

# **Habilitation à Diriger des Recherches**

**Université de Poitiers**

**Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées**

Section : Sciences agronomiques

Spécialité : Agronomie, Productions animales et végétales et Agroalimentaire

**Bernadette Julier-Koubaïti**

INRA,  
Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères,  
86600 Lusignan

## **Jury proposé**

S. Delrot (PR, Université de Poitiers)  
F. Dosba (PR, ENSAM Montpellier), rapporteur  
A. Gallais (PR, INA-PG Paris), rapporteur  
C. Rameau (DR, HDR, INRA Versailles), rapporteur  
T. Huguet (PR, ENSAT Toulouse)  
C. Huyghe (DR, HDR, INRA Lusignan)



## Sommaire

1. Curriculum vitae .....	2
2. Travaux de recherche.....	4
2.1. Introduction.....	4
2.2. Développement des thèmes de recherche .....	4
2.2.1. Etude de l'architecture déterminée chez le lupin blanc d'hiver.....	4
2.2.2. Génétique de caractères agronomiques chez la luzerne.....	6
2.2.2.1. Contexte.....	6
2.2.2.2. Variabilité génétique dans le complexe d'espèces <i>Medicago sativa</i> .....	8
2.2.2.3. Valeur énergétique de la luzerne .....	10
2.2.2.4. Dégradabilité des protéines.....	13
2.2.2.5. Production de semences.....	15
2.3. Projet de recherches .....	17
2.3.1. Objectifs.....	17
2.3.2. La morphogenèse aérienne .....	18
2.3.3. Le contexte scientifique international.....	18
2.3.4. Stratégie .....	19
2.3.5. Démontrer la synténie existante entre <i>M. sativa</i> et <i>M. truncatula</i> .....	19
2.3.6. Identifier les bases génétiques de la morphogenèse chez la légumineuse modèle <i>M. truncatula</i> .....	21
2.3.6.1. Variabilité génétique pour la morphogenèse chez <i>M. truncatula</i> .....	21
2.3.6.2. Identifier les gènes impliqués dans les variations de la morphogenèse aérienne .....	21
2.3.7. Identifier les bases génétiques de la morphogenèse chez la luzerne.....	23
2.3.7.1. Diversité génétique et structuration .....	23
2.3.7.2. Identifier les QTL ou les gènes impliqués dans la morphogenèse aérienne chez la luzerne .....	26
2.3.8. Perspectives .....	27
2.3.8.1. Conséquences sur l'évolution des peuplements.....	27
2.3.8.2. Amélioration génétique de la luzerne .....	28
3. Publications et Communications .....	32
4. Activités d'animation de la recherche .....	38
5. Activités d'encadrement.....	38
6. Jurys de thèses, referee, expertises .....	39
7. Coopérations nationales et internationales .....	39
8. Coopération industrielles et valorisation .....	40
9. Formations et stages spécialisés .....	40
10. Collaborations .....	41
11. Information scientifique, techniques et vulgarisation.....	41



## **1. Curriculum vitae**

### **Bernadette Julier-Koubaïti**

Née le 12 Juin 1967  
à Lannion (Côtes d'Armor)  
Nationalité française  
Mariée, 2 enfants

### **Adresse personnelle**

La Terraudière  
86480 Rouillé

### **Adresse professionnelle**

INRA  
Unité de Génétique et d'Amélioration des  
Plantes Fourragères  
86600 Lusignan  
Tel : 05 49 55 60 38  
Fax : 05 49 55 60 44  
Email : Bernadette.Julier@lusignan.inra.fr

## **TITRES UNIVERSITAIRES**

- 1985-87: DEUG B, Université Paris VII, moyenne 16/20
- 1987-1990: Magistère interuniversitaire de Biologie-Biochimie, Université Paris VII
- 1987-1988: Licence de Biologie et Génétique Appliquées, Université Paris VII, mention Assez Bien
- 1988-1989: Maîtrise de Biologie et Génétique Appliquées, Université Paris VII, mention Bien
- 1989-1990 : DEA Ressources génétiques et amélioration des plantes, Université Paris XI, mention Bien  
Stage de DEA à l'INRA de Lusignan (Station d'Amélioration des Plantes Fourragères) :  
" Etude des groupes d'aptitude à la combinaison chez le maïs ensilage "
- 1991-1994 : Thèse de doctorat de l'ENSA de Rennes, mention Très honorable avec félicitations, effectuée à l'INRA de Lusignan (Station d'Amélioration des Plantes Fourragères) : " Etude génétique et physiologique de l'architecture déterminée chez le lupin blanc d'hiver. Conséquences agronomiques et en sélection "

## **FONCTIONS**

- Co-responsable de l'équipe "Bases Génétiques de la morphogenèse" à l'Unité de Génétique et Amélioration des Plantes Fourragères de l'INRA de Lusignan
- Membre de la Commission de Spécialistes 66/69 de l'Université de Poitiers, de 1998 à 2001

## **ACTIVITES DE FORMATION**

- Formation par la recherche d'étudiants en thèse, DEA-DESS, maîtrise, BTS-DUT
- Présentations des travaux de recherches à des étudiants :
  - en Maîtrise de Biologie Cellulaire (Pr Tourte, Université de Poitiers), de 1995 à 1998,
  - en BTS Productions Végétales du Lycée Agricole de Venours,
  - en DAA Génétique Végétale (Pr Gallais, Ina Paris-Grignon), 1999,
  - à des étudiants en visite à l'INRA de Lusignan



## **CHARGES ADMINISTRATIVES**

- Membre du conseil de gestion du Centre INRA Poitou-Charentes, depuis 2003
- Membre du conseil de l'Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères depuis 1999

## **EXPERIENCE PROFESSIONNELLE**

- Juin-Août 1994: Sélectionneur de colza chez Hillebrand-Sandoz-Seeds à Ressons (Oise)
- Depuis Septembre 1994: Chargée de recherche à l'INRA, Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes, Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères, Lusignan

## **THEMES DE RECHERCHE**

- 1994-2001 : Génétique de caractères agronomiques chez la luzerne : valeur alimentaire, valeur protéique, production de semences
- Depuis 2001: Déterminants génétiques de la morphogenèse des légumineuses fourragères pérennes

## **LANGUES**

- Anglais courant
- Espagnol
- Notions d'arabe et d'allemand

## **DIVERS**

- Membre du conseil d'administration de l'UDAF86 (Union Départementale des Associations Familiales de la Vienne)
- Membre du conseil d'administration de l'association LA DORNE : crèche parentale et centre de loisirs, à Lusignan
- Sauveteur-secouriste du travail
- Pratique du Judo-Loisirs



## **2. Travaux de recherche**

### **2.1. Introduction**

Après avoir obtenu mon DEA d'amélioration des plantes (1989-1990) à l'Université Paris XI-Orsay, étant particulièrement motivée pour faire une carrière dans le secteur de la recherche appliquée en génétique végétale, aussi bien à l'INRA que dans le secteur privé de la sélection, j'ai effectué une thèse à la Station d'Amélioration des Plantes Fourragères à l'INRA de Lusignan. Mon sujet de thèse de doctorat (1991-1994) avait pour objectif l'analyse de l'intérêt de l'architecture déterminée pour l'amélioration génétique du rendement en graines du lupin blanc d'hiver. A l'issue de cette thèse, j'ai accepté un poste de sélectionneur de colza dans la société Hillebrand NK (filiale de Sandoz Seeds, maintenant Novartis) en Picardie. J'ai démissionné de ce poste après avoir réussi le concours d'entrée à l'INRA, sur un poste de CR2 à Lusignan (Station d'Amélioration des Plantes Fourragères) visant à l'acquisition de connaissances permettant d'optimiser des programmes d'amélioration génétique d'une légumineuse fourragère, la luzerne. Cette courte expérience (Juin-Août 1994) chez un sélectionneur privé m'a permis d'appréhender le fonctionnement dynamique d'une société internationale, ayant des objectifs clairs, et mettant les moyens nécessaires pour les réaliser.

De 1994 à 2001, j'ai travaillé sur des recherches appliquées à l'amélioration génétique de la luzerne (*Medicago sativa*), principalement sur la valeur alimentaire de ce fourrage. Puis, à partir de 2000, tenant compte de l'évolution des contextes scientifiques et techniques, j'ai choisi d'axer mes recherches sur l'identification des bases génétiques de la morphogenèse, en utilisant les ressources disponibles sur l'espèce modèle *Medicago truncatula*.

### **2.2. Développement des thèmes de recherche**

J'ai effectué l'ensemble de mes recherches sur des légumineuses (ou fabacées). La légitimité d'un investissement sur ce groupe d'espèces provient de leur aptitude à fixer l'azote de l'air en symbiose avec des *Rhizobium* du sol. Historiquement, l'intérêt de ces espèces réside dans leur forte production de protéines, permettant d'envisager de réduire la dépendance de l'Europe en protéines importées pour la nutrition des animaux. Plus récemment, la prise de conscience de (1) la pollution azotée issue d'un excès d'utilisation des engrais de synthèse, et (2) le coût énergétique de ces engrais, dont la fabrication industrielle requiert une forte consommation de réserves fossiles, incite à reconsidérer l'utilisation des légumineuses dans l'agriculture. Ce sont donc trois objectifs qui peuvent être considérés: production de protéines végétales pour assurer l'autonomie européenne pour la nutrition animale, sauvegarde de l'environnement en limitant les fuites d'azotes et gestion des réserves en énergie fossile.

#### **2.2.1. Etude de l'architecture déterminée chez le lupin blanc d'hiver**

Le lupin blanc est une légumineuse annuelle qui produit des graines riches en protéines (38%, cette teneur étant de 23 % chez le pois et 40% chez le soja). Cette espèce a le potentiel de production de protéines à l'hectare le plus élevé de tous les protéagineux des pays tempérés. Cependant, pour des problèmes techniques (mode de culture non maîtrisé) et économiques (rendements instables), le lupin n'était pratiquement pas cultivé en France. Un travail de sélection n'a débuté à l'INRA sur cette espèce qu'après le choc pétrolier de 1973, afin d'augmenter l'autonomie protéique de la France.



Avant mon arrivée en thèse, il avait été montré que les variétés de type hiver (semées en automne), grâce à leur fort développement végétatif, avaient un potentiel de rendement bien supérieur aux variétés de type printemps. Cependant, ces variétés hiver étaient caractérisées par une instabilité rédhibitoire de leur rendement. L'introduction par croisement de l'architecture déterminée chez les lupins d'hiver avait permis d'obtenir une réduction du développement végétatif, qui semblait prometteuse.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à montrer que, comme chez d'autres légumineuses à grosses graines, l'architecture déterminée était une voie pour réduire le développement végétatif et améliorer le rendement en graines et sa stabilité chez le lupin blanc d'hiver (*Lupinus albus*). Une étude écophysiologie et génétique de ce type architectural a donc été entreprise, en analysant ses conséquences sur l'élaboration du rendement en graines.

**Publication n° 28 :** Milford G.F.J., Day J., Huyghe C., **Julier B.**, 1993. *Floral determinacy in autumn-sown white lupin (Lupinus albus) : development of varieties for cooler European climates. Aspects of Applied Biology 34, Physiology of varieties, 89-97.*

En étudiant des croisements en générations F1, F2 et F3, nous avons montré que **l'hérédité de l'architecture déterminée est monogénique récessive**, ce qui permet une utilisation simple du caractère en sélection. Le **développement végétatif est réduit**, car tous les bourgeons passent précocement à l'état floral dans le cycle de la plante. Alors que la tige principale n'est pas affectée, les ramifications portent chacune moins de feuilles que chez les indéterminés, et le nombre de niveaux de ramifications est réduit. La distribution du nombre de feuilles sur les ramifications primaires en fonction de la position de la ramification sur la tige principale suit un profil caractéristique en forme de cloche, qui a été modélisé.

**Publication n°25 :** **Julier B.**, Huyghe C. (1993). *Description and model of the architecture of four genotypes of determinate autumn-sown white lupin (Lupinus albus L.) as influenced by location, sowing date and density. Annals of Botany 72, 493-501.*

Il existe une grande variabilité génétique pour l'architecture, bien que la relation positive entre tardiveté de floraison et développement végétatif (nombre de niveaux de ramification, nombre de feuilles par ramification) soit forte. L'interception de la lumière par le couvert au cours du temps est similaire chez les déterminés et les indéterminés. Cependant, les déterminés atteignent une interception maximale moins importante, à relier à leur indice foliaire restreint. La proportion de lumière qui parvient jusqu'aux feuilles de la tige principale est accrue.

**Le rendement des génotypes déterminés semble compétitif avec celui des génotypes indéterminés. La production de matière sèche est plus faible, mais l'indice de récolte est supérieur. La date de maturité est sensiblement avancée, surtout sous des climats frais et humides, et la stabilité du rendement est plus grande.** Ces caractéristiques sont liées à la réduction du développement végétatif, et à une compétition entre développement végétatif et développement reproducteur plus faible que celle observée chez les indéterminés. Le rendement est essentiellement produit sur la tige principale et le premier niveau de ramifications, ces sites étant moins sujets à des aléas climatiques que les niveaux supérieurs de ramifications. La variabilité génétique pour les composantes du rendement est large. On met en évidence des relations entre certains caractères



d'architecture et les potentialités de rendement. Un développement végétatif trop restreint aussi bien qu'un développement végétatif excessif nuisent au rendement. Les caractères de développement des ramifications, en nombre de feuilles et en nombre de niveaux, sont des critères de sélection pertinents chez les lupins déterminés.

**Publication n°20 :** Julier B., Huyghe C., Papineau J., Billot C., Deroo C. (1995). *Genetic and environmental variation in architecture and yield components in determinate white lupin (Lupinus albus L.). Euphytica 81, 171-179.*

**Publication n°22 :** Julier B., Huyghe C., Papineau J. (1994). *Dry matter and nitrogen accumulation on autumn-sown white lupin cv. Lunoble. European Journal of Agronomy 3, 153-160.*

**Publication n°23 :** Huyghe C., Julier B., Harzic N., Papineau J. (1994). *Yield and yield components on autumn-sown white lupin cv. Lunoble. European Journal of Agronomy 3, 145-152.*

**Publication n°26 :** Julier B., Huyghe C., Papineau J. (1993). *Dry matter and nitrogen accumulation and seed yield in autumn-sown determinate white lupins. Agronomie 13, 877-888.*

**Publication n°27 :** Julier B., Huyghe C., Papineau J., Milford G.F.J., Day J., Billot C., Mangin P. (1993). *Seed yield and yield stability of determinate and indeterminate autumn-sown white lupin grown at different locations in France and the UK. Journal of Agricultural Science 121, 177-186.*

Pendant cette thèse, j'ai eu l'occasion de travailler dans une unité qui était reconnue au niveau international. J'ai développé des collaborations avec des laboratoires étrangers. Ainsi, l'analyse de la stabilité du rendement a été effectuée en lien direct avec des collègues de Rothamsted Experimental Station (Grande-Bretagne). Cependant, il faut remarquer que si une recherche sur une espèce peu travaillée au niveau international permet de produire assez facilement des résultats originaux, la faiblesse des connaissances disponibles engendre des risques dans les travaux de recherche. J'ai donc décidé de privilégier des thématiques de recherches et des espèces plus largement travaillées dans la communauté scientifique.

## **2.2.2. Génétique de caractères agronomiques chez la luzerne**

### **2.2.2.1. Contexte**

La luzerne, légumineuse pérenne, est l'espèce fourragère qui permet de récolter le plus de protéines à l'hectare en zone tempérée. Son intérêt pour l'alimentation des ruminants nécessite de réaliser des recherches pour l'amélioration de cette espèce, soit en définissant des critères pour de nouveaux objectifs de sélection, soit en développant des méthodologies pour accélérer les processus de sélection. Autotétraploïde et allogame, sa génétique et sa biologie compliquent beaucoup les travaux d'amélioration et limitent le progrès génétique. Cependant, cette complexité est à la source de recherches passionnantes, comme le montrent les développements théoriques en génétique quantitative (Y. Demarly et A. Gallais dans les années 1960-1970 surtout, à l'INRA de Lusignan).



En 1994 en France, deux unités de l'INRA travaillaient sur la luzerne, l'une à Montpellier, axée sur les ressources génétiques (collecte, évaluation, structuration de la diversité génétique) et l'autre à Lusignan, centrée sur l'amélioration génétique de l'espèce. Par ailleurs, des recherches fondamentales (CNRS Gif sur Yvette et Toulouse) étaient conduites sur l'espèce modèle *Medicago truncatula*, offrant potentiellement des possibilités de collaboration. Au niveau international, les travaux sur la luzerne portaient, à ce moment, principalement sur l'amélioration de différents caractères (résistance à des maladies ou ravageurs, résistance à la sécheresse ou au froid, rendement, pérennité, aptitude au pâturage, etc.). Les équipes nord-américaines étaient fortement présentes. Les équipes de l'Europe de l'Est étaient en déclin, faute de financement, et celles du Maghreb peinaient à structurer leurs travaux. Au niveau ouest-européen, des équipes italiennes et espagnoles continuaient à développer des recherches sur cette espèce.

Six entreprises privées sélectionnaient cette espèce (cinq maintenant), de façon active mais en ayant des structures assez fragiles car les retours financiers de la vente des semences sur les espèces fourragères pérennes sont plus faibles que sur les espèces de "grande culture". Ces entreprises, regroupées dans l'Association des Créateurs de Variétés Fourragères (ACVF), entretenaient depuis les années 1970 une collaboration avec l'INRA, donnant une légitimité au caractère appliqué des recherches. Les recherches ont donc porté sur des thématiques stratégiques pour l'amélioration de la luzerne.

Ainsi, de 1994 (date de mon arrivée sur le sujet) à 2001, quatre domaines se situant juste en amont de la création variétale ont été traités, en utilisant principalement les outils classiques de la génétique quantitative :

- (1) L'analyse de la **variabilité génétique du complexe d'espèces *Medicago sativa*** et sa structuration. La connaissance du matériel génétique est indispensable à tout programme d'amélioration.
- (2) **La valeur énergétique** de la luzerne. Parmi les composantes de la valeur alimentaire, ce critère a été identifié comme frein à l'utilisation de ce fourrage dans les rations des animaux laitiers à fort niveau de production.
- (3) **La dégradabilité des protéines** des légumineuses fourragères dans le rumen. Les deux légumineuses fourragères les plus cultivées (la luzerne et le trèfle blanc) produisent un fourrage riche en protéines qui sont mal valorisées par les ruminants car trop vite dégradées dans le rumen.
- (4) **La production des semences** de la luzerne. La production de semences chez les espèces fourragères est une composante majeure de la commercialisation des variétés, même si ce n'est pas directement une composante de la valeur agronomique. En 30-40 ans de sélection de la luzerne, le progrès génétique sur ce caractère a été négligeable, faute de bases scientifiques et de critères de sélection faciles à mettre en œuvre.

Ces thématiques étaient en adéquation avec les objectifs du Département de Génétique et Amélioration des Plantes de l'INRA qui visaient à construire des outils méthodologiques pour une utilisation finalisée en amélioration génétique.

Pour les trois dernières thématiques, j'ai entrepris la démarche suivante :

- 1) choix des caractères à mesurer,
- 2) évaluation de la variabilité génétique disponible, avec mesure de l'héritabilité des caractères,

Figure 1. Le complexe d'espèces *Medicago sativa*.

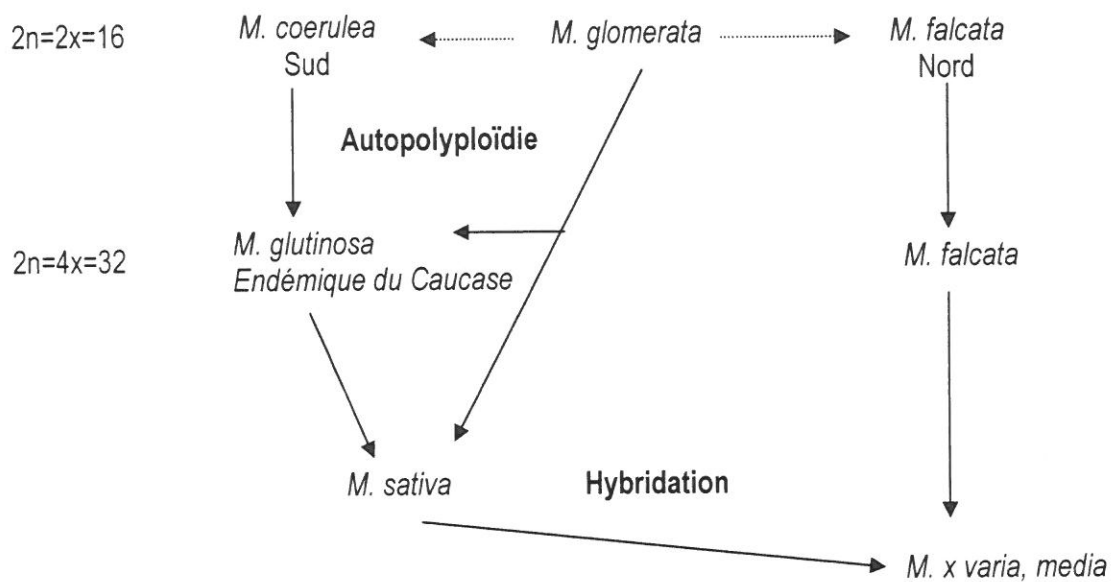
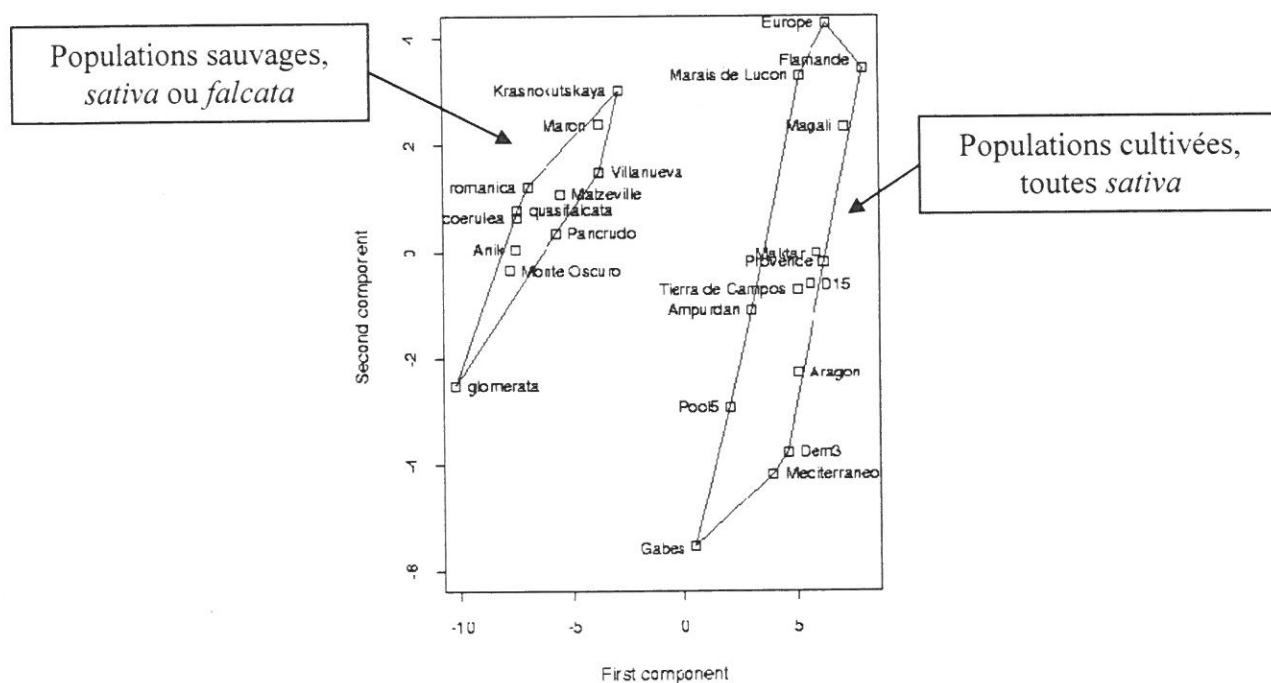


Figure 2. Répartition de populations de luzerne sur un diagramme d'analyse en composantes principales basé sur des caractères morphologiques et de rendement



- 3) calcul des corrélations avec d'autres composantes de la valeur agronomique et analyse des interactions génotypes x milieux,
- 4) définition des critères de sélection et conséquences sur les schémas de sélection.

#### **2.2.2.2. Variabilité génétique dans le complexe d'espèces *Medicago sativa***

Le complexe d'espèces (Michaud et al. 1988) recouvre une large gamme de populations ayant des caractéristiques variées, et dispersées sur l'ensemble des continents (figure 1). La caractérisation de la variabilité disponible permet de mieux gérer les collections de ressources génétiques, de positionner le matériel cultivé français dans l'ensemble de la diversité du complexe d'espèces et d'identifier du matériel génétique potentiellement intéressant dans les programmes de sélection.

- Une étude bibliographique a permis d'établir l'origine génétique du matériel génétique français, et de reprendre l'historique de son maintien traditionnel et de son évolution avant la mise en place des premiers schémas de sélection dans les années 1950-60.

**Publication n°17 : Julier B.** (1996). Traditional seed maintenance and origins of the French lucerne landraces. Euphytica 92, 353-357.

Les analyses ont été réalisées en deux temps. De 1992 à 1994, des populations diploïdes et tétraploïdes, sauvages ou cultivées, ont été étudiées pour des caractères morphologiques et de productivité, des caractéristiques biochimiques et la résistance aux parasites. Puis, entre 1993 et 1996 (thèse de M.L. Crochemore, 1993-1996, encadrée par C. Huyghe, co-encadrée par moi-même), l'analyse du complexe *sativa* - *falcata* a porté uniquement sur des populations tétraploïdes, sauvages et cultivées. Cette étude avait pour objectif de décrire à l'aide de différents caractères la variabilité génétique disponible au sein du matériel classiquement utilisé dans les programmes d'amélioration d'Europe Occidentale et dans du matériel provenant d'autres régions où la luzerne est cultivée. Les différents caractères utilisés sont des caractères morphologiques mesurés en plantes isolées et des marqueurs moléculaires RAPD.

- **Les caractères morphologiques et de rendement** différencient nettement les types sauvages et les cultivés, les types sauvages de *sativa* et de *falcata* ayant un port plus prostré, une repousse lente après une coupe, une faible hauteur, un faible rendement en matière sèche et une dormance automnale très précoce (figure 2). Le groupe des populations sauvages comprend à la fois des populations diploïdes et tétraploïdes, *falcata* ou *sativa*. Avec les caractères analysés, seule la couleur des fleurs permet de distinguer les populations sauvages *sativa* d'Espagne (mielga) à fleurs violettes des populations *falcata* à fleurs jaunes.

**Publication n°19 : Julier B., Porcheron A., Ecalle C., Guy P.** (1995). Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). Agronomie 15, 295-304.

Parmi les populations cultivées, celles originaires du nord de la France ont une résistance à l'hiver supérieure aux méditerranéennes, ainsi qu'un meilleur rendement. Par leurs caractères de résistance à l'hiver et leurs fleurs bigarrées, ces populations *sativa* françaises montrent qu'elles ont intégré certains caractères provenant de la sous-espèce *falcata* (par introgression). Au sein des populations cultivées, les caractères morphologiques mesurés séparent les types à port évasé issus d'une sélection pour l'aptitude au pâturage des types dressés.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

**Publication n°14** : Crochemore M.L., Huyghe C., Ecalle C., Julier B. (1998). Structuration of alfalfa genetic diversity using agronomic and morphological characteristics. Relationship with RAPD markers. *Agronomie* 18, 79-94.

• **Pour la résistance à quatre maladies** (*Verticillium albo-atrum*, *Colletotrichum trifolii*, *Sclerotinia trifoliorum* et *Pseudopezizza medicaginis*) et au nématode des tiges (*Ditylenchus dipsaci*), ces populations montrent des différences de sensibilité, mais, excepté pour *P. medicaginis*, on ne retrouve pas la distinction entre populations sauvages ou cultivées, ni entre les populations *sativa* et *falcata*. La teneur en acide médicagénique (composant des saponines qui possède un effet anti-nutritionnel chez les monogastriques) est la plus faible chez les populations *sativa* méditerranéennes, plus élevée chez les populations *falcata*, et intermédiaire dans les populations *sativa* introgressées de *falcata* que sont les variétés flamandes françaises.

**Publication n°16** : Julier B., Guy P., Castillo-Acuna C., Caubel G., Ecalle C., Esquibet M., Furstoss V., Huyghe C., Lavaud C., Porcheron A., Pracros P., Raynal G. (1996). Genetic variation for disease and nematode resistance and forage quality in perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Euphytica* 91, 241-250.

• **Les populations ont été caractérisées à l'aide de marqueurs RAPD.** Elles ont été séparées en trois groupes d'origine : populations *falcata*, populations de type Flamand, populations méditerranéennes et de type Provence. Les dissimilarités intra- et inter-population ont été calculées. A l'aide de la méthode d'Analyse Moléculaire de Variance (Excoffier et al. 1992), il a été montré que la variance totale se répartissait à 50.6% au niveau intra-population, 41.7% au niveau inter-population intra-groupe et à 7.7% au niveau inter-groupe. Si on considère que des marqueurs neutres comme les RAPD sont de bons représentants de caractères non soumis à la sélection, ces résultats suggèrent que la variation intra-population est une source majeure de variabilité. Les dendrogrammes tracés à l'aide des distances inter-population mettent en évidence la structuration liée aux sous-espèces mais ne rejoignent pas la structuration obtenue pour les caractères morphologiques au sein des types cultivés. Cela peut être expliqué par le fait que la structuration obtenue sur les caractères morphologiques est peut-être due à des variations sur un faible nombre de caractères majeurs tels que le port ou le niveau de 'dormance'. Les marqueurs neutres comme les RAPD peuvent difficilement permettre de retrouver une telle structuration.

**Publication n°18** : Crochemore M.L., Huyghe C., Kerlan M.C., Durand F., Julier B. (1996). Partitioning and distribution of RAPD variation in the *Medicago sativa* complex. *Agronomie* 16, 421-432.

Ces études ont permis d'évaluer l'ampleur de la diversité génétique dans le complexe *M. sativa*, et ce pour un ensemble de caractères d'intérêt agronomique. Elles ont souligné l'importance de la variabilité génétique disponible au sein du matériel utilisé dans les programmes d'amélioration ouest-européens. L'importante diversité disponible au sein du matériel *falcata* peut être facilement utilisée en croisement pour l'amélioration des luzernes flamandes. La quantification à l'aide des marqueurs RAPD de l'importante variation intra-population souligne la nécessité d'adapter les programmes de sélection de façon à pouvoir mesurer et exploiter cette source de variation pour l'amélioration des caractères agronomiques.



### **2.2.2.3. Valeur énergétique de la luzerne**

La valeur alimentaire d'un fourrage résulte de plusieurs composantes: valeur énergétique (énergie que l'animal retire de la consommation du fourrage), valeur protéique (quantité de protéines que l'animal valorise), valeur minérale, etc. Pour optimiser la production animale (maximiser la production en limitant les coûts, souvent en réduisant le nombre d'animaux qui produisent chacun davantage), il convient d'améliorer la valeur énergétique des fourrages. En particulier, la luzerne, qui possède des caractéristiques fourragères favorables (richesse en protéines, richesse en minéraux, ingestibilité, pouvoir tampon réduisant les risques d'acidose), a une valeur énergétique relativement médiocre qui limite la part de luzerne que l'agriculteur introduit dans la ration, pour ne pas réduire sa valeur énergétique.

Nous avons donc cherché à évaluer les possibilités de progrès génétique pour la valeur énergétique de la luzerne. Il avait été établi que la diminution de la valeur énergétique de la luzerne, mesurée par sa digestibilité, au cours de la croissance résultait de deux facteurs: la diminution de la proportion de feuilles dans le fourrage total (rapport feuilles/tiges), les feuilles étant plus digestibles que les tiges, et la diminution de la digestibilité des tiges associée à leur lignification (Lemaire et Allirand 1993; Mowat et al. 1965; Nordkvist et Aman 1986). Les travaux décrivant une variabilité génétique pour la digestibilité de la luzerne étaient rares (Buxton et al. 1987; Lenssen et al. 1991; Wilson et al. 1978) et basés sur des gammes génétiques n'incluant pratiquement aucun matériel européen, et montraient essentiellement que tout progrès dans la digestibilité était associé à une détérioration du rendement fourrager.

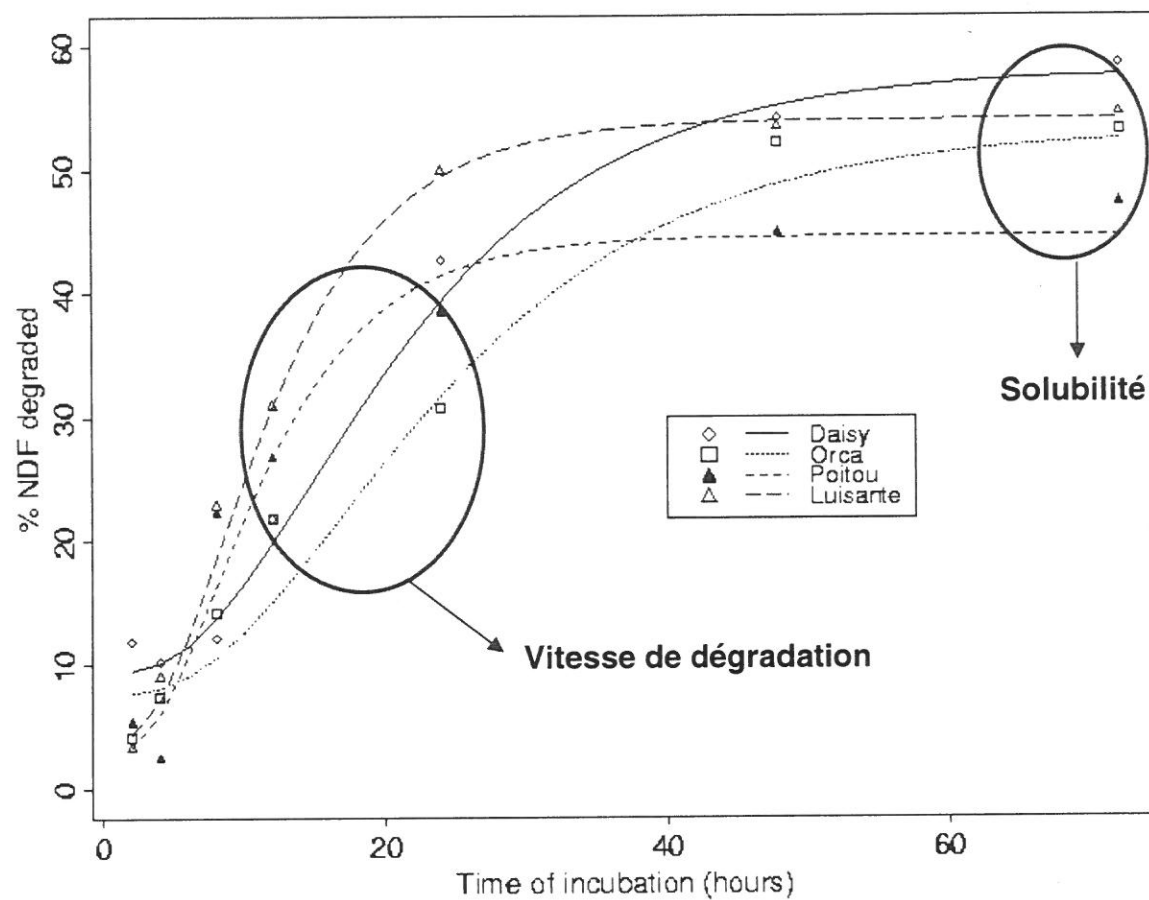
J'ai articulé le programme autour de quatre points, pour (1) choisir des méthodes de mesure, fiables et utilisables en routine, (2) évaluer la variabilité du caractère, (3) estimer son héritabilité, et (4) proposer des méthodes et des outils pour la création variétale. Ce programme a été soutenu par deux contrats de branches successifs, financés par le Ministère de l'Agriculture, avec la collaboration de l'ACVF (Association des Créateurs de Variétés Fourragères), et par un contrat entre l'INRA et le SNDF (Syndicat National des Déshydrateurs de France).

#### **Choix des méthodes de mesure**

Plusieurs méthodes relativement faciles à mettre en œuvre sont disponibles pour la mesure de la digestibilité des aliments: la solubilité enzymatique qui consiste à incuber un fourrage avec des enzymes intervenant dans la digestion (Aufrère 1982), et des teneurs en fibres (Goering et Van Soest 1970) qui mesurent la quantité et la composition des parois cellulaires, composantes des cellules qui limitent la digestion: Neutral Detergent Fiber (ou NDF qui englobe la cellulose, les hémicellulose et la lignine), Acid Detergent Fiber (ADF, cellulose et lignine) et Acid Detergent Lignin (ADL ou lignine). Ces quatre méthodes ont été utilisées pour évaluer la variabilité génétique entre variétés ou génotypes. Elles ont une précision suffisante pour mettre en évidence la variabilité génétique chez la luzerne, et sont très corrélés les unes aux autres. La synthèse de toutes mes études permet de préconiser l'utilisation de l'ADF pour comparer les variétés.

**Publication n°55 :** Julier B., Barre P., Hébert Y., Huguet T., Huyghe C. (2003) *Methodology of alfalfa breeding: a review of recent achievements. Proc 25<sup>th</sup> Eucarpia Fodder Crops and Amenity grasses section Meeting, Czech J. Genet. Plant Breed.* 39, 71-81.

Figure 3 . Cinétique de dégradation des parois (NDF) de luzerne dans le rumen de vaches fistulées, pour quatre variétés.



De façon similaire, les tests standards américains recommandent la mesure de l'ADF pour prédire la digestibilité, en préconisant le NDF pour mesurer l'ingestibilité (Sheaffer et al. 1995). D'après mes résultats, les variétés se classent de la même façon avec les deux caractères. Pour tous ces caractères, des équations de prédiction dans le proche infrarouge (SPIR) ont été développées et transmises aux entreprises privées de sélection qui les utilisent en routine. Elles permettent une mesure d'un très grand nombre d'échantillons avec un coût modéré, comme cela est nécessaire en sélection.

Une méthode de laboratoire a été mise au point pour mesurer la digestibilité des parois (ou digestibilité du NDF), le composant cellulaire faiblement digestible. Ce caractère est très corrélé à la teneur en NDF chez la luzerne, comme cela a aussi été décrit par d'autres auteurs (Jung et Lamb 2003).

**Publication n°13** : Julier B., Lila M., Furstoss V., Travers V., Huyghe C. (1999). *Measurement of cell-wall digestibility in lucerne using the filter bag technique. Animal Feed Science and Technology* 79, 239-245.

Les méthodes d'évaluation de la digestion des fourrages dans le rumen se développant, j'ai cherché à savoir si les méthodes de laboratoire rendaient compte de la dynamique du processus de digestion. La cinétique de dégradation de la matière sèche et des parois dans le rumen de vaches fistulées révèle une variation génotypique pour la vitesse de dégradation du fourrage et une variation pour la digestibilité potentielle (figure 3). Les méthodes de laboratoire rendent compte de la digestibilité potentielle. Cependant, la digestibilité des parois mesurée dans le rumen est nettement plus élevée que celle mesurée en laboratoire. Aucune méthode de laboratoire ne mesure la vitesse de dégradation. Or celle-ci est probablement une composante clé de la valeur alimentaire d'un fourrage, en jouant sur son ingestibilité (quantité de fourrage volontairement ingérée par l'animal).

**Publication n°10** : Julier B., Emile J.C., Lila M., Huyghe C. (2001) *Phenotypic variation for in sacco dry matter and fibre degradation kinetics in lucerne. Australian Journal of Agricultural Research*, 52, 439-445.

## **Mise en évidence et explicitation de la variabilité génétique**

### **Variabilité génétique**

Dans nos programmes, la digestibilité a été mesurée sur les plantes entières, dans des dispositifs en parcelles denses. En parallèle, les rendements en biomasse, la teneur en protéines et le rapport feuilles/tiges ont été mesurés. Les variations de digestibilité des plantes entières ont toujours été comparées en tenant compte des variations de biomasse. En effet, une amélioration génétique de la digestibilité doit être faite sans dégradation du rendement fourrager ou d'autres caractères d'importance agronomique.

Une même cinétique de diminution de la digestibilité au cours de la croissance a été observée pour l'ensemble des génotypes. Cependant, des différences entre variétés pour la digestibilité de la plante entière ont été observées, résultant de variations pour deux caractères: le rapport feuilles/tiges et la digestibilité des tiges. Une diminution du rapport feuilles/tiges étant toujours associée, par construction, à une diminution de la biomasse produite, l'existence d'une variabilité pour la digestibilité des tiges permet d'envisager l'amélioration de la digestibilité de la plante entière sans réduction du rendement. Les variétés les plus digestibles sont celles qui associent favorablement les deux caractères, rapport feuilles/tiges et digestibilité des tiges.

**Publication n°15** : Julier B., Huyghe C. (1997) *Effect of growth and cultivar on alfalfa digestibility in a multi-site trial. agronomie*, 17, 481-489.

Figure 4. Variabilité génétique pour la relation entre le rendement et la digestibilité, établie sur 150 variétés de luzerne

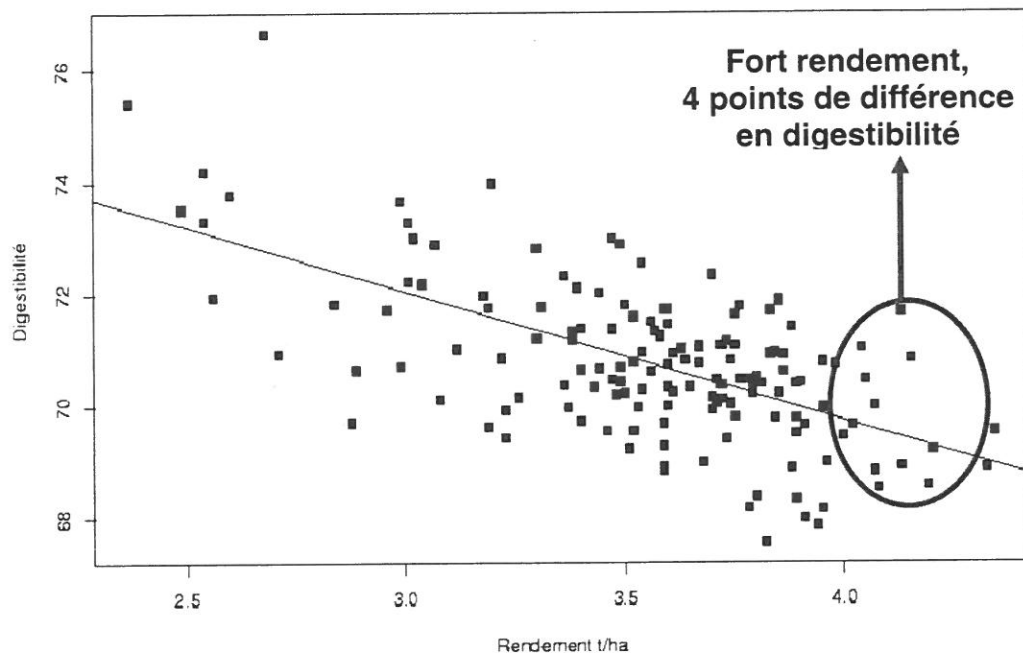
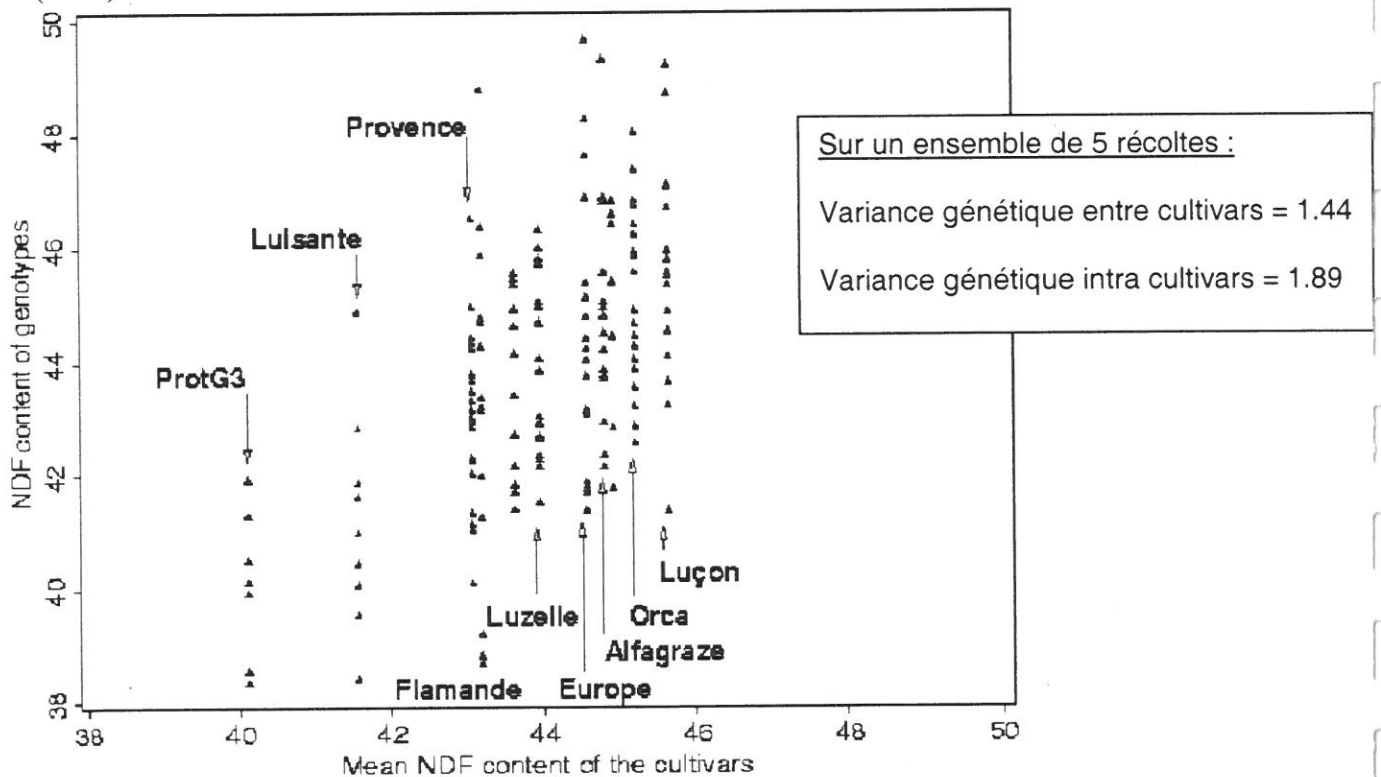


Figure 5. Variabilité entre et à l'intérieur des variétés de luzerne pour la digestibilité (NDF)



Au stade de récolte du fourrage, une large variabilité génétique pour la digestibilité a été mise en évidence: entre populations du complexe d'espèces *Medicago sativa* (publication n°16), entre variétés cultivées (publication n°15), entre génotypes à l'intérieur des variétés, à niveau de rendement équivalent (figures 4 et 5). L'identification de la variabilité intra-variétale et de son ampleur a été particulièrement novatrice et a conduit à proposer des modifications des schémas de sélection pour la prendre en compte.

**Publication n°12 :** Julier B., Huyghe C., Ecalte C. (2000). *Within- and among-cultivar genetic variation in alfalfa : forage quality, morphology and yield. Crop Science 40, 365-369.*

Le milieu influence la digestibilité, mais il n'a pas été possible d'identifier les paramètres pédoclimatiques qui pénalisent ou favorisent la digestibilité (publication n°15). Les interactions entre génotypes et milieux sont significatives, mais leur importance reste néanmoins limitée. La stabilité de la digestibilité est variable selon les variétés, certaines ayant des performances stables et d'autres ayant une digestibilité instable selon le milieu. Cette observation rejoint celle de d'autres auteurs (Sheaffer et al. 1998).

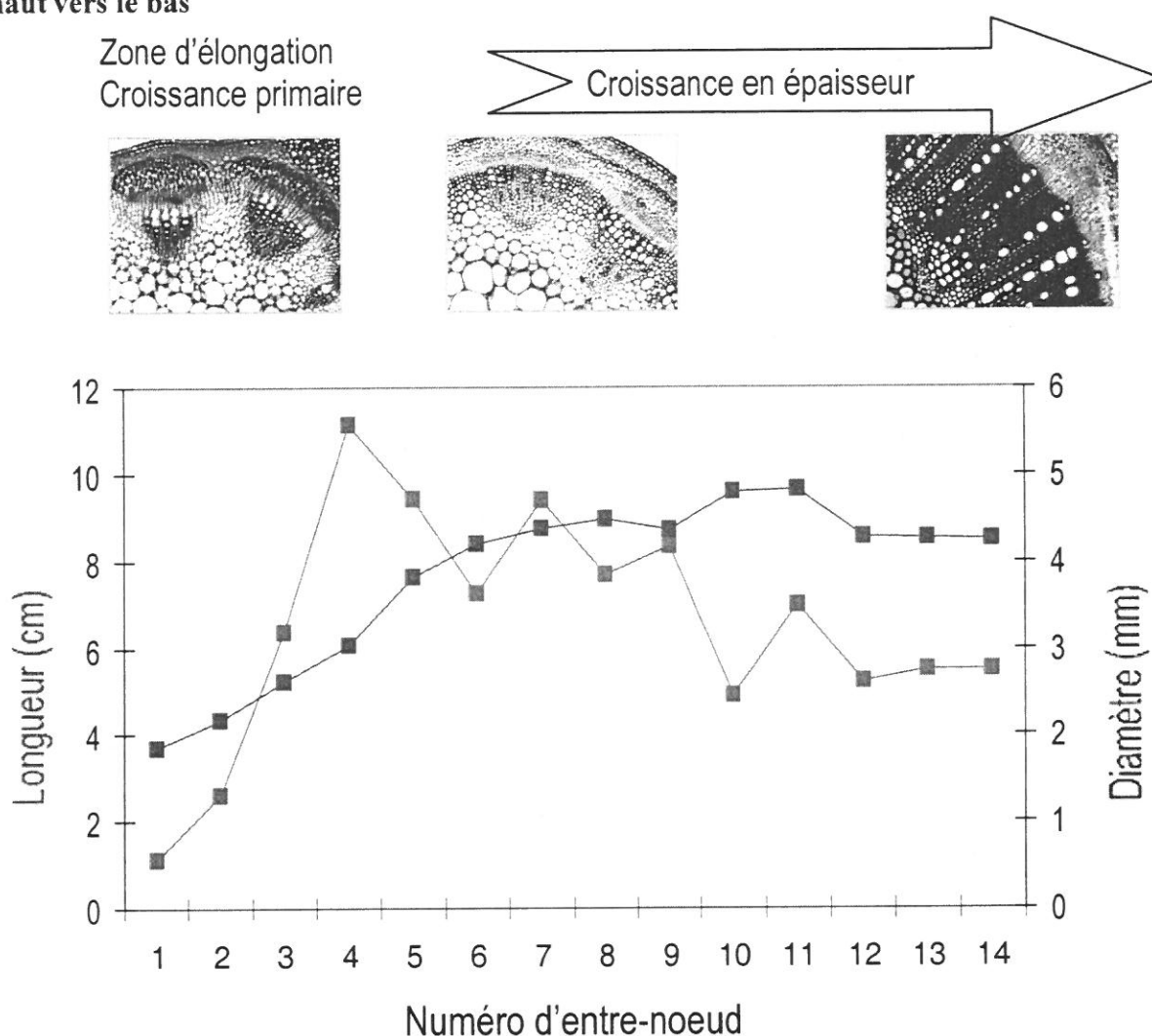
Cependant, la variabilité génétique pour la digestibilité des parois et pour la teneur en lignine des parois est faible, et ces deux caractères sont fortement liés à la teneur en parois (NDF). Chez la luzerne, tout se passe comme si chaque unité de paroi se mettait en place avec une part fixe de lignine, elle-même étant le paramètre-clé de la digestibilité des parois. Ce schéma semble être général aux dicotylédones (Barrière et al. 2005).

#### Compréhension de la variation pour la digestibilité des tiges

Nous avons cherché à relier la digestibilité et la teneur en lignine des tiges à la structure histologique des tiges (thèse de F. Guines, 2002). La luzerne étant une dicotylédone, la tige est un organe contenant à la fois des tissus primaires et des tissus secondaires, ces derniers étant en partie responsables de la croissance en diamètre. De plus, les tissus secondaires se mettent progressivement en place du haut vers le bas de la tige, avec une progression de la lignification de certains tissus, xylème et fibres supraphloémiennes (Engels et Jung 1998; Jung et Engels 2002; Kühbauch et Bestajovsky 1983) (figure 6). Nos travaux ont permis de quantifier la part de chacun de ces tissus tout le long de la tige. Des analyses biochimiques ont montré que la teneur en lignine des parois est variable le long de la tige, puisqu'elle augmente vers le bas de la tige (F. Guines 2002). L'organisation générale de la tige est similaire pour les différents génotypes. Cependant, une variabilité génétique pour les caractères histologiques (diamètre de la tige, proportions de parenchyme médullaire, de xylème, d'écorce, épaisseurs des parois du xylème) a été mise en évidence. Des corrélations négatives entre la digestibilité de la tige et des caractères histologiques (proportion de xylème dans la tige et épaisseur des parois du xylème) ont été trouvées. Il n'y a pas de corrélation entre la digestibilité et le diamètre de la tige.

**Publication n°6 :** Guines F., Julier B., Ecalte C., Huyghe C. (2002) *Genetic control of quality traits of lucerne (Medicago sativa L.). Australian Journal of Agricultural Research 53, 401-407.*

**Figure 6. Evolution de la morphologie et de l'histologie de la tige de luzerne depuis le haut vers le bas**



**Tableau 1. Caractérisation de trois paires de polycross issus d'un et deux cycles de sélection divergente pour la digestibilité (A+ vs A-, B+ vs B-, C+ vs C-), en comparaison avec trois variétés témoin. La teneur en NDF, la biomasse et la teneur en protéines sont des moyennes issues de 5 coupes au cours de 2 ans pour le matériel issu du premier cycle de sélection, et de 2 coupes au cours d'une année pour le matériel issu du second cycle de sélection.**

Cultivar	Premier cycle			Second cycle		
	NDF %	Biomasse g MS/ parcelle	Protéines %	NDF %	Rendement t/ha	Protéines %
Polycross A+	44.9 cd	413 a	14.8 b	40.6 b	3.6 a	17.2 a
Polycross A-	46.4 bc	411 a	14.1 c	45.6 a	3.6 a	15.3 ab
Polycross B+	43.9 d	391 a	15.5 a	42.2 ab	3.5 a	17.5 a
Polycross B-	45.8 bc	362 a	13.9 c	44.3 ab	3.8 a	15.6 ab
Polycross C+	44.1 d	386 a	15.4 a	40.3 b	3.3 a	17.5 a
Polycross C-	47.5 a	382 a	13.1 d	45.4 a	3.8 a	14.7 b
Témoin <sup>1</sup>	45.8 bc	384 a	14.1 c	46.3 a	3.5 a	15.4 ab
Luisante	42.6 e	289 c	14.8 b	42.0 ab	3.4 a	17.2 a
Natsuwakaba	45.8 bc	326 b	13.9 c	44.1 ab	3.3 a	15.8 ab

Pour chaque variable, les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement

<sup>1</sup> Cv Europe au premier cycle, cv Mercedes au second cycle

## Héritabilité de la digestibilité

L'héritabilité de la digestibilité, évaluée dans des plans de croisements diallèle et factoriel, est faible, que ce soit au sens large ou au sens strict, en raison d'une variance d'erreur importante. Cependant, l'héritabilité étant principalement additive, les caractères offrent une prise à la sélection. L'analyse des corrélations entre la digestibilité et les autres caractères agronomiques suggère qu'il est possible d'améliorer génétiquement l'ensemble des caractères: la corrélation génétique entre digestibilité et rendement est négative mais relativement faible, et il n'y a pas de corrélation entre la digestibilité et la verse ou la résistance aux maladies (*publication n°16*).

*Publication n°7: Guines F., Julier B., Ecalte C., Huyghe C. (2002) Genetic control of quality traits of lucerne (Medicago sativa L.). Australian Journal of Agricultural Research 53, 401-407.*

## Conséquences en sélection

Au cours de ce programme, on a toujours cherché à pouvoir appliquer les résultats à la sélection. Ainsi, à titre d'illustration (tableau 1), l'intérêt de la variabilité intra-variété a été montrée par une sélection divergente (*publication n°55*). De même, un schéma de sélection permettant d'inclure ce critère sans détériorer la valeur agronomique a été proposé. Enfin, un programme a été mené avec le CTPS pour prendre en compte la digestibilité comme critère de la Valeur Agronomique et Technologique dans l'inscription des variétés de luzerne au Catalogue Officiel Français.

### 2.2.2.4. Dégradabilité des protéines

Les espèces fourragères, et particulièrement les deux légumineuses les plus cultivées (la luzerne et le trèfle blanc), produisent un fourrage riche en protéines qui sont mal valorisées par les ruminants car trop vite dégradées dans le rumen (Broderick 1995; Dhiman et Satters 1993). Cette dégradation rapide est à l'origine de la météorisation (production de mousse dans le rumen, pouvant mettre la vie de l'animal en danger par étouffement) qui intervient parfois pour des ruminants pâturant des légumineuses (Howarth et al. 1977). De plus, quand la ration est trop pauvre en énergie, les protéines dégradées dans le rumen sont souvent perdues sous forme d'ammonium excrété, contribuant à la pollution de l'environnement (Tamminga 1990). Cependant, les légumineuses fourragères qui produisent des tannins condensés (lotiers, coronille) ont une dégradabilité des protéines plus limitée (Barry et McNabb 1999; Hedqvist et al. 2000; McMahon et al. 2000), mais leur valeur agronomique est médiocre. La réduction de la dégradabilité des protéines végétales fournies aux ruminants serait un atout majeur, en termes économique et environnemental.

Au cours de cette étude, nous avons testé différentes méthodes de mesure de la dégradabilité des protéines, recherché de la variabilité génétique entre variétés de quatre espèces de légumineuses, puis évalué des méthodes visant à ajouter des tannins à du fourrage de luzerne ou de trèfle. Ce programme a été soutenu par l'Union Européenne (FAIR 1999-2002), et a été réalisé en collaboration avec des équipes italienne (F. Damiani, CNR Perugia) et britannique (M. Robbins, IGER Aberystwyth).

## Choix des méthodes de mesure

La méthode de référence est la cinétique de dégradation des protéines dans le rumen de vaches fistulées (méthode *in situ*), technique particulièrement lourde à mettre en œuvre (Nozière et Michalet-Doreau 2000). Des méthodes de laboratoire sont décrites (Aufrère et al. 1991; Hristov et Broderick 1994; Poos-Floyd et al. 1985; Sniffen et al. 1992), mais elles ont essentiellement été utilisées pour

**Tableau 2. Valeurs moyennes pour quatre espèces de légumineuses fourragères, de la teneur en protéines, la teneur en tannins condensés, et la proportion de protéines résiduelles après incubation dans le rumen de vaches fistulées. La variabilité entre cultivars de chaque espèce est indiquée par \*, \*\*\* (significatif à 5% et 1%, respectivement) ou ns (non significatif)**

Espèce	Protéines (% MS)	Tannins condensés (% MS)	Protéines résiduelles après		
			2 h	8 h	48 h
				%	
Luzerne	19.2	-	43.9 ns	30.0 *	8.0 ***
Trèfle blanc	22.3	-	56.5 ns	44.2 ns	5.3 ns
Lotier	21.8	1.57	60.8 ***	49.9 ***	8.6 ***
Coronille	25.0	0.43	57.0	50.3	8.8

comparer des aliments ou des traitements technologiques. Ces méthodes risquaient de manquer de précisions, car au cours de traitements technologiques, les variations induites sont beaucoup plus importantes que des variations génétiques à l'intérieur d'une espèce.

Nous avons évalué la variabilité génétique entre espèces de légumineuses fourragères et entre variétés avec les animaux fistulés. Les paramètres des cinétiques de dégradation des protéines, obtenus après modélisation (Orskov et McDonald 1979), sont suffisamment précis pour détecter d'éventuelles différences génétiques. En parallèle, des méthodes de laboratoire ont été testées. Deux d'entre elles ont donné des résultats corrélés aux mesures *in situ* de dégradation des protéines : la solubilité des protéines dans un tampon et la teneur en azote du résidu NDF. Ces deux critères sont assez aisément mesurables sur un grand nombre d'échantillons, et leur précision permet de mettre en évidence des différences génétiques.

### **Variabilité entre espèces (luzerne, trèfle blanc, lotier, coronille) et entre variétés**

La dégradabilité des protéines a été mesurée avec la méthode de référence *in situ* (tableau 2). Les protéines de lotier et de coronille sont moins vite dégradées dans le rumen que les protéines de trèfle blanc et de luzerne. Chez le lotier, il y a de la variabilité pour la dégradabilité des protéines entre variétés. Cette variabilité est expliquée d'une part par des différences de teneur en tannins, d'autre part par la dégradabilité de la matière sèche (elle-même fonction de la teneur en parois). De la façon similaire, il a été montré sur une gamme variée de différences espèces que la teneur en tannin n'explique pas seule les différences de dégradabilité des protéines (Broderick et Albrecht 1997). Entre variétés de trèfle blanc ou de luzerne, la variabilité génétique est négligeable, et uniquement liée à des différences de teneur en parois. Ceci rejoint une autre étude menée sur la luzerne (Tremblay et al. 2000) dans laquelle la variabilité entre variétés a été trouvée très faible et liée à la dégradabilité de la matière sèche.

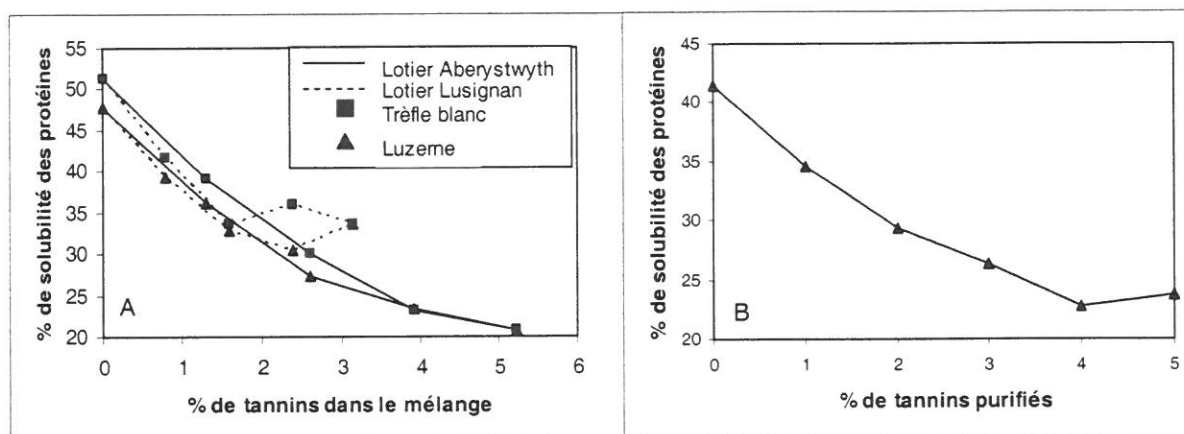
***Publication n°5:*** Julier B., Guines F., Emile J.C., Huyghe C. (2003) *Variation in protein degradability in dried forage legumes. Animal Research* 52, 401-412.

Chez le lotier, il serait possible de rechercher des variétés combinant de façon optimale la teneur en tannins, la dégradabilité des protéines et la digestibilité de la matière sèche. Cependant, la valeur agronomique de cette espèce dans le contexte agricole européen est trop faible pour qu'une telle sélection ait un intérêt. Chez les deux légumineuses fourragères communément utilisées en Europe (luzerne et trèfle blanc), les possibilités offertes par une amélioration génétique classique sont pratiquement nulles. Cependant, des chercheurs canadiens ont obtenus une variété limitant le risque de météorisation, et ayant donc une moindre dégradabilité des protéines (Coulman et al. 2000). Elle a été obtenue en limitant la dégradabilité de la matière sèche, et par conséquent de la valeur énergétique. Une telle variété peut effectivement avoir un intérêt dans les contextes agricoles utilisant fortement le pâturage de la luzerne, ce qui n'est pas le cas en Europe.

### **Addition de tannins exogènes à la luzerne et au trèfle blanc**

Le mode d'action des tannins condensés, qui sont des composés polyphénoliques, est bien décrit (Morris et Robbins 1997; Zimmer et Cordesse 1996). Ces composés vacuolaires sont libérés lors de la mastication du fourrage, et se lient fortement et sélectivement aux protéines ainsi qu'à d'autres macromolécules, grâce aux fonctions hydroxyles des groupements phénols. Ces complexes sont stables et insolubles dans les conditions de pH du rumen (pH entre 6 et 7), mais deviennent instables et libèrent les protéines au pH de l'intestin grêle (pH supérieur à 8) qui peut alors les absorber. Dans la

**Figure 7. Solubilité des protéines de luzerne après addition de lotier (A) ou après addition de tannins condensés purifiés (B).**



mesure où la variabilité génétique naturelle pour la dégradabilité des protéines n'existe pas chez ces deux espèces, nous avons envisagé d'ajouter des tannins à la luzerne et au trèfle blanc. Cette opération a été faite soit en mélangeant du fourrage de lotier, riche en tannins, à de la luzerne ou du trèfle blanc, soit en ajoutant des tannins purifiés à ces fourrages. La dégradabilité des protéines a été mesurée par la solubilité dans un tampon.

Le mélange de fourrage de lotier à de la luzerne ou du trèfle en différentes proportions permet de réduire la dégradabilité des protéines du fourrage composite ainsi créé. Cette réduction est plus importante que le simple effet de "dilution" de protéines fortement dégradables avec des protéines de lotier moins dégradables (figure 7). A l'échelle d'un tube à essai, il semble donc que les tannins condensés du lotier (composés solubles) vont chélater les protéines disponibles dans le milieu et réduire ainsi leur dégradabilité.

A partir de différentes espèces de légumineuses métropolitaines ou tropicales, des tannins ont été purifiés (par les collègues de l'IGER). Ils ont été ajoutés à du fourrage de luzerne ou de trèfle, à des proportions allant de 0 à 5 % de la matière sèche. On observe une diminution de la dégradabilité des protéines, avec une dégradabilité similaire pour des teneurs en tannins entre 3 et 5 % (figure 7). Les tannins exogènes parviennent donc à former des complexes avec les protéines du fourrage et à réduire leur solubilité. Selon l'origine des tannins, la dégradabilité des protéines a été variable. Cependant, il a été difficile de relier la dégradabilité des protéines avec la composition monomérique et le poids moléculaire des tannins.

Cette étude ouvre la voie à des études à plus grande échelle des possibilités techniques de réduire la dégradabilité des protéines des espèces fourragères, légumineuses ou graminées. Une des possibilités serait de fournir un complément alimentaire riche en tannins (par exemple du foin de lotier ajouté à la ration, ou du lotier cultivé en association des espèces fourragères principales, dans des prairies utilisées pour le pâturage ou la récolte de foin). La faisabilité d'une extraction à grande échelle de tannins condensés à partir d'espèces très riches pourrait être étudiée. Il faudrait aussi vérifier l'effet positif de ce complément sur la réduction de la dégradation ruminale des protéines et donc sur la nutrition animale.

Une autre voie consisterait à introduire par transgénèse le ou les gènes responsable(s) de l'accumulation de tannins dans les parties aériennes de la luzerne. La luzerne possède la voie de biosynthèse des tannins condensés, mais elle ne s'exprime que dans le tégument des graines. Même si les gènes de la voie de biosynthèse sont nombreux, il suffirait peut-être d'activer cette voie dans les tiges ou les feuilles, ou de lever une répression. Pour cela, il faudrait en savoir plus sur la voie de biosynthèse des tannins condensés, pour essayer de l'induire "à façon" dans les organes cibles qui devront en synthétiser une quantité adéquate.

#### **2.2.2.5. Production de semences**

Ce programme a été mené dans le cadre de la thèse de E.D. Bolaños-Aguilar (2001), encadré par C. Huyghe, co-encadré par moi-même. La France est depuis longtemps exportatrice de semences de luzerne et possède une sélection privée active. L'amélioration génétique de la production de semences, qui n'est pas directement un caractère jouant dans la valeur agronomique des variétés, serait un atout pour le développement de cette activité. Le programme a été mené en collaboration étroite avec la FNAMS (Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences).



### Variabilité génétique, hérédités

La production de semences sur une parcelle est classiquement décomposée en composantes liées au nombre de gousses, au nombre de graines par gousse et au poids de 1000 graines. Deux composantes, le nombre de gousses et le nombre de graines ont aussi été évaluées au niveau de l'inflorescence. Ce niveau d'organisation a paru pertinent, dans la mesure où toutes les fleurs d'une inflorescence sont émises dans un laps de temps court, et subissent des conditions environnementales et de nutrition similaires. La variabilité génétique entre variétés et intra-variétés est importante pour toutes les composantes du rendement grainier chez la luzerne. L'hérédité des caractères est élevée, en particulier pour le poids de graines par inflorescence.

*Publication n°11: Bolaños-Aguilar E.D., Huyghe C., Julier B., Ecalte C. (2000) Genetic variation for seed yield and its components in alfalfa populations. Agronomie 20, 333-345.*

L'effet du milieu est très significatif sur la production de semences de luzerne. Dans les conditions classiques de culture des luzernes porte-graines, il est apparu que les conditions pédoclimatiques qui permettent une forte accumulation de biomasse aérienne sont celles qui permettent une forte production de semences. Cependant, dans de telles conditions, des risques majeurs peuvent détériorer cette relation, comme la verse ou des maladies foliaires (thèse de E.D. Bolaños-Aguilar, 2001). Quoique l'hypothèse n'ait pas été complètement testée, les données suggèrent qu'il n'y a pas de corrélation négative entre la production de biomasse végétative et le rendement en graines.

Les interactions géotypes x milieux pour le rendement grainier sont significatives, mais il n'y a pas d'inversion de classement des variétés selon les milieux. Le nombre de milieux à utiliser pour évaluer des variétés peut donc être faible, mais les milieux les plus discriminants sont ceux à plus fort potentiel.

*Publication n°8: Bolaños-Aguilar E.D., Huyghe C., Ecalte C., Hacquet J., Julier B. (2002) Effect of cultivar and environment on seed yield in alfalfa. Crop Science 42, 45-50.*

### Conséquences en sélection

Nous avons cherché à identifier un caractère synthétique, héréditaire, facile à mesurer et fortement corrélé au rendement en graines. Parmi les caractères mesurés, le poids de graines par inflorescence remplit ces exigences.

*Publication n°9: Bolaños-Aguilar E.D., Huyghe C., Djukic D., Julier B., Ecalte C. (2001) Genetic control of alfalfa seed yield and its components. Plant Breeding 120, 67-72.*

De plus, des schémas de sélection visant à prendre en compte la production de semences ont été proposés. Les faibles progrès génétiques observables chez la luzerne pour ce critère sont largement liés à une prise en compte très tardive dans les schémas de sélection, avec des critères mal adaptés. Nos études montrent qu'une évaluation précoce dès les étapes d'évaluation du matériel génétique en pépinière, pour le poids de graines par inflorescence, ou du poids des inflorescences, permettra d'accomplir des progrès significatifs. Les variétés ainsi améliorées auront un atout essentiel pour leur commercialisation.



Les techniques culturales, déjà fortement améliorées depuis une vingtaine d'années, pourront être modifiées, de façon à maximiser la production de semences *via* la maximisation de la production de biomasse, tout en limitant les risques d'accidents culturaux.

**L'ensemble des programmes visant directement la sélection et menés entre 1994 et 2001 ont abouti à de nombreux résultats: des méthodes de mesure des caractères, des critères de sélection, la mise en évidence (digestibilité et production de semences) ou non (dégradabilité des protéines) de variabilité génétique, l'évaluation de l'héritabilité des caractères, la mesure des corrélations entre caractères. Au cours de ces études, nous avons montré l'importante variabilité intra-population pour les caractères agronomiques et proposé une modification des schémas de sélection pour la valoriser : il convient d'avoir une évaluation individuelle des génotypes, dans les fonds génétiques habituellement travaillés, sans recourir à des croisements avec des variétés « exotiques » mal adaptées. Ces résultats ont fait l'objet de nombreuses publications, et les résultats ont été communiqués aux sélectionneurs privés. Ceux-ci ont pris le relais et utilisent désormais pour leurs schémas de sélection, les critères et méthodes que nous avons proposés.**

## **2.3. Projet de recherches**

### **2.3.1. Objectifs**

En 2000, les chercheurs du Centre INRA Poitou-Charentes ont cherché à recentrer leurs travaux sur les plantes fourragères, pour mieux comprendre le fonctionnement des peuplements prairiaux pérennes, en développant une approche intégrée entre génétique et écophysiologie. En effet, ces peuplements ont plusieurs spécificités qui méritent une attention : (1) le grand nombre de génotypes présents dans une prairie (variétés synthétiques dont tous les individus sont différents même s'ils sont apparentés), (2) la pérennité des peuplements, exploités pendant 2 à 10 ans au cours desquels ils subissent des stress, biotiques ou abiotiques, (3) des récoltes pluriannuelles, après lesquelles les plantes reprennent leur croissance, (4) la mortalité différentielle des individus au cours du temps, entraînant à terme la dégradation de la prairie.

Après de nombreuses discussions, les chercheurs de l'Unité ont présenté deux projets, l'un visant à connaître les bases génétiques de la morphogenèse, phénomène à la base de la croissance et de la pérennité des individus, l'autre étudiant l'évolution génétique des peuplements au cours du temps. J'ai la responsabilité du projet de recherche intitulé: "**Bases génétiques de la morphogenèse aérienne des légumineuses fourragères pérennes**" qui fait partie d'un cadre plus large incluant également des graminées fourragères étudiées par d'autres collègues du Centre.

Mon projet s'inscrit dans le schéma stratégique du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes de l'INRA, il fait partie du champ thématique " Connaissance des génomes végétaux : structure et fonctionnement ", dans la rubrique " Déterminants génétiques, physiologiques et moléculaires de caractères cibles, chez quelques espèces agronomiques ". Localement, dans le Pôle Végétal de Lusignan, regroupant l'Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères et l'Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères, mon programme s'insère dans l'analyse des processus écophysiologiques et des bases génétiques de la morphogenèse, de la croissance et de l'aptitude à la compétition des plantes dans les peuplements prairiaux pérennes.



### **2.3.2. La morphogenèse aérienne**

La morphogenèse aérienne comprend un processus de développement, c'est à dire la mise en place des organes (feuilles, tiges, bourgeons végétatifs ou floraux) et un processus de croissance (élongation des feuilles et tiges). Après analyse avec des écophysiologistes (Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères, INRA Lusignan, Unité de Génétique et Ecophysiologie des Légumineuses, INRA Dijon), nous avons choisi d'étudier sur les légumineuses la croissance en longueur et en diamètre des tiges, la ramification et la date de floraison. Ces caractères sont étudiés en réponse à des facteurs environnementaux (température, qualité et quantité de lumière simulant un couvert végétal, fréquence de défoliation, alimentation hydrique).

La morphogenèse aérienne a deux impacts majeurs dans la vie d'une plante prairiale. D'une part, elle va être à l'origine de la quantité de fourrage récolté, ainsi que de sa qualité (proportion de tiges et de feuilles, maturité des tissus via le processus de lignification, accumulation de protéines ou de sucres). D'autre part, la morphogenèse est un facteur essentiel à la survie des plantes au sein d'une prairie : on considère qu'une plante dominée dans un couvert par ses voisines, ayant un moindre accès aux ressources, risque d'avoir une repousse pénalisée après la coupe (elle émet moins de tiges qui ont chacune une croissance moindre), puis de ne pas être capable d'émettre de tige : elle meurt alors. Dans ce processus de survie ou non des plantes dans le peuplement, il faut prendre en compte la diversité génétique des individus : la mort d'un individu induit une modification de la composition génétique de la population. Finalement, les deux impacts de la morphogenèse (production et survie) peuvent être intégrés dans une notion de " pérennité de la production ". Il ne suffit pas que le peuplement survive, il faut que les plantes présentes permettent de maintenir la production, en quantité et en qualité. Le problème à résoudre est de maîtriser la variabilité génétique au sein de peuplements fourragers pour des caractères déterminant leur valeur d'usage (quantité et qualité au cours du temps). Pour cela, il convient d'identifier les gènes impliqués dans les variations génétiques pour la morphogenèse aérienne.

La connaissance des bases génétiques de la morphogenèse aérienne doit permettre de mieux ajuster la composition génétique d'une prairie semée aux conditions environnementales naturelles (sol, climat) et aux modes de conduite. Ces connaissances fourniront aussi des outils et des méthodes pour la gestion des ressources génétiques ou leur utilisation en sélection.

### **2.3.3. Le contexte scientifique international**

La génomique des légumineuses fourragères a débuté récemment, car la complexité de la génétique des espèces cultivées (polyploïdie) est un frein majeur. Le recours à une espèce modèle est donc indispensable. De nombreuses équipes dans le monde travaillent activement sur des légumineuses modèles, *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*, et les données sont rapidement accessibles ou publiées. *M. truncatula*, espèce diploïde, autogame et annuelle, est plus particulièrement intéressante car elle appartient à la tribu des Trifolieae, dans laquelle on trouve la luzerne et le trèfle blanc. Initialement, *M. truncatula* a été utilisée pour analyser la symbiose (Barker et al. 1990), mais de plus en plus, elle sert aussi de modèle aux analyses des interactions plante-pathogène ou plante-ravageur et de l'effet de stress abiotiques (Cook 1999; VandenBosch et Stacey 2003). Je me suis donc positionnée sur l'utilisation de cette espèce modèle pour l'analyse des déterminants génétiques de la morphogenèse.



En France, une dynamique s'est mise en place, entre un groupe (CNRS-INRA-ENSAT Toulouse) qui investit sur la génomique de *M. truncatula* dans des consortiums internationaux, et plusieurs unités de l'INRA qui utilisent *M. truncatula* comme modèle pour des espèces cultivées (le pois et la luzerne). Des travaux communs ont été réalisés dans l'Action Transversale Structurante (ATS) *Medicago truncatula* entre 1999 et 2002. C'est au cours de ce programme que j'ai initié mes travaux sur *M. truncatula* en tant que modèle pour la génétique de la luzerne. La constitution d'un groupe européen "Grain Legumes" soutenu par l'Union Européenne depuis 2004 est un moteur d'intégration des études. Malheureusement, mes recherches ont été de fait exclues de ce groupe qui n'a pas voulu étendre ses thématiques aux légumineuses fourragères.

#### **2.3.4. Stratégie**

Pour répondre à l'objectif, trois étapes ont été définies: (1) Démontrer la synténie existante entre *M. sativa* et *M. truncatula*, (2) Identifier les bases génétiques (QTLs) de la morphogenèse chez la légumineuse modèle *M. truncatula*, (3) Identifier les bases génétiques de la morphogenèse chez la luzerne en transférant les connaissances acquises chez la plante modèle. Les connaissances produites permettront d'analyser l'évolution des peuplements (le second volet du projet de l'Unité) et pourront être utilisées pour la sélection et la gestion des ressources génétiques. En outre, ce projet fournira la démonstration de l'intérêt d'une plante modèle pour l'amélioration d'une plante cultivée.

Les résultats déjà obtenus dans ce projet sont encadrés.

#### **2.3.5. Démontrer la synténie existante entre *M. sativa* et *M. truncatula***

Les deux espèces appartiennent au même genre botanique, et possèdent le même nombre chromosomique de base. Cela augure d'une forte synténie (conservation de l'ordre des marqueurs le long des chromosomes) qu'il faut démontrer en comparant des cartes génétiques des deux espèces possédant des marqueurs communs.

Le développement de cartes génétiques chez *M. truncatula* est encore récent, mais dès 2001, une carte a été obtenue sur un croisement F2 en France (Thoquet et al. 2002). Deux autres cartes ont été réalisées, en F2 (N. Young aux Etats-Unis, <http://mtgenome.ucdavis.edu/index.html>) et en F6 (T. Huguet, non publié).

Sur la luzerne, l'autotétraploïdie a longtemps été un frein au développement d'une carte génétique saturée. Deux approches avaient été cependant mises en œuvre. Dès 1993, des cartes avaient été réalisées sur des écotypes sauvages de luzerne diploïde (Brummer et al. 1993; Echt et al. 1993; Kiss et al. 1993). Ces écotypes faisant partie du même complexe d'espèces que la luzerne, cette stratégie était particulièrement judicieuse. Les cartes ont été construites avec des marqueurs RFLP, puis l'une d'elles a été ensuite enrichie avec des marqueurs PCR (Kaló et al. 2000). Elle est actuellement la carte de référence pour les *Medicago*. Par ailleurs, une carte de la luzerne tétraploïde basée sur des marqueurs RFLP a été publiée (Brouwer et Osborn 1999), mais le manque de marqueurs RFLP n'a pas permis de saturer cette carte.

J'ai donc entrepris d'obtenir une carte dense chez la luzerne tétraploïde, en privilégiant deux stratégies complémentaires : la mise au point de marqueurs microsatellites, en utilisant les marqueurs de *M. truncatula* et en sélectionnant ceux qui fournissaient une amplification et un polymorphisme, et



l'utilisation des outils théoriques récents pour le développement de cartes chez les autotétraploïdes (Hackett et al. 1998; Luo et al. 2000; Luo et al. 2001; Ripol et al. 1999).

### **Réalisation d'une carte génétique chez la luzerne autotétraploïde**

#### *Construction d'une population de cartographie*

L'allogamie et l'hétérozygotie de la luzerne, associées à une forte dépression de consanguinité, nous ont conduit à produire comme population de cartographie une population F1. Les deux plantes parentales ont été choisies pour provenir de fonds génétiques différents, mais issues du matériel en sélection en France, et contrastées pour plusieurs caractères d'importance agronomique. D'après l'origine de ces deux plantes, leur hétérozygotie (nécessaire pour obtenir des ségrégations en F1) a été supposée importante. Un ensemble de 230 graines F1 ont été obtenues. Les travaux de cartographie portent sur 186 individus F1.

#### *Obtention de marqueurs moléculaires révélés par PCR chez la luzerne*

Chez cette espèce, deux voies ont été retenues pour obtenir des marqueurs moléculaires : rechercher des marqueurs révélés en masse (AFLP) et transférer les marqueurs microsatellites obtenus à partir d'une banque d'EST chez *M. truncatula*.

En utilisant 27 couples d'amorces AFLP, 588 marqueurs polymorphes ont été obtenus. Leur ségrégation a été étudiée. Ces marqueurs étant relativement peu reproductibles et dominants, ils demandent à être complétés par des marqueurs codominants.

Un total de 235 marqueurs microsatellites, mis au point sur *M. truncatula* essentiellement à partir d'une banque publique d'EST (INRA-CNRS Toulouse), mais aussi d'une banque enrichie en motifs microsatellites (INRA Montpellier) et d'une publication, ont été testés sur les deux parents et 2 individus F1 de la population de cartographie. Nous avons obtenu une amplification pour 71% des marqueurs, 42% des marqueurs étant polymorphes entre les deux parents alors que 29% étaient monomorphes. Ceci est compatible avec la proximité phylogénétique des deux espèces. D'autres marqueurs microsatellites étant en cours d'obtention à Toulouse et aux Etats-Unis, la disponibilité en marqueurs codominants, révélés par PCR, n'est pas un frein chez la luzerne. En génotypant la population de cartographie avec 74 de ces marqueurs, nous avons obtenu au total 256 allèles différents soit 3.4 allèles par locus sur les deux parents.

#### *Obtention d'une carte génétique chez la luzerne cultivée*

La construction d'une carte chez une espèce autotétraploïde a pu s'appuyer sur les récents travaux menés par C. Hackett, au SCRI à Dundee (Grande-Bretagne) en utilisant le logiciel de cartographie TetraploidMap (Hackett et Luo 2003).

L'étude de la ségrégation des marqueurs microsatellites permet de confirmer une hérédité tétrasomique généralisée chez la luzerne (autotétraploïdie). Un faible pourcentage de double-réduction (cas de ségrégation particulière aux autotétraploïdes, issu de la formation de tétravalents à la méiose) est constaté. Il n'est pas possible de complètement l'attester, des erreurs de génotypage ou une simple distorsion de ségrégation auraient statistiquement produit le même effet.

Une carte a été obtenue pour chaque parent. Chacune contient les 8 groupes de 4 chromosomes homologues, comme attendu. La longueur de chaque carte atteint 3000 cM, soit 4 fois la longueur du génome haploïde de la sous-espèce sauvage diploïde *M. sativa* (Kaló et al. 2000). Les liaisons en

Figure 8. Relation de synténie entre l'espèce modèle *M. truncatula* (à gauche) et la luzerne (à droite). Les traits relient des marqueurs microsatellites identiques.

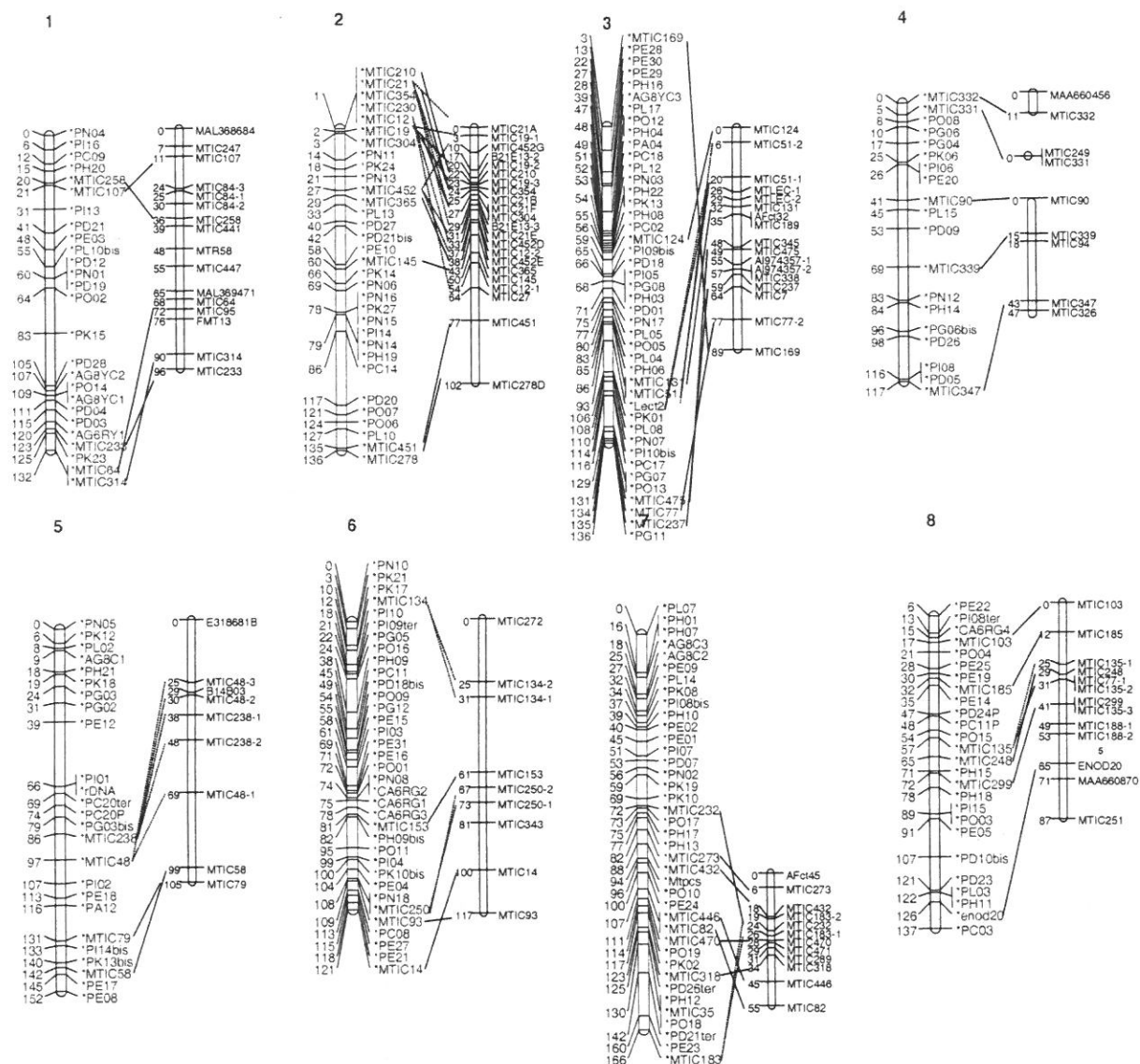
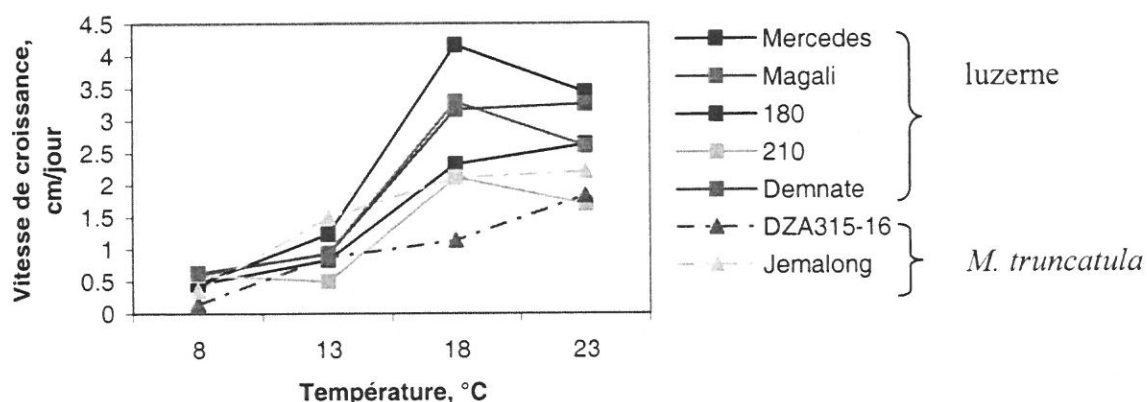


Figure 9. Analyse de l'interaction entre génotype et température, chez la luzerne (traits continus) et *M. truncatula* (pointillés).



répulsion entre marqueurs de différents chromosomes dans chaque groupe d'homologie attestent encore de l'autotétraploïdie. Une carte génétique formée uniquement des marqueurs microsatellites a été calculée.

Les groupes d'homologie de luzerne contiennent les mêmes marqueurs microsatellites que les groupes de liaison de *M. truncatula* (figure 8). Sur la base de ces marqueurs, les groupes d'homologie des cartes de luzerne ont été numérotés comme chez *M. truncatula*. Au sein de chaque groupe, l'ordre des marqueurs est globalement conservé, indiquant la synténie des deux espèces.

Les cartes ainsi obtenues sont novatrices (1) par la couverture complète du génome, (2) parce que les marqueurs sont de type PCR, (3) parce qu'elles peuvent être alignées sur la carte de *M. truncatula*. Les résultats obtenus fournissent aussi des informations sur l'hérédité intégralement tétrasomique chez la luzerne et la fréquence faible d'occurrence de double-réduction à la méiose.

**Publication n°4:** Julier B., Flajoulot S., Barre P., Cardinet G., Santoni S., Huguet T., Huyghe C. (2003) Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology* 3 :9, <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/9>.

**Cette carte de luzerne tétraploïde a donc permis de démontrer la synténie de cette espèce avec *M. truncatula*.** De façon similaire, la synténie entre *M. sativa* diploïde et *M. truncatula* a été observée (Choi et al. 2004). Ce contexte offre de larges perspectives pour utiliser les informations obtenues chez *M. truncatula* pour travailler sur la luzerne.

**Publication n°29:** Julier B., Huguet T. (2005) Genetic maps and molecular markers in *Medicago* genus. In : P.B. Kirti (Ed), *Handbook of new technologies for genetic improvement of legumes*, Haworth Press, New York, sous presse.

### **2.3.6. Identifier les bases génétiques de la morphogenèse chez la légumineuse modèle *M. truncatula***

#### **2.3.6.1. Variabilité génétique pour la morphogenèse chez *M. truncatula***

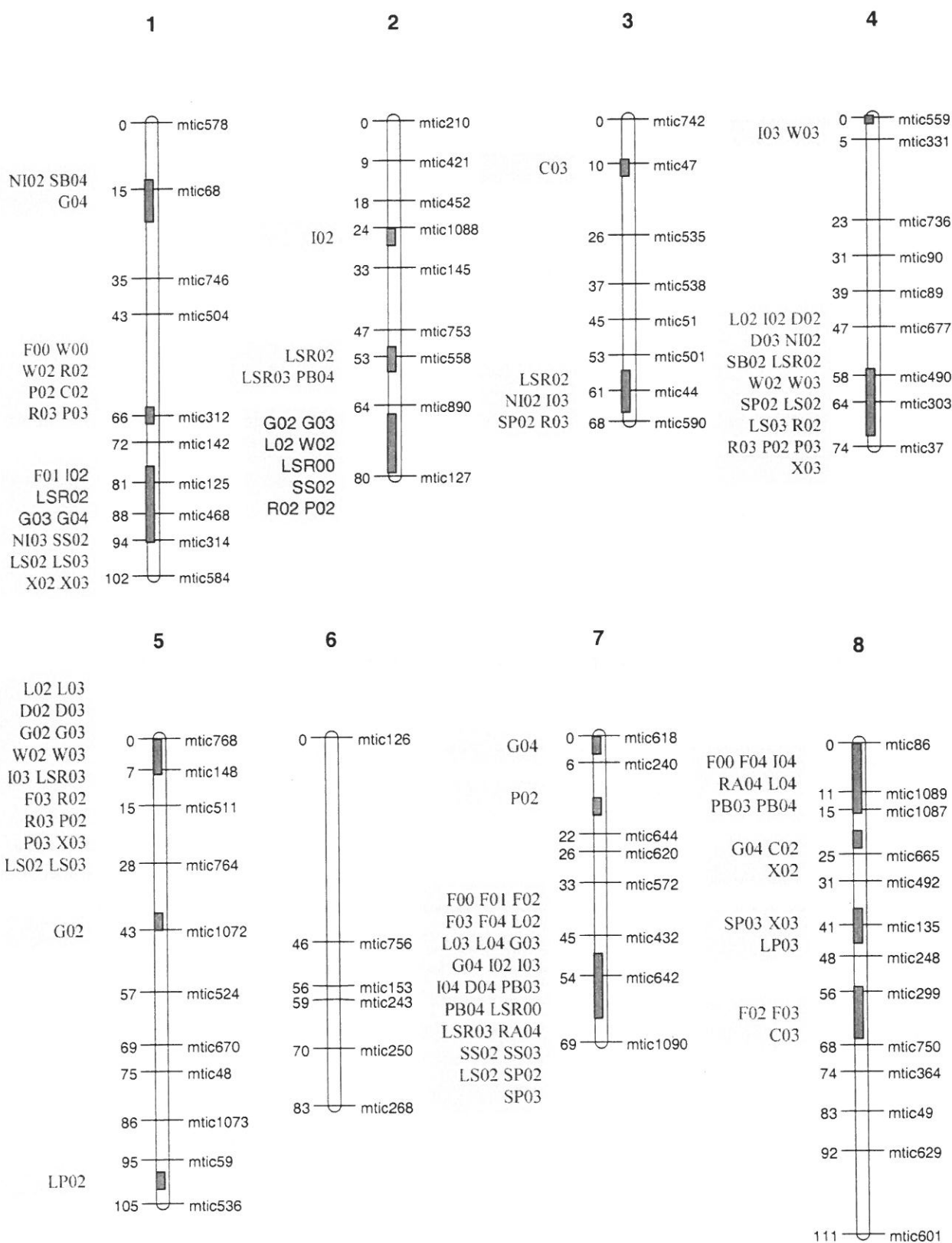
Un inventaire de la variabilité génétique est nécessaire avant d'étudier les déterminants génétiques des caractères. Pour la croissance aérienne (croissance en longueur et en diamètre des tiges, ramification), nous avons réalisé un inventaire limité à quelques lignées, qui devra être complété sur la core-collection, pour disposer de l'ensemble de la variabilité génétique spontanée. Ces travaux ont été initiés par l'"Action Transversale Structurante" *Medicago truncatula* soutenue par l'INRA (1999-2002). L'effet de paramètres physiques du milieu sur la morphogenèse aérienne est encore peu connu. Nous avons mené une étude préliminaire de l'effet de la température (gamme non stressante) sur deux lignées parents d'une population de cartographie, montrant des températures de base différentes (figure 9). Un inventaire a été fait pour la date de floraison à l'INRA de Montpellier sur la core-collection de l'espèce, en analysant l'effet des températures vernalisantes.

#### **2.3.6.2. Identifier les gènes impliqués dans les variations de la morphogenèse aérienne**

Ce travail est basé sur l'utilisation de populations de lignées recombinantes en génération F6 (INRA Montpellier, ENSAT-INRA-CNRS Toulouse), cartographiées avec des marqueurs microsatellites.

**Figure 10. QTL de morphogénèse dans le croisement Jemalong x DZA315.16 de *M. truncatula*.** Les barres repèrent les régions des QTL pour les caractères indiqués à gauche des chromosomes.

F, date de floraison; L, longueur des tiges; D, diamètre des tiges; I, longueur des tiges après une semaine de croissance; G, vitesse de croissance des tiges; W, poids sec des tiges; LSR, rapport feuilles/tiges; B, nombre de ramifications; NI, nombre d'entre-nœuds; R, rayon de la tige; P, rayon du parenchyme de la tige; X, rayon du xylème de la tige; C, rayon du cortex de la tige; LS, solubilité des feuilles; SS, solubilité des tiges; NDF, teneur en NDF des tiges; LP, protéines des feuilles; SP, protéines des tiges; 00, 01, 02 et 03 pour les années 2000-2003.



Cinq populations sont actuellement disponibles, et en fonction des caractères analysés dans les populations naturelles, d'autres croisements peuvent être réalisés.

Une des populations de cartographie, Jemalong6 x DZA315-16 obtenue à Toulouse et Montpellier, a été étudiée à Lusignan pour les caractères de morphogenèse aérienne. La similitude morphologique entre la luzerne et *M. truncatula* donne de l'intérêt à une recherche de QTL sur l'espèce modèle. Par ailleurs, l'analyse sur l'espèce modèle va permettre une recherche précise de QTL, car il s'agit d'une population de lignées recombinantes et que la carte génétique est très précise.

Les caractères mesurés sont : la longueur des tiges à la récolte, la vitesse d'allongement des tiges, la longueur des tiges après une semaine de croissance, le nombre d'entre-nœuds, la date de floraison, des critères portant sur la croissance secondaire des tiges (diamètre, composition tissulaire). Une grande variabilité génétique a été observée dans la population de RILs, avec des transgressions par rapport aux parents. Des QTL ont été identifiés, expliquant entre 5.7 et 56.9% de la variation phénotypique (figure 10). Ils permettent de localiser une zone majeure sur le chromosome 7, intervenant à la fois pour la date de floraison, la longueur des tiges et la longueur des tiges après une semaine de croissance. La longueur des tiges montre aussi un QTL sur le chromosome 1 et sur le chromosome 2, qui colocalisent tous deux avec un QTL de vitesse d'allongement des tiges. Pour ces trois QTL, après criblage des données de séquençage, un homologue du gène *Constans* ou un homologue du gène *TFL1* (ou *Late Flowering* chez *A. thaliana*) pourrait être impliqué dans le QTL du chromosome 7. Sur le chromosome 2, un QTL lié à la longueur des tiges et à leur vitesse d'allongement colocalise avec le gène *LE* du pois, qui code pour la gibbérelline 3 $\beta$  hydroxylase intervenant dans le nanisme. Pour le QTL lié au diamètre des tiges sur le chromosome 5, aucun gène candidat n'a été détecté, alors que cette portion du génome est déjà séquencée chez *M. truncatula*. Sur le chromosome 4, les nombreux QTL intervenant dans le diamètre des tiges et le rayon du parenchyme pourraient être expliqués par plusieurs gènes liés à la croissance, la biosynthèse de la lignine et la date de floraison. Enfin, sur le chromosome 3, les QTL de longueur de tiges et de rapport feuilles/tiges colocalisent avec le gène *Erecta* (impliqué dans la croissance chez *Arabidopsis*) et avec le gène *Leafy* (impliqué dans la date de floraison).

Pour identifier d'autres QTL ou d'autres gènes intervenant dans la variation, la gamme génétique en étude a été élargie. Ainsi, trois autres populations sont en cours d'analyse par un étudiant qui a commencé sa thèse sous ma responsabilité en janvier 2005 (J.B. Pierre). On s'attend à trouver des QTL différents selon les croisements, car les gènes montrant du polymorphisme ne sont pas les mêmes. Une méta-analyse (Arcade et al. 2004) de ces populations fournira des précisions sur la position et l'effet des QTL.

De plus, un programme de cartographie fine sera nécessaire pour préciser la position des QTL. Pour cela, des populations de grande taille seront développées. Ainsi, une population de 2000 individus est en cours de création pour localiser plus précisément le QTL de date de floraison sur le chromosome 7 entre Jemalong6 x DZA315-16.

A partir de la position de QTL, les données de séquençage du génome de *M. truncatula* (le consortium international devrait avoir séquencé les régions riches en gènes fin 2006) permettent de rechercher des gènes candidats. En effet, les BACs déjà séquencés sont annotés et ancrés à une carte génétique, ce qui permet de rechercher les gènes proches de la région d'un QTL. Par ailleurs, des études bibliographiques fournissent des listes de gènes susceptibles d'intervenir dans les caractères étudiés



chez d'autres espèces. Il est alors facile de rechercher des orthologues de ces gènes dans la séquence de *M. truncatula* pour les "cartographier" de façon virtuelle. Cependant, si cette approche se révèle infructueuse, un clonage positionnel est envisageable, en s'aidant du matériel génétique disponible (plantes F5 hétérozygotes au site du QTL par exemple) et des outils génomiques (données de séquence, marqueurs).

Lorsqu'un gène candidat est localisé, il convient de prouver son rôle dans le caractère. Pour cela, deux principales méthodes sont utilisables chez cette espèce: la transgénèse avec une étude d'expression du transgène dans différents organes à différents stades, et l'analyse de mutants obtenus par TILLING ou par transposon. Dans ces deux cas, à partir de la séquence du gène candidat, une démarche de génétique inverse va permettre de rechercher les plantes portant des allèles disruptés. Leur analyse phénotypique démontrera (ou non) l'effet du gène sur le caractère. Une banque de TILLING est en cours de réalisation à l'INRA de Dijon, tandis que le CNRS de Gif-sur Yvette développe des mutants avec le transposon TNT1. Ce matériel sera utilisé pour caractériser les phénotypes obtenus lors de la disruption d'un gène en cours d'étude.

Une dernière étude consistera à évaluer la part de variation expliquée par chaque gène dans le caractère au sein de l'espèce ou d'un sous-ensemble de l'espèce. Pour cela, après une analyse de la variabilité allélique dans une population ayant un déséquilibre de liaison faible et couvrant une gamme génétique et phénotypique large, on étudiera la relation entre la variabilité allélique et la variabilité phénotypique. Une telle étude d'association est particulièrement efficace pour prendre en compte une large gamme génétique. Ce travail s'appuiera sur la core-collection de *M. truncatula*, en liaison avec l'équipe de l'INRA de Montpellier.

### **2.3.7. Identifier les bases génétiques de la morphogenèse chez la luzerne**

Le volet est largement basé sur un transfert des connaissances acquises sur la morphogenèse de *M. truncatula* (en particulier des gènes) vers la luzerne. En préalable, il est nécessaire de mieux connaître différents aspects de la génétique de cette espèce pour pouvoir ensuite rechercher des QTL ou des gènes responsables des variations de morphogenèse.

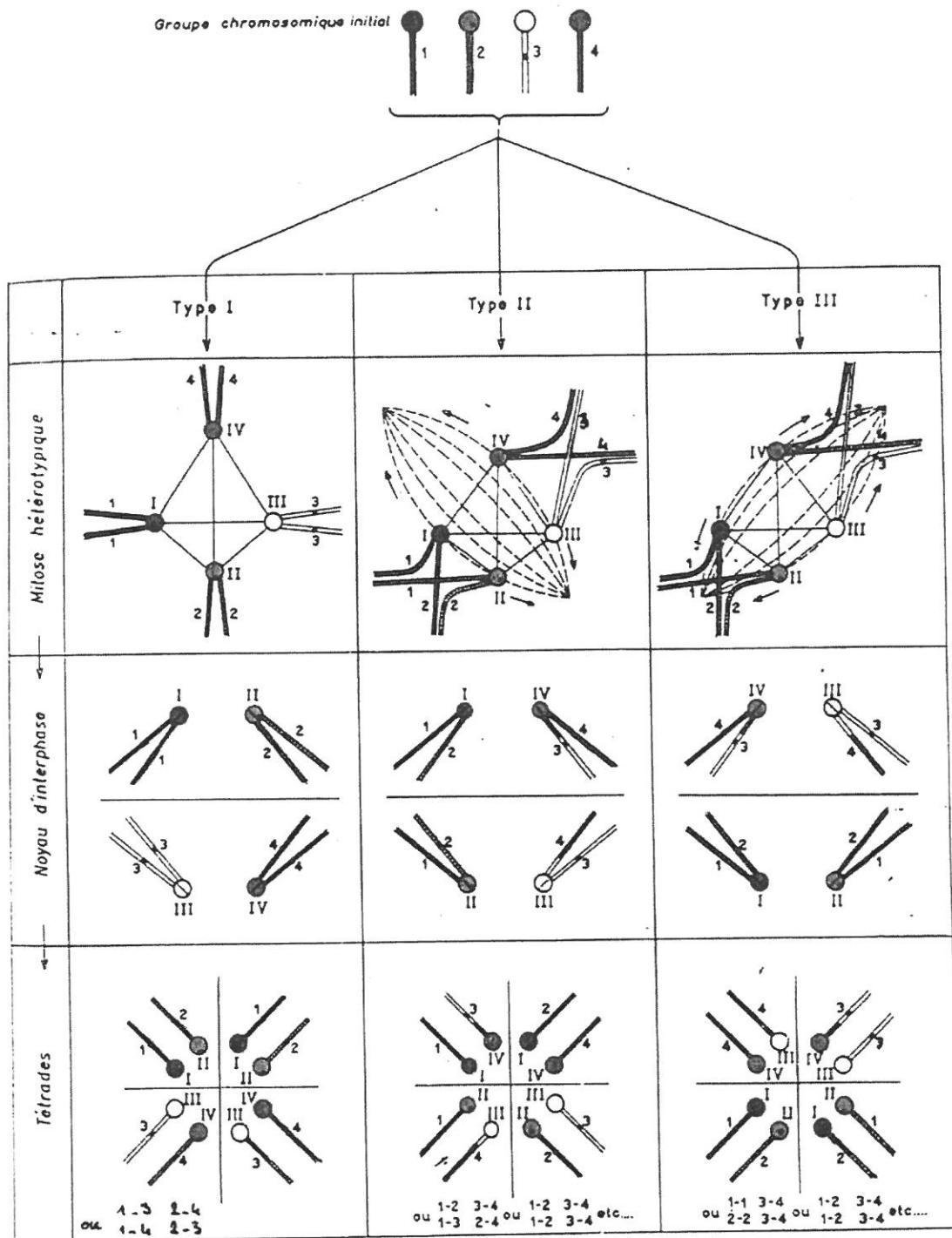
#### **2.3.7.1. Diversité génétique et structuration**

Une meilleure connaissance de la génétique de la luzerne est un atout pour l'ensemble des études d'analyse de la structure des populations cultivées, d'amélioration génétique ou de gestion de ressources génétiques. Quelques paramètres de la génétique de la luzerne nécessitent une investigation : diversité génétique en réponse à des paramètres du milieu, comportement de cette espèce autotétraploïde à la méiose (estimation de la fréquence de double-réduction), taille du déséquilibre de liaison, et structuration de la diversité génétique, revue à l'aide des outils moléculaires.

##### **2.3.7.1.1. Variabilité génétique pour la morphogenèse en relation avec des paramètres du milieu**

L'inventaire de la variabilité a déjà été fait pour la plupart des caractères dans différentes équipes, incluant des sélectionneurs, et a permis de mettre en évidence l'existence de variabilité génétique. L'effet de facteurs du milieu a été étudié, mais l'interaction entre génotype et facteur du milieu a rarement été analysée. Nous avons analysé l'effet de températures non stressantes (entre 8 et 23 °C) sur quelques génotypes, et montré qu'il n'y a pas d'interaction entre génotype et température entre 8 et 18°C (figure 9). Par contre, on constate une interaction génotype x température pour la vitesse d'allongement des tiges, à des températures de 18 et 23°C. L'effet de stress hydrique sera

Figure 11. Méiose d'un individu autotétraploïde. Dans les méiotes de type III, la formation d'un tétravalent, et la non-disjonction des chromatides-sœurs conduisent à des gamètes non réduits.



prochainement analysée, en étudiant l'efficacité d'utilisation de l'eau sur une population de cartographie (programme européen PERMED, INRA écophysiologie, Montpellier).

#### **2.3.7.1.2. Fréquence de double-réduction chez la luzerne**

Si l'autotétraploïdie de la luzerne est connue depuis les années 1950 (Stanford 1951), plusieurs questions sont restées en suspens, faute d'outils génétiques suffisamment fins. Elles peuvent maintenant être étudiées. Ainsi, la fréquence de double-réduction à la méiose (figure 11), conduisant à des gamètes dans lesquels les chromatides sœurs n'ont pas été séparées peut être mesurée en utilisant des marqueurs codominants. Une fréquence même faible de double-réduction modifie à la fois la ségrégation des locus, l'équilibre panmictique et l'avancement vers l'équilibre panmictique (Bever et Felber 1992; Butruille et Boiteux 2000). En particulier, la double-réduction produit des individus plus consanguins, alors même que ce type d'individus souffre généralement d'une vigueur générale amoindrie (dépression de consanguinité). De plus, la fréquence de double-réduction sera plus forte à l'extrémité des chromosomes que près du centromère, car ce phénomène requiert un crossing-over entre le locus considéré et le centromère. La modification des fréquences alléliques sous l'effet de la double-réduction a donc plus de probabilité d'occurrence pour les locus distaux que pour les locus proximaux.

Dans la population de cartographie que nous avons étudiée, nous n'avons pas formellement diagnostiqué de cas de double-réduction. Cette même population a été agrandie à environ 600 plantes, et l'analyse est en cours à la fois pour des locus positionnés à l'extrémité de chromosomes que pour des locus près des centromères (séjour post-doctoral de R. Ayadi, 05/2004 – 04/2005). Pour deux locus distaux actuellement analysés, nous avons obtenu une fréquence de double-réduction de 2 et de 3%, respectivement. Ces fréquences faibles sont compatibles avec des observations anciennes montrant de faibles fréquences de formations de tétravalents à la méiose (Armstrong 1954). Cependant, les simulations disponibles (Butruille et Boiteux 2000) montrent que cette fréquence de double-réduction induit un changement dans l'équilibre panmictique, surtout pour les allèles délétères. Par ailleurs, dans une population de cartographie de 200 individus, il y aurait environ jusqu'à 4 à 6 individus issus de double-réduction pour chaque marqueur. Il faudrait en tenir compte dans les calculs de cartographie.

La plupart des outils théoriques disponibles permettent de tenir compte de la fréquence de double-réduction, que ce soit dans les études de cartographie génétique (Luo et al. 2004) ou d'analyse de diversité génétique (Thrall et Young 2000).

#### **2.3.7.1.3. Mesure du déséquilibre de liaison dans des variétés synthétiques**

Les variétés, obtenues par multiplication en panmixie de génotypes parentaux (clones ou familles de demi-frères) pendant trois ou quatre générations, comportent une large part du déséquilibre de liaison qui préexisteraient entre les parents (Gallais 2003). Cependant, selon la structure des parents, différentes configurations peuvent se produire, avec préexistence ou non de ce déséquilibre de liaison. L'allogamie de la luzerne induira probablement un faible déséquilibre de liaison (Flint-Garcia et al. 2003). L'analyse de la liaison entre marqueurs répartis le long d'un chromosome, à des distances variables, permettra de mesurer ce déséquilibre de liaison. Les populations synthétiques, variétés ou matériel expérimental, pourraient ainsi être un matériel de choix pour réaliser des études d'association entre génotype et phénotype.



#### 2.3.7.1.4. Structuration de la diversité génétique dans des variétés de luzerne, analysée à l'aide de marqueurs moléculaires

Toutes les études menées à l'aide de caractères phénotypiques ou de marqueurs moléculaires dominants (incluant les nôtres) ont montré une importante diversité entre populations et variétés, lorsque l'origine du matériel génétique est suffisamment contrastée (Jenczewski et al. 1999; Michaud et al. 1988). Cependant, la diversité intra-variétale est très élevée, pour des caractères agronomiques ou des marqueurs moléculaires (Jenczewski et al. 1999; Maureira et al. 2004; Muller et al. 2001). Outre les problèmes de distinction des variétés que cela pose, une meilleure description de la variabilité génétique intra et inter-variétale permettrait de mieux raisonner les programmes de sélection et la gestion des ressources génétiques.

##### Structuration avec des marqueurs neutres

Dans le cadre d'un partenariat avec un sélectionneur privé, le GIE GRASS (anciennement Verneuil Semunion Recherche), nous avons analysé la diversité entre les variétés issues de ce programme de sélection, à l'aide de marqueurs microsatellites. Chez la luzerne, espèce allogame, autotétraploïde et hétérozygote, les variétés sont des populations synthétiques. Les sélectionneurs appliquent des pressions de sélection sur des caractères agronomiques, pour modifier progressivement le fonds génétique. L'objectif de l'étude a été d'analyser le niveau de différenciation entre sept variétés provenant d'un schéma de sélection, et entre ces variétés et le pool de sélection, avec huit marqueurs microsatellites. Ces marqueurs neutres codominants et très polymorphes, avec une analyse de génétique des populations (Weir et Cockerham 1984) étendue aux autotétraploïdes (Ronfort et al. 1998), sont des outils pour l'analyse de la diversité génétique chez la luzerne. Le nombre d'allèles par locus variait de 3 à 24. Tous les loci étaient à l'équilibre panmictique dans les variétés, sauf un, probablement à cause d'allèles nuls. En excluant ce locus, chaque variété a été trouvée en équilibre panmictique. La diversité génétique moyenne était élevée, variant de 0.665 à 0.717 dans les variétés. Le paramètre  $F_{ST}$  indiquait une diversité faible mais significative entre cultivars. Parmi les 21 paires de variétés, 15 étaient significativement différentes. Le pool de sélection était aussi très variable, et significativement différent de chaque variété sauf la plus récente. Ces résultats ont permis de réfléchir sur le schéma de sélection de l'obteneur et sur les modalités d'élaboration des variétés: (1) des progrès génétiques ont été obtenus (en particulier pour des résistances) sans modification du fonds génétique et sans perte de variabilité, (2) l'obtention d'une différenciation forte entre variétés issues d'un seul programme de sélection nécessiterait créer des variétés synthétiques de clones. Dans le cas présent, les parents des variétés étant des familles de demi-frères, le niveau de structuration en variétés ne peut être élevé. Enfin, cette étude a montré que les marqueurs pourraient néanmoins aider à la distinction des variétés, aux côtés des caractères phénotypiques actuellement utilisés.

**Publication n°1:** Flajoulot S., Ronfort J., Baudouin P., Barre P., Huguet T., Huyghe C., Julier B. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program using SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, accepté sous réserve de modifications.

Une étude complémentaire est en cours, basée sur l'étude de variétés d'origine génétique plus variée, et incluant des individus issus des ressources génétiques du complexe d'espèces *M. sativa*.

##### Structuration avec des marqueurs non neutres

Ultérieurement, il sera crucial de reprendre ces études en utilisant des marqueurs non neutres, définis dans des gènes ayant montré leur influence sur la morphogenèse. Ces gènes sont susceptibles d'être

R<sup>2</sup> entre 0.2 et 0.6

soumis à la sélection, artificielle ou naturelle, et révéler ainsi des structurations différentes de celles obtenues avec les marqueurs neutres. On attendra une diversité intra-population plus réduite qu'avec des marqueurs neutres, et des différenciations entre populations accrues si elles sont issues de sélection ayant pris sur ces gènes. L'analyse d'un polymorphisme de séquence sur une espèce tétraploïde sera assez compliquée. Deux stratégies seront possibles. Une méthode sera le séquençage d'un échantillon d'allèles qui fournira les sites de polymorphisme permettant de définir des marqueurs pour chaque site, à révéler sur une base génétique plus large. L'autre méthode consistera à utiliser « l'Ecotilling » (Comai et al. 2004) qui permet grâce à une combinaison de PCR, de révéler les allèles présents et les sites de polymorphisme. Cette dernière méthode n'a pas encore fait ses preuves pour l'analyse de polymorphisme de séquence d'espèces autopolyploïdes.

La meilleure connaissance de la génétique de la luzerne va être un atout pour l'ensemble des études d'amélioration génétique, de gestion de ressources génétiques ou d'analyse de la structure des populations cultivées. Par exemple, nous pouvons désormais analyser la relation entre le nombre et la nature des parents des variétés et la variabilité à l'intérieur de ces variétés. Des modèles théoriques restent à élaborer au niveau autotétraploïde, mais l'établissement d'une relation entre ces paramètres permettra de savoir comment créer des populations avec des bases génétiques étroites ou larges selon leurs atouts respectifs. Par ailleurs, la gestion des ressources génétiques pourrait être revue. En effet, une meilleure connaissance de la diversité des populations et de leur structuration révélera les spécificités ou les redondances des collections. Une gestion plus exhaustive et plus efficace en découlera.

#### **2.3.7.2. Identifier les QTL ou les gènes impliqués dans la morphogenèse aérienne chez la luzerne**

Actuellement, une seule carte est disponible (paragraphe a) sur le croisement Magali-2 x Mercedes-4.11 et la population a été phénotypée. Une seconde population a été créée dans le cadre du programme européen PERMED, sur un croisement entre une plante sensible à la sécheresse (Magali-A) et une plante résistante (Gabès).

Une recherche de QTL pour les caractères de morphogenèse fournit des indications des zones du génome impliquées dans les variations. Les individus de la population Magali-2 x Mercedes-4.11 ont été étudiés pour différents caractères de la morphogenèse aérienne. Une large variabilité génétique a été observée pour tous les caractères, avec de fortes transgressions par rapport aux parents. La recherche de QTL est en cours (figure 12). Les QTL forts pourront faire l'objet d'une recherche de gènes candidats, en exploitant les données de séquençage de *M. truncatula*, et en se basant sur le bon alignement des deux génomes.

La réalisation d'autres populations de cartographie, entre plantes ayant des phénotypes spécifiques pourra être menée.

En parallèle à cette démarche, les gènes identifiés chez *M. truncatula* pour intervenir dans des caractères, seront étudiés chez la luzerne. La première étape consiste à analyser la variabilité allélique du gène dans l'espèce. Puis, une étude d'association entre variabilité génétique et variabilité phénotypique montrera l'effet du gène sur le caractère. On utilisera des populations construites pour



avoir un faible déséquilibre de liaison (paragraphe c.1.3.), ce qui permettra de confirmer ou d'infirmer sans risque d'erreur le rôle du gène dans la variation pour le caractère.

**Ainsi, une stratégie basée sur des allers-retours entre l'espèce modèle et l'espèce cultivée est nécessaire pour intégrer les connaissances acquises sur *M. truncatula* dans l'analyse des bases génétiques de *M. sativa*. Progressivement, des gènes impliqués dans les variations pour la morphogenèse chez la luzerne seront identifiés, et utilisables pour l'analyse de l'évolution des peuplements ou des programmes de sélection.**

### **2.3.8. Perspectives**

Deux types de perspectives sont envisageables à l'issue de ce programme. L'un se situe dans le domaine de l'analyse du fonctionnement des peuplements de luzerne, l'autre dans l'amélioration génétique de la luzerne.

#### **2.3.8.1. Conséquences sur l'évolution des peuplements**

L'acquisition de connaissances sur les bases génétiques de composantes de la morphogenèse, et sur la structure génétique des populations ou variétés de luzerne fournit des éléments nécessaires à l'analyse de l'évolution des peuplements. En relation avec l'équipe chargée de cette thématique dans l'Unité, nous pourrions répondre à plusieurs questionnements :

#### **Comment évolue la diversité génétique d'une variété au cours du temps ?**

Connaissant la diversité génétique d'une variété au moment où elle est semée, on pourra suivre l'évolution de la variabilité allélique au cours du temps dans des parcelles. L'étude simultanée de gènes et de marqueurs neutres permettra de différencier une dérive d'une évolution par sélection. Parallèlement, l'analyse de la structuration de la variabilité des populations dans l'espace pourra révéler des adaptations locales à des micro-milieus. Cette approche est parallèle à celle menée par J. Ronfort à l'INRA de Montpellier, avec ma collaboration, sur *M. truncatula*, en utilisant des populations naturelles et une population artificielle dont elle analyse l'évolution génétique dans différents milieux.

Pour ce type d'étude, la construction de populations ayant des diversités génétiques larges ou étroites sera particulièrement intéressante. En particulier, on pourrait implanter une population de cartographie F1 (pour laquelle on connaît la diversité phénotypique et allélique) dans différents contextes de culture, et étudier la modification des fréquences alléliques au cours du temps.

#### **Y a-t-il une relation entre la variabilité génétique intra-variétale et la valeur agronomique ?**

L'histoire de l'amélioration des plantes a montré l'intérêt de variétés homogènes dont tous les individus sont identiques (lignées ou hybrides). En effet, en combinant tous les allèles favorables dans un seul génotype, celui-ci est le plus productif. Cependant, des études d'écologie des populations (Hector et al. 1999; Wilsey et Polley 2004) montrent, au niveau interspécifique, une relation entre diversité génétique et productivité, dans des prairies à faible niveau d'intensification.

La construction de populations, dont on connaît la diversité initiale pour un caractère ou un gène, sera un préalable indispensable permettant de simplifier l'étude, et de chercher des mécanismes explicatifs. Ces populations pourront être soumises à des contraintes particulières, comme la fréquence de coupe par exemple.



### **2.3.8.2. Amélioration génétique de la luzerne**

L'application de connaissances fondamentales, même acquises sur une espèce cultivée, à l'amélioration génétique n'est jamais évidente, car il faut définir des méthodologies susceptibles d'apporter un progrès sans détériorer les pratiques existantes. Sur la luzerne, les schémas de sélection actuels sont tous basés sur des observations phénotypiques de plantes ou de familles, suivies du choix des génotypes les plus prometteurs et de leur intercroisement. La prise en compte de données génotypiques peut avoir lieu à plusieurs niveaux :

- Dans le choix des parents des variétés, permettant (1) de « régler » la diversité intra-variétale obtenue pour des marqueurs neutres, (2) de ne retenir que les plantes portant les allèles favorables aux gènes impliqués dans des caractères d'intérêt agronomique. Sur ce dernier point, la sélection assistée par marqueurs sera potentiellement efficace sur cette espèce polyploïde. En effet, le génotype donne accès aux quatre allèles de chaque locus, ce qui permet de choisir les individus portant l'allèle favorable, et ayant un nombre de copies de cet allèle maximum.
- Les schémas de sélection pourraient aussi être basés sur des populations de cartographie, et choisissant les plantes portant les QTL favorables. Cette stratégie ne nécessite pas d'identifier les gènes responsables, mais présente la lourdeur liée à la réalisation des croisements et des cartes.

Ce type de programme devra être mené par des obtenteurs de variétés, qui possèdent des programmes de sélection opérationnels, et auxquels je pourrai fournir mon expertise. Il faut noter qu'une démarche identique pourrait immédiatement être menée sur une autre légumineuse fourragère, comme le trèfle blanc.

### **Références bibliographiques**

- Arcade A., Labourdette A., Falque M., Mangin B., Chardon F., Charcosset A., Joets J. (2004) BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20, 2324-2326.
- Armstrong J.M. (1954) Cytological studies in alfalfa polyploids. *Can.J.Bot.* 32, 531-542.
- Aufrère J. (1982) Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Ann.Zootech.* 31, 111-130.
- Aufrère J., Graviou D., Demarquilly C., Vérité R., Michalet-Doreau B., Chapoutot P. (1991) Predicting in situ degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). *An.Feed Sci.Tech.* 33, 97-116.
- Barker D., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Essad S., Flament P., Gallusci P., Génier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Denarie J., Huguet T. (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol.Biol.Rep.* 8, 40-49.
- Barrière Y., Laperche A., Barrot L., Aurel G., Briand M., Jouanin L. (2005) *Plant Science*
- Barry T.N., McNabb W.C. (1999) The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Br.J.Nutr.* 81, 263-272.
- Bever J.D., Felber F. (1992) The theoretical population genetics of autopolyploidy. *Oxford Surv.Evol.Biol.* 8, 185-217.
- Broderick G.A. (1995) Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. *J.Anim.Sci.* 73, 2760-2773.
- Broderick G.A., Albrecht K.A. (1997) Ruminant in vitro degradation of protein in tannin-free and tannin-containing forage legume species. *Crop Sci.* 37, 1884-1891.



- Brouwer D.J., Osborn T.C. (1999) A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 99, 1194-1200.
- Brummer E.C., Bouton J.H., Kochert G. (1993) Development of an RFLP map in diploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 86, 329-332.
- Butruille D.V., Boiteux L.S. (2000) Selection-mutation balance in polysomic tetraploids: Impact of double reduction and gametophytic selection on the frequency and subchromosomal localization of deleterious mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6608-6613.
- Buxton D.R., Hornstein J.S., Marten G.C. (1987) Genetic variation for forage quality of alfalfa stems. *Can. J. Plant Sci.* 67, 1057-1067.
- Choi H.K., Kim D., Uhm T., Limpens E., Lim H., Mun J.H., Kaló P., Penmetsa R.V., Seres A., Kulikova O., Roe B.A., Bisseling T., Kiss G.B., Cook D.R. (2004) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166, 1463-1502.
- Comai L., Young K., Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Codomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Odden A.R., Henikoff S. (2004) Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J.* 37, 778-786.
- Cook D.R. (1999) *Medicago truncatula* - a model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 301-304.
- Coulman B.E., Goplen B.P., McAllister T., Majak W., Cheng K.J., Berg B., Hall J., McCartney D., Acharya S. (2000) A review of the development of a bloat-reduced alfalfa cultivar. *Can. J. Plant Sci.* 80, 487-491.
- Dhiman T.R., Satters L.D. (1993) Protein as the first-limiting nutrient for lactating dairy cows fed high proportions of good quality alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 76, 1960-1971.
- Echt C.S., Kidwell K.K., Knapp S.J., Osborn T.C., McCoy T.J. (1993) Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome* 37, 61-71.
- Engels F.M., Jung H.G. (1998) Alfalfa stem tissues: cell-wall development and lignification. *Ann. Bot.* 82, 561-568.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Flint-Garcia S.A., Thornsberry J.M., Buckler IV E.S. (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 357-374.
- Gallais A. (2003) Quantitative genetics and breeding methods in autopolyploid plants. INRA Editions, Paris, France, pp
- Goering H.K., Van Soest P.J. (1970) Forage fiber analysis. *USDA Agric. handbook* 379, 1-20.
- Hackett C.A., Bradshaw J.E., Meyer R.C., McNicol J.W., Milbourne D., Waugh R. (1998) Linkage analysis in tetraploid species: a simulation study. *Genet. Res., Camb.* 71, 143-154.
- Hackett C.A., Luo Z.W. (2003) TetraploidMap: Construction of a linkage map in autotetraploid species. *J. Hered.* 94, 358-359.
- Hector A., Schmid B., Beierkuhnlein C., Caldeira M.C., Diemer M., Dimitrakopoulos P.G., Finn J.A., Freitas H., Giller P.S., Good J., Harris R., Hogberg P., Huss-Danell K., Joshi J., Jumpponen A., Körner C., Leadley P.W., Loreau M., Minns A., Mulder C.P.H., O'Donovan G., Otway S.J., Pereira J.S., Prinz A., Read D.J., Scherer-Lorenzen M., Schulze E.D., Siamantziouras A.S.D., Spehn E.M., Terry A.C., Troumbis A.Y., Woodward F.I., Yachi S., Lawton J.H. (1999) Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *Science* 286, 1123-1127.
- Hedqvist H., Mueller-Harvey I., Reed J.D., Krueger C.G., Murphy M. (2000) Characterisation of tannins and in vitro protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *An. Feed Sci. Tech.* 87, 41-56.
- Howarth R.E., Majak W., Waldern D.E., Brandt S.A., Fesser A.C., Goplen B.P., Spurr D.T. (1977) Relationships between ruminant bloat and the chemical composition of alfalfa herbage. I. Nitrogen and protein fractions. *Can. J. Anim. Sci.* 57, 345-357.
- Hristov A.N., Broderick G.A. (1994) In vitro determination of ruminal protein degradability using [<sup>15</sup>N]ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. *J. Anim. Sci.* 72, 1344-1354.



- Sheaffer C.C., Cash D., Ehlke N.J., Henning J.C., Grimsbo Jewett J., Johnson K.D., Peterson M.A., Smith M., Hansen J.L., Viands D.R. (1998) Entry x environment interactions for alfalfa forage quality. *Agron.J.* 90, 774-780.
- Sheaffer C.C., Peterson M.A., McCaslin M., Volenec J.J., Cherney J.H., Johnson K.D., Woodward W.T., Viands D.R. (1995) Acid cetergent fiber, neutral detergent fiber concentration, and relative feed value. North American Alfalfa Improvement Conference,
- Sniffen C.J., O'Connor J.D., Van Soest P.J., Fox D.G., Russell J.B. (1992) A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J.Anim.Sci.* 70, 3562-3577.
- Stanford E.H. (1951) Tetrasomic inheritance in alfalfa. *Agron.J.* 43, 222-225.
- Tamminga S. (1990) Nutrition managment of dairy cows as a contribution to pollution control. *J.Dairy Sci.* 75, 345-357.
- Thoquet P., Ghérardi M., Journet E.P., Kereszt A., Ané J.M., Prosperi J.M., Huguet T. (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biol.* 2, 1-
- Thrall P.H., Young A. (2000) AUTOTET: A program for analysis of autotetraploid genotypic data. *J.Hered.* 91, 348-349.
- Tremblay G.F., Michaud R., Bélanger G., McRae K.B., Petit H.V. (2000) In vitro ruminal undegradable proteins of alfalfa cultivars. *Can.J.Plant Sci.* 80, 315-325.
- VandenBosch K.A., Stacey G. (2003) Summaries of legume genomics projects from around the globe. Community resources for crops and models. *Plant Physiol.* 131, 840-865.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 68, 1358-1370.
- Wilsey B.J., Polley H.W. (2004) Realistically low species evenness does not alter grassland species-richness-productivity relationships. *Ecology* 85, 2693-2700.
- Wilson J.R., Kromann R.P., Evans D.W. (1978) Nutrient digestibility, digestible energy and metabolizable energy and agronomic data for varieties of alfalfa hay. *J.Anim.Sci.* 46, 1351-1355.
- Zimmer N., Cordesse R. (1996) Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Productions Animales* 9, 167-179.



### **3. Publications et Communications**

#### **3.1 - Article et notes dans des revues à comité de lecture**

1. Flajoulot S., Ronfort J., Baudouin P., Barre P., Huguet T., Huyghe C., **Julier B.** Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program using SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, accepté sous réserve de modifications
2. Jensen L.B., Muylle H., Arens P., Andersen C.H., Holm P.B., Ghesquière M., **Julier B.**, Lübberstedt T., Nielsen K.K., De Riek J., Roldan-Ruiz I., Roulund N., Taylor C., Vosman B., Barre P. (2005) Development and mapping of a public reference set of SSR markers in *Lolium perenne* L. Molecular Ecology Notes, sous presse.
3. **Julier B.**, Bournoville R., Landré B., Ecalte C., Carré S. (2004) Genetic analysis of alfalfa seedling resistance to pea aphid. Euphytica 138, 133-139.
4. **Julier B.**, Flajoulot S., Barre P., Cardinet G., Santoni S., Huguet T., Huyghe C. (2003) Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. BMC Plant Biology 3:9, <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/9>.
5. **Julier B.**, Guines F., Emile J.C., Huyghe C. (2003) Variation in protein degradability in dried forage legumes. Animal Research 52, 401-412.
6. Guines F., **Julier B.**, Ecalte C., Huyghe C. (2003) Among and within-cultivar variability for histological traits of lucerne (*Medicago sativa* L.) stem. Euphytica 130, 293-301.
7. Guines F., **Julier B.**, Ecalte C., Huyghe C. (2002) Genetic control of quality traits of lucerne (*Medicago sativa* L.). Australian Journal of Agricultural Research 53, 401-407.
8. Bolaños-Aguilar E.D., Huyghe C., Ecalte C., Hacquet J., **Julier B.** (2002) Effect of cultivar and environment on seed yield in alfalfa. Crop Science 42, 45-50.
9. Bolaños-Aguilar E.D., Huyghe C., Djukic D., **Julier B.**, Ecalte C. (2001) Genetic control of alfalfa seed yield and its components. Plant Breeding 120, 67-72.
10. **Julier B.**, Emile J.C., Lila M., Huyghe C. (2001) Phenotypic variation for *in sacco* dry matter and fibre degradation kinetics in lucerne. Australian Journal of Agricultural Research, 52, 439-445.
11. Bolaños-Aguilar E.D., Huyghe C., **Julier B.**, Ecalte C. (2000) Genetic variation for seed yield and its components in alfalfa populations. Agronomie 20, 333-345.
12. **Julier B.**, Huyghe C., Ecalte C. (2000). Within- and among-cultivar genetic variation in alfalfa : forage quality, morphology and yield. Crop Science 40, 365-369.
13. **Julier B.**, Lila M., Furstoss V., Travers V., Huyghe C. (1999). Measurement of cell-wall digestibility in lucerne using the filter bag technique. Animal Feed Science and Technology 79, 239-245.
14. Crochemore M.L., Huyghe C., Ecalte C., **Julier B.** (1998). Structuration of alfalfa genetic diversity using agronomic and morphological characteristics. Relationship with RAPD markers. Agronomie 18, 79-94.
15. **Julier B.**, Huyghe C. (1997) Effect of growth and cultivar on alfalfa digestibility in a multi-site trial. agronomie, 17, 481-489.
16. **Julier B.**, Guy P., Castillo-Acuna C., Caubel G., Ecalte C., Esquibet M., Furstoss V., Huyghe C., Lavaud C., Porcheron A., Pracros P., Raynal G. (1996). Genetic variation for disease and nematode resistance and forage quality in perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). Euphytica 91, 241-250.
17. **Julier B.** (1996). Traditional seed maintenance and origins of the French lucerne landraces. Euphytica 92, 353-357.
18. Crochemore M.L., Huyghe C., Kerlan M.C., Durand F., **Julier B.** (1996). Partitioning and distribution of RAPD variation in the *Medicago sativa* complex. Agronomie 16, 421-432.
19. **Julier B.**, Porcheron A., Ecalte C., Guy P. (1995). Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). Agronomie 15, 295-304.
20. **Julier B.**, Huyghe C., Papineau J., Billot C., Deroo C. (1995). Genetic and environmental variation in architecture and yield components in determinate white lupin (*Lupinus albus* L.). Euphytica 81, 171-179.



21. Crochemore M.L., Huyghe C., Papineau J., **Julier B.** (1994). Intra-plant variability in seed size and seed quality in *Lupinus albus* L. *Agronomie* 14, 5-13.
22. **Julier B.**, Huyghe C., Papineau J. (1994). Dry matter and nitrogen accumulation on autumn-sown white lupin cv. Lunoble. *European Journal of Agronomy* 3, 153-160.
23. Huyghe C., **Julier B.**, Harzic N., Papineau J. (1994). Yield and yield components on autumn-sown white lupin cv. Lunoble. *European Journal of Agronomy* 3, 145-152.
24. Barrière Y., Hébert Y., **Julier B.**, Young E., Furstoss V. (1993). Genetic variation for silage and NIRS traits in an half-diallel design of 21 inbred lines of maize. *Maydica* 38, 7-13.
25. **Julier B.**, Huyghe C. (1993). Description and model of the architecture of four genotypes of determinate autumn-sown white lupin (*Lupinus albus* L.) as influenced by location, sowing date and density. *Annals of Botany* 72, 493-501.
26. **Julier B.**, Huyghe C., Papineau J. (1993). Dry matter and nitrogen accumulation and seed yield in autumn-sown determinate white lupins. *Agronomie* 13, 877-888.
27. **Julier B.**, Huyghe C., Papineau J., Milford G.F.J., Day J., Billot C., Mangin P. (1993). Seed yield and yield stability of determinate and indeterminate autumn-sown white lupin grown at different locations in France and the UK. *Journal of Agricultural Science* 121, 177-186.
28. Milford G.F.J., Day J., Huyghe C., **Julier B.**, 1993. Floral determinacy in autumn-sown white lupin (*Lupinus albus*) : development of varieties for cooler European climates. *Aspects of Applied Biology* 34, *Physiology of varieties*, 89-97.

### **3.2 - Ouvrages et articles dans des ouvrages**

29. **Julier B.** Huguet T. (2005) Genetic maps and molecular markers in *Medicago* genus. In : P.B. Kirti (Ed), *Handbook of new technologies for genetic improvement of legumes*, Haworth Press, New York, sous presse.
30. Varlet-Grancher C., **Julier B.**, Moulia B., Ripoche D. (1995). Facteurs climatiques et mise en place des structures. *Actes de l'Ecole-Chercheur en bioclimatologie, Tome 1 : De la plante au couvert végétal*. Le Croisic, 3-7 avril 1995, INRA, 41-60.
31. Dreyer E., Camenen L., Hanocq J.F., **Julier B.** (1995). Utilisation de la fluorescence de la chlorophylle dans l'analyse in situ de la photosynthèse foliaire. *Actes de l'Ecole-Chercheur en bioclimatologie, Tome 1 : De la plante au couvert végétal*. Le Croisic, 3-7 avril 1995, INRA, 217-230.

### **3.3 - Conférences sur invitation**

32. **Julier B.** (2002) The *M. truncatula* model for quantitative genetics of tetraploid allogamous related species. Legumes for sustainable agriculture, Genetics and genomics of *Medicago truncatula* and legume crops: making use of synteny in breeding. Strasbourg 27-28/09/2002, AEP.

### **3.4 - Proceedings à des Congrès avec comité de lecture**

33. Huguet T., Thoquet P., Ghérardi M., Cardinet G., Prioul S., Lazrek F., Aouani M.E. Laour M., Abdelguerfi A., Kurchak O., Jacquet C., Torregrosa C., **Julier B.**, Kiss E., Batut J., Prosperi J.M. (2004) A post-genomic approach of the natural variations of the model-legume *Medicago truncatula*. *Proceedings of 5<sup>th</sup> European Conference on Grain Legumes – 2<sup>nd</sup> International Congress on Legume Genetics and Genomics*, Dijon, 169-170.
34. **Julier B.**, Ecalle C., Huyghe C. (2002) Identification of molecular markers associated to morphological traits in alfalfa. Multi-function grasslands: quality forages, animal products and landscapes. *Proceedings of the 19th General Meeting of the European Grassland Federation*, La Rochelle, France, 27-30 May 2002, 318-319.
35. **Julier B.**, Guines F., Prosperi J.M., Ecalle C., Huyghe C. (2002) Variation for morphology and histology of the stems in the model legume species *M. truncatula*. *Multi-function grasslands: quality forages, animal*



- products and landscapes. Proceedings of the 19th General Meeting of the European Grassland Federation, La Rochelle, France, 27-30 May 2002, 316-317.
36. Guines F., **Julier B.**, Poussot P., et al. (2002) Quantitative analysis of histological traits along the stem of lucerne. Multi-function grasslands: quality forages, animal products and landscapes. Proceedings of the 19th General Meeting of the European Grassland Federation, La Rochelle, France, 27-30 May 2002, 300-301.
  37. **Julier B.**, Lila M., Huyghe C., Morris P., Allison G., Robbins M. (2002) Effect of condensed tannin content on protein solubility in legume forages. Multi-function grasslands: quality forages, animal products and landscapes. Proceedings of the 19th General Meeting of the European Grassland Federation, La Rochelle, France, 27-30 May 2002, 134-135.
  38. Julier B., Barre P., Huyghe C. (2002) Molecular mapping in the autotetraploid alfalfa : preliminary results. International Conference on Plant, Animal & Genomes X, San Diego, Californie.
  39. **Julier B.**, Henri D., Ecalle C., Huyghe C. (2001) Tetraploid alfalfa mapping using AFLP markers and research of markers of pollen fertility. Proceedings of the XIV Eucarpia Medicago spp Group Meeting, Zaragoza, Spain, 12-15 September 2001, Options Méditerranéennes 45A, 37-40.
  40. **Julier B.**, Huyghe C., Emile JC, Morris P., Allison G., Robbins M. (2001) Variation for protein degradation in three forage legume species. Proceedings of the XIV Eucarpia Medicago spp Group Meeting, Zaragoza, Spain, 12-15 September 2001, Options Méditerranéennes 45A, 265-269.
  41. Guines F., **Julier B.**, Poussot P. Huyghe C. (2001) Investigating variation for histological characters in alfalfa stems. Proceedings of the XIV Eucarpia Medicago spp Group Meeting, Zaragoza, Spain, 12-15 September 2001, Options Méditerranéennes 45A, 47-51.
  42. Bournoville R., **Julier B.**, Landré B., Ecalle C., Carré S. (2001) Diallel analysis of pea aphid resistance in alfalfa seedlings. Proceedings of the XIV Eucarpia Medicago spp Group Meeting, Zaragoza, Spain, 12-15 September 2001, Options Méditerranéennes 45A, 77-80.
  43. Huyghe C., **Julier B.**, Bolanos-Aguilar E.D., Ecalle C., Hacquet J. (2001) Effect of cultivar and environment of seed yield in alfalfa. Proceedings of the XIV Eucarpia Medicago spp Group Meeting, Zaragoza, Spain, 12-15 September 2001, Options Méditerranéennes 45A, 127-130.
  44. Huyghe C., **Julier B.**, Bolanos-Aguilar E.D., Ecalle C. (2001) 3D distribution of seed yield in alfalfa seed canopy. Proceedings of the XIV Eucarpia Medicago spp Group Meeting, Zaragoza, Spain, 12-15 September 2001, Options Méditerranéennes 45A, 37-40.
  45. **Julier B.**, Huyghe C., Ecalle C. (1999). Within and among-cultivar genetic variance for digestibility and forage yield in alfalfa. XIII Eucarpia Medicago Group Meeting, Perugia, Italie, 13-16 September 1999, 352-358.
  46. **Julier B.**, Huyghe C., Ecalle C. (1999). Genetic variation and variety x environment interaction for digestibility, forage yield and protein content in alfalfa. XIII Eucarpia Medicago Group Meeting, Perugia, Italie, 13-16 September 1999, 359-364.
  47. Huyghe C., Bolaños-Aguilar E.D., Ecalle C., Hacquet J., **Julier B.** (1999) The seed weight per inflorescence as a selection criterion for seed yield in alfalfa. Proceedings of the XIII Eucarpia Medicago spp Group Meeting, Perugia, Italy, 13-16 September 1999, 107-116.
  48. Landré B., Bournoville R., Aupinel P., Carré S., Badenhausser I., Girousse C., **Julier B.** (1999). Rating of some lucerne and medics cultivars for pea aphid resistance. XIII Eucarpia Medicago Group Meeting, Perugia, Italie, 13-16 septembre 1999, 231-238.
  49. Bolaños-Aguilar E.D., Huyghe C., **Julier B.**, Ecalle C. (1999). Genetic variation within and between populations for seed yield in alfalfa. XIII Eucarpia Medicago Group Meeting, Perugia, Italie, 13-16 September 1999, 176-182.
  50. Bolaños-Aguilar E.D., Huyghe C., Djukic D., **Julier B.**, Ecalle C. (1999). Diallel analysis of seed yield in lucerne. XIII Eucarpia Medicago Group Meeting, Perugia, Italie, 13-16 September 1999, 307-314.
  51. **Julier B.**, Huyghe C. (1997). Genetic variation for digestibility and fiber contents in the *Medicago sativa* complex. In : Seed production of lucerne (O. Chloupek et U. Simon, eds), Proceedings of the XIIth Eucarpia Meeting of the group Medicago, 4-8 July 1996, Prague, 74-76.
  52. Crochemore M.L., Huyghe C., Durand F., **Julier B.**, Kerlan M.C. (1997). Partitioning of the RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. In : Seed production of lucerne (O. Chloupek et



- U. Simon, eds), Proceedings of the XIIth Eucarpia Meeting of the group *Medicago*, 4-8 July 1996, Prague, 40-41.
53. **Julier B.**, Huyghe C., Guy P., Crochemore M.L. (1996). Genetic variation in the *Medicago sativa* complex. *Options Méditerranéennes*, 18, 91-102.

### **3.5 - Communications orales à des congrès**

54. Julier B., Flajoulot S., Huguet T., Santoni S., Barre P., Huyghe C. (2004) Construction of linkage map in alfalfa and assessment of colinearity with *Medicago truncatula*. Possible uses in QTL detection and gene mapping. North American Alfalfa Conference, Québec.
55. **Julier B.**, Barre P., Hébert Y., Huguet T., Huyghe C. (2003) Methodology of alfalfa breeding : a review of recent achievements. Proc 25<sup>th</sup> Eucarpia Fodder Crops and Amenity grasses section Meeting, Czech J. Genet. Plant Breed. 39, 71-81. (sur invitation)
56. **Julier B.**, Guines F., Ecalle C., Huyghe C. (2001) From description to explanation of variations in alfalfa digestibility. Proceedings of the XIV Eucarpia *Medicago* spp Group Meeting, Zaragoza, Spain, 12-15 September 2001, Options Méditerranéennes 45A, 19-23. (sur invitation)
57. **Julier B.**, Ecalle C., Huyghe C. (1999) Potential for including the digestibility in breeding of alfalfa. Proceedings of the XIII Eucarpia *Medicago* spp Group Meeting, Perugia, Italy, 13-16 September 1999, 125-133 (sur invitation)
58. **Julier B.**, Huyghe C. (1991). Heredity of determinate growth in winter white lupin. Influence of the sowing time on architecture. Proceedings of the First European Conference on Grain Legumes. pp 47-48, Angers, France.

### **3.6 - Communications par affiche**

59. Flajoulot S., Ronfort J., Baudouin P., Huguet T., Barre P., Huyghe C., **Julier B.** (2005) Genetic diversity among alfalfa cultivars using SSR markers. Molecular Breeding of Forage and Turf, Aberystwyth
60. **Julier B.**, Huguet T., Prosperi J.M., Barre P., Cardinet G., Huyghe C. (2005) QTL for morphogenetic traits in *Medicago truncatula*. Molecular Breeding of Forage and Turf, Aberystwyth
61. Ayadi R., Barre P., Huyghe C., **Julier B.** (2005) Estimation of the coefficient of double-reduction in autotetraploid lucerne. Molecular Breeding of Forage and Turf, Aberystwyth
62. Barre,P.; Darrieutort,G.; Auzanneau,J.; **Julier,B.** (2005) Development of a tool for automated alignments of genes from a ABC's GenBank card against several data bases and screening of the results. Molecular Breeding of Forage and Turf, Aberystwyth.
63. Flajoulot S., Baudouin P., Ronfort J., Huguet T., Barre P., **Julier B.**, Huyghe C. (2004) Structuration of genetic diversity among and within alfalfa varieties using microsatellite markers. North American Alfalfa Conference, Québec.
64. **Julier B.**, Flajoulot S., Barre P., Cardinet G., Santoni S., Huguet T., Huyghe C. (2004) A SSR-based genetic linkage map in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) and synteny with *M. truncatula*. Conference Handbook of 5<sup>th</sup> European Conference on Grain Legumes – 2<sup>nd</sup> International Congress on Legume Genetics and Genomics, Dijon, p 183.
65. **Julier B.**, Barre P., Cardinet G., Prosperi J.M., Huguet T., Huyghe C. (2004) Identification of QTLs for morphogenetic traits in *Medicago truncatula*. Conference Handbook of 5<sup>th</sup> European Conference on Grain Legumes – 2<sup>nd</sup> International Congress on Legume Genetics and Genomics, Dijon, p 106.
66. **Julier B.**, Huguet T., Flajoulot S., Cardinet G. (2003) Transfer of SSR markers from *Medicago truncatula* to alfalfa (*M. sativa*). Molecular Breeding of Forage and Turf, 3<sup>rd</sup> International Symposium, Dallas.
67. Barre, P., Flajoulot S., Lauvergeat V., **Julier B.** (2003) SNPs development on phytochromes A, B and C and on cryptochrome in *Lolium perenne*. Molecular Breeding of Forage and Turf, 3<sup>rd</sup> International Symposium, Dallas.
68. **Julier B.**, Guines F., Huguet T., Hackett C., Santoni S., Barre P., Huyghe C. (2002) Mapping in autotetraploid alfalfa and identification of QTL of stem morphology and histology. International



69. **Julier B.**, Guines F., Hackett C., Huguet T., Huyghe C. (2002) Genetic mapping and identification of QTL for stem morphology in tetraploid alfalfa. North American Alfalfa Improvement Conference, Sacramento, Californie.
70. **Julier B.**, Czochara M., Lauvergeat V., Huyghe C. (2002) Effect of mevalonate kinase gene on stem growth in transgenic alfalfa. North American Alfalfa Improvement Conference, Sacramento, Californie.
71. Bournoville R., Carré S., Badenhausser I., Girousse C., Aupinel P., **Julier B.** (2002) Trends about alfalfa resistance to the pea aphid in France. North American Alfalfa Improvement Conference, Sacramento, Californie.
72. Bolanos-Aguilar E.D., Huyghe C., **Julier B.**, Ecalte C. (2001) Dry matter accumulation and partitioning between vegetative and reproductive organs in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Proceedings of the XIX International Grassland Congress, 11-21 February 2001, Sao Pedro Sao Paulo, Brazil, p 143-145.
73. **Julier B.**, Huyghe C., Ecalte C. (2000) Genetic variation and variety x environment interaction for digestibility. Proceeding of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Madison, Wisconsin, USA, July 16-19, 2000, p 321.
74. **Julier B.**, Emile J.C., Lila M., Huyghe C. (2000) Genetic variation for in sacco kinetics of dry matter and fiber degradation in alfalfa. Proceeding of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Madison, Wisconsin, USA, July 16-19, 2000, p 322.
75. Guines F., **Julier B.**, Huyghe C. (2000) Genetic variation for in situ kinetics of protein degradation in alfalfa. Proceeding of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Madison, Wisconsin, USA, July 16-19, 2000, p 323.
76. Guines F., **Julier B.**, Huyghe C. (2000) Inheritance of digestibility and fiber content in alfalfa. Proceeding of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Madison, Wisconsin, USA, July 16-19, 2000, p 324.
77. **Julier B.**, Huyghe C., Ecalte C. (1998). Growth and cultivar effects on alfalfa digestibility. Report of the 36<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Bozeman, Montana, 75.
78. **Julier B.**, Huyghe C., Ecalte C. (1998). Within and between-cultivar variation for alfalfa digestibility. Report of the 36<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Bozeman, Montana, 76.
79. Bolanos-Aguilar E.D., Huyghe C., **Julier B.**, Ecalte C. (2001) Dry matter accumulation and partitioning between vegetative and reproductive organs in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Proceedings of the XIX International Grassland Congress, 11-21 February 2001, Sao Pedro Sao Paulo, Brazil, p 143-145.
80. Huyghe C., **Julier B.**, Bolanos-Aguilar E.D., Ecalte C. (2000) Effect of cultivar and environment on seed yield in alfalfa. Proceeding of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Madison, Wisconsin, USA, July 16-19, 2000, p 327.
81. Huyghe C., **Julier B.**, Bolanos-Aguilar E.D., Ecalte C. (2000) Relationship between seed yield and biomass in alfalfa seed crops. Proceeding of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Madison, Wisconsin, USA, July 16-19, 2000, p 330.
82. Huyghe C., **Julier B.**, Bolanos-Aguilar E.D., Ecalte C. (2000) 3D distribution of seed yield in an alfalfa seed canopy. Proceeding of the 37<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Madison, Wisconsin, USA, July 16-19, 2000, p 331.
83. Huyghe C., Leneguer R., Auriel P.H., Bodin C., Ecalte C., **Julier B.** (1998). Genetic variation of male and female fertilities in alfalfa. Report of the 36<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Bozeman, Montana, 51.
84. Huyghe C., Bolaños-Aguilar E.D., Ecalte C., **Julier B.** (1998). Distribution of seed yield in an alfalfa canopy. Report of the 36<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Bozeman, Montana, 57.
85. **Julier B.**, Huyghe C. (1996). Genetic variation for digestibility and fiber contents in the *Medicago sativa* complex. Report of the 35<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference, Oklahoma City, 32.
86. **Julier B.**, Huyghe C. (1993). Phenotypic and genotypic variability of the architecture of determinate autumn-sown white lupin. *VIIIth International Lupin Conference*, Evora, Portugal.



87. **Julier B.**, Huyghe C. (1993). Modelling the architecture of first-order branches on determinate autumn-sown white lupin. *VIIth International Lupin Conference*, Evora, Portugal.
88. Crochemore M.L., Huyghe C., **Julier B.**, Papineau J. (1993). Origin of the seed size variation in *Lupinus albus*. *VIIth International Lupin Conference*, Evora, Portugal.
89. Harzic N., **Julier B.**, Huyghe C. (1993). Phenotypic and genotypic variability for radiation profile in canopies of autumn-sown white lupin (*Lupinus albus* L.) with contrasted architecture. *VIIth International Lupin Conference*, Evora, Portugal.
90. Huyghe C., **Julier B.**, Harzic N., Papineau J. (1993). Breeding of *Lupinus albus*: new architectures for a further domestication. *VIIth International Lupin Conference*, Evora, Portugal.

### 3.7- Rapports de recherche

91. **Julier B.**, Thami Alami I. (2002) Etude des bases scientifiques et techniques de la production de semences des populations locales de luzerne du Sud Maroc en vue d'améliorer la viabilité économique des systèmes fourragers et de sauvegarder les ressources génétiques locales. Projet de Recherche agronomique pour le développement (PRAD) du CIHEAM. Rapport final.
92. **Julier B.**, Thami Alami I. (2001) Etude des bases scientifiques et techniques de la production de semences des populations locales de luzerne du Sud Maroc en vue d'améliorer la viabilité économique des systèmes fourragers et de sauvegarder les ressources génétiques locales. Projet de Recherche agronomique pour le développement (PRAD) du CIHEAM. Rapport d'étape.
93. **Julier B.**, Thami Alami I. (2000) Etude des bases scientifiques et techniques de la production de semences des populations locales de luzerne du Sud Maroc en vue d'améliorer la viabilité économique des systèmes fourragers et de sauvegarder les ressources génétiques locales. Projet de Recherche agronomique pour le développement (PRAD) du CIHEAM. Rapport d'étape.
94. **Julier B.**, Huyghe C., ACVF Luzerne, SNDF (2002) La valeur énergétique et l'inscription des variétés de luzerne au catalogue officiel français. Projet d'appui aux sections du CTPS. Rapport final.
95. **Julier B.**, Huyghe C., ACVF Luzerne, SNDF (2001) La valeur énergétique et l'inscription des variétés de luzerne au catalogue officiel français. Projet d'appui aux sections du CTPS. Rapport d'étape.
96. Damiani F. et al., Robbins M. et al., **Julier B.** et al. (2002) Compounds and genes for enhanced protein assimilation and digestibility of forage legumes (CAGED) Projet européen 1999-2002 FAIR 98-4068, rapport final.
97. Damiani F. et al., Robbins M. et al., **Julier B.** et al. (2001) Compounds and genes for enhanced protein assimilation and digestibility of forage legumes (CAGED) Projet européen 1999-2002 FAIR 98-4068, rapport annuel.
98. Damiani F. et al., Robbins M. et al., **Julier B.** et al. (2000) Compounds and genes for enhanced protein assimilation and digestibility of forage legumes (CAGED) Projet européen 1999-2002 FAIR 98-4068, rapport annuel.
99. **Julier B.**, Huyghe C. (1997) Compte-rendu de l'expérimentation INRA-SNDF : Variabilité génétique pour la digestibilité de la luzerne, rapport annuel.
100. **Julier B.**, Huyghe C. (1998) Compte-rendu de l'expérimentation INRA-SNDF : Variabilité génétique pour la digestibilité de la luzerne, rapport annuel.
101. **Julier B.**, Huyghe C. (1999) Compte-rendu de l'expérimentation INRA-SNDF : Variabilité génétique pour la digestibilité de la luzerne, rapport final.
102. **Julier B.**, Huyghe C. (2000) Amélioration génétique de la digestibilité de la luzerne, dans la perspective d'un retour important à l'alimentation du bétail au moyen de la pâture et des protéines végétales. Contrat de branches Ministère de l'Agriculture – ACVF – INRA, rapport final.
103. **Julier B.**, Huyghe C. (2000) Amélioration génétique de la digestibilité de la luzerne, dans la perspective d'un retour important à l'alimentation du bétail au moyen de la pâture et des protéines végétales. Contrat de branches Ministère de l'Agriculture – ACVF – INRA, rapport d'étape.
104. **Julier B.**, Huyghe C. (2000) Amélioration génétique de la digestibilité de la luzerne, dans la perspective d'un retour important à l'alimentation du bétail au moyen de la pâture et des protéines végétales. Contrat de branches Ministère de l'Agriculture – ACVF – INRA, rapport d'étape.



#### **4. Activités d'animation de la recherche**

Membre du groupe Fourrages

Membre du groupe Morphogenèse DGAP

Co-organisation avec C. Huyghe des "Journées Luzerne" en 1995, 1996, 1998, 1999

#### **5. Activités d'encadrement**

##### **5.1 Thèses de doctorat**

1. Pierre J.B. (depuis 01/2005) Déterminants génétiques de la morphogenèse aérienne chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*. ENSA Rennes
2. Guines F (2002) Bases génétiques des variations pour la structure histologiques des tiges de luzerne (*Medicago sativa* L.). Thèse de doctorat de l'ENSA de Rennes, 99 p.
3. Bolanos-Aguilar E.D. (2001) Etude génétique de la production de graines chez la luzerne (*Medicago sativa* L.). ENSA de Rennes, Biologie et Agronomie, 133 p. Thèse encadrée par C. Huyghe, co-encadrée par moi-même à 30%.
4. Crochemore M.L. (1996) Structuration de la variabilité génétique de la luzerne (*Medicago sativa* L.) pérenne, tétraploïde à l'aide de caractères agro-morphologiques, moléculaires et physico-chimiques. Université de Poitiers, Option Agronomie et Biologie Moléculaire, 100 p + annexes. Thèse encadrée par C. Huyghe, co-encadrée par moi-même à 30%.

##### **5.2 Mémoires de DEA, DESS**

5. Pierre J.B. (2004) Développement et cartographie de marqueurs gènes-spécifiques chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*. DESS de Génétique, Génomique et Technologies Avancées des Végétaux, Université de Montpellier II.
6. Auzanneau J. (2003) Identification de QTL de la morphogenèse aérienne en situation de compétition chez la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.). DEA de Génétique, Adaptations et Productions Végétales, ENSA Rennes, 33 p. + annexes
7. Berland S. (2003) Cartographie génétique de la luzerne cultivée tétraploïde *Medicago sativa* à l'aide de marqueurs microsatellites. Diplôme Inter-Universitaire de Biotechnologies Végétales, ENSA Rennes, 30 p.
8. Bousseau D. (2001) Cartographie et détection de QTL chez la luzerne cultivée autotétraploïde *Medicago sativa* : application à la morphogenèse. DAA Ingénierie de la Production Végétale, INA P-G, 36p + annexes
9. Henri D. (2000) Cartographie de la luzerne cultivée autotétraploïde *Medicago sativa* à l'aide de marqueurs AFLP. DESS Université Paris 7.

##### **5.3 Stages de maîtrise, licence, BTS, DUT**

10. Benito N. (2003) Identification de QTLs de caractères biochimiques et histologiques chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*. Programme Eurodyssée, 31 p.
11. Bigot G. (2003) Identification de QTL de caractères de morphogenèse chez la luzerne cultivée *Medicago sativa*. IUT de Statistique et Traitement Informatique des Données, Poitiers, 39p + annexes
12. Pierre J.B. (2002) Cartographie génétique de la luzerne cultivée autotétraploïde *Medicago sativa*. Licence Professionnelle ENFA Toulouse-Auzeville.
13. Czochara M. (2001) Etude moléculaire de plantes transformées de luzerne : mise en évidence du gène Erg12 codant pour la mévalonate kinase. Stage Passerelle ESCM Poitiers, 50 p.
14. Nouhaud A. (1999). Dégradabilité des protéines de la luzerne. Université de Poitiers, Maîtrise de Chimie, 36 p.



15. Samson S. (1999). Transformation de *Medicago sativa* par *Agrobacterium tumefaciens*. IUT de La Rochelle, IUT Génie Biologique 34 p.
16. Cuquel L. (1998). Variabilité génétique pour la digestibilité des parois chez la luzerne : Choix d'une méthode d'évaluation et applications. Université de Pau et des Pays de l'Adour, Maîtrise de Biochimie, 37 p.
17. Prioul S. (1997). Recherche d'allèles mutés non fonctionnels de l'OMT chez *Medicago sativa*. Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, Université de Rennes I, 20 p.
18. Travers V. (1997). Mise au point d'une technique de mesure de la digestibilité des parois de luzerne. MST Chimagri, 42 p.
19. Blugeon S. (1996). Etude de la variabilité génétique sur la digestibilité des parois cellulaires de luzerne. 36 p.
20. Picard K. (1996). Clonage et séquençage de l'OMT de *Medicago truncatula* en vue de la production de luzernes transgéniques avec modification de la lignification. Université de Rennes I, 26 p.
21. Garon C. (1996). Evolution de la croissance et de la qualité en fonction du génotype et de la densité de peuplement. BTS Productions Végétales, Lycée Agricole de Venours, Rouillé.
22. Holtzer C. (1996) Essai de transformation de la luzerne (*Medicago sativa*) par *Agrobacterium tumefaciens*. Mémoire DIRS, Université de Tours.
23. Barrière E. (1995). Effet de la densité et du génotype sur la croissance et la digestibilité de la luzerne. BTS Productions Végétales, Lycée Agricole de Venours, Rouillé.
24. Deletage C. (1995). Etude de la variabilité du taux de pectines dans les tiges de luzerne. MST CHIM'AGRI, Université de Poitiers, 21 p.

## **6. Jurys de thèses, referee, expertises**

**Jury de thèse** de F. Guines (2002)

**Referee** pour les revues Crop Science, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Canadian Journal of Plant Science, Australian Journal of Agricultural Research, Grass and Forage Science, Euphytica

**Referee** pour la revue de vulgarisation *Fourrages*

**Referee** pour l'International Foundation for Science: 2004

**Expert** auprès du Comité Technique Permanent de la Sélection, section Plantes fourragères et à gazon

**Membre du Comité de thèse** de Delphine Moreau (INRA Dijon) depuis 2004 et de Komlan Avia (INRA Mons) depuis 2005

## **7. Coopérations nationales et internationales**

**Accueil de chercheurs étrangers**

2001 : accueil de A. Bouizgaren (3 mois), Ingénieur à l'INRA de Rabat dans le cadre d'un programme de coopération PRAD entre la France et le Maroc : Etude de fertilité des gamétophytes mâle et femelle et du potentiel grainier chez les populations locales de luzerne du Maroc



2004-2005: accueil de R. Ayadi (1 an), enseignante-chercheuse à l'Université de Blida (Algérie) avec un financement de la région Poitou-Charentes : Recherche de polymorphisme allélique pour quelques gènes impliqués dans la date de floraison et la morphogenèse chez la légumineuse modèle *M. truncatula*. Analyse de la fréquence de double-réduction chez la luzerne autotétraploïde.

#### **Contrats de recherche internationaux**

Programme Européen STREP (6<sup>ème</sup> PCRD): PERMED (improvement of native PERennial forage plants for sustainability of MEDiterranean farming systems) : responsable du work-package 2: Utilization of molecular tools to breed for drought resistance and water use efficiency. The case of *Medicago sativa*.

Programme Européen (5<sup>ème</sup> PCRD) (2002-2005): Development of ryegrass allele-specific markers for sustainable grassland improvement (GRASP).

Programme Européen (4<sup>ème</sup> PCRD) (1999-2002): Compounds and genes for enhanced protein assimilation and digestibility of forage legumes (CAGED), FAIR 98-4068. Responsable pour le partenaire français.

Contrat PRAD avec l'INRA du Maroc, financé par le CIHEAM: 2000-2002 : Etude des bases scientifiques et techniques de la production de semences des populations locales de luzerne du Sud Maroc en vue d'améliorer la viabilité économique des systèmes fourragers et de sauvegarder les ressources génétiques locales. Responsable pour le partenaire français.

#### **Contrat de recherche national**

Action Transversale Structurante *Medicago truncatula* (1999-2002) financée par l'INRA: contribution aux modules 5 (Qualité des graines et fourrages) et 7 (Validation du modèle *Medicago truncatula* pour le pois et la luzerne : cartographie comparée).

### **8. Coopération industrielles et valorisation**

- Contrats de branches ACVF (Association des Créateurs de Variétés Fourragères) - INRA financés par le Ministère de l'Agriculture: 1994-1996 et 1997-1999: Amélioration génétique de la digestibilité de la luzerne
- Contrat INRA-SNDF (1995-1999) : Variabilité génétique pour la digestibilité de la luzerne
- Contrat CTPS-INRA (1999-2001): Distinction des variétés de luzerne
- Contrat CTPS-INRA (2001-2002): La valeur énergétique et l'inscription des variétés de luzerne au catalogue officiel français. Projet d'appui aux sections du CTPS
- Contrat ACVF - INRA (2003-2005): Intérêt des marqueurs microsatellites pour l'étude de la diversité génétique des populations et variétés de luzerne pérenne, financement ACVF

### **9. Formations et stages spécialisés**

- Bioinformatique : 1 semaine, INRA Lusignan, février 2005



- Sauveteur-secouriste du travail: 2 jours, novembre 2004
- Ecole chercheur Bioclimatologie: Formation INRA, Le Croisic, 1 semaine en 1995.
- Communiquer des résultats de recherche: 3 jours, INRA Lusignan, mars 1991
- Anglais: formation permanente, INRA Lusignan

## **10. Collaborations**

- INRA Montpellier (Joëlle Ronfort et Jean-Marie Prosperi): structuration de la diversité génétique, *M. truncatula* et *M. sativa*
- ENSAT Toulouse (Thierry Huguet): génomique de *M. truncatula*
- INRA Dijon (Nathalie Munier-Jolain): écophysiologie de la morphogenèse chez *M. truncatula*

## **11. Information scientifique, techniques et vulgarisation**

### **Information technique interne**

25. Ghesquière M., Julier B. (2004) Introduction au logiciel SAS version 8.1. Formation interne au Centre Poitou-Charentes en informatique. Formation dispensée en 2004 et 2005 (1 journée)

### **Articles de vulgarisation**

26. **Julier B.**, Barre P. (2005) Les cartes génétiques chez les espèces fourragères pérennes des régions tempérées. Journées AFPP : Génétique et prairies, 15-16 mars 2005. Fourrages, à paraître (communication orale).
27. Barre P., **Julier B.** (2005) Recherche de QTL chez les espèces fourragères pérennes des régions tempérées. Journées AFPP : Génétique et prairies, 15-16 mars 2005. Fourrages, à paraître.
28. **Julier B.**, Lila M., Huyghe C., et al. (2003) Effet des tannins condensés sur la solubilité des protéines de légumineuses fourragères. Journées AFPP : Fourrages, protéines et environnement: de nouveaux équilibres à construire (2e partie), 27-28 mars 2003. Fourrages 175, 373-377.
29. **Julier B.**, Huyghe C., Emile J.C. (2003) Variations pour la dégradation des protéines de quatre espèces de légumineuses fourragères. Journées AFPP : Fourrages, protéines et environnement: de nouveaux équilibres à construire (2e partie), 27-28 mars 2003. Fourrages 175, 367-371
30. **Julier B.**, Guines F., Ecalte C., Emile J.C., Lila M., Briand M., Huyghe C. (2003) Eléments pour une amélioration génétique de la valeur énergétique de la luzerne. Fourrages, 173: 49-61
31. **Julier B.**, Huyghe C. (1998). Variabilité génétique pour la digestibilité de la luzerne : relation avec la production de matière sèche et la proportion de feuilles. *Fourrages*, 154, 261-268.
32. Barrière Y., Hazard L., Emile J.C., Ghesquière M., **Julier B.**, Mousset C., Hébert Y. (1997). Maximiser l'utilisation des fourrages par l'amélioration génétique de la valeur agronomique et de la valeur alimentaire des variétés. 4emes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, 4-5 Décembre, 125-132.
33. **Julier B.** (1998). Types de luzerne, variétés et populations de pays. Historique de la sélection. Bulletin Semences
34. **Julier B.**, Ghesquière M. (1997). Possibilités nouvelles offertes par les biotechnologies chez les plantes fourragères. *Fourrages*, 147, 273-292
35. Barrière Y. Bourgoïn B., Chabosseau J.M., Demarly Y., Ghesquière M., Huyghe C., **Julier B.**, Mansat P., Poisson C. (1996). La Station INRA d'Amélioration des Plantes Fourragères de Lusignan : des projets sur " l'herbe ". *Fourrages* 148, 311-331.
36. Flajoulot S., Baudouin P., Ronfort J., Huguet T., Barre P., Huyghe C., **Julier B.** (2004) Variabilité génétique révélée à l'aide de marqueurs neutres entre et à l'intérieur de variétés de luzerne. Journées de l'Association Française Pour les Fourrages, 23-24 mars 2004, Paris

