées d'impanifiables

Des études spécifiques sont réalisées sur des protéines ayant un rôle important dans la valeur d'utilisation des blés : c'est le cas notamment du système thiorédoxine. Ce sont les protéines contenues dans la farine qui sont responsables des propriétés viscoélastiques d'une pâte à pain. Il a été montré que les protéines de réserve (gliadines et gluténines) étaient les constituants majeurs du gluten qui est ce que l'on obtient après pétrissage d'une pâte sous un mince filet d'eau.

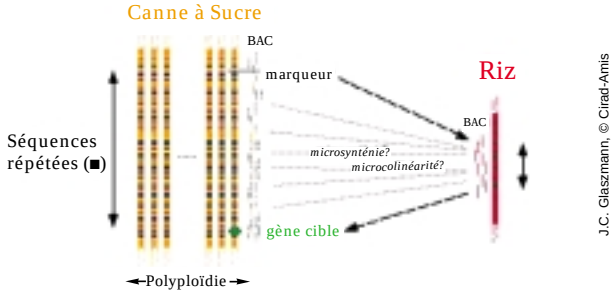
En fonction des propriétés rhéologiques de ce gluten, on obtiendra des pains plus ou moins développés après fermentation. Si de nombreuses liaisons chimiques interviennent, un rôle tout particulier est attribué aux liaisons disulfures. Elles joueraient en effet un rôle essentiel dans l'élasticité de la pâte. Or, le système thiorédoxine NADP-dépendant (un système enzymatique) est capable de réduire les ponts disulfures des protéines de réserve mais aussi d'autres petites protéines particulièrement riches en ponts disulfures. L'action de ce système permet donc de générer des groupements –SH libres qui peuvent alors se réoxyder en créant des liaisons inter-protéines, facilitant ainsi la formation du réseau et contribuant à l'élasticité de la pâte. L'addition contrôlée des différents éléments de ce système thiorédoxine permet donc d'améliorer la qualité boulangère de variétés qualifiées d'impanifiables.

Les différentes composantes de ce système font l'objet d'études biochimiques et moléculaires. Plusieurs isoformes ont été obtenues ainsi que des ADNc correspondant aux acteurs du système. Les protéines correspondantes sont produites chez des hôtes hétérologues afin d'étudier leurs structures et leurs fonctions.

Contact : Philippe Joudrier, joudrier@inra.ensam.fr

Synténie et marche chromosomique parallèle chez les graminées

La famille des graminées (*Poaceae*) est remarquable par la conservation, chez les espèces qui la composent, de la structure de base des génomes. On parle de conservation de la synténie (répartition des gènes entre chromosomes) et de colinéarité entre chromosomes homologues. On observe ce phénomène malgré une grande diversité du format des génomes qui est liée, d'une part, à la fréquence de séquences répétées anonymes (sans fonction déterminée) et, d'autre part, au niveau de ploïdie (nombre d'exemplaires des chromosomes de base présents dans les cellules). Ce parallélisme permet la transposition d'informations entre les espèces et la confection de ressources analytiques et biologiques communes. Le riz, qui possède le génome le plus simple des *Poaceae*, représente l'espèce modèle.



Le riz sert de raccourci pour marcher d'un marqueur à un gène cible sur les génomes beaucoup plus grands des autres Poacées grâce aux banques BAC

Son génome est en voie d'être séquencé. Des banques de grands fragments d'ADN, constituées dans des BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*) ont été construites pour les principales espèces comme le riz, le sorgho, la canne à sucre ou le blé. Cet ensemble permet de constituer un dispositif efficace pour entreprendre l'analyse génomique de caractères comme la résistance aux maladies, la qualité du grain, l'architecture de la plante ou la tolérance à la sécheresse.

Contact : J.-C.Glaszmann, jean-christopheglaszmann@cirad.fr

Génomique *et développement* des plantes

Comprendre comment une graine se forme et acquiert sa longévité et sa vigueur germinative, comment la productivité en protéine est contrôlée par le ribosome, comment le potentiel oxydo-réducteur contrôle le cycle cellulaire, la croissance et l'adaptation des plantes à leur environnement… autant de questions que la génomique et la génétique moléculaire permettent aujourd'hui d'appréhender dans toute leur complexité.

L'équipe

L'unité mixte de recherche " Génome et Développement des Plantes " (UMR GDP) est constituée de 17 chercheurs provenant du CNRS et de l'Université de Perpignan .
Responsable : Michel Delseny, UP, delseny@univ-perp.fr, fax : +33 (0)4 68 66 22 24, site : http://syrah.univ-perp.fr/lgdp

Depuis sa création, le laboratoire de l'Université de Perpignan s'intéresse à l'analyse moléculaire du développement des plantes. Cette approche l'a amené, dès le début des années 80, à acquérir et développer l'ensemble des technologies qui ont conduit à la génomique. C'est ainsi que le laboratoire a joué un rôle pionnier dans le démarrage des projets sur *Arabidopsis thaliana* en France, espèce qui demeure le principal modèle d'étude en raison des avantages qui lui sont attachés : connaissance de la totalité de la séquence du génome, existence de très nombreux mutants permettant de disséquer les voies métaboliques, programmes de développement, réponses aux stimuli environnementaux et mécanismes de base de la machinerie cellulaire, possibilité de mettre en œuvre des approches génétiques directes ou inverses.

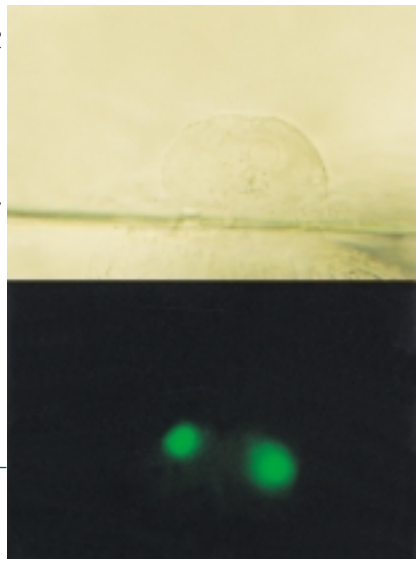
L'une des spécificités de cette équipe est d'associer au sein d'un même laboratoire des chercheurs maîtrisant la plupart des aspects de la génomique et des chercheurs intéressés à l'analyse de processus de développement ou à la dissection de mécanismes biochimiques et cellulaires fondamentaux.

Etudier les premiers stades *de développement* des plantes

Le domaine privilégié est celui de l'embryogenèse, de la formation de la graine et de sa maturation, thématique qui constitue un enjeu important pour l'industrie semencière et l'agriculture (suite page 14). •••

Biosynthèse du ribosome

Le ribosome est un organite cellulaire qui assure la biosynthèse des protéines. Son bon fonctionnement est largement responsable de la productivité de la cellule végétale. Il est composé d'ARN ribosomique et de 80 protéines distinctes. L'essentiel des travaux a porté jusqu'à présent sur l'analyse de la maturation des précurseurs des ARN ribosomiques. Des complexes ribonucléoprotéiques impliqués dans la maturation de ces précurseurs ont été caractérisés et les protéines ont été purifiées et microséquencées de manière à cloner les gènes correspondants. Ainsi, il a été montré que certaines de ces protéines se liaient au promoteur de plusieurs gènes de protéines ribosomiques, suggérant l'existence d'une régulation intégrée de leur synthèse. Des progrès sont en cours dans cette analyse grâce à l'identification systématique, dans les données brutes du génome d'*Arabidopsis*, des gènes des protéines ribosomiques, ceux des protéines impliquées dans les complexes mis en évidence et des gènes des snoARN (*small nucleolar* RNA) responsables de la modification des ARN ribosomiques.
Contact : Manuel Echeverria, manuel@univ-perp.fr

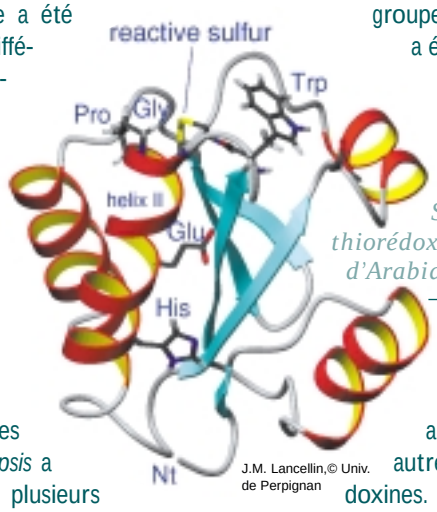


Fredy Barneche,© Univ de Perpignan

Visualisation de la fibrillarine fusionnée à la GFP par fluorescence dans des cellules d'oignons transformés

Rôle des thioredoxines dans la cellule végétale

Les thioredoxines sont des enzymes capables d'ouvrir les ponts disulfures des protéines et ainsi de contribuer à la régulation de leur conformation et donc de leur activité. Le premier gène de thioredoxine cytosolique végétale a été isolé dans notre laboratoire par criblage différentiel d'ADNc (complémentaires) correspondant, à partir des ARN messagers exprimés très précocement lors de la dédifférenciation de protoplastes de tabac. L'activité d'un deuxième gène de thioredoxine de tabac a été mise en évidence lors de la reprise de la division cellulaire lorsque les protoplastes de tabac sont mis en culture. Ceci a permis de montrer ainsi l'implication de ces protéines dans la régulation du cycle cellulaire. La découverte de copies multiples de gènes de thioredoxines dans le génome d'*Arabidopsis* a conduit à leur analyse systématique selon plusieurs angles : quel est le rôle de chacun des gènes dans différents processus cellulaires ?



J.M. Lancellin,© Univ. de Perpignan

Structure d'une thiorédoxine cytosolique d'Arabidopsis thaliana

Quelles sont les cibles des différentes thioredoxines ? Quels sont les domaines fonctionnels des thioredoxines qui leur confèrent leur spécificité ? Sur toutes ces questions, le groupe a réalisé des avancées très significatives : il a été démontré que les différentes thioredoxines présentent une spécialisation soit dans l'assimilation du sulfate, soit dans le contrôle du cycle cellulaire, soit dans la réponse au stress oxydatif et en particulier aux pathogènes. Plusieurs mutants d'insertion ont été obtenus, mais aucun n'a révélé de phénotype évident : ceci suggère que l'altération d'un gène pourrait être compensée par l'expression d'un autre, voire par l'expression de gènes d'une autre famille de redoxine comme les glutaredoxines.

Contact :Yves Meyer, ymeyer@univ-perp.fr

Alain Got,© Univ. de Perpignan

Arabidopsis thaliana, plante modèle pour les dicotylédones

Etudier les plantes modèles

Deux plantes modèles représentent les deux grandes divisions chez les plantes supérieures (monocotylédones et dicotylédones). Elles ont été choisies pour étudier de façon systématique la structure et la fonction des génomes végétaux.

Pour les **dicotylédones**, la plante modèle est *Arabidopsis thaliana*. On dispose depuis la fin 2000 de la séquence complète de son génome. Le profil d'expression des gènes a également été étudié par l'obtention, à partir de banques d'ADNc (ADN complémentaire), d'étiquettes (ESTs, *Expressed Sequence Tags*) identifiant chacune un gène qui est exprimé à un moment donné dans la vie de la plante. Néanmoins, seuls des ESTs correspondant à la moitié des gènes d'*Arabidopsis* sont disponibles ; de plus, on ne peut proposer une fonction que pour environ 60% des quelque 25000 gènes. Une analyse de la structure de ce génome par bio-informatique permettra de déterminer la localisation et la structure de tous les gènes de la plante et d'identifier les éléments qui contrôlent leur expression. Il est également possible de proposer une fonction aux gènes, ceci à travers la création de mutants (par insertion d'un fragment d'ADN au hasard dans les gènes) et l'observation du ou des caractères qui sont affectés par la mutation. L'équipe de Perpignan participe à l 'ensemble de ces projets depuis 1992.

Les techniques développées pour étudier *Arabidopsis* sont très utiles pour analyser la structure et l'expression du génome du riz, plante modèle des **monocotylédones**. Ainsi, la séquence complète de ce génome devrait être disponible en 2003. L'ordonnancement des clones de grands fragments d'ADN, utilisés pour le séquençage, nous a permis de fournir au Centre National de Séquençage les points de départ pour le séquençage du chromosome 12. Des banques d'ADNc sont en cours de préparation pour l'étude de l'expression des gènes et de leur structure, tandis qu'une analyse systématique des mutants d'insertion est effectuée pour déterminer la fonction des gènes. Ce travail est réalisé sur le cultivar qui a été choisi par l'ensemble des partenaires du projet international de séquençage.

(voir page 10 " *Riz : des mutants pour identifier la fonction des gènes*")

Contact : Richard Cooke, cooke@univ-perp.fr

La génétique pour mieux comprendre les mécanismes de l'embryogénèse

L'embryogenèse des plantes à fleurs se découpe en trois parties : l'**embryogenèse précoce** au cours de laquelle se forme l'embryon, la **maturation de la graine** avec synthèse et accumulation des réserves de protéines, lipides et carbohydrates, et la **dessiccation**, quand la graine perd une grande partie de son contenu en eau et entre en dormance.

Ces trois aspects sont étudiés à l'UMR GDP.

Embryogenèse précoce : ce thème est abordé par l'analyse génétique de " mutants d'embryogenèse ", appelés *embryo-defective* (emb) chez *Arabidopsis*. La collection de mutants d'insertion d'ADN-T de l'INRA est criblée pour identifier des plantes qui renferment des graines avortées dans leurs fruits. Ces graines n'ont pas pu achever leur formation à cause de la disruption d'un gène essentiel (gène *EMB*). Grâce à l'étiquette (ADN-T), on peut identifier et étudier le gène lésé responsable de la mutation. Une demi-douzaine de gènes *EMB* essentiels aux premières divisions des cellules de l'embryon ont ainsi été caractérisés.

La maturation : après avoir répertorié les principales protéines de réserve de la graine chez *Arabidopsis*, l'équipe s'intéresse à présent aux gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des lipides. Cette étude se fait principalement sur le colza et concerne les gènes d'élongases et d'acyltransférases qui contribuent à la formation des triglycérides.

La dessiccation : les protéines LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) sont synthétisées en grande quantité lors de la dessiccation de la graine. Un de leurs rôles serait de maintenir un environnement de survie aux cellules. Un inventaire des protéines LEA a tout d'abord été dressé. Ensuite, un effort important a été réalisé sur un de ses membres, la protéine Em1. En utilisant le gène *Em1* comme outil, le gène *ABI5*, un activateur de l'expression des gènes *LEA*, a été isolé dans notre laboratoire. Nous essayons de comprendre les interactions entre *ABI5* et les autres régulateurs des LEA.

Contacts : Martine Devic, Université de Perpignan, devic@univ-perp.fr et Michel Delseny, Université de Perpignan, delseny@univ-perp.fr

Jocelyne Guilleminot, © Univ. de Perpignan

Mise en évidence d'un gène impliqué dans le développement de la graine

Les deux grandes questions posées sont, d'une part d'identifier le rôle et la fonction des gènes impliqués dans l'embryogenèse précoce et la formation du patron de l'embryon et, d'autre part, de déterminer quel est le rôle des protéines impliquées dans la maturation de la graine et leur régulation. Ces recherches donnent lieu à des développements technologiques : recherche de promoteurs, contrôle de l'expression des gènes de façon conditionnelle, manipulation des teneurs en protéines ou lipides de réserve.

Etudier le **déterminisme génétique** *des processus* **biochimiques** *fondamentaux*

Une autre préoccupation est de comprendre comment des mécanismes tels que l'ouverture et la fermeture des ponts disulfures des protéines contribuent au contrôle du cycle cellulaire et aux réponses aux stress oxydatifs chez les plantes. Dans cette perspective; le groupe se livre à une analyse systématique des gènes de redoxine, à l'étude de leur régulation, et à la recherche des protéines cibles des thioredoxines.

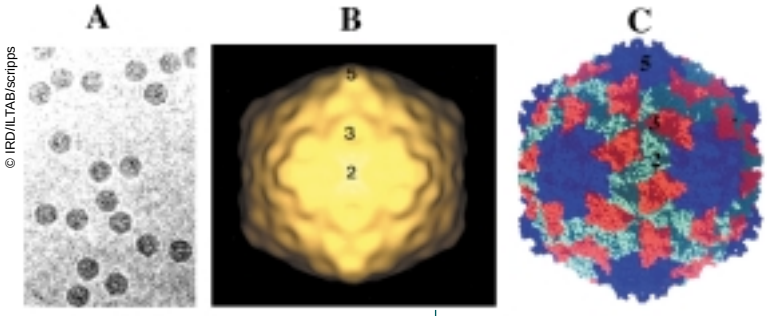
Le dernier volet d'activité porte sur l'analyse d'un processus fondamental de la cellule : la biosynthèse du ribosome et la coordination de la synthèse de ses différents constituants,

ARN ribosomiques et protéines ribosomiques. Ces approches ont été largement développées au niveau biochimique avec l'identification de protéines régulatrices de la maturation du précurseur d'ARN ribosomiques. L'ambition, maintenant que le génome d'*Arabidopsis* est entièrement séquencé, est de comprendre comment les différents éléments sont intégrés et corégulés et comment la redondance fonctionnelle est gérée en créant sans doute une hétérogénéité des ribosomes entre différents stades physiologiques.

Des recherches en *constante évolution*

Si, au plan de l'analyse du génome, l'essentiel des efforts de l'UMR DGP a porté sur *Arabidopsis* avec une participation au programme d'obtention d'EST (*Expressed Sequence Tags*), et au programme de séquençage génomique, il s'oriente maintenant vers l'analyse fonctionnelle en utilisant largement l'étude des mutants, et vers l'analyse de l'architecture et de l'organisation du génome (présence de larges duplications, familles multigéniques, annotation…).
L'expérience acquise sur *Arabidopsis* montre que l'étude des génomes végétaux au niveau séquence est possible. Le laboratoire entreprend donc de diversifier son activité dans ce domaine et, en collaboration avec d'autres équipes de la région, au sein de la Génopole Montpellier-Languedoc-Roussillon ou de Génoplante (voir page suivante) ou encore d'équipes étrangères, il met en place des projets nouveaux de génomique portant sur le riz, le manioc et d'autres espèces. ■

Interactions et résistances naturelles au virus de la panachure jaune du riz



© IRD/ILTAB/scripps

3 images du virus de la panachure jaune du riz
A- par microscopie electronique
B- cryomicroscopie et reconstruction d'image
C- cristallographie

Le virus de la panachure jaune (Rice yellow mottle virus, RYMV) est une maladie virale en forte expansion depuis les 20 dernières années, consécutivement à l'intensification de la riziculture irriguée en Afrique. Le développement de résistances variétales est la seule solution envisageable pour lutter contre cet agent pathogène. Depuis sa découverte, les recherches se sont concentrées sur le virus lui-même (structure, cycle viral, variabilité sérologique et moléculaire) et sur les résistances naturelles qui pourraient être exploitées en amélioration des plantes.
Ainsi, l'étude du cycle infectieux a permis de décrire, à l'ILTAB[1], les différentes étapes et les caractéristiques du mouvement du virus dans la plante. Les techniques de cryomicroscopie et de cristallographie[2] ont permis de déterminer la structure tridimensionnelle du virus avec une extrême précision. Ces informations fournissent maintenant un cadre d'interprétation très utile pour mieux comprendre, d'une part, les bases moléculaires des interactions entre la protéine de l'enveloppe du virus et les protéines de l'hôte et, d'autre part, leurs conséquences sur la variabilité de la pathogénéicité du virus. Les collaborations avec l'ADRAO[3] en Côte d'Ivoire ont permis d'étudier précisément différentes sources naturelles de résistance à ce virus au sein des deux espèces de riz cultivées en Afrique[4]. La cartographie et le marquage génétique ont permis de localiser ces gènes de résistance (ou les QTLs) sur les chromosomes du riz.
Les outils de la génomique permettent aujourd'hui d'envisager de manière réaliste le clonage positionnel de ces gènes de résistance et d'étudier plus précisément leur fonction. Ces gènes de résistance naturelle sont transférés par sélection assistée par marqueurs en collaboration avec l'ADRAO. Leur clonage permettra d'évaluer la diversité existante dans les collections de riz, de caractériser d'autres interactions hôte-virus comme la tolérance et de simuler en laboratoire le contournement possible de ces gènes de résistance pour anticiper ainsi la durabilité des résistances lorsqu'elles seront déployées à plus grande échelle. Enfin, comme le riz est une plante modèle pour étudier la génomique fonctionnelle des céréales, les interactions moléculaires Riz-RYMV constituent probablement aussi un modèle pour explorer les interactions hôte-virus chez les autres céréales.
Les travaux menés sur l'étude du virus de la panachure jaune sont un exemple de recherche multidisciplinaire réalisée par plusieurs équipes à Montpellier avec des collaborations internationales et qui permettent d'aboutir à des résultats importants aussi bien sur le plan connaissance fondamentale qu'application concrète pour le développement.

(1)ILTAB : International Laboratory for Tropical Agriculture Biotechnology, USA.
(2) Collaboration avec l'ILTAB et le Scripps Research Institute.
(3)ADRAO :Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest
(4) Oryza sativa et Oryza glaberrima

Contact : Alain Ghesquière, alain.ghesquiere@mpl.ird.fr

La Génopole Montpellier *Languedoc Roussillon*

Quand l'union fait la force

Les Génopoles ont été conçues en France dans le but de mettre en commun et à la disposition des différentes équipes d'une même région travaillant dans le domaine de la génomique, des équipements complexes performants. Ce regroupement des forces et des moyens doit participer à l'essor national et européen des études de génomique et de post-génomique.

La Génopole Montpellier Languedoc-Roussillon recouvre une quarantaine de laboratoires impliqués dans des travaux de génomique, tant végétale que microbienne, animale ou humaine. Elle est une des premières à avoir été créées en France et a eu, dès le départ, une orientation végétale clairement affichée.

Outre la mise en place d'outils de recherche, la Génopole a pour objet de permettre l'émergence d'enseignements nouveaux dans le domaine de la génomique et de favoriser la création d'entreprises de biotechnologie à forte valeur ajoutée.

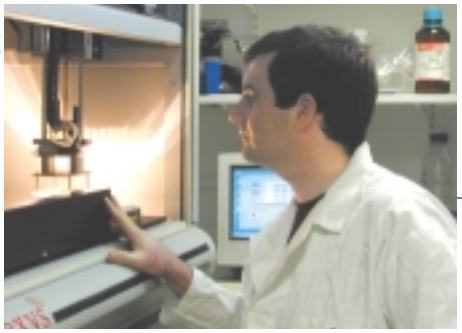
Les investissements déjà réalisés portent sur l'acquisition de :
- robots, machines à séquencer ou à génotyper d'ADN,
- moyens de calcul informatique,
- plate-formes de réalisation et de lecture de puces à ADN,
- complément d'appareillages pour l'analyse des protéines par spectrophotométrie de masse,

ainsi que sur la réalisation de serres de confinement pour les plantes transgéniques.

Plusieurs plateaux techniques sont déjà opérationnels :
- atelier de robotique génomique
- sites de séquençage à moyenne échelle (≅5Mbp/an)
- analyse du transcriptome
- analyse du protéome
- bio-informatique
- biologie structurale.

D'autres plateaux techniques (génotypage des plantes, analyse de souris transgéniques et analyse des interactions protéines-protéines et protéines-acides nucléiques) se mettent en place progressivement. Dans le domaine du végétal, plusieurs grands projets de séquençage sont en cours, principalement sous forme d'EST *(Expressed Sequence Tag)* sur les espèces tropicales (riz, palmier à huile, manioc), sur un champignon et sur une algue. Quelques régions d'intérêt du génome du riz sont également séquencées. Plusieurs banques BAC *(Bacterial Artificial Chromosome)* sont en cours de construction. Les projets d'analyse fonctionnelle portent surtout sur les mutants d'*Arabidopsis* et de riz mais l'obtention d'EST à partir de nombreux génomes va permettre l'essor des programmes d'analyse du transcriptome. Les études de protéomique sont également développées.

Contact :
Michel Delseny, Université de Perpignan, delseny@univ-perp.fr



Sémina Cebti, ©Agropolis

La Génopole : des équipements performants mis à la disposition des chercheurs en génomique

Réunir secteurs publics et privés pour une plus grande performance : le programme Génoplante

Génoplante est un programme national associant des partenaires publics (Cirad, CNRS, INRA et IRD) ainsi que des partenaires privés (Aventis Crop Science, Biogemma et Bioplante). Plus centré sur les grandes cultures que le programme régional de la Génopole Montpellier Languedoc-Roussillon, Génoplante est un vaste programme qui a pour vocation de doter la France d'un dispositif global, cohérent et compétitif pour l'étude des génomes végétaux et la valorisation de ces travaux. Les objectifs sont de stimuler la recherche et la créativité en génomique et de mettre au point des semences de qualité répondant davantage aux attentes des consommateurs et des agriculteurs.
Les programmes couvrent un champ allant des ressources génétiques à l'analyse génomique des espèces végétales. Les plantes autour desquelles les travaux sont axés sont, d'une part, *Arabidopsis* et le riz, en tant que plantes modèles, et, d'autre part, les grandes espèces cultivées en Europe : maïs, colza, blé… Les laboratoires de la région Languedoc Roussillon, très impliqués dans ces thématiques, participent activement à ce programme, en particulier à travers des travaux de recherche sur le riz.

Contact :
Michel Delseny,
delseny@univ-perp.fr

Michel Dukhan-IRD

Le riz, plante modèle pour les monocotylédones

L'expérience d'une nouvelle forme de partenariat : la plate-forme Agropolis

La plate-forme Agropolis sur la génomique et les biotechnologies végétales pour le Sud fait travailler ensemble, dans un cadre européen d'expertise et de compétence reconnues et au sein d'infrastructures très bien équipées, des chercheurs français, des chercheurs des CIRAs (centres internationaux de recherche agricole) et des chercheurs du Sud. Cette plate-forme permet la conduite de recherches de pointe nécessaires pour consolider plus spécifiquement les activités de recherche agricole pour le développement des pays du Sud.

Elle s'inscrit dans un contexte particulièrement favorable puisque Montpellier et sa région participent déjà à deux projets d'envergure dans le domaine de la génomique et des biotechnologies végétales : la Génopole et Génoplante.

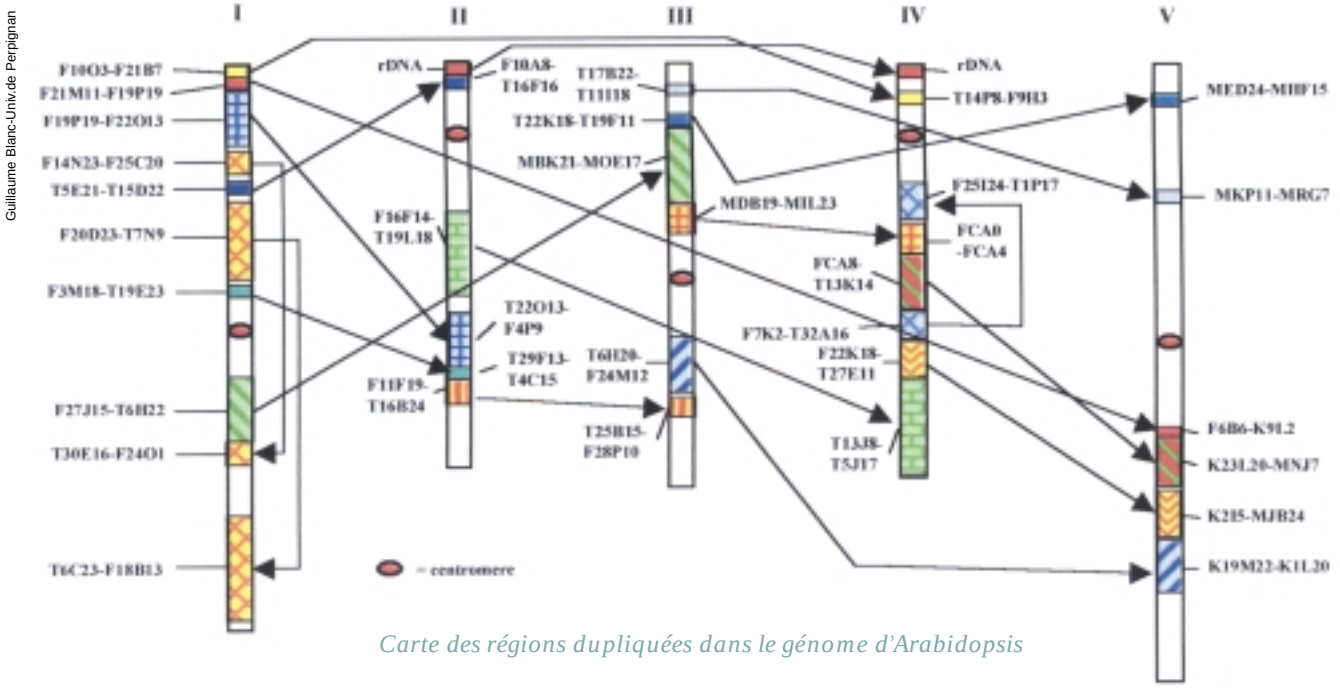
Le concept de plate-forme crée les conditions d'une nouvelle mise en commun de ressources humaines et de moyens, pour un objectif global, une mission partagée. Il se situe à l'interface entre la recherche faite au Sud dans les structures nationales et les CIRAs, et la recherche de pointe des institutions du Nord. Expérimenté aujourd'hui dans le domaine des biotechnologies végétales, son succès permet d'envisager d'etendre le concept à d'autres domaines de recherche, pour répondre aux vœux exprimés par plusieurs partenaires nationaux et internationaux du Sud.

Contact :
Yves Savidan, Agropolis, savidan@agropolis.fr

Séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* : l'arabette n'est pas celle que l'on croyait ...

Espèces	taille du génome (paires de bases)
Arabette	1.0×10^8
Riz	4.2×10^8
Tomate	1.0×10^9
Maïs	2.5×10^9
Blé	1.6×10^{10}

La Génopole de Montpellier-Languedoc-Roussillon et l'équipe de Michel Delseny, ont participé au projet international de séquençage d'*Arabidopsis,* en contribuant notamment au séquençage du chromosome 3. L'arabette des dames *(Arabidopsis thaliana)*, avait été choisie comme plante modèle parce qu'elle présente, pour l'expérimentateur, toute une série d'avantages – petite taille, croissance rapide, cycle reproductif court, et surtout petite taille du génome. A ce sujet, on pensait que la différence observée avec d'autres plantes (voir tableau) connues pour avoir des génomes bien plus grands serait due essentiellement au fait que les gènes de l'arabette existent en copie unique, au contraire des espèces à plus grand génome. Le séquençage a montré, au contraire, qu'au moins 70% des gènes de l'arabette sont dupliqués (cf. carte ci-dessous). L'espèce contiendrait moins de 15.000 gènes différents sur les 26.000 gènes séquencés. Il s'agit maintenant d'identifier la fonction de chacun d'entre eux ainsi que le rôle joué par chacune des protéines dont ils permettent la synthèse. Le séquençage n'est qu'une étape mais elle ouvre des perspectives sans précédent, notamment pour l'étude de la diversité des espèces et son utilisation en amélioration et sélection variétale.



Guillaume Blanc-Univ.de Perpignan

Carte des régions dupliquées dans le génome d'Arabidopsis

Adaptation des *plantes à des* environnements *perturbés*

Les contraintes environnementales liées au climat et à la qualité des sols constituent le principal facteur limitant la production végétale à l'échelle mondiale. Une grande diversité de tolérances à ces contraintes existe entre les espèces et les variétés. Dans la plupart des cas, chaque individu dispose d'une panoplie de variantes de ses programmes génétiques. Face à chaque type de contrainte, la plante est capable de sélectionner, dans cet ensemble, des programmes génétiques de rechange dont l'expression permet une meilleure adaptation aux nouvelles conditions. Cette aptitude à utiliser des signaux environnementaux pour piloter l'expression du génome est une spécialité du monde végétal, connue sous le nom de plasticité phénotypique.

L'équipe

L'unité mixte de recherche "Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes " (UMR B&PMP) rassemble près de 40 chercheurs provenant de l'Agro.M, du CNRS, de l'INRA et de l'Université Montpellier II.

Responsable : Claude Grignon, Agro.M, grignon@ensam.inra.fr, fax : +33 (0)4 67 52 57 37

Les recherches menées dans l'UMR B&PMP (Biologie et Physiologie Moléculaire des Plantes) visent à identifier les bases génétiques et moléculaires de l'adaptation des plantes à des facteurs tels que la salinité, la disponibilité de l'eau, l'excès de métaux toxiques ou la déficience en éléments minéraux nutritifs. Cette thématique générale identifie l'UMR B&PMP sur la carte nationale et européenne des forces de recherche en physiologie moléculaire des plantes.

Une approche **globale : du gène** *à la protéine*

Quatre mots-clefs définissent le positionnement stratégique de l'UMR B&PMP : génétique moléculaire, physiologie moléculaire, biologie intégrative et génomique fonctionnelle. Toutes les recherches menées utilisent la discipline-outil appelée ***génétique moléculaire,*** c'est-à-dire le clonage de gènes et l'étude de leur expression. Elles ont pour objectif d'affiner les explications des mécanismes physiologiques, en les amenant au niveau moléculaire (voir ci-contre *" Clonage du premier gène de transporteur… "*).

La discipline-objet est la **physiologie moléculaire.** Les différentes équipes complètent leurs démarches moléculaires par des approches de biochimie, de biophysique ou de physiologie pour élucider les fonctions des gènes. Parmi les mécanismes étudiés, beaucoup dépassent l'échelle cellulaire et s'inscrivent à l'échelle de la plante : à travers des approches de physiologie moléculaire et ses collaborations avec des équipes d'écophysiologistes et de pédologues spécialisées dans l'étude des interactions plante-milieu, la dimension **biologie intégrative** est bien représentée dans l'UMR.
L'UMR B&PMP s'est dotée d'une panoplie d'outils permettant une démarche cohérente de physiologie moléculaire, allant de l'identification d'un gène jusqu'à l'élucidation de sa fonction *in planta*, en passant par la fonction moléculaire de la protéine qu'il code et les lieux et conditions de son expression (voir page 21 *" Des gènes… pour quelles protéines ? "*).

Ces approches utilisent :
- divers **systèmes d'expression hétérologue** de gènes de plante (levure, ovocyte de batracien, cultures de cellules d'insecte et de mammifère) ;
- les **méthodes de la génétique inverse** (transformation génétique de plantes avec des gènes rapporteurs, sur et sous expresseurs, dissection de promoteurs et collections de mutants disruptés) ;
- une variété de **techniques physiologiques** (flux de traceurs isotopiques, électrophysiologie *in vivo*, analyses spectroscopiques des transports *in vitro* en systèmes reconstitués, microsonde à pression pour le transport d'eau, etc.)

Clonage du premier gène de transporteur de complexe fer-sidérophore de plante

J.-F. Briat, © UMR B&PMP

Dans ce champ de soja, seul le plant de sorgho échappe à la chlorose ferrique

La physiologie moléculaire est largement basée sur des approches de génétique directe (du phénotype au gène) et inverse (du gène au phénotype). Une illustration de cette stratégie est offerte par le clonage récent chez le maïs du premier gène de transporteur de complexe fer-sidérophore. Les besoins en fer des plantes sont relativement élevés, mais l'insolubilité de la forme ferrique dominante dans de nombreux sols limite la disponibilité de cet élément essentiel. C'est l'origine du jaunissement des feuilles appelé chlorose ferrique. Alors que les racines de dicotylédones réduisent le fer ferrique en fer ferreux puis absorbent ce dernier, les racines de graminées utilisent un autre mécanisme : elles sécrètent des molécules (sidérophores) capables de complexer le fer ferrique en solution et absorbent le complexe entier. Ce processus, qui assure la disponibilité du fer ferrique pour les transporteurs membranaires, permet aux graminées de résister efficacement à la chlorose ferrique. Chez le maïs, la mutation *YS1* correspond à la perte de l'aptitude à absorber le complexe fer-sidérophore, et se traduit par des zones chlorotiques sur les feuilles. L'analyse génétique d'une collection de mutants de maïs créée par insertion d'un transposon a permis de repérer des individus homozygotes dans lesquels le phénotype chlorotique est associé à la présence du transposon. L'exploration des séquences génomiques voisines du transposon a conduit à l'identification du gène *YS1* qui code un polypeptide ayant, au niveau structural, les apparences d'un transporteur d'ions. La capacité de cette protéine à transporter le complexe fer-sidérophore a été vérifiée par complémentation d'une souche de levure mutante incapable d'absorber le fer. Effectivement, le gène *YS1* de maïs restaure l'aptitude de la levure à se développer sur un milieu à faible teneur en fer, uniquement si cet élément est apporté avec le sidérophore. Le gène *YS1* s'exprime dans les racines et les feuilles. Il est induit par la carence en fer, ce qui explique que les plantes déficientes en fer aient une capacité accrue de transport du complexe fer-sidérophore.

Contact : Jean-François Briat, briat@ensam.inra.fr

Une forte **implication dans** *les initiatives* **nationales de** *génomique*

La génomique se différencie de la génétique moléculaire par le caractère global de ses approches, à l'échelle de l'ensemble du génome des organismes. Dans le secteur végétal, l'UMR B&PMP est un acteur majeur de l'effort national de **génomique fonctionnelle.** Cette discipline est un outil pour comprendre la complexité physiologique. Par exemple, les approches globales de l'expression des gènes révèlent les grandes fonctions physiologiques mobilisées lors des étapes du développement ou dans les réponses à des situations environnementales données. Appliquées à la comparaison de mutants, ces approches révèlent les interactions du gène muté avec son environnement cellulaire. Dans l'UMR B&PMP, plusieurs programmes sont bâtis sur ces principes:

- un atelier national de protéomique y est implanté ;
- plusieurs approches différentes des transcriptomes y sont développées (membranes à ADN et SAGE, *Serial Analysis of Gene Expression*) ;
- toutes les équipes participent à l'exploitation systématique de collections de mutants d'insertion d'*Arabidopsis*.

En permettant d'accéder aux déterminants moléculaires des fonctions physiologiques, la génomique fonctionnelle ouvre de larges perspectives de valorisation des connaissances biologiques. Avec une quinzaine de programmes de génomique fonctionnelle, dont la majorité concerne l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, l'UMR est fortement impliquée dans la Génopole de Montpellier et dans le programme national Génoplante (voir page 16). Des programmes de transfert des acquis vers les espèces cibles, comme par exemple la vigne ou le maïs, sont en cours. •••

Le dialogue entre les feuilles et les racines d'*Arabidopsis* pour une meilleure nutrition minérale

L'étude des signaux qui informent la racine des besoins nutritionnels des parties aériennes offre une illustration des démarches de physiologie moléculaire. Dans cet exemple, une plante d'*Arabidopsis* est carencée en azote parce qu'une moitié de son système racinaire est placée sur un milieu dépourvu de cet élément. L'autre moitié des racines, placée sur milieu contenant du nitrate, est correctement alimentée en azote. Néanmoins, elle reçoit des parties aériennes des signaux de carence qui se traduisent par l'induction d'un gène codant un transporteur spécifique de nitrate. Cette induction est visualisée par hybridation des ARN messagers racinaires avec une sonde correspondant à ce gène. Des mesures d'influx de nitrate marqué par l'isotope ^{15}N montrent parallèlement que la capacité racinaire d'acquisition du nitrate se développe. Ainsi, bien que n'étant pas elle-même carencée, la racine adapte son équipement moléculaire et son fonctionnement aux besoins accrus en azote des parties aériennes : elle répond à des signaux de demande nutritionnelle, dont l'identification est un enjeu important. La disponibilité de gènes marqueurs de cette réponse permet, à travers la dissection fonctionnelle de leurs promoteurs, de rechercher les acteurs moléculaires de cette signalisation.

Contact : Alain Gojon, gojon@ensam.inra.fr

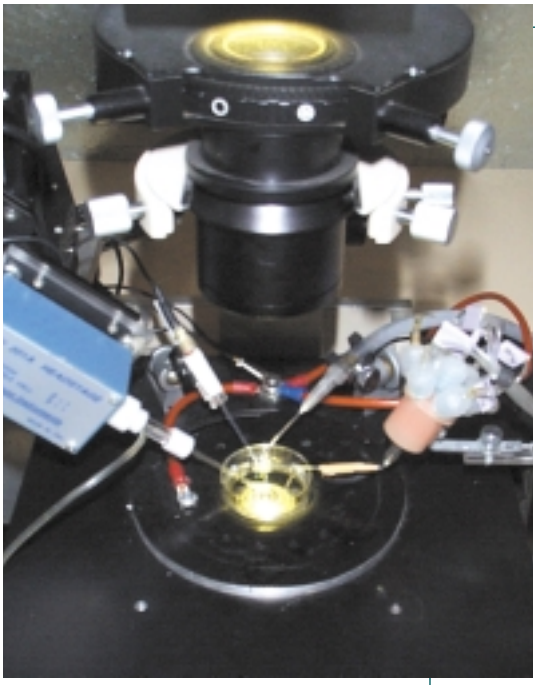
S.Munoz – P.Tillard, © UMR B&PMP

Les racines des plantes sont séparées en 2 parties et cultivées, à gauche, en présence de nitrate et, à droite, en absence de nitrate. La racine présente une augmentation de l'expression d'un gène de transporteur de nitrate, constituant une réponse à la carence dans les parties aériennes.

Un environnement *scientifique* favorable : l'Institut *des Productions* Végétales

Les objectifs de recherche et les stratégies expérimentales de l'UMR B&PMP la positionnent au centre d'un groupe de trois UMR de Montpellier, aux activités complémentaires, inscrites dans un continuum d'approches allant de l'analyse des ressources génétiques à l'écophysiologie du développement des plantes. Ce groupe, appelé Institut des Productions Végétales, est constitué des UMR B&PMP, LEPSE (Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux, voir page 26), et BDPPC (Biologie du Développement des Plantes Pérennes Cultivées, voir page 22). Leur présence sur le même campus constitue une opportunité unique en France pour combler le fossé qui existe entre les aspects génétiques, moléculaires et cellulaires et l'expression globale au niveau de la plante entière dans son environnement.

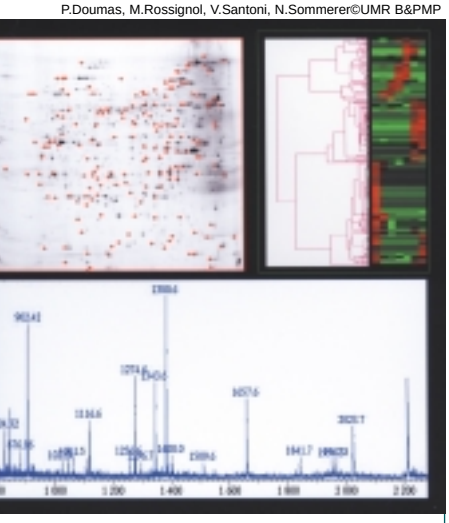
J.-B. Thibaut, © UMR B&PMP



Electrophysiologie

La plate-forme protéomique

P.Doumas, M.Rossignol, V.Santoni, N.Sommerer©UMR B&PMP



En haut à gauche : gel d'électrophorèse à 2 dimensions des protéines de racine d'Arabidopsis. En haut à droite : analyse bioinformatique des profils d'abondance de protéines de la racine au cours du développement de la carence en phosphate. En bas : spectre de masse de digestion d'un polypeptide séparé par électrophorèse à 2 dimensions (MaldiTof).

La plate-forme protéomique de l'UMR B&PMP (voir page 16 *"La Génopole de Montpellier Languedoc-Roussillon"*) est orientée vers l'analyse fonctionnelle à haut débit des protéomes :
- cartographie 2D et construction de banques de données, analyse de profils d'expression ;
- identification robotisée des protéines par cartes peptidiques massiques (MALDI-TOF MS), séquençage (ESI MS/MS, séquenceur).

Les approches conduites par l'UMR B&PMP concernent la construction de banques de données de référence, l'analyse de modifications post-traductionnelles, l'identification de réponses aux contraintes environnementales et le développement de nouvelles méthodologies pour l'analyse des protéomes membranaires.
Un exemple d'application de ces technologies est celui des changements adaptatifs de la morphogénèse racinaire induits par les carences minérales. Des approches globales génomiques sont utilisées sur *Arabidopsis* pour analyser les changements d'expression des gènes induits par la carence en phosphate. Les approches du transcriptome utilisent des *DNA arrays* à moyenne et haute densité. Les approches du protéome utilisent la technologie MALDI-TOF. Elles sont couplées à des analyses par imagerie de la dynamique du développement racinaire. Ce programme est conduit en collaboration avec l'UMR Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux (voir page 26).
Les objectifs sont :
- l'identification des grandes fonctions physiologiques contribuant à la morphogénèse adaptative, à travers le repérage des ensembles de gènes recrutés ;
- la recherche des gènes candidats pour la régulation de ces réponses ;
- la distinction des voies spécifiques de la réponse au stress appliqué (carence en phosphate) de celles qui constituent la plate-forme générale de réponse aux stress.

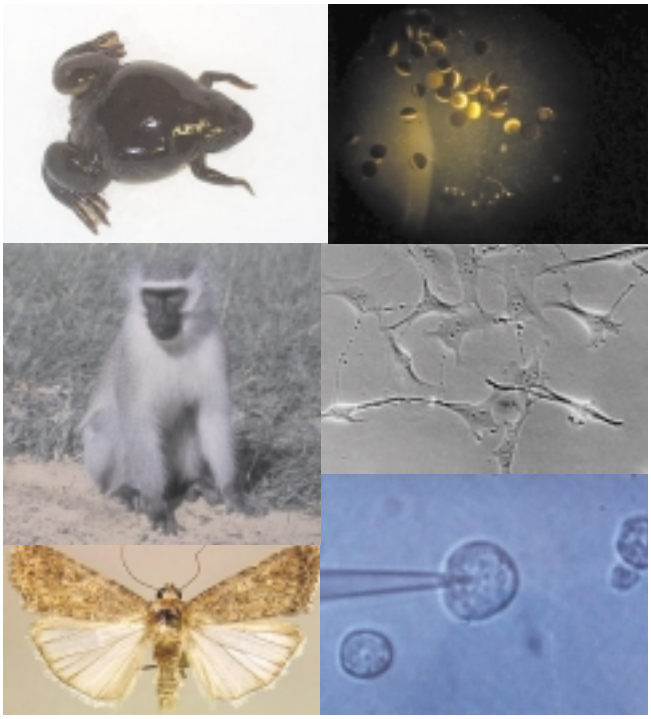
Contact : Michel Rossignol, rossignol@ensam.inra.fr

Des gènes… pour quelles protéines ?

Dans les démarches de physiologie moléculaire, la première étape après le clonage d'un gène est l'identification de la fonction moléculaire de son produit. Cette identification est faite grâce à des approches biochimiques et/ou physiologiques qui reposent généralement sur l'expression du gène dans un système hétérologue. Par exemple, la protéine codée peut être produite dans la bactérie *Escherichia coli* ou dans une levure. Dans le cas des protéines ayant un rôle de transporteurs d'ions et d'eau, l'expression dans l'ovocyte de Xénope (un crapaud tropical) permet des mesures directes de la fonction de ces canaux. L'ovocyte, comme les cellules COS de cercopithèque ou les cellules *Sf9* de lépidoptère, constituent aussi des systèmes d'expression compatibles avec les techniques de " *patch-clamp* " qui permettent une caractérisation électrophysiologique des canaux ioniques. Cette association des outils moléculaires et physiologiques permet non seulement d'identifier la fonction du produit du gène, mais également de disséquer les relations structure-fonction, par des démarches de mutagénèse dirigée.

Contact : Hervé Sentenac, sentenac@ensam.inra.fr

J.-B. Thibaut, © UMR B&PMP



Systèmes d'expression hétérologues

Biologie du *développement des* plantes pérennes *cultivées*

Les plantes sont soumises à des changements d'environnement et à des conditions de compétition en peuplements cultivés. Les adaptations des plantes à ces évolutions se traduisent par des modifications plus ou moins marquées de leur développement, modifications qui peuvent être accélérées par le biais de l'amélioration génétique.

L'approche de la biologie du développement des plantes nécessite l'acquisition de connaissances sur l'ensemble des processus moléculaires, cellulaires et structuraux, conduisant du zygote à la plante adulte capable de se reproduire (embryogenèse, phases de développement juvénile et adulte). Chez les espèces pérennes cultivées, des spécificités sont à prendre en compte qui sont liées à la pérennité des cultures, à la longueur de la phase juvénile, au processus de lignification et d'édification architecturale pérenne.

Etudier le **développement des** *arbres et optimiser* **leur exploitation**

L'objectif essentiel de l'UMR " Biologie du Développement des Plantes Pérennes Cultivées " (BDPPC) est d'élaborer des connaissances en matière de développement des plantes ligneuses sur quelques espèces supports tempérées et tropicales, afin de maîtriser leur fonctionnement, leur valorisation génétique et leur utilisation agronomique.•••

L'équipe

L'unité mixte de recherche "Biologie du développement des plantes pérennes cultivées" (UMR BDPPC) est constituée de 33 chercheurs provenant de l'Agro.M, du Cirad, de l'INRA, de l'IRD et de l'UM II.

Responsable : Françoise Dosba, dosba@ensam.inra.fr, fax : +33 (0)4 99 61 26 16
Site Web : http://www.ensam.inra.fr/arbo/arbo34.htm

Des milliers d'arbres à caoutchouc nés en laboratoire

L'hévéa représente une source exclusive de caoutchouc naturel. L'homogénéité et la productivité des plantations sont réduites non seulement par l'hétérogénéité génétique des porte-greffes issus de graines mais aussi par le vieillissement physiologique des greffons des génotypes sélectionnés. L'embryogenèse somatique est utilisée pour la multiplication rapide et conforme de ces génotypes. Le rajeunissement du matériel végétal et le clonage de l'arbre entier devraient conduire à un gain de vigueur et à une meilleure homogénéité des plantations. Différentes lignées de " cals embryogènes " (cellules entretenues en prolifération dans un milieu de culture approprié) issues du génotype appelé PB 260, ont servi pour la production expérimentale de 20 000 vitroplants entre 1996 et 2000. Le procédé est en cours d'adaptation à d'autres génotypes sélectionnés. Depuis 1992, des essais en champ sont régulièrement mis en place sur 5 sites (Afrique, Asie, Amérique latine) pour mesurer la croissance, la production et les caractéristiques agronomiques de ce nouveau matériel de plantation.

Contact : Ludovic Lardet, ludovic.lardet@cirad.fr

M.-P. Carron, © Cirad-CP

Vitroplant d'hévéa en champ d'essai (Côte d'Ivoire), clone PB 260 de 3 ans

Des gènes qui permettent aux arbres de fixer l'azote

Les filaos sont des arbres tropicaux originaires d'Océanie qui appartiennent à la famille des Casuarinacées. Grâce à leurs faibles exigences nutritionnelles et à leur remarquable tolérance à la sécheresse, les filaos jouent un rôle important dans les pays du sud, à la fois pour la production de bois et de biomasse, pour la protection des sols contre toutes les formes d'érosion et pour la restauration de la fertilité des zones dégradées. Ils ont la propriété de vivre en symbiose avec un microorganisme fixateur d'azote appelé Frankia. Les "nodules actinorhiziens" ou "racines symbiotiques" créés lors de cette symbiose s'apparentent à des racines latérales modifiées. Les recherches entreprises à l'IRD visent à comprendre le dialogue moléculaire qui s'établit entre la plante et le microorganisme lors de la différenciation et du fonctionnement des racines symbiotiques. Des gènes du filao, intervenant dans le processus de " rhizogénèse symbiotique " –la formation de ces racines modifiées-, sont identifiés et caractérisés grâce à des approches complémentaires de physiologie moléculaire et de biologie cellulaire.
La transformation génétique du filao est également utilisée comme outil pour caractériser les gènes de la plante. Les résultats de ces études permettront de comprendre les mécanismes qui conduisent à la modification d'une racine latérale en racine symbiotique. Ils laissent envisager une meilleure maîtrise des conditions de la rhizogénèse symbiotique du filao. L'identification et la caractérisation des gènes symbiotiques du filao conduiront à l'obtention de nouvelles symbioses plus performantes ou mieux adaptées aux stress de l'environnement.

Contact : Didier Bogusz, didier.bogusz@mpl.ird.fr

Les enjeux scientifiques de l'UMR se situent à trois niveaux :
- l'extension à des plantes pérennes cultivées des outils de la génomique structurale et fonctionnelle mis au point chez d'autres plantes, en particulier *Arabidopsis thaliana* et les espèces forestières,
- le développement des biotechnologies nécessaires à l'étude des mécanismes biologiques et à leur utilisation en amélioration génétique (manipulations génétiques et embryogenèse somatique),
- la prise en compte des méthodologies de modélisation, pour appréhender dans le temps et dans l'espace les relations entre le développement des plantes pérennes, leur fonctionnement et les mécanismes génétiques et moléculaires qui y sont liés.

Didier Bogusz, © IRD

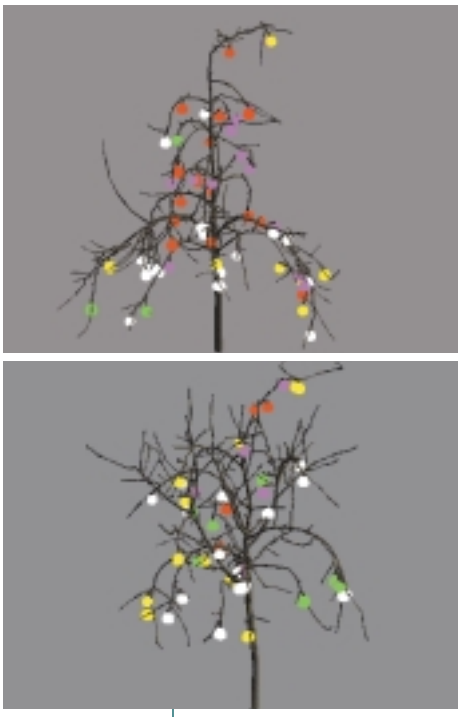
Étudier les gènes symbiotiques du filao pour obtenir des symbioses plus performantes.

Du gène
à l'architecture…

Ces recherches sont actuellement développées à trois niveaux complémentaires :
- le **niveau moléculaire** permet d'aborder l'identification des gènes intervenant dans les différentes phases de développement des plantes pérennes et la régulation de leur expression, l'utilisation de ces gènes pour comprendre l'architecture de ces espèces dans un souci d'amélioration et la description des mécanismes permettant la modulation de l'expression du génome.
- le **niveau cellulaire** permet d'appréhender la mise au point de systèmes de régénération *in vitro* en vue de l'étude des réponses morphogénétiques aux variations de l'environnement, l'identification des étapes importantes de la croissance, le rôle des régulateurs de croissance et la maîtrise des systèmes de transformation génétique adaptés aux plantes pérennes.
- le **niveau de la plante entière** est pris en compte par l'architecture et le schéma de développement des structures racinaires et raméales, en fonction des génotypes et des conditions environnementales, et par les relations entre les composantes architecturales et les mécanismes génétiques qui permettent l'expression et la régulation des gènes concernés.

Les espèces pérennes servant de support à ces études sont :
- des **espèces tempérées** : pommier (encart " *Architecture des arbres et qualité des fruits* ") et vigne, et, pour des thèmes spécifiques, abricotier, olivier et poirier ;
- des **espèces tropicales** : palmier à huile, Casuarina (encart " *Des gènes qui permettent aux arbres de fixer de fixer l'azote* "), cocotier, caféier et bananier, et, pour des thèmes plus spécifiques, hévéa (encart " *Des milliers d'arbres à caoutchouc nés en laboratoire* "), cacaoyer et *Eucalyptus*.

Architecture des arbres et qualité des fruits



Evelyne Coste, © INRA

Comparaison de l'architecture de deux pommiers de la variété Fuji, en fonction du mode de conduite (libre à gauche, conduite en Solaxe à droite). Incidence sur la répartition du calibre des fruits dans la couronne.

L'analyse architecturale des plantes, développée dans les années 60 en forêt intertropicale, est appliquée aux espèces fruitières tempérées par l'équipe " Architecture et Fonctionnement des Espèces Fruitières " de l'INRA et de l'Agro.M à Montpellier. Elle correspond à une **méthodologie d'observation de l'arbre,** celui-ci étant considéré dans sa totalité et au cours de son évolution dans le temps. Elle permet de reconstituer l'histoire de son développement à partir de marqueurs morphologiques. L'étude et l'analyse des règles de fonctionnement qui conduisent, d'une part, à l'édification des arbres d'une espèce donnée au moment de leur entrée en production et, d'autre part, au maintien d'une production régulière, ont constitué les objectifs principaux des travaux engagés sur ce thème.

Cette approche permet de proposer des **évolutions de modes de conduite,** fondées sur la connaissance approfondie des règles de croissance et de fructification des variétés. De plus, dans un contexte économique de surproduction, **l'obtention de fruits de qualité** revêt aujourd'hui un intérêt particulier. Aussi une meilleure compréhension de l'élaboration de la qualité des fruits est recherchée à partir de la connaissance du positionnement des fruits dans le feuillage et des caractéristiques du bois porteur. Cette approche tient compte des modes de conduite pratiqués, notamment la forme de l'arbre et l'éclaircissage. Dans cette démarche pluridisciplinaire interviennent des morphologistes, des physiologistes et écophysiologistes, des agronomes et des technologues de l'INRA. Au sein de l'UMR BDPPC, **l'étude du déterminisme génétique des principales composantes architecturales** constitue l'objectif prioritaire de l'équipe. Le but est d'approfondir la compréhension des mécanismes liés à l'architecture et au fonctionnement des plantes d'intérêt économique ou environnemental dans une perspective d'amélioration génétique. Cette étude sera développée sur le pommier par l'identification et la manipulation des gènes qui interviennent dans les différentes phases du développement et dans leur régulation et notamment de ceux qui sont impliqués dans la morphogenèse caulinaire ou racinaire. Elle nécessitera d'acquérir la maîtrise des systèmes de transformation génétique. A plus long terme, il s'agit **d'intégrer des caractères morphologiques liés aux composantes du rendement dans les schémas de sélection** et de permettre l'évolution des matériels sélectionnés vers des systèmes de culture plus intégrés, moins consommateurs en intrants et ayant un coût environnemental moindre.

Contact : Evelyne Costes, costes@ensam.inra.fr

Construire des *plantes résistantes à* la sécheresse ?

La recherche d'une meilleure adaptation des plantes au manque d'eau est un enjeu essentiel pour la production agricole dans les prochaines décennies. Les biotechnologies mais aussi la modélisation des régulations des plantes devraient permettre des progrès dans ce domaine.

L'équipe

L'unité mixte de recherche "Laboratoire d'écophysiologie des plantes sous stress environnementaux" (UMR LEPSE) est composée de 13 chercheurs provenant de l'Agro.M et de l'INRA.

Responsable : François Tardieu, tardieu@ensam.inra.fr, fax : +33 (0)4 67 52 44 43

Une production agricole importante nécessite obligatoirement un minimum d'eau : chez les plantes, photosynthèse et croissance ne sont possibles que s'il y a transpiration. En effet, le gaz carbonique pénètre dans les feuilles par des pores microscopiques, les stomates. C'est par ces mêmes stomates que l'eau est transpirée en grande quantité (jusqu'à trois fois le poids de la plante un jour d'été). Si la plante ne peut pas prélever cette quantité d'eau, elle est obligée de ralentir sa transpiration en fermant ses stomates et en réduisant sa croissance foliaire. Ceci évite la déshydratation mais réduit aussi la photosynthèse. Cet échange "eau contre carbone" restera inévitable quel que soit le progrès génétique.

Tolérance à la **sécheresse :** *un déterminisme* **pluri-factoriel**

La recherche de la tolérance à la sécheresse consiste donc à optimiser la photosynthèse, la croissance et le développement des plantes afin d'obtenir une production maximale avec une quantité donnée d'eau. La stratégie d'amélioration ne peut donc être la même que celle suivie pour d'autres caractères comme la résistance à une maladie ou à un herbicide qui dépend du transfert d'un ou de quelques gènes. En effet :

- le climat est variable suivant les années et les lieux ; un génotype •••

F.Tardieu, © INRA

Sécheresse et vitesse de croissance des feuilles

Variabilité génétique naturelle de la réponse de la vitesse de croissance foliaire au déficit hydrique de l'air et du sol

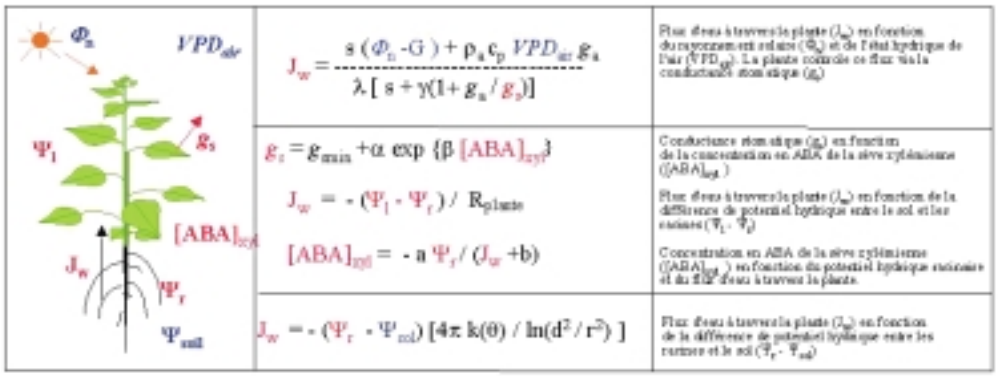
Un modèle a été établi, qui rend compte des réponses de la vitesse de croissance foliaire à l'état hydrique du sol, à l'humidité de l'air et à la température du méristème. Ce modèle a été testé tant au laboratoire qu'au champ, en mettant en relation les conditions environnementales mesurées avec la vitesse de croissance (photo). Maintenant la variabilité génétique des réponses est évaluée à chaque condition environnementale sur 100 lignées recombinantes de maïs, ce qui permet d'associer des allèles de gènes à chaque réponse environnementale.

Contact : Bertrand Muller, muller@ensam.inra.fr

Prévoir les effets d'une transgénèse

Modélisation de l'effet d'une transformation génétique sur la transpiration et l'état hydrique de plantes en déficit hydrique

F. Tardieu et T. Simonneau, © INRA



Modèle de contrôle de la transpiration des plantes.
Les variables environnementales (ressenties par la plante) figurent en bleu (Φ_n, rayonnement solaire, VPD_{air}, état hydrique de l'air, Ψ_{sol}, potentiel hydrique du sol).
Cinq variables ajustées par la plante figurent en rouge (g_s, conductance stomatique, $[ABA]_{xyl}$, concentration en acide abscissique de la sève xylémienne, Ψ_r et Ψ_l, potentiels hydriques dans les racines et dans les feuilles, J_w, flux d'eau à travers la plante. Ces cinq variables sont calculées à chaque instant au moyen des cinq équations.
Les paramètres (en noir) représentent soit des constantes physiques, soit des caractéristiques du génotype étudié.

Des plantes de *Nicotiana plumbaginifolia* ont été transformées sur un gène impliqué dans la synthèse de l'acide abscissique (ABA). Les plantes déficientes perdent toute capacité à fermer leurs stomates. Des plantes plus ou moins affectées sur cette enzyme ont été soumises à des déficits hydriques variables ou ont été greffées sur des plantes sauvages ou alimentées en ABA artificiel. Tous les comportements des transformants à toutes les conditions testées peuvent être prévus au moyen d'un modèle unique (cf. illustration), ne variant que sur le paramètre de vitesse de synthèse de l'ABA.

Contact :Thierry Simonneau, simonneau@ensam.inra.fr

résistant à un scénario de sécheresse ne l'est pas nécessairement à un autre. L'évaluation d'un génotype par une stratégie purement expérimentale nécessiterait donc des dizaines d'années, ce qui, pour des raisons pratiques et économiques, est difficilement envisageable.

▪ la recherche d'un optimum est plus complexe que la recherche d'un caractère qualitatif et met en cause la stratégie personnelle de l'agriculteur. Au moment de choisir un génotype, celui-ci peut privilégier soit un rendement potentiel maximum associé à un risque élevé de perte totale du rendement, soit un maximum de protection contre les risques associé à un plus faible rendement potentiel.

Les travaux menés par l'UMR LEPSE (Laboratoire d'écophysiologie des plantes sous stress environnementaux) visent donc à construire et évaluer des génotypes ayant des réponses contrastées à plusieurs scénarios de déficit hydrique, depuis une réponse faible (maintien de la photosynthèse, de la croissance et de la transpiration : maximiser le rendement potentiel au prix d'un risque maximum) jusqu'à une réponse maximum (mise en place de protections, réduction du risque, réduction du rendement potentiel). Pour cela la recherche de gènes d'intérêt est combinée avec la modélisation. Quatre approches sont entreprises :

▪ **L'exploration de la variabilité génétique naturelle de la réponse de la croissance et du développement au déficit hydrique du sol et de l'air** (maïs *Arabidopsis thaliana*, dactyle). La combinaison de modèles de développement, de mesures micrométéorologiques et d'analyse génétique (recherche de QTL, *Quantitative Trait Loci*) permet d'identifier individuellement des allèles caractéristiques de la réponse à la température, aux conditions hydriques dans l'air et au déficit hydrique du sol (collaboration avec l'unité INRA de Génétique du Moulon et de Versailles). Une recherche du même type est menée pour explorer la variabilité génétique de la capacité de survie de génotypes de dactyles soumis à des déficits hydriques sévères. •••

Des plantes virtuelles pour simuler la résistance au stress

Modélisation de l'architecture du tournesol et d'Arabidopsis thaliana sous contraintes environnementales

L'outil de modélisation informatique est essentiel pour simuler les conséquences lointaines d'un stress et/ou d'une variation allélique sur le comportement d'une plante. Un programme est en cours pour représenter en temps réel les réponses adaptatives de génotypes de tournesol et d'*Arabidopsis* à des variations transitoires des conditions environnementales. Chez *Arabidopsis*, plusieurs écotypes sont comparés systématiquement quant aux paramètres du modèle d'architecture.

Contacts : Jérémie Lecoeur, lecoeur@ensam.inra.fr, Hervé Rey, rey@cirad.fr

© H. Rey, Cirad-AMAP et J. Lecoeur, INRA

Représentations tridimensionnelles de plantes d'Arabidopsis thaliana

- **l'analyse de l'expression des gènes associés aux adaptations chez des plantes soumises à des conditions environnementales connues** (maïs, *Arabidopsis*, dactyle)

Grâce aux progrès des mesures micrométéorologiques, ceci peut être fait au champ comme au laboratoire. L'analyse de l'expression des gènes se fait en collaboration avec l'UMR B&BMP (voir page 18). Elle concerne les ARNm (utilisation de *microarrays* ADNc) et les protéines (*western blots*, analyses d'activité). On cherche ainsi à établir des correspondances entre l'expression d'un gène et une variable quantitative dans plusieurs scénarios environnementaux (par exemple, expression d'un gène du cycle cellulaire et vitesse de division cellulaire).

- **la mesure systématique de l'ensemble des conséquences de la manipulation d'un gène sur les réponses d'un génotype aux conditions environnementales**

Parce que la plante est un système régulé, plusieurs variables caractérisant le phénotype sont en relation fonctionnelle. La modélisation permet d'analyser la complexité apparente des réponses pour les réduire aux caractères essentiels de chaque génotype. La principale expérience a porté sur la manipulation d'un gène impliqué dans la synthèse d'une hormone qui contrôle la transpiration et la croissance des plantes en déficit hydrique.

- **la modélisation du comportement d'un génotype donné dans un grand nombre de scénarios pédoclimatiques** (*Arabidopsis*, *tournesol*)

On fournit à un ordinateur les caractéristiques microclimatiques et les caractéristiques du génotype, il calcule la consommation en eau, la production de biomasse etc. Cette opération a un coût marginal faible, on peut donc simuler un grand nombre de scénarios et calculer les risques associés à un génotype.
Cette activité n'en est qu'à ses débuts, on n'arrive pas encore à établir une correspondance entre un gène et une simulation de rendement. En revanche, il est déjà possible d'établir cette correspondance pour des fonctions plus simples comme la transpiration ou la vitesse de croissance foliaire (en collaboration avec l'unité Cirad-INRA-AMAP).

Les interactions *plantes-parasites :*

des perspectives pour la protection intégrée

Les exigences accrues des consommateurs en matière de qualité des aliments et de préservation de l'environnement impliquent que l'on trouve des solutions aux nouvelles contraintes qui se posent à l'agriculture. Il est particulièrement important de développer des méthodes qui puissent limiter les recours aux traitements phytosanitaires, et favoriser le recours à des méthodes alternatives comme l'utilisation de la résistance variétale aux maladies et aux parasites. Ces recherches doivent s'accompagner du développement de méthodes d'aide à la décision.

L'équipe

L'unité mixte de recherche "Biologie et génétique des interactions plantes-parasites pour la protection intégrée" (UMR BGPI) comprend 25 chercheurs provenant de l'Agro.M, du Cirad et de l'INRA.

Responsable : Jean-Loup Notteghem, notteghem@ensam.inra.fr, fax : +33 (0)4 67 54 59 77

L'UMR Biologie et génétique des interactions plantes-parasites pour la lutte intégrée (BGPI) développe des recherches conduisant à la mise au point d'innovations favorables au développement de méthodes de **protection intégrée** en proposant la meilleure combinaison des moyens de lutte disponibles pour lutter contre les bioagresseurs. Ainsi sont mises en place des recherches qui visent à mieux comprendre les interactions entre les plantes et leurs parasites, tant au niveau des mécanismes d'interactions qu'à l'échelle des populations.

Les recherches fondamentales sur des modèles appropriés fournissent des approches et des outils qui permettent de progresser dans plusieurs domaines :

- la **génétique des populations,**
- l'étude **génétique des interactions,**
- la modélisation mathématique des fluctuations des populations. •••

J.-L. Notteghem, © INRA

Attaque de pyriculariose dans un dispositif d'évaluation variétale sur une variété résistante (au centre) et sur des variété sensibles (à droite et à gauche) de riz.

Le couple Riz-*Magnaporthe grisea* modèle d'étude

La pyriculariose causée par *Magnaporthe grisea* est la plus importante maladie fongique du riz: elle est le principal facteur limitant la production de riz, en particulier en Amérique Latine. La résistance d'une nouvelle variété est en général rapidement surmontée par le pathogène et le coût des fongicides est prohibitif pour une majorité d'agriculteurs.

Cette maladie constitue également un modèle d'étude sur lequel se sont impliquées de nombreuses équipes internationales. Une importante collection d'isolats a été constituée; elle est utilisée pour le développement d'études sur la structure des populations de *M.grisea* et sur leur évolution. Les travaux ont été conduits à diverses échelles: population mondiale, population européenne, population de Chine et populations fertiles d'Asie.

Les travaux sur les mécanismes d'interaction ont également été réalisés. De nouveaux gènes de résistance et de virulence ont été cartographiés et l'un des gènes d'avirulence a donné lieu à une collaboration avec une unité Aventis-CNRS (Centre National de Recherche Scientifique) qui a abouti au clonage d'un gène d'avirulence. Ce travail sera poursuivi pour de nouveaux gènes d'avirulence. Le clonage d'un gène de résistance est en cours. Les approches de génomique sont initiées pour l'identification et le clonage de gènes impliqués dans les mécanismes de défense du riz.

Contact : Didier Tharreau, tharreau@cirad.fr

Marbrure rouge de la canne à sucre provoquée par le Peanut Clump Virus (PCV)

P. Baudin, © Cirad-CA

Etudier les interactions seneçon du Cap – rouille pour élaborer des méthodes de lutte biologique

Senecio inaequidens, le seneçon du Cap, est une mauvaise herbe exotique envahissant les espaces naturels et les cultures, comme la vigne en Languedoc-Rousillon. Elle est en expansion dans toute L'Europe. Cette espèce est sensible à une rouille originaire d'Australie, *Puccinia lagenephora*, arrivée en France depuis une trentaine d'années. L'étude de la dynamique des populations, de la structure génétique de l'hôte et de son interaction avec la rouille est entreprise dans le but déterminer si l'épidémiologie et le type d'interaction hôte-parasite font de la rouille australienne du seneçon un agent possible pour une lutte biologique. Ce projet renforcera les collaborations déjà entreprises de l'UMR BGPI avec les antennes locales des laboratoires de recherche australiens (CSIRO[1]) et américain (USDA-ARS[2]) spécialisés dans la lutte biologique et membres associés d'Agropolis.

Jacques Maillet, © Agro.M

Attaque de Puccinia lagenephorae (rouille) sur Sénéçon du Cap

(1) CSIRO : Commonwealth scientific and industrial research organisation
(2) USDA-ARS : United States Departement of Agriculture Agricultural Research Services

Contact : Jacques Maillet, Agro-Montpellier,
maillet@ensam.inra.fr

Diagnostiquer les maladies virales

Le diagnostic des maladies virales est un objectif prioritaire qui nécessite de mener des études d'étiologie et de caractérisation. Le Cirad met au point des tests de détection sérologique ou moléculaire pour un grand nombre de micro-organismes attaquant les cultures de bananiers, canne à sucre, cacaoyer, cultures maraîchères, palmiers et cocotiers. Une activité de suivi technique des nouvelles méthodes de détection est continuellement conduite pour garantir la qualité des contrôles phytosanitaires effectués au Cirad au sein de services internationaux de quarantaine de la canne à sucre et d'indexation bananier (VIC-INIBAP[1]), en tenant compte du risque d'émergence de nouvelles souches virales, voire de nouveaux pathogènes. Par ailleurs, ces études visent à la mise en place de kits de diagnostic large pour une utilisation directe sur le terrain par nos partenaires.

M. Chatenet, © Cirad-CA

Peanut Clump Virus (PCV) infectant la canne à sucre

(1) VIC-INIBAP: Virus Indexing Center of the International Network for the Improvement of Banana and Plantain (centre d'indexation des virus du réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain)

Contact : Michel Peterschmitt, Cirad,
michel.peterschmitt@cirad.fr

Trois thèmes de recherche sont donc développés par l'UMR :

• **L'étude des mécanismes d'interaction** prend en compte l'analyse du pouvoir pathogène des agents responsables des maladies des plantes et l'analyse de la résistance des plantes. Les approches de cartographie et de clonage de gènes sont utilisées. La génomique des réactions de défense du riz est initiée sur la base du matériel généré par les équipes impliquées dans la Génopole végétale de Montpellier (voir page 16)

• **L'étude des facteurs d'épidémies virales transmises par insectes** est basée sur une étude spatio-temporelle des épidémies et une analyse des facteurs prédominants qui prend en compte différents volets : la biologie des vecteurs et l'étude de la vection, la diversité des populations virales, la résistance de l'hôte, l'effet du fractionnement géographique des régions de culture, l'analyse de l'effet de différentes méthodes de lutte. Ces travaux se font en collaboration étroite avec les agriculteurs et les instituts techniques travaillant dans ce domaine.

• **L'étude génétique des populations de champignons, de bactéries et de nématodes phytoparasites et de leurs interactions avec les cultivars résistants**
C'est un domaine qui connaît de nouveaux développements ; en effet, les outils moléculaires sont utilisés pour caractériser les populations d'agents pathogènes et connaître les mécanismes d'évolution génétique de ces populations. Les différents aspects des interactions plantes-agents pathogènes y sont abordés : l'étude de l'effet de la résistance de l'hôte sur la structuration des populations d'agents pathogènes, la caractérisation de leur pouvoir pathogène, l'étude et la caractérisation de la résistance des plantes .

Les applications des projets de recherche concernent le diagnostic des maladies des plantes ainsi que l'expertise sur la durabilité de la résistance et sur l'optimisation de sa gestion. Les résistances caractérisées sont utilisées par les généticiens des plantes. Ainsi son proposés des dispositifs visant à limiter les contaminations par les virus transmis par vecteur.

Diffusion de l'innovation

De la recherche à ses applications

Les semences et les plants améliorés sont les vecteurs traditionnels et privilégiés du transfert du progrès génétique vers les agriculteurs. Les biotechnologies végétales ont considérablement modifié ce processus en termes de rapidité et d'efficacité. Les équipes de recherche de la région Languedoc-Roussillon participent activement à la mise au point de ces nouvelles technologies : elles ont su développer des méthodes et des procédés dont l'ensemble est maîtrisé et disponible sur Agropolis. Certaines d'entre-elles ont pu être transférées dans des entreprises et à l'étranger

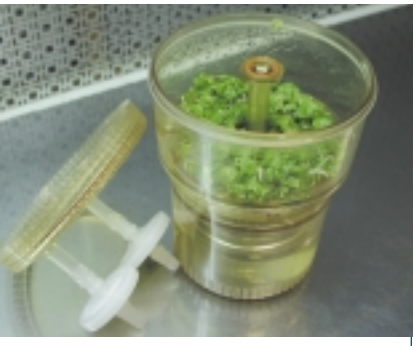
Faciliter la création *de nouvelles variétés*

La création de variété est une activité longue et coûteuse. De nombreuses techniques permettent aujourd'hui de faciliter et d'accroître les performances des méthodes traditionnelles. Nous présentons ici quelques-unes d'entre-elles.

• Les haplométhodes
L'utilisation de lignées pures est très souvent nécessaire dans les programmes d'amélioration visant à créer des hybrides. Alors que par les méthodes traditionnelles 8 à 10 ans sont nécessaires, les haplométhodes (haplo-diploïdisation) permettent d'obtenir très rapidement des variétés hybrides, en générant des lignées pures, en une seule génération.
Pour cela, des plantes possédant seulement une moitié du patrimoine génétique sont produites en cultivant des cellules sexuelles -ovules ou pollen- puis leur patrimoine génétique est doublé pour rétablir leur fertilité. C'est le croisement entre ces lignées pures qui est utilisé pour produire actuellement des hybrides de riz tropicaux ou tempérés, par exemple.

• Les fusions et les hybridations somatiques
L'échange de matériel génétique entre différentes variétés lors de la reproduction constitue une source importante de variabilité mais certaines espèces montrent des difficultés à s'hybrider et sont donc difficiles à améliorer par les méthodes classiques. Les fusions et les hybridations somatiques permettent de mélanger en laboratoire les structures génétiques et cytoplasmiques de plantes grâce à la technique de fusion de protoplastes augmentant ainsi la diversité génétique de certaines espèces.

Marc Lartaud (© Cirad-Amis, Biotrop)



Appareil RITA contenant des vitroplants de café

RITA, un appareil qui facilite la culture in vitro

La culture *in vitro* doit permettre de multiplier en routine des milliers de " copies conformes " d'une plante, à partir d'un simple fragment de tissus de la plante mère.
Ce procédé est réalisé grâce à l'utilisation de mélanges complexes contenant sels minéraux, sucres, acides aminés, vitamines, régulateurs de croissance… Bien que l'utilisation du milieu liquide soit considéré comme une technique idéale pour la production de masse de vitroplants, on assiste souvent à des problèmes de vitrification et de désordre physiologique (asphyxie) provoqués par la présence de résidus dans le milieu. On sait depuis longtemps que l'immersion temporaire permet de diminuer ces problèmes.

À partir de 1988, le laboratoire Biotrop du Cirad a travaillé sur l'utilisation de cette technique et la mise au point d'un appareil de manipulation simple et d'usage pratique : *Rita* (récipient à Immersion Temporaire Automatisé). Cet appareil, constitué de deux compartiments, permet de profiter des avantages du milieu liquide sans en avoir les inconvénients puisque le contact du matériel végétal avec le milieu liquide n'est que temporaire. De plus, sa conception et ses dimensions font qu'il est facilement manipulable par ses utilisateurs. Il est actuellement utilisé pour les différentes techniques de micropropagation et sur un grand nombre de plantes et, notamment, pour la micropropagation d'hybrides sélectionnés de *Coffea arabica.*

Contact : Marc Berthouly, marc.berthouly@cirad.fr
UMR BDPPC (page 22)
Site : http://www.cirad.fr/produits/rita/fr/accueil.htm

A Agropolis, cette technique est utilisée chez les agrumes.

• La sélection assistée par marqueurs
Pour s'assurer qu'un hybride cultivé a bien récupéré le ou les gène(s) à l'origine de la caractéristique agronomique recherchée, il faut classiquement passer par des tests en champ qui sont difficiles et souvent longs à réaliser. La génétique moléculaire permet d'identifier et de localiser les gènes, et maintenant, de les repérer et de les suivre au cours des opérations de croisement et de sélection, grâce à l'association de ces gènes à des marqueurs moléculaires. Cette technique permet ainsi de concentrer les caractères les plus intéressants et d'éviter de les perdre au cours de ces opérations. Ce procédé, d'abord mis en oeuvre pour les caractères simples, est de plus en plus utilisé pour les caractères quantitatifs, plus difficiles à manipuler.

• Le transfert direct de gènes par transgénèse
Alors que le transfert d'un caractère agronomique à un hybride est particulièrement long et difficile par les voies naturelles, il est aujourd'hui possible de transférer le gène contrôlant cette caractéristique directement dans la plante cultivée par transgénèse.
Cette méthode dont les premières applications font l'objet de controverses en Europe en est à ses débuts et reste largement à découvrir. On s'oriente de plus en plus vers le transfert d'un caractère intéressant d'une plante de la même espèce ou d'une espèce voisine dans les variétés sélectionnées. •••

Vitropic : un laboratoire de production de vitro-plants d'espèces tropicales en Languedoc Roussillon

Yvan Matthieu, © Vitropic S.A.

L'utilisation de vitroplants de bananier permet d'obtenir des rendements plus élevés avec moins de pesticides.

Vitropic S.A., filiale du Cirad, est un laboratoire de production de vitro-plants (plants obtenus par culture *in vitro*) installé près de Montpellier, à St Mathieu de Tréviers. Avec un chiffre d'affaires annuel de 7 MF, cette entreprise créée en 1986 emploie 15 salariés et produit 2 à 3 millions de vitro-plants par an, surtout des bananiers, diffusés principalement aux Antilles et en Afrique. Grâce à son activité, Vitropic occupe une place de leader sur ces marchés étrangers et a fait du site de production une des capitales de la production de plants de bananiers.

Un exemple de " biotechnologie" pour produire mieux
La fabrication des vitro-plants ne fait pas intervenir de techniques de transformation génétique mais celle de la culture de tissus. Il s'agit en fait d'obtenir en éprouvettes, de façon accélérée, la multiplication de plantes sélectionnées pour leurs caractéristiques agronomiques. Les plants de bananiers miniatures, produits en conditions protégées de laboratoire, sont indemnes de maladies et sont expédiées depuis Montpellier sur les zones de production. Leur utilisation comme matériel de plantation permet de "produire mieux" ; en effet, grâce à l'utilisation sur des sols sains de ces vitro-plants indemnes de " nématodes " (des parasites du sol), on obtient des rendements plus élevés avec moins de pesticides. Les vitro-plants sont donc, dans le cas du bananier, une des voies clés pour le développement d'une culture plus respectueuse de l'environnement.

Une nécessité d'innovation permanente
Pour développer son savoir-faire, améliorer et diversifier ses produits, Vitropic doit innover en permanence et consacrer une part de ses activités à des actions de recherche et de développement. L'entreprise trouve dans le pôle Agropolis, et en particulier au Cirad, un environnement favorable et des partenaires scientifiques et techniques de choix pour poursuivre ses objectifs. Ajoutons enfin que, tout en maintenant l'essentiel de ses activités dans la région Languedoc-Roussillon, Vitropic développe des collaborations avec de nombreux partenaires des pays du Sud.

Contact : François Cote, Cirad, francois.cote@cirad.fr

Reproduire à grande échelle les palmiers les plus interéssants pour fixer les caractères agronomiques les plus utiles

Yves Duval, © IRD

Culture *in vitro* du palmier à huile et reproduction conforme

Le palmier à huile constitue la première source de corps gras d'origine végétale de la zone intertropicale humide. Avec une production annuelle de l'ordre de 20 millions de tonnes, elle représente environ 20 % de la production mondiale d'oléagineux. Pour cette plante à reproduction croisée obligatoire et uniquement propagée par graine, les techniques classiques de multiplication végétative (bouturage, rejets, greffe) n'existent pas. Le mode de reproduction et les délais nécessaires à l'amélioration génétique entraînent une hétérogénéité importante dans les plants issus des semences sélectionnées disponibles pour les planteurs. De ce fait, la maîtrise d'un procédé de multiplication végétative faisant appel aux techniques de biologie cellulaire et capable de reproduire à grande échelle et de façon conforme les individus les plus intéressants permet de fixer les caractères agronomiques les plus utiles. Un procédé de multiplication et de régénération à grande échelle utilisant le phénomène d'**embryogenèse somatique** a été développé en collaboration par l'IRD et le Cirad au début des années 80. Il a été transféré dans les principaux pays producteurs (Côte d'Ivoire, Malaisie, Indonésie) pour être testé à l'échelle pilote. Ces travaux, avec la plantation de plusieurs centaines de milliers de palmiers régénérés *in vitro* et l'identification de plusieurs clones entraînant un gain de production de 20 à 30%, ont permis de valider l'intérêt de cette démarche. Ils ont aussi permis de déterminer l'existence de palmiers " hors-type ", stériles, résultant de la technique de régénération. Ce phénomène appelé **variation somaclonale** fait actuellement l'objet d'études approfondies, en relation avec des équipes de recherche du Royaume-Uni et de Malaisie, en utilisant des approches moléculaires mettant en jeu des techniques de pointe disponibles à Agropolis, en particulier grâce à la Génopole montpelliéraine (voir page 16).

Contact : Yves Duval, Cirad-IRD, yves.duval@mpl.ird.fr, UMR BDPPC (page 22)

Les techniques de multiplication

La culture de plantes in vitro sur un milieu nutritif stérile est déjà ancienne et largement répandue en ce qui concerne le microbouturage ou le microgreffage. D'autres techniques sont en cours d'amélioration, par exemple :

• Le sauvetage d'embryons
Les espèces voisines mais peu compatibles peuvent parfois se croiser mais l'embryon qui en résulte est souvent peu viable ou n'arrive pas à se développer au-delà d'un certain stade. Or, ce type de croisement pourrait permettre d'améliorer les variétés cultivées.
Le sauvetage d'embryons permet d'obtenir des hybrides à partir des premières cellules issues d'un croisement entre espèces " non-compatibles " : leur récupération à un stade précoce, peu de temps après la fécondation, permet de les cultiver et, ainsi, de les sauver. Cette technique a notamment été utilisée pour les agrumes et pour le riz.

• L'embryogénèse somatique
C'est une forme de multiplication végétative qui permet d'obtenir une multitude de plantules identiques génétiquement à la plante mère donneuse d'explants. Elle permet de reproduire à l'identique un individu en millions d'exemplaires à partir d'un fragment de feuille ou de tige. C'est une technique très prometteuse car elle permet des taux de multiplication énormes. Elle est également encore utilisable dans les systèmes de transgénèse. Elle est surtout utile lorsque la plante ne possède pas de multiplication végétative naturelle (palmier à huile, cocotier...). Malgré certaines difficultés techniques qui existent, des centaines de milliers de plants de palmier mais aussi d'hévéa, de cotonnier, de bananier ont été produits, à Montpellier, par ce procédé.

L'ensemble de ces techniques nécessitent des équipements nouveaux adaptés aux procédés et aux réglementations. Les équipes d'Agropolis, à travers leurs travaux de recherche, ont été amenées à inventer ou à adapter ces équipements.
C'est le cas des récipients RITA® (voir page 32 "*Rita, un appareil qui facilite la culture in vitro*") conçus pour permettre une meilleure croissance des cultures in vitro.
D'autres équipements ont été mis au point en collaboration avec des petites et moyennes entreprises locales, comme les serres de confinement ou les salles de cultures dont plusieurs exemplaires ont été construites en Afrique et en Asie. Il existe dans ce domaine, à Agropolis et dans son environnement, un savoir-faire, en particulier en matière d'ingénierie in vitro qui peut être largement valorisé.

Contact : Jacques Meunier, Cirad, jacques.meunier@cirad.fr

La formation *à Agropolis*

Agropolis est un des grands pôles français et européen de formation dans le domaine de l'agronomie et du développement agro-alimentaire et rural. Au sein de cet ensemble, les universités de Montpellier II et de Perpignan ainsi que l'Agro de Montpellier (Agro.M) assurent de nombreuses formations dans le domaine de la génomique végétale, des ressources génétiques et des biotechnologies, à différents niveaux.

Les formations diplomantes

Niveau		Diplôme	Intitulé de la formation	Etablissement	Responsable
Bac + 3	2ème cycle	Licence	Biologie mention Biologie Cellulaire et Physiologie végétale appliquée	UM II	Yves Sauvaires
Bac + 4	2ème cycle	Maîtrise	Biologie mention Biologie Cellulaire et Physiologie végétale appliquée	UM II	Francine Casse
	Ingéniorat	Modules spécialisés	Etude de la conservation de la biodiversité : la diversité génétique des organismes	Agro.M	André Charrier
			Apport des biotechnologies pour la filière semences et plantes	Agro.M	Dominique This
			L'agriculture sous certification : exemple de la protection intégrée des cultures	Agro.M	Jean-Loup Notteghem
Bac + 5	Formations professionnalisantes	DESS	Génétique, génomique et technologie avancée dans le domaine végétal	UM II	Michel Lebrun
		DAA	Ingénierie de la production végétale: semences et plants	INA-PG / Agro.M / INH	André Charrier
Bac + 5 à 8	Formations doctorales	DEA (bac+5) Doctorat (bac+8)	Ressources phytogénétiques et Interactions biologiques	UM II / Agro.M	J.-L. Notteghem Isabelle Oliviéri
			Développement et adaptation des plantes	UM II / UP / Agro.M	Michel Lebrun Michel Delseny Claude Grignon
			Biologie évolutive et écologie	UM II / Agro.M	Bernard Delay Jacques Maillet

Glossaire

Agro.M : *Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier (ENSA.M)*
DAA : *Diplôme d'Agronomie Approfondie*
DEA : *Diplôme d'Etudes Approfondies*
DESS : *Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées*
DEUG : *Diplôme d'Etudes Universitaires Générales*
INA-PG : *Institut National Agronomique – Paris Grignon*
INH : *Institut National d'Horticulture (Angers)*
UM II : *Université Montpellier II*
UP : *Université de Perpignan*

Le système d'enseignement *supérieur français en évolution*

Système français			Système international
		Baccalauréat	Fin de la " high school "
DEUG		Bac+1 +2	BSc
Licence		+3	
Maîtrise		+4	MSc
DESS	DEA	+5	
	Doctorat	+6 +7 +8	PhD

La réforme de l'enseignement supérieur français engagée fin 1998 a pour objectif d'organiser les cursus de formation pour leur harmonisation au sein de l'espace européen, avec 3 niveaux principaux de diplômes : licence (Bac+3), master (Bac+5) et doctorat (Bac+8). Le cursus post-licence se différencie en une voie courte débouchant sur une insertion professionnelle à Bac+5 et une voie longue correspondant aux études doctorales.

Alain Rival, © IRD-Cirad-CP

La formation continue

▪ **Les formations à la carte**

Pour répondre à des demandes collectives ou individuelles, Agropolis peut organiser des sessions spécifiques construites sur mesure : séminaires, stages en laboratoire, formations de terrain, formations de formateurs, ... Selon la demande et le contexte, ces formations peuvent se dérouler à Montpellier ou à l'extérieur.

Pour tout renseignement sur les formations à la carte, consulter le site

http://www.agropolis.fr/formation/servicesfc.html

Remarque : les modules de formations doctorales et professionalisantes sont accessibles à la formation continue.

▪ ***"Introduction à la biologie moléculaire"***, formation d'une semaine ouverte aux bac + 2. (Lieu : campus de l'Agro.M)

Responsable : Philippe Joudrier,

joudrier@ensam.inra.fr.

Formation scientifique en biologie moléculaire (France/Afrique) Montpellier

L'Ecole doctorale "Biologie intégrative"

L'Ecole doctorale (ED) regroupe l'ensemble du cursus d'études, de formation et de recherche qui conduit à la thèse de doctorat. Ce cursus débute par l'année de DEA (B+5) et se prolonge par des compléments de formation apportés sous forme de séminaires et conférences scientifiques, de modules de formation pendant les 3 années de préparation de la thèse. Ces modules ont pour but d'améliorer la formation scientifique des doctorants et de mieux préparer leur avenir professionnel.

L'Ecole doctorale " Biologie intégrative " rattachée à l'UM II s'intéresse à l'intégration des processus biologiques et aux interactions dans les systèmes biologiques pour répondre aux enjeux de la conservation de la biodiversité, de la protection de l'environnement, du développement durable en agriculture et de l'essor des biotechnologies. Les 6 thèmes scientifique prioritaires de cette ED sont :

• Biodiversité, mécanismes de l'évolution, ressources génétiques.
• Génomique : structuration et organisation du génome, fonctions des gènes et régulations, génomique fonctionnelle.
• Interactions hôtes-parasites et hôtes symbiotes.
• Ecologie des populations, des communautés et des écosystèmes ; changements globaux.
• Physiologie et écophysiologie des relations plantes-milieu biotique et abiotique.
• Mathématiques et informatique appliquées aux systèmes et processus biologiques.

L'Ecole doctorale " Biologie intégrative " est constituée de 7 formations doctorales habilitées à délivrer le DEA qui accueillent 75-80 étudiants par an. Avec un flux de 60 nouveaux inscrits/an, l'Ecole doctorale gère près de 200 doctorants. Ils sont accueillis dans une trentaine d'unités mixtes de recherche, rattachées à l'enseignement supérieur (UM II / Agro.M), dépendant des instituts de recherche Cirad, CNRS, INRA, IRD du site de Montpellier.

Les formations doctorales sont plus particulièrement orientées vers le thème des biotechnologies végétales, de la génomique et des ressources génétiques :

- DEA " Ressources Phytogénétiques et Interactions Biologiques ",
- DEA " Développement et Adaptation des Plantes ",
- DEA " Biologie évolutive et Ecologie " .

Accueil des étudiants et stagiaires étrangers

Afin d'améliorer leur condition de séjour, Agropolis renseigne et oriente les étudiants et stagiaires étrangers pour :
- les formalités d'obtention des titres de séjour,
- la recherche d'un logement,
- les demandes d'allocation logement,
- les aspects pratiques de la vie étudiante (restauration, transports, activités culturelles…)

Agropolis propose également, dans le cadre de certains cursus de spécialisation, un module d'accueil personnalisé pour étudiants étrangers. Un ensemble de services associés à la formation choisie par l'étudiant comprend au sein d'une phase préparatoire :
- des cours de français,
- une période de stage en laboratoire,
- des cours complémentaires (pré-requis) définis avec le responsable de la formation,
- un tutorat personnalisé.

J.-L. Porreye, © Agro.M

Etudiants en formation dans la collection de vigne de l'Agro.M

Quelques chiffres…

- Nombre de thèses réalisées dans le domaine Biotechnologies végétales, Génomique et Ressources génétiques : 20-25 par an.
- Stocks d'étudiants : 75 thésards, 30 DEA, 15 DESS, 15 DAA soit un total de 135 personnes en 3ème cycle.

Contact et coordonnées

- DEA et Ecole doctorale Biologie Intégrative :
André Charrier, Agro.M, acharrie@ensam.inra.fr
fax : +33 (0) 4 67 04 54 15
- Formation continue et accueil des étudiants et stagiaires étrangers : http://www.agropolis.fr,
rubrique "formation", agropolis@agropolis.fr,
fax : +33 (0)4 67 04 75 99

Cette publication a été réalisée avec le soutien de l'Etat et de la Region Languedoc-Roussillon.

Les organismes membres d'Agropolis impliqués dans le domaine des ressources génétiques de la génomique et des biotechnologies végétales :

AGRO Montpellier (Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier)
2, Place Pierre Viala
F-34060 Montpellier Cedex 1
Tél : +33 (0)4.99.61.22.00
http : //www.ensam.inra.fr

CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement)
2477, avenue Agropolis - BP 5035
F-34032 Montpellier Cedex 1
Tél : +33 (0) 4 67 61 58 00
http : //www.cirad.fr

CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique)
Route de Mende
F-34293 Montpellier Cedex 5
Tél.: +33 (0)4 67 61 34 34
http://www.dr13.cnrs.fr/

INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)
2, Place Viala
F-34060 Montpellier Cedex 1
Tél : +33 (0) 4 99 61 22 00
http : //www.ensam.inra.fr

IRD (Institut de Recherche pour le Développement)
911, avenue Agropolis - BP 5045
F-34032 Montpellier Cedex 1
Tél : +33 (0) 4 67 41 61 00
http : //www.mpl.orstom.fr

Université Montpellier II (UM II)
Place Eugène Bataillon
F-34095 Montpellier Cedex 5
Tél : +33 (0) 4 67 14 30 30
http : //www.univ-montp.fr

Université de Perpignan
52, Avenue de Villeneuve
F-66860 Perpignan Cedex
Tél : +33 (0) 4 68 66 20 00
http : //www.univ-perp.fr

Directeur de la publication : Michel de Nucé de Lamothe

Réalisation : Véronique Molénat, Yves Savidan

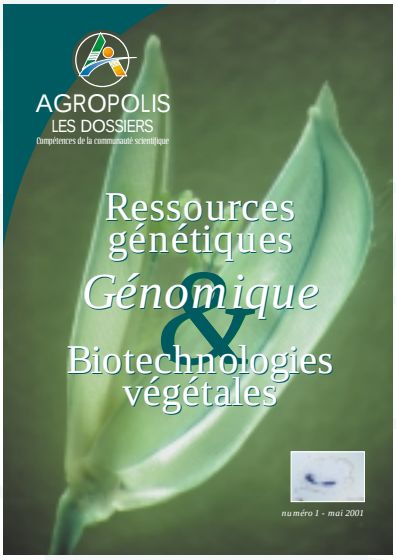
Coordonnateur scientifique : André Charrier

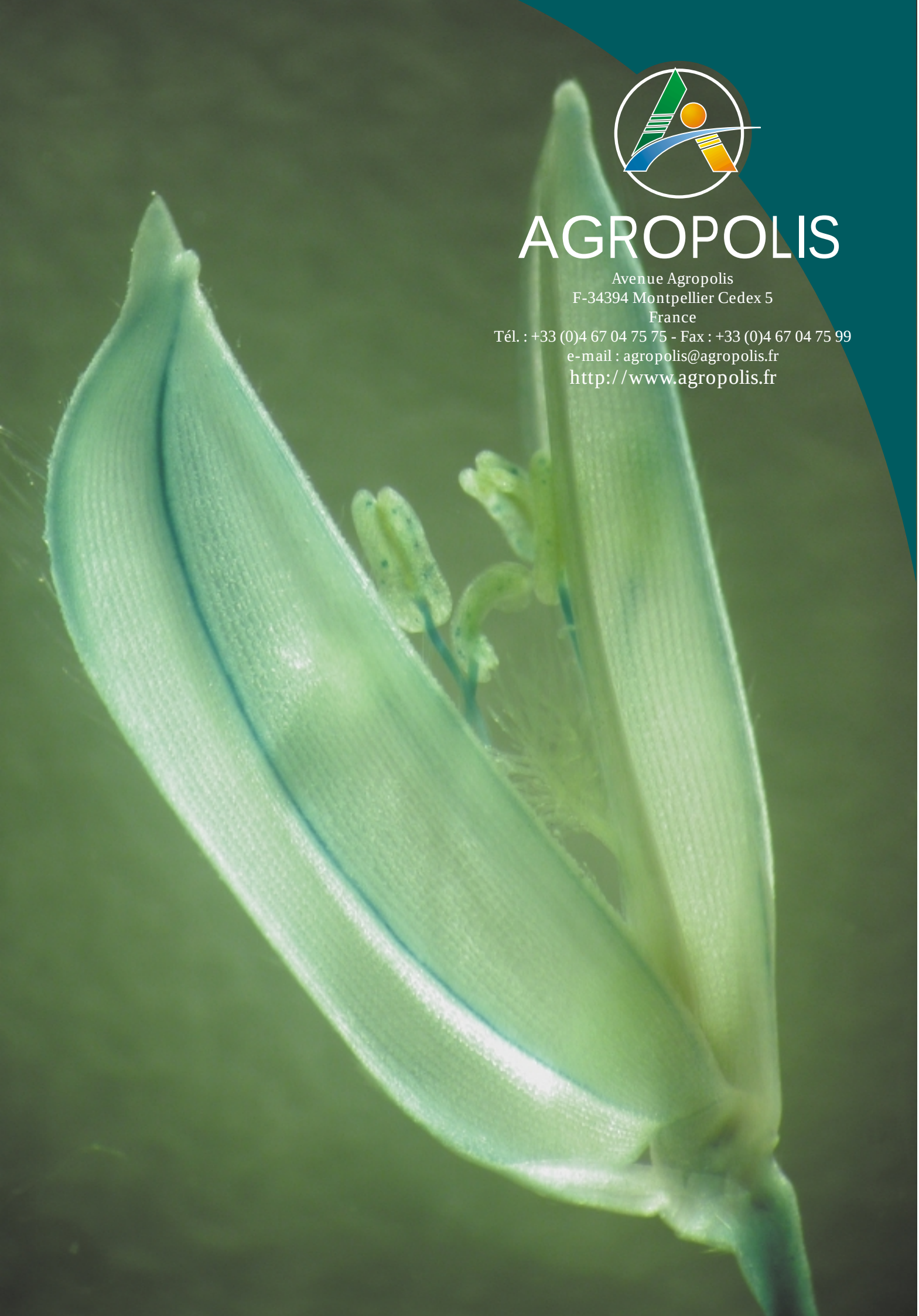
Ont participé à ce numéro : Marc Berthouly, André Bervillé, Didier Bogusz, Fabien Boulier, Jean-François Briat, Richard Cooke, Evelyne Coste, François Cote, Michel Delseny, Martine Devic, Angélique D'Hont, Françoise Dosba, Stéphane Dussert, Yves Duval, Manuel Echeverria, Alain Ghesquière, Marc Giband, Jean-Christophe Glaszmann, Alain Gojon, Claude Grignon, Serge Hamon, Emmanuel Guiderdoni, Philippe Joudrier, Pierre Lagoda, Ludovic Lardet, Jérémie Lecoeur, Jacques Maillet, Jacques Meunier, Yves Meyer, Bertrand Muller, Jean-Loup Notteghem, Michel Peterschmitt, Jean-Claude Prot, Hervé Rey, Michel Rossignol, Marc Seguin, Hervé Sentenac, Thierry Simonneau, François Tardieu, Didier Tharreau, Patrice This.

Remerciements pour les photos : Bernard Marin, Danièle Cavanna, Sémiha Cebti, Jean-Pierre Grouzis, Thierry Lacombe, Marc Lartaud.

Mise en page : Design Publicis Méditerranée

Impression : IMP'ACT imprimerie





AGROPOLIS
Avenue Agropolis
F-34394 Montpellier Cedex 5
France
Tél. : +33 (0)4 67 04 75 75 - Fax : +33 (0)4 67 04 75 99
e-mail : agropolis@agropolis.fr
http://www.agropolis.fr