



AGROPOLIS

LES DOSSIERS

Compétences de la communauté scientifique

Ressources
génétiques
Génomique
&
Biotechnologies
végétales



numéro 1 - mai 2001

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-FIhor



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* (génomme A) et *Musa balbisiana* (génomme 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 Hsu, © 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. Chausseine, © 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 descendance, 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 descendance 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.

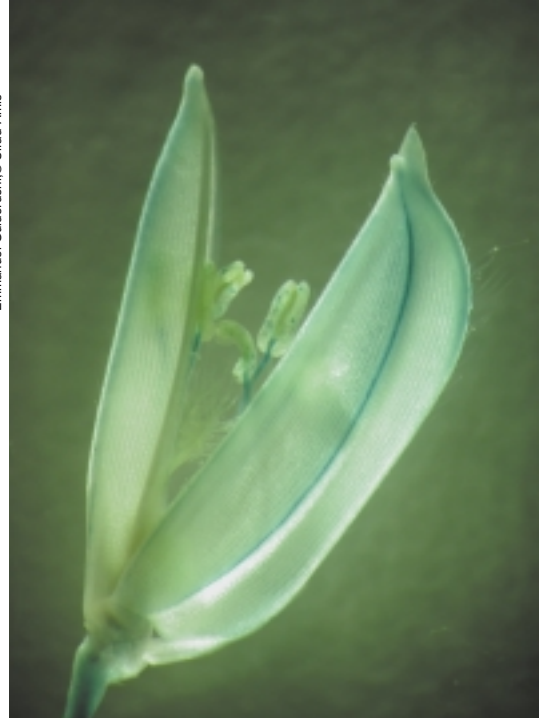
- **la cartographie physique du génome** consiste à construire une réplique d'un génome entier sous la forme de grands fragments d'ADN clonés (à l'intérieur des bactéries dans le cas des clones BAC, *Bacterial Artificial Chromosome*), et ordonnés les uns par rapport aux autres. Cette cartographie sert 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 Génomique 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, embryogénèse...) 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 mutagenèse 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 modifica-

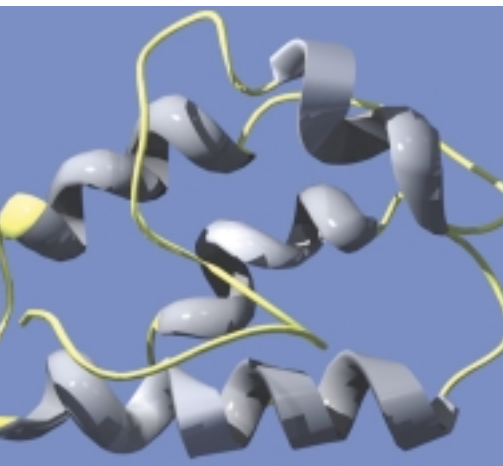
tion de son expression dans la plante ;

- **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.

Frédéric 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 matura-

tion. 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.

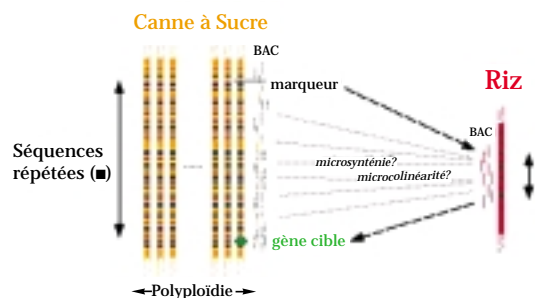
En fonction des propriétés rhéologiques de ce gluten, on obtiendra des pains plus ou moins développés après fermentation. Si de nombreuses liaisons chimiques interviennent, un rôle tout particulier est attribué aux liaisons disulfures. Elles joueraient en effet un rôle essentiel dans l'élasticité de 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

J.C. Glaszmann, © Cirad-Amis