

Présentation des projets financés au titre de l'édition 2008 du
 Programme « Knowledge Based Bio Economy »

ACRONYME et titre du projet	Page
ALGALGLYCO : A new scenario for the production of recombinant proteins in algae. Exploiting a native pathway for targeting glycoproteins to the algal chloroplast	2
BALANCE : Activities of small metabolites in balancing plant responses to environmental stress and productivity	4
BOTBANK : Creation of a mapped database of Botrytis cinerea T-DNA transformants allowing pathogenic development and plant defense studies	6
CELLWALL : Uncovering regulatory modes for secondary Cell wall synthesis as means for improving biomass saccharification	8
CORNFED : Integration of advanced mapping and phenotyping methods to identify key alleles for building European maize ideotypes	10
FOSI : Phosphate signalling	13
FRAGENOMICS : Genetical genomics for improving strawberry fruit nutritional quality	15
GRAPERSEQ : Large scale re-sequencing in the Vitis for identification of resistance genes, SNP discovery and high throughput genotyping	17
HOT IRON PLANT : Homeostasis and transport of iron improving plant productivity and growth	19
SEPSAPE : Safe and efficient plant systems for antimicrobial peptide production	21
STREG : Novel knowledge based abiotic stress regulator	23
TRANSNET : Transcriptional networks and their evolution in the Brassicaceae	25

A new scenario for the production of recombinant proteins in algae. Exploiting a native pathway for targeting glycoproteins to the algal chloroplast

Résumé

Depuis une quinzaine d'années, les plantes transgéniques constituent un système d'expression intéressant pour produire des protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique. En effet, elles sont capables de produire, dans leur système endomembranaire, des molécules recombinantes et notamment des glycoprotéines qui représentent 70% des protéines thérapeutiques. Différentes études menées dans notre laboratoire ont permis de montrer que ces anticorps recombinants sont glycosylés par des N-glycannes complexes spécifiques des végétaux, qui empêchent l'utilisation thérapeutique de ces glycoprotéines puisque celles-ci sont allergènes et immunogènes chez l'homme.

Pour cette raison et afin de prendre en considération leurs faibles rendements et le risque potentiel de dissémination de gènes dans l'environnement lors de l'utilisation des plantes transgéniques, il est important d'identifier et de caractériser un nouveau système de production végétal.

Ainsi, nous proposons d'évaluer la possibilité de produire des protéines recombinantes à intérêt thérapeutique dans les microalgues. En effet, ces eucaryotes présentent l'avantage d'être cultivables en bioréacteurs dans des milieux de culture peu coûteux. Au préalable, il est nécessaire de faire un état des lieux concernant la capacité des microalgues à glycosyler les protéines.

Dès lors, nous proposons d'étudier les processus de N-glycosylation chez une algue verte modèle, *Chlamydomonas reinhardtii* en analysant d'une part, précisément les structures des N-glycannes associés aux protéines endogènes totales et plastidiales et, d'autre part, en travaillant sur la caractérisation de la voie de biosynthèse de ces structures par des approches *in silico* et génomiques.

Parallèlement, nous offrons d'étudier l'existence chez *Chlamydomonas reinhardtii*, d'une voie de trafic cellulaire des protéines entre le système sécrétoire et les chloroplastes à l'instar des récentes découvertes faites chez les plantes supérieures (Villajero et al., 2005) par Arsénio Villajero, coordinateur de ce projet. Dans cette voie, les protéines entrent dans le réticulum endoplasmique, y subissent des étapes de N-

glycosylation, transitent à travers l'appareil de Golgi avant d'être adressées aux chloroplastes. L'objectif de cette partie du projet est d'identifier les signaux peptidiques responsables de cet adressage chloroplastique des protéines de la voie sécrétoire. Les glycoprotéines accumulées dans les chloroplastes de *Chlamydomonas reinhardtii* seront identifiées par une approche protéomique. Une comparaison entre les séquences des glycoprotéines candidates permettra de déterminer les séquences protéiques à l'origine de ce trafic cellulaire. Cette identification des signaux contrôlant le trafic cellulaire entre le système endomembranaire de sécrétion et le chloroplaste ouvrira la porte à la production, dans les chloroplastes d'algues, de glycoprotéines pharmaceutiques.

Finalement, forts de nos résultats sur la N-glycosylation et les signaux d'adressage chloroplastique, nous exprimerons puis analyserons une glycoprotéine recombinante dans le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Partenaires

Université Rouen - Muriel Bardor
Universidad de Madrid- Arsenio Villarejo (**coordinateur KBBE**)
University Umea- Goran Samuelsson
University of Munster- Michael Hippler
Algenics- Morgan Cabiglieria

Coordinateur

Muriel BARDOR – Université de Rouen
muriel.bardor@univ-rouen.fr

Aide de l'ANR
Début et durée
Référence
Label pôle

162 k€
36 mois
ANR-08-KBBE-001

Résumé

Une contrainte fondamentale sur la productivité de l'agriculture est la sensibilité des plantes supérieures aux stress biotiques de l'environnement. L'infection des plantes par des agents pathogènes limite la croissance et le rendement, et crée des problèmes de santé et d'environnement. La demande globale croissante pour une production alimentaire durable et le besoin de réduire l'apport de pesticides conduisent à la recherche d'alternatives complémentaires pour le contrôle des maladies des plantes. L'importance et la complexité des voies métaboliques inductibles par les agents pathogènes et des hormones dérivées de ces voies, dans la régulation de l'immunité végétale sont claires. Cependant, les modes d'action de ces petites molécules bioactives, la localisation cellulaire de leur site de biosynthèse, leur transport de cellule à cellule, leur compartimentalisation, leur séquestration, leur remobilisation et leur dérivatisation dans les plantes saines demeurent peu connus. De même, peu de connaissances ont été acquises sur les mécanismes de cross-talk entre les différents systèmes hormonaux. Actuellement, il est connu que des hormones végétales telles que l'acide salicylique (SA), les jasmonates (JA) et l'éthylène, sont des signaux clé dans la réponse des plantes aux agents pathogènes. De plus, des hormones telles que les brassinostéroïdes, les auxines, les gibberellines, les cytokinines, l'acide abscissique et les oxylipines/signaux lipidiques autres que le JA, peuvent jouer également des rôles importants dans la modulation fine de la réponse de la plante aux stress environnementaux, tels que la ré-allocation de ressources métaboliques aux programmes de défense et de mort cellulaire qui sont coûteux en énergie. La dynamique des interactions protéines-protéines, les réseaux transcriptionnels et les voies métaboliques sont peu caractérisés, mais sont prédits pour réguler l'induction des défenses en réponse à différentes classes d'agents pathogènes. Afin d'accroître la tolérance des plantes aux stress et de maintenir la productivité en termes de rendement et de biomasse, il est nécessaire de comprendre la diversité moléculaire et les activités des métabolites de stress, leurs interactions avec les systèmes hormonaux et de traduire ces connaissances pour les espèces agronomiques.

L'objectif du consortium 'BALANCE' est d'acquérir une meilleure

comprehension du système d'immunité végétale en intégrant des stratégies de « profiling » génomique, protéomique et métabolomique dans la plante modèle Arabidopsis et de transmettre ces connaissances pour une amélioration de l'espèce Brassica. Une expertise et des technologies complémentaires apportées par les partenaires seront mises à profit pour identifier des noeuds de régulation clé et de petits métabolites importants pour la réponse antimicrobienne et pour le cross-talk entre défense de la plante, les programmes de mort cellulaire et le développement.

Partenaires

CNRS INRA UMR 2594 Dominique Roby
Biogemma- Bruno Grezes-Besset
MPIZ- Jane Parker (**coordonateur KBBE**)
MPIZ- Paul Schulze Lefert
CNB Madrid- Carmen Castresana
CNB Madrid - Roberto Solano
CBGP Madrid- Antonio Molina

Coordinateur

Dominique ROBY – CNRS INRA UMR 2594
dominique.robby@toulouse.inra.fr

Aide de l'ANR
Début et durée
Référence
Label pôle

311 k€
36 mois
ANR-08-KBBE-002

Creation of a mapped database of Botrytis cinerea T-DNA transformants allowing pathogenic development and plant defense studies

Résumé

Botrytis cinerea est un champignon phytopathogène nécrotrophe, capable d'infecter plus de 200 espèces végétales à la fois au cours des cultures et du stockage (Elad et al., 2004; Staats et al., 2005). Ce pathogène est l'agent de la pourriture grise qui affecte la vigne et d'autres cultures d'importance économique (légumes, fruits, fleurs, tournesol, pois chiches) (Williamson et al., 2007). L'infection par B. cinerea a pour conséquence de diminuer la valeur ajoutée des fruits, en affectant leurs propriétés organoleptiques ou leur fermentation (Colmenares et al., 2002; Reino et al., 2004; La Guerche et al., 2007; Nisiotou et al., 2007) ou la destruction des récoltes (Williamson et al., 2007). Le contrôle biologique de la pourriture grise a donné en serres des résultats prometteurs, toutefois difficilement reproductibles (Paulitz and Bélanger, 2001; Alizadeh et al., 2007). Par conséquent, la prévention des maladies causées par B. cinerea repose sur l'utilisation de produits antifongiques, dont l'utilisation récurrente a conduit à l'apparition de souches résistantes (Leroux et al., 2002; Fournier et al., 2005) et nécessite l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte chimique.

B. cinerea utilise un panel d'armes –enzymes lytiques, enzymes de production et de dégradation de molécules d'oxygène réactives (ROS), toxines– pour décomposer les tissus végétaux et induire la mort cellulaire programmée, qui est exploitée en retour par le parasite pour poursuivre la colonisation de l'hôte (Govrin and Levine, 2000; Lyon et al., 2004; van Kan, 2006; Choquer et al., 2007; van Baarlen et al., 2007; Williamson et al., 2007). La contribution des mécanismes de défense des plantes à leur sensibilité à B. cinerea et leur détournement aux bénéfices du parasite a été explorée à l'aide d'analyses de transcriptome (AbuQamar et al., 2006; van Baarlen et al., 2007). Ces études reposent sur l'utilisation d'Arabidopsis thaliana, qui n'est pas un hôte naturel de B. cinerea, et nécessitent d'être étendues à des cultures cibles d'importance économique (Williamson et al., 2007).

L'objectif de notre projet est de développer une collection de mutants étiquetés de B. cinerea et de valider la création de cette banque par la caractérisation de souches dont le développement parasite est altéré.

La transformation via Agrobacterium tumefaciens sera employée pour enrichir la collection de mutants déjà existante (Tudzynski

et al., non publié). La croissance et la capacité de conidiation des transformants seront évaluées à la fois in vitro et in planta. En parallèle, les sites d'intégration de l'ADN-T seront déterminés en utilisant la TAIL-PCR et la séquence du génome (Broad Institute, Genoscope). Ces informations seront répertoriées en une banque de données, sur le modèle des banques de mutants des plantes modèles *A. thaliana* et *Oryza sativa* et du pathogène fongique *Magnaporthe oryzae* (Samson et al., 2002; Droc et al., 2006; Betts et al., 2007). Cette banque de données sera accessible ensuite pour la communauté scientifique et exploitable comme support de recherche fondamentale. De plus, les mutants dont le développement parasite est affecté seront caractérisés au niveau biochimique et moléculaire. Les signatures biochimiques des mutants seront définies sur la base de tests in vitro dont la mesure de la capacité de sécrétion d'enzymes lytiques (polygalacturonases, mannanases), de production de ROS et de tolérance aux ROS. Au niveau moléculaire, l'analyse comparative des souches sauvage virulente vs mutantes non pathogènes sera réalisée à l'aide des approches du transcriptome (microarray) et du protéome (analyses conventionnelles 1-D et 2-D, 2-D et DIGE couplées à des analyses de spectrométrie de masse et Western blots) en utilisant les cultures obtenues in vitro et in planta (baies de raisin comme hôte modèle).

Partenaires

CNRS UMR 5240- Géraldine Mey
INRA UMR 1290- Muriel Viaud
Bayer CropScience - Roland Beffa
Université de Cordoba- Jorin Novo
Institut für botanik Munster- P Tudzynski

Coordinateur

Géraldine MEY – CNRS Université Lyon 1 UMR 5240
geraldine.mey@univ-lyon1.fr

Aide de l'ANR
Début et durée
Référence
Label pôle

519 k€
36 mois
ANR-08-KBBE-003

CELLWALL

**Uncovering regulatory modes for secondary
CELL WALL synthesis as means for improving
biomass saccharification**

Résumé

Un obstacle majeur pour le développement des biocarburants de la deuxième génération ainsi que la chimie verte est la récalcitrance de la biomasse à la saccharification (la conversion enzymatique en sucres fermentables). Une voie étudiée intensivement pour la réduction de la récalcitrance à la saccharification est la modification génétique de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse de certains polymères de la paroi. Ces changements sont malheureusement souvent accompagnés par des changements non souhaités dans d'autres polymères et peuvent affecter la croissance et la vigueur des plantes. Nous proposons dans ce projet une approche alternative et beaucoup moins explorée basée sur le ciblage de la régulation de la déposition de la paroi secondaire. Dans un premier temps, seront identifiés des régulateurs de transcription et des protéines kinases qui régulent des réseaux de gènes codant des enzymes de biosynthèse des constituants pariétaux et des protéines pariétales dans différents types cellulaires ayant une composition de la paroi secondaire différente. La manipulation de l'expression de tels régulateurs devrait permettre de modifier la digestibilité de la biomasse en enrichissant les tissus en parois secondaires composées de polymères moins récalcitrants à la saccharification. Deux espèces modèles seront utilisées : Arabidopsis thaliana et le modèle pour les graminées Brachypodium distachyon. Ce projet réunit des spécialistes en bio-informatique, génomique, glycobiologie, protéomique, biologie cellulaire et développementale ainsi qu'une entreprise de biotechnologie intéressée par le transfert des connaissances vers des espèces dédiées à la production de bio-énergie.

Partenaires

INRA UPR 501-99- Herman Höfte
UPS CNRS UMR 5546- Elizabeth Jamet
Max Planck Gölm- Staffan Persson (coordinateur KBBE)
Universidad Santiago de Compostela- Ignacio Zarra Cameselle
Calantia Biotech- Hugo Alonso

Coordinateur

Herman Höfte – INRA UPR 501
herman.hofte@versailles.inra.fr

Aide de l'ANR

495 k€

Début et durée

36 mois

Référence

ANR-08-KBBE-004

Label pôle

Integration of advanced mapping and phenotyping methods to identify key alleles for building European maize ideotypes

Résumé

Aims . Following its introduction into Europe in the late 15th early 16th centuries, maize developed unique adaptive features to environmental conditions. These traditional European accessions have proven extremely complementary to American cornbelt material in terms of heterosis, leading to the major success story of European hybrid maize. After comparison of all possible species, maize has proven to be the most efficient crop to produce high energy feed for animals through whole plant biomass harvested for silage conservation. This is to a large extent due to the unique efficiency of its C4 metabolism. For the same reason, maize also has been acknowledged as a possible solution for energy production for German regions with high water precipitation and 250.000 ha are already cultivated there, mostly with existing silage varieties. Further improvement of whole plant biomass production requires the identification of key alleles to optimise light interception and conversion into biomass, in particular through cold tolerance for early sowing, rapid leaf growth, and then conversion into biomass. Key alleles need also to be identified to monitor flowering time and plant maturity according to environmental factors and end product use, while maintain quality features. .

Workplan

To achieve this goal, the project associates a consortium of 4 major European based private companies and 10 public laboratories being major groups involved in maize genetics and physiology in Germany, France and Spain. These groups have complementary expertise in terms of advanced knowledge of maize genetic diversity, quantitative genetics and breeding methodology, material production using double haploid technology, phenotypic analysis of traits mentioned above, advanced technologies of polymorphism discovery and genotyping. Expertise and corresponding resources will be assembled into genetic approaches for deciphering the genetic determinism the traits of interest combining (i) connected multiparental linkage mapping designs and (ii) Linkage Disequilibrium (LD) mapping in optimised populations of diverse inbred lines. To do so, new polymorphisms and genotyping resources today not yet affordable to our community will be developed. Also populations of introgression materials will be prepared to validate and further investigate allelic effects and conduct fine mapping programs. The genetic variability of

biomass accumulation will be analysed in phenotyping platforms and in the field. It will be dissected into mechanistic traits having a higher heritability, namely (i) leaf growth and its response to cold temperatures, studied either with high temporal definition for introgression lines or by daily 3D imaging in LD panels, (ii) radiation use efficiency and water use efficiency in the same platform, analysed daily. (iii) tolerance to cold temperatures. Biomass accumulation will be analysed in a network of field experiments comprising LD panels and multiparental crosses, with measurements during the crop cycle carried out by periodic measurements of biomass and of spectral reflectance of plant canopy. Specific attention will be paid in all cases to the representation of European maize diversity and its comparison with other origins presently investigated into US and international programs. Extension of the cooperation to Italian groups is intended to form an unprecedented European platform. A close connection will be established with the US community to conduct synergistic efforts, in particular to develop a common unique high density genotyping SNP platform.

Expected results

The project is built so as to provide directly applicable results in terms of alleles discovered at several key loci defining the desired ideotype, along with markers allowing a predictive inference within the main genetic groups considered for breeding and possibly at the species wide level. This is expected first for alleles making it possible to adjust the plant growth cycle and also for biomass composition. It will also settle a unique basis of knowledge regarding the variation of the traits of interest and provide protocols to evaluate these using advanced technologies. Also insight will be gained in the magnitude and organisation of Linkage Disequilibrium (LD) between and within genetic groups and its consequences for LD mapping. Specific attention will be paid to the organisation and durability of the access to the genetic resources assembled. Also key data obtained in the programs in terms of sequence polymorphism and high density genotyping will remain accessible to the partners of the project and a broader community through a database improved in the duration of the project. It is therefore expected that the resources and data produced will form the core of future cooperative efforts of partners

Partenaires

INRA UMR 320- Alain Charcosset
INRA UPR 1279- Dominique Brunel
INRA UMR 1281- Catherine Giauffret
INRA UMR 759- François Tardieu
Biogemma- Christophe Tatout
Limagrain Verneuil Holding- Pascal Flament
Syngenta Seeds- Monica Menz

Coordinateur

Alain Charcosset – INRA UMR 320
charcos@moulon.inra.fr

Aide de l'ANR	1 070 K€
Début et durée	36 mois
Référence	ANR-08-KBBE-005
Label pôle	

Résumé

L'agriculture durable nécessite une meilleure compréhension de la nutrition minérale chez les plantes. Dans les dernières années, les progrès de la biologie moléculaire et de la génétique ont contribué à identifier de nouveaux éléments de régulation contrôlant de nombreuses réponses mises en jeu par les plantes pour répondre aux carences minérales.

Néanmoins, l'identification des mécanismes mis en jeu chez ces organismes pour adapter leur croissance à la concentration ionique présente dans le milieu reste un challenge pour la physiologie végétale et une nécessité dans le contexte de la production de plantes adaptées à une agriculture moins consommatrice d'intrants.

En utilisant le phosphate, l'un des macro-éléments majeurs des plantes, nous souhaitons faire progresser nos connaissances dans le domaine de la signalisation ionique. De récents résultats indiquent que ces voies contrôlent l'inhibition de croissance de la racine observée en conditions de carence en phosphate. Cette découverte modifie considérablement notre vision, qui associait ce phénotype avec une limitation métabolique. Aussi l'identification de ces mécanismes de perception et de contrôle représente une étape fondamentale pour comprendre les phénomènes de perception des ions utilisés par les plantes pour s'adapter à leur environnement. Ils offrent aussi des pistes prometteuses pour les améliorateurs de plantes qui pourraient manipuler certaines voies limitant la croissance en réponse à la carence en phosphate.

Les systèmes de régulation impliqués dans la perception du phosphate sont complexes. De récents travaux ont démontré qu'outre le contrôle de la transcription, d'autres niveaux de régulation comme les ARN non codants, les micro ARN et le protéasome dépendant de l'ubiquitine étaient aussi impliqués. Ceci nécessite plusieurs couches de contrôles qui impliquent en outre des mécanismes locaux et systémiques (agissant à distance) et des régulations par des éléments redondants (comme c'est le cas pour la majeure partie des gènes identifiés à ce jour comme PHO1, PHO2, PHR1). Ceci expliquerait les difficultés rencontrées, malgré de nombreuses tentatives, pour disséquer ces voies en utilisant la génétique classique.

Complexité et redondance peuvent s'expliquer facilement du fait de l'importance cruciale des nutriments pour la croissance et la productivité des plantes. Pour contourner ces difficultés, nous souhaitons combiner diverses approches complémentaires (génétique chimique, exploration du transcriptome codant et non codant, protéasome) en vue d'identifier de nouveaux

éléments de cette cascade de transduction pour compléter la vue fragmentaire actuelle de cette voie.

Partenaires

CNRS CEA UMR 6191- Laurent Nussaume
Bayer CropScience- Roland Beffa
GreenPharma- Philippe Bernard
CSIC- Vicente Rubio

Coordinateur

Laurent NUSSAUME – CNRS CEA UMR 6191
lnussaume@cea.fr

Aide de l'ANR

262 k€

Début et durée

36 mois

Référence

ANR-08-KBBE-006

Label pôle

Résumé

De nombreuses données suggèrent qu'une alimentation riche en composés nutritionnels réduit le risque de certaines maladies chroniques de l'homme telles que le cancer, l'infarctus et les maladies neuro-dégénératives. Les fraises produites par le fraisier cultivé, *Fragaria x ananassa* Duch., constituent plus une source riche en composés nutritionnels et plus particulièrement phénoliques. Certains composés nutritionnels présents dans les fruits ont un effet antioxydant, anticancéreux, anti-athérosclérotique et anti-neuro-dégénérative important à la fois in vitro et in vivo.

L'objectif majeur de ce projet est d'avoir une meilleure connaissance du contrôle génétique de la qualité nutritionnelle des fraises. Les résultats permettront une optimisation des programmes de sélection d'obtention de nouvelles variétés riches en nutriments, bénéfiques pour les consommateurs.

Pour répondre à cet objectif, des eQTL (QTL liés à la variation quantitative de l'expression de transcrits) de gènes impliqués dans la qualité nutritionnelle des fruits et des QTL liés à la teneur des fruits en nutriments seront détectés en utilisant le génotypage et le phénotypage généré par des approches de transcriptome et de métabolome. Ces données seront obtenues à partir de deux populations, en ségrégation pour les composés nutritionnels et présentant des fonds génétiques différents. A partir des eQTL détectés, des marqueurs moléculaires seront identifiés. Ces marqueurs seront intégrés dans les méthodes de sélection classiques afin de développer la sélection assistée par marqueurs avec les sélectionneurs.

Le projet est divisé en trois parties.

Partie 1: Production de données de génotypage, et de phénotypage par des approches de transcriptome et métabolome.

En vue de générer des e-QTL liés à la qualité nutritionnelle des fruits, un micro-réseau d'ADNc de 8000 EST unigènes correspondant à des gènes exprimés dans la fraise sera utilisé. Ce micro-réseau sera hybridé par du cDNA obtenu à partir de fruits produits par 150 descendants constituant un échantillon des deux populations de fraisier. Les cartes génétiques de ces populations seront construites avec des marqueurs polymorphes transférables (46 SSR couvrant l'ensemble de la carte génétique octoploïde).

Les fruits seront analysés par LC-ESI-MS pour leurs teneurs en flavonols, flavonoïdes, anthocyanidins, acides organiques,

vitamine C, polyphénols, et sucres. Afin d'étudier une plus grande variabilité génétique, des ressources génétiques seront également analysées avec les microsatellites et par les approches de transcriptome et de métabolome.

Partie 2: Détection et validation de eQTLs

La variation de l'expression des transcrits des 150 descendants sera mesurée puis utilisée comme caractères quantitatifs. Les eQTL seront cartographiés à l'aide des cartes génétiques développées dans la partie 1. Par ailleurs, les QTL liés aux composés nutritionnels présents dans les fruits seront détectés en utilisant la variation des métabolomes. La relation entre les eQTLs et les QTL liés à des teneurs en composés nutritionnels sera analysée. Les gènes candidats détectés comme cis-eQTLs seront identifiés et analysés dans les ressources génétiques.

La fonction biologique des gènes candidats identifiés sera analysée par expression transitoire dans les fraises. De plus, la contribution des différents homéo-allèles (allèles issus d'un allèle ancestral) sera étudiée en fonction du génotype et du stade du fruit et en utilisant la QRT-PCR.

Partie 3: Application de eQTLs en sélection assistée par marqueurs (SAM)

Cette partie a pour objectif de développer des marqueurs liés aux e-QTL, de les transférer vers les sélectionneurs qui les utiliseront dans leurs programmes de sélection.

Les résultats seront diffusés par l'intermédiaire de pages Web, de publications, et de réunions entre les chercheurs et les sélectionneurs.

Les principaux résultats escomptés sont les suivants : (1) détection de eQTLs pour identifier des gènes candidats liés à des teneurs élevées en composés nutritionnels dans la fraise, et (2) transformation de ces eQTL en marqueurs moléculaires utilisable dans les programmes de sélection d'entreprises privées

Partenaires

Inra UR 419- Béatrice Denoyes-Rothan

Inra UPR 875- Brigitte Mangin

CIREF - Pierre Gaillard

UCO UMA- Munoz Blanco

IRTA- Amparo Montfort

TU Munich- Wilfried Schwab

Plantas de Navarra- Alexandre Pierron Darbonne

Coordinateur

Béatrice DENOYES-ROTHAN – INRA UR 419

denoyes@bordeaux.inra.fr

Aide de l'ANR

259 k€

Début et durée

36 mois

Référence

ANR-08-KBBE-007

Label pôle

GRAPERESQ Large scale re-sequencing in the Vitis genus for identification of resistance genes, SNP discovery and high throughput genotyping

Résumé

La compréhension des relations en la diversité des génotypes et des phénotypes est un défi majeur en biologie des plantes qui rendra plus efficace l'amélioration génétique des espèces cultivées en permettant leur description, leur gestion et leur exploitation au niveau génotypique. Le développement récent d'outils à très haut débit pour le séquençage et le génotypage permet maintenant d'étudier ce polymorphisme à l'échelle du génome et ce à des coûts raisonnables. L'objectif de ce projet est de profiter de la récente mise à disposition de la séquence du génome de la vigne pour développer des stratégies et des outils permettant d'identifier à haut débit les allèles intéressants chez les Vitaceae pour le développement de nouvelles variétés résistantes aux maladies et de qualité supérieure. En effet, la vigne est la culture la plus gourmande en fongicides à l'échelle européenne et la filière souhaite réduire de moitié cette consommation dans les dix prochaines années.

Deux approches seront développées. La première vise à faciliter l'étude de régions du génome connues pour subir des réarrangements structuraux rapides. Elle combinera le re-séquençage à moyenne couverture (8X) d'un hybride F1 *V. cinerea* x *V. riparia* par pyro-séquençage (454/Roche) avec l'utilisation de séquences d'extrémités de BAC (BES) pour rapidement identifier des régions impliquées dans le contrôle de caractères agronomiques importants comme des résistances à des maladies. Pour cela, le brouillon de séquence obtenu et les BES seront alignés sur la séquence de référence du génome de la vigne et avec une carte génétique du même hybride F1 sur laquelle auront été détectés des QTLs pour des caractères agronomiques importants. Une séquence finie sera réalisée pour 10 de ces régions. La deuxième approche visera à développer une ressource Européenne importante (en complément d'un projet similaire aux USA) en SNP qui servira de base au développement de outils haut débit pour la sélection assistée par marqueurs et pour le développement d'étude de génétique d'association. Une méthode basée sur l'utilisation de puces pour capturer tous les exons et UTR prédits chez la vigne sera employée pour les re-séquençer chez 15-20 génotypes à l'aide d'une plateforme Solexa/Illumina.

Les séquences obtenues seront alignées sur la séquence de référence du génome afin d'évaluer le polymorphisme

génomique de type SNP au sein des Vitaceae. 10 000 SNP seront génotypés sur 2300 individus à l'aide d'une plateforme Illumina avec deux objectifs: (i) développer des panels de marqueurs transférables au sein du genre Vitis pour la sélection assistée par marqueurs (MAS) et (ii) développer des panels de marqueurs pour la génétique d'association chez Vitis vinifera. Toutes les séquences obtenues seront intégrées dans un système d'information commun (GnpIS). Pour cela, des routines automatiques seront développées pour l'entrée et la visualisation des données et l'intégration des différents modules du système d'information sera améliorée et adaptée. Des méthodes seront développées pour améliorer l'assemblage de séquences courtes dérivées de génomes hétérozygotes ainsi que pour l'analyse statistique de SNPs à une échelle génomique dans le but de dresser l'image de la fréquence et du déséquilibre de liaison. Tout cela devra faciliter les requêtes et l'analyse des résultats au court du projet mais également par de futures utilisateurs extérieurs.

Les résultats du projet permettront de développer des outils haute densité et haut débit de génotypage chez la vigne aussi bien dans des objectifs de cartographie que d'analyse des ressources génétiques disponibles. Ils seront donc la base de la mise en place de stratégies basées sur la connaissance d'amélioration variétale chez la vigne et de meilleure valorisation des ressources disponibles dans l'objectif prioritaire de réduire drastiquement la couverture en pesticide des vignobles.

Partenaires

INRA UMR 1165 - Anne-Françoise Adam-Blondon
 INRA UMR 1097 - Jean-Michel Boursiquot
 INRA UPR 1164 - Hadi Quesneville
 INRA UPR 1279 - Dominique Brunel
 CNRS UMR 1152 - Bernard Prum
 CNB CSIC - José M Martinez Zapater
 IGS CeBitech - Bernd Weishaar
 UNIV- Reinhard Töpfer
 JKI- Massimo Delledonne

Coordinateur

Anne-Françoise ADAM-BLONDON – INRA CNRS UMR 1165
adam@evry.inra.fr

Aide de l'ANR
 Début et durée
 Référence
 Label pôle

551 k€
 36 mois
 ANR-08-KBBE-008

**HOT IRON
PLANT
PROGROW**

**Homeostasis and transport of Iron-improving
plant productivity and growth**

Résumé

Le fer est l'un des facteurs limitants de la production de biomasse chez les plantes. La carence en fer provoque une chlorose sévère ainsi qu'une diminution de la productivité et de la qualité des produits végétaux. Les plantes étant la source majoritaire de la nutrition sidérique humaine, la carence en fer des plantes cultivées n'a pas seulement un impact agronomique et économique, elle est aussi à l'origine de carence en fer chez l'homme, l'un des problèmes nutritionnels les plus importants actuellement.

Parce que la machinerie photosynthétique nécessite beaucoup de fer pour son fonctionnement, les chloroplastes sont les puits intracellulaires majeurs pour le fer. Le transport et le stockage du fer dans le chloroplaste représentent des étapes clés dans le contrôle de l'homéostasie du fer au niveau cellulaire. Cependant, les éléments moléculaires contrôlant l'homéostasie du fer dans le plaste sont inconnus.

L'objectif du projet est d'élucider les processus de régulation liant l'homéostasie du fer dans le chloroplaste et dans le cytosol avec les mécanismes de transport et d'acquisition.

Par une approche génomique, nous proposons d'identifier les cibles moléculaires de la réponse à la carence en fer et à sa toxicité chez *Arabidopsis thaliana*. Les résultats obtenus chez cette plante modèle seront ensuite utilisés pour modifier et améliorer les conditions de croissance et la productivité de plantes d'intérêt agronomique.

Partenaires

INRA CNRS Supagro UMR 386- Jean-François Briat
Institut for Plant Biochemistry and Physiology U Munich- Katrin Philippar (coordinateur KBBE)
U Hohenheim- Nicolaus von Wiren
CSIC - Javier Abadia
CIPAV - José Maria Garcia Mina
IonGate Biosciences - Petr Obrdlik

Coordinateur

Jean-François BRIAT – INRA UMR 386 CNRS/SupAgro/Université Montpellier 2
briat@supagro.inra.fr

Aide de l'ANR

156 k€

Début et durée

36 mois

Référence

ANR-08-KBBE-009

Label pôle

Résumé

The objective of the project is to develop economically, sustainable, high yield and safe plant expression systems (plant biofactories) to bring antimicrobial peptides (AMPs) to the market with an advantageous position of research groups and private companies from Europe. Sustainable production of AMPs will benefit the plant protection, food, veterinary and human pharma sectors.

The project starts from well established and characterized synthetic AMPs as lead compounds that were developed previously with antibacterial (peptide BP100 as representative of the BP series) and antifungal selectivity (PAF26 from PAF peptides). The project will also consider other AMPs that have been successfully tested against bacterial and/or fungal pathogens. Identification and rational design of novel AMPs will be oriented not only to increase antimicrobial activity and decrease toxicity to non-target organisms, but most importantly to optimize properties for plant expression at high yield and accumulation in different plant tissues. The amount of possible combinations will require a high throughput screening (HTS) platform for peptides that have to be developed on purpose.

Synthetic genes and constructions in expression vectors will be made based on a targeting strategy to decrease toxicity, escape proteolysis and increase yield, directing secretion to subcellular compartments (endoplasmic reticulum retention, oil bodies) and/or tissue specific storage (seed endosperm, tuber, green tissue). Efficiency of expression will be also evaluated with different types of AMP transgenes (cecropin A, BP100, PAF26, LfcB) or constructions (tandem, enlarged, with processing elements).

Proteomics of specific tissues and subcellular organelles, extraction, purification and analysis of recovered expression products, and bioassays of activity in vitro of the recovered peptide fractions will be then performed. Proteomic analysis will be performed by using staining procedures with visible stains and fluorescent dyes in combination with MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry and by gel-free based proteomics combining chemical protein tagging and nanoLC-MS/MS. Integration of data from proteomics and metabolomics will be performed by data-dimensionality reduction methods.

Specific downstream processing of the plant biomass will be developed for each expression strategy, including homogeneization in antioxidant buffer, removal of fiber and

plant debris, protein or oil bodies extraction and expression product recovery, enzyme processing (specific tag-fusion removal), AMP recovery, and further purification or formulation. The analysis of the bioactivity of recovered AMPs against bacterial and fungal pathogens will be performed at laboratory scale on selected bacterial and fungal pathogens, and also using plant (*Arabidopsis thaliana*) and animal (*Caenorhabditis elegans*) models.

Finally, batches of AMPs produced will be selected to perform acute toxicity testing and pilot trials of efficacy of control of representative pathogens of interest such as in a mice model, postharvest pathogens causing fruit rot (apple and pear, citrus, strawberry), greenhouse fungal and bacterial pathogens, and food-borne bacterial pathogens in minimally processed fresh meat and vegetable products.

Partenaires

INRA UPR 1199 - Nicolas Sommerer
 U Girona - Emilio Montesinos **coordonateur KBBE**
 CSIC - José F Marcos
 CSIC IRTA - Maria Coca
 Bioiberica - Carlos Chetrit
 U Erlangen Nuremberg - Uwe Sonneveld
 Max Planck - Stefan Schillberg
 FIMBAE - Wolfram Weckwerth

Coordinateur

Nicolas SOMMERER – INRA UPR 1199
 sommerer@supagro.inra.fr

Aide de l'ANR

166 k€

Début et durée

36 mois

Référence

ANR-08-KBBE-010

Label pôle

Résumé

Ce projet porte sur la caractérisation de nouveaux régulateurs de la réponse des plantes aux stress abiotiques et leur utilisation pour la création de variétés plus résistantes. Les travaux comportent des approches bioinformatiques, des analyses fonctionnelles chez l'espèce modèle *Arabidopsis* et une validation de l'intérêt agronomique chez le riz. Les régulateurs identifiés ainsi que de nouveaux régulateurs chimériques seront testés chez ces plantes. Une fois validés chez le riz, ces résultats devraient également pouvoir être utilisés pour l'amélioration d'autres plantes, que ce soit par transgénèse ou par sélection assistée par marqueurs. Le projet que nous proposons doit donc contribuer au développement d'une agriculture productive et durable, notamment en permettant une augmentation, ou au moins une stabilisation des rendements en conditions de cultures limitantes.

Ce projet est une collaboration Franco-Germano-Espagnole, qui fait intervenir des partenaires publics et privés, dans les domaines de la génomique et des biotechnologies. L'approche retenue est multidisciplinaire et implique l'utilisation d'outils de bioinformatique, de biologie moléculaire et de caractérisation phénotypique à grande échelle.

Les outils bioinformatiques seront utilisés afin d'identifier de nouveaux éléments cis régulateurs, des facteurs de transcription et les réseaux de régulations impliqués dans la réponse aux stress abiotiques. Parmi ceux-ci, la sécheresse et la forte teneur en sels des sols sont les deux facteurs majeurs qui interviennent dans la limitation du rendement des plantes cultivées. L'identification des éléments cis régulateurs conservés sera réalisée sur la base de l'étude des séquences promotrices de gènes dont les expressions sont co-régulées par les stress abiotiques chez *A. thaliana*. Un premier groupe d'éléments a déjà été identifié. De nouveaux éléments seront également caractérisés et étudiés. Ces éléments seront testés à l'aide de gènes rapporteurs par expression transitoire et dans des plantes transgéniques. Ces cis-éléments d'ADN seront utilisés pour isoler des protéines qui ont la capacité de s'y fixer.

Ces données permettront une modélisation comparative des domaines de liaison à l'ADN des protéines sélectionnées. La caractérisation des domaines de liaison à l'ADN pourra servir de base pour la création de facteurs de transcription synthétiques

et pour l'identification de nouvelles protéines endogènes susceptibles de réguler l'expression des gènes au travers des éléments cis étudiés. Les différents FT endogènes et synthétiques seront exprimés de manière ectopique chez *A. thaliana* et chez le riz. Les plantes ainsi générées seront testées pour leur tolérance à différents stress. Des approches de bioinformatiques chercheront à déterminer s'il peut y avoir des effets synergistiques et additifs entre les différents éléments cis identifiés. Cette approche devrait conduire à l'identification d'une combinatoire d'éléments qui seront alors étudiés de la même manière que les éléments préalablement identifiés. Des analyses fonctionnelles d'expression transitoire et d'approches moléculaires serviront alors de base pour redéfinir les paramètres pour les analyses bioinformatiques. Au delà de l'identification de nouveaux éléments cis régulateurs et de FT correspondant, les réseaux de régulation pourront être étudiés. Par exemple, si un composant des cascades de transduction du signal peut être prédit et vérifié de manière expérimentale comme étant impliqué dans la tolérance au stress hydrique, un niveau supplémentaire de la tolérance au stress pourra être abordé (e.g. une protéine kinase régulant l'activité de FT impliqués dans les mécanismes de tolérance à ce stress)

Partenaires

INRA UMR 204 - Loïc Lepiniec
 Inst of Genetics Braunschweig - Lorenz Bulow (coordinateur KBBE)
 BASF - Andreas Renz
 Biefeld University - Bernd Weishaar
 Estacion Experimental de Aula Dei - Bruno Contreras Moreira

Coordinateur

Loïc Lepiniec – INRA UMR 204
Loic.Lepiniec@versailles.inra.fr

Aide de l'ANR
 Début et durée
 Référence
 Label pôle

276 k€
 36 mois
 ANR-08-KBBE-011

TRANSNET

Transcriptional networks and their evolution
in the Brassicaceae

Résumé

Transcriptional control is the single most important regulatory mechanisms in all organisms. It ultimately depends on transcription factors (TF) that recognise *cis*-regulatory elements within their targets. Due to their importance in the control of gene activity, transcription factors and *cis*-regulatory motifs play a pivotal role in evolution and have enormous biotechnological potential. We will exploit recent developments in DNA sequencing technology together with state of the art bioinformatics to derive the transcriptional networks regulating important agronomic traits from comparative analysis of Arabidopsis and its relatives. Our aims are to identify key promoter motifs associated with particular gene expression patterns, to directly determine the number of binding sites for selected TFs across the genomes of these species and to determine how conserved the number and positions of these sites are between the species. On the other hand, another layer of regulation of gene expression is that determined by chromatin structure, which controls promoter accessibility. In this context, an additional objective of the project is to map along these genomes relevant histone modifications and DNA methylation, and to determine the degree of conservation of the epigenome across species. The unique data set generated together with the close interactions between bioinformatic and experimental groups will provide insights on the architecture of particular transcriptional networks and on how they evolve in plants. Additionally, it will provide key information on combinatorial action of TFs, reflected in the non-random presence of other *cis*-motifs in the target genes of a particular TF

Partenaires

CNRS UMR 8186- Vincent Colot
INRA UPR 1164 - Hadi Quesneville
Max Planck - George Coupland (coordinateur KBBE)
Universidad Politecnica Madrid - Javier Paz Ares
Universidad Politecnica Madrid - Pilar Carbonero
Max Planck - Detlef Weigel
BIOBASE - Alexander Kel

Coordinateur

Vincent COLOT – CNRS ENS UMR 8186
colot@biologie.ens.fr

Aide de l'ANR
Début et durée
Référence
Label pôle

409 k€
36 mois
ANR-08-KBBE-012

