

MICHEL CABOCHE

PARCOURS SCIENTIFIQUE D'UN BIOLOGISTE DE L'INRA



© Inra / Jean Weber

Portrait de Michel Caboche dans son bureau à l'Inra de Versailles.

Le métier de chercheur est captivant. Il nécessite un investissement personnel maximal si on ne veut pas être devancé par les autres. Etre devancé a une double conséquence : une dévaluation du travail effectué, et un sentiment d'avoir travaillé pour rien. Plus le thème de recherche est jugé de grande importance et plus il attire de nouveaux chercheurs avec lesquels il faut tantôt collaborer, tantôt entrer en compétition. Ce climat de concurrence est un puissant moteur de la recherche, mais il y a un prix à payer : il faut avoir une grande disponibilité.

Souvent, c'est la famille qui en fait les frais. Ceci a été le cas de ma propre famille et, en premier lieu, de Marie-Claude, mon épouse, qui jour après jour m'a soutenu dans ma recherche. En renonçant à mener une vie professionnelle, elle a énormément facilité mes propres changements. Elle a accepté de quitter Toulouse où nous nous plaisions beaucoup pour la banlieue parisienne. Elle a été aussi d'accord pour me suivre dans mes expatriations aux Etats-Unis et au Japon. Lorsque j'ai traversé des crises graves, Marie-Claude a été toujours là pour me redonner confiance. Les dix dernières années de ma carrière ont été particulièrement difficiles pour elle qui m'a vu écrasé sous l'effet conjugué, d'une part, d'un travail intense et frustrant car de plus en plus administratif / bureaucratique et, d'autre part, de la maladie qui s'est installée en moi. La création, à l'Inra de Versailles en 2002, de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV) a été une réussite et, en même temps, un naufrage personnel. Ce récit commence donc par un grand MERCI à celle qui m'a suivi et soutenu dans cette aventure. Tous les deux, nous nous souviendrons également longtemps de la rencontre avec Marion Guillaou quand je lui ai annoncé ma décision de prendre ma retraite, en l'informant du diagnostic médical, sans appel, qui venait d'être fait la semaine précédente. Je lui suis reconnaissant de m'avoir donné le statut de chercheur émérite qui m'a permis de rester en contact avec le monde de la recherche.

L'ÉVEIL À LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET L'INTÉRÊT POUR LA BIOLOGIE

LA FORMATION ET LA RECHERCHE À L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE : L'OUVERTURE DE L'X À LA BIOLOGIE

Mon premier contact avec la recherche remonte aux événements de Mai 68, alors que je fais mes études à l'école Polytechnique que j'ai intégrée en 1966. C'était l'époque de la grande remise en question de la société et nous avons été nombreux à l'X à souhaiter faire autre chose que ce à quoi polytechnique nous préparait. « La Renault 16 à 30 ans » comme objectif professionnel ne nous motivait pas et nous étions nombreux à être attirés par la « botte recherche ». À cette époque les polytechniciens qui partaient dans l'industrie devaient payer une bonne partie des frais d'études (70 000 Francs de l'époque) et ceux qui choisissaient la voie du service public pour une durée suffisante avaient leurs frais d'étude payés par l'Etat. Cet aspect financier avait de l'importance pour un X issu de milieu modeste comme c'était mon cas, ayant grandi dans l'exploitation agricole de mon père en Picardie dans le Beauvaisis. Le choix du service public s'imposait donc et la recherche m'intéressait.

La proximité du laboratoire de physique nucléaire de Polytechnique, dirigé par le charismatique professeur Louis Leprince-Ringuet attirait quelques uns d'entre nous. Personnellement, je ne me sentais pas trop motivé par cette discipline qui nécessitait une démarche de recherche collective et l'accès, déjà à cette époque, à de grands instruments (accélérateurs de particules), ainsi qu'une spécialisation professionnelle (expérimentateur ou théoricien ?). J'avais envie d'avoir mon sujet de recherche bien à moi. Mais lequel ?

Nous étions plusieurs à avoir entendu parler de François Jacob et Jacques Monod, tous deux prix Nobel de médecine en 1965. L'idée nous est venue d'organiser un enseignement de biologie à Polytechnique. Il n'y avait jamais eu d'enseignement de ce type à l'école, probablement parce que la direction de l'X ne voyait pas bien ce qu'un jeune polytechnicien pouvait apporter à la recherche en biologie, sauf peut-être en biophysique. Nous avons donc contacté les grands biologistes dont nous avions entendu parler et à notre grande surprise quasiment tous ceux qui furent approchés acceptèrent de donner une conférence sur le sujet de leur choix. Ainsi Jacques Monod nous a initié à l'analyse génétique de régulations métaboliques dans une bactérie aboutissant au modèle de l'opéron lactose. Quand Monod a fini son exposé, il a voulu écrire la formule chimique du glucose sur le tableau noir, mais, hésitant sur la position des groupements OH de la molécule, il a fini en déclarant que ça n'avait pas d'importance. Monod voyait loin. On était dans la « high science », et ravis de ce contact direct avec un prix Nobel. Le neurobiologiste Jean-Pierre Changeux est venu lui aussi. Il nous a parlé de l'allostérie, un concept qu'il a formalisé avec Jacques Monod et Jeffries Wyman (les enzymes changent de forme en présence de certains substrats, qui de ce fait régulent leur vitesse de fonctionnement). Il y avait un peu de maths dans cette recherche et Changeux nous a fait comprendre que ce serait une orientation intéressante pour des « matheux » d'étudier les réactions catalysées par les enzymes.

Celui qui nous a le plus captivé a été François Gros, biologiste pionnier de la biologie cellulaire. Il avait l'art de tout rendre simple et limpide. Il nous a expliqué l'importance du « dogme » de la biologie moléculaire (l'ADN est copié en ARN et l'ARN à son tour traduit par les ribosomes pour faire des protéines très diverses, selon les règles du code génétique). François Gros avait la capacité d'écouter une journée de conférences sur un sujet de biologie qu'il ne connaissait pas et de résumer ce qui s'était dit comme s'il avait toujours travaillé dans ce domaine. Un autre intervenant a été Maurice Guéron, qui nous a fait visiter l'institut Pasteur et nous a initié aux outils de biophysique (ex : centrifugeuses, machines de RMN). Nous avons aussi invité Michel Gillois pour nous parler de la recherche en génétique sur les animaux à l'Inra. C'est Jean Croizé de Pourcelet qui avait rejoint Gillois pour faire des maths dans le domaine de la génétique quantitative qui nous avait mis en contact.

Alors que certains d'entre nous sont rentrés à l'institut Pasteur, comme Francis Berthelot, d'autres sont rentrés dans des laboratoires du CNRS, comme François Caron, camarade de caserne, aujourd'hui décédé, qui a étudié la paramécie, un protozoaire. Personnellement, j'étais encore hésitant, et je n'avais pas abandonné l'idée de faire de la géologie, ma passion depuis l'école primaire. Je collectionnais les oursins que je trouvais dans les champs et j'étais fasciné par la découverte de nodules de marcassite dans les carrières de craie de ma Picardie natale. Ces nodules de pyrite une fois cassés faisaient apparaître de magnifiques aiguilles de sulfure de fer et de ce fait je me suis intéressé aux cristaux.

Justement au laboratoire de chimie de l'Ecole Polytechnique dirigé par Emmanuel Grison, on faisait des travaux d'étude des cristaux et de Mai à Août 1968 j'ai réalisé un petit travail de cristallographie qui consistait à identifier la structure d'une molécule, le chloro 4 thienopyridazine, en utilisant les techniques de diffraction des rayons X sur les cristaux. Avec un traitement mathématique approprié, on convertit ces tâches en cartes de densité électronique entourant les atomes et on détermine la structure de la molécule. Pour cela, on utilisait un ordinateur IBM 1120 que l'on alimentait avec un programme informatique établi sur 4000 cartes perforées qui avaient la mauvaise habitude de se coincer en passant dans le lecteur ! Cette expérience de cristallographie m'a fait découvrir une recherche consommatrice de mathématiques, très éloignée de la collection des pierres et cristaux et j'ai donc abandonné cette orientation pour revenir à la biologie.

L'INTÉRÊT PRÉCOCE POUR LA BIOLOGIE

Enfant, je m'intéressais aussi aux animaux et aux plantes et je collectionnais aussi bien les crânes et les dents de petits animaux, que les plantes mises à sécher entre les feuilles de vieux livres que j'avais trouvés au grenier de notre maison. Cet intérêt pour les êtres vivants avait été stimulé par les travaux expérimentaux que nous faisions, dès la classe de seconde M', (scientifique avec une seule langue vivante) au lycée de Beauvais où j'ai été interne. Notre professeure de biologie, madame Méléard, nous faisait réaliser des expériences qui me passionnaient. Une expérience me revient à l'esprit. Mme Méléard avait récolté les branches d'une plante aquatique, l'élodée, qui produit des petites bulles à la base de sa tige lorsqu'elle est éclairée par la lumière. Nous avons identifié le gaz enfermé dans ces bulles (de l'oxygène qui stimule une flamme), puis nous avons déterminé quelle partie du spectre lumineux est active pour produire de l'oxygène. Nous avons ainsi été initié au processus de photosynthèse chez les plantes. Non seulement on admirait, mais on comprenait (un peu) ce qui se passait. Ainsi, les conférences de J. Monod et F. Gros sont tombées dans une oreille attentive, déjà éveillée à la biologie par une professeure pédagogue.

Ce sont les conférences que nous avons organisées en 1968 à Polytechnique qui ont éveillé mon intérêt pour la génétique, et c'est finalement cette discipline qui a été le point commun de toutes les recherches que j'ai

menées durant les quarante années de ma carrière scientifique. La génétique a ceci de particulier qu'elle permet d'analyser un processus biologique, par exemple la floraison ou la fixation de l'azote atmosphérique, sans avoir aucune connaissance de ses bases biochimiques. Avec son levier, Archimède était prêt à soulever le monde pourvu qu'on lui donne un point d'appui. Avec le levier que constitue le phénotypage de populations mutagenisées il est possible de répertorier (une partie importante) les gènes qui sont impliqués dans un processus. Les gènes sont identifiés par les pertes de fonction qu'ils occasionnent lorsqu'ils sont mutés. Ceci a été illustré de manière spectaculaire pour l'analyse de la segmentation chez la drosophile, et pour l'analyse de la structure de la fleur chez les plantes.

MES DÉBUTS DE CHERCHEUR : L'OUVERTURE DE LA GÉNÉTIQUE DE L'INRA À LA BIOLOGIE CELLULAIRE

L'INRA RECRUTE DES POLYTECHNICIENS « IGNARES EN BIOLOGIE »

Après mon stage au laboratoire d'Emmanuel Grison, Michel Gillois et Jean Croizé m'ont recontacté et convaincu de venir travailler à l'Inra. J'étais sensible aux arguments de Michel Gillois, très bon mathématicien, qui avait fait un travail important en génétique des animaux domestiques, permettant de calculer la consanguinité entre deux animaux de la même espèce. Il faut réduire au maximum cette consanguinité pour obtenir des animaux vigoureux et performants. Théorie et pratique servaient à améliorer l'élevage, ce qui me semblait un modèle de ce que je devrais faire.

Mais, Gillois avait un second domaine d'intérêt, celui de la génétique cellulaire. Il était convaincu que l'on pourrait avancer très vite en génétique en travaillant sur des cellules animales plutôt que sur des animaux entiers. Après les succès de la génétique bactérienne illustrés par le modèle de l'opéron lactose et la découverte de l'ADN support physique de l'hérédité, la communauté des biologistes moléculaire a commencé à réfléchir à la manière d'utiliser la génétique pour étudier des organismes pluricellulaires. Un obstacle important portait sur la fréquence des mutations. En bactériologie la fréquence de mutations spontanées pour un gène particulier était de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} , ce qui nécessite un millilitre de culture bactérienne pour être observé/étudié. Si la fréquence de mutation des gènes était du même ordre de grandeur chez des organismes pluricellulaires tels que la souris, il fallait maintenir des populations de 10 à 100 millions d'animaux pour faire de la génétique sur cette espèce, ce qui est colossal. Deux approches permettaient de contourner ce problème. D'abord, la mutagenèse chimique qui peut multiplier par mille la fréquence de mutations. Ensuite, les cultures de cellules isolées permettent de manipuler aisément des populations de 100 000 à 10 millions de cellules. Les deux approches combinées, associées à une technique de régénération d'organismes à partir de cellules permettaient potentiellement d'analyser la fonction des gènes, tout au moins ceux qui sont exprimés en culture de cellules.



Au laboratoire de génétique cellulaire à Castanet Tolosan, au milieu des années 1970, Michel Caboche (à droite) avec Claude Chevalet, Jeanine et Nathalie Andrezza, Ginette Giffard.

C'est cette démarche qui nous a guidé, moi et trois autres camarades de promotion, Philippe Mulsant, Michel Poize et Alain Gourves, pour rejoindre à Toulouse le laboratoire Inra de génétique cellulaire dirigé par Michel Gillois. Nous pensions que de nombreuses fonctions étaient exprimées en culture de cellules, en particulier l'arsenal des gènes nécessaires aux fonctions de ménage (ex : voies de synthèse des acides aminés). Reprenant l'idée de F. Jacob (ce qui est vrai pour la souris est vrai pour l'éléphant !), ce travail de génétique cellulaire était proche conceptuellement du travail de génétique bactérienne en pleine période de découverte.

Michel Gillois avait séduit Jacques Poly, alors chef du Département de génétique animale et qui deviendra dix ans après le grand patron de l'Inra, ce dernier soutenant sans état d'âme les projets de son poulain. Un laboratoire de génétique cellulaire fut créé à Jouy-en-Josas en 1968 et la direction de l'Inra, qui avait soutenu auparavant le recrutement de Jean Croizé puis celui de Claude Chevalet, renforça son soutien au laboratoire naissant en ouvrant quatre postes d'agents contractuels scientifiques (ACS) en septembre 1968 pour nous quatre venus de Polytechnique. Ceci souleva un certain émoi à l'Inra : quatre postes étaient ouverts pour recruter des polytechniciens « complètement ignares en biologie » selon un tract syndical du Syndicat Général de la Recherche Agronomique (CFDT). Mais, une fois recrutés par l'Inra en tant qu'ACS, Michel Gillois avait un sérieux problème à résoudre : nous installer dans un laboratoire ! En attendant de voir l'Inra construire le laboratoire à Toulouse, nous avons été logés dans une sorte de clapier sur le site du CNRZ à Jouy.

En ce qui me concerne, j'avais une motivation supplémentaire : issu du monde agricole, j'avais une dette morale à rembourser à ma famille qui m'avait soutenu dans mes études pour me voir finalement quitter la ferme natale et laisser mon père sans successeur pour conduire cette ferme. En entrant à l'Inra j'avais l'impression que je pourrais être utile au monde agricole tout en réalisant mon rêve de devenir chercheur.

L'APPROFONDISSEMENT DES CONNAISSANCES EN BIOLOGIE ET L'OUVERTURE AUX APPROCHES BIOCHIMIQUES

Durant l'année scolaire 1968-1969, j'ai suivi à l'Université d'Orsay, au pas de charge, des cours de biologie qui m'ont permis d'obtenir un certificat de maîtrise de biologie structurale et métabolique, ainsi qu'un certificat de biochimie physicochimique et macromoléculaire. Les cours de Jean Claude Patte et d'Hubert Clauser étaient remarquables, par contre, Edgard Lederer nous assénait des dizaines de structures de lipides divers et variés. Je relève ceci pour dire qu'un bon scientifique n'est pas toujours un bon enseignant ; en effet, sur deux cents élèves qui suivaient ses cours à la rentrée, une quinzaine tenaient le coup jusqu'au bout ! Ces certificats obtenus, nous avons tous quatre été promus, après concours, assistants de recherche à l'Inra pour travailler au laboratoire de génétique cellulaire de Michel Gillois.

En plus des cours suivis à Orsay, j'ai effectué un travail expérimental, non pas à Jouy-en-Josas, mais à l'Inra de Versailles dans le laboratoire de Jean Mossé, qui m'a ouvert aux approches biochimiques. Jacques Landry, excellent biochimiste, m'a appris à faire de la chromatographie des protéines du sang pour en purifier certaines, dont la fétuine. Gillois m'avait confié le soin de mettre au point des milieux de culture qui permettraient la multiplication de cellules bovines, et la fétuine était suspectée d'être un élément nutritif approprié pour les cultures. Landry travaillait avec Thérèse Moureaux pour identifier et séparer les protéines de réserve des graines.

Ce stage terminé j'ai préparé un DEA co-dirigé par Marianne Grunberg-Manago, John Michelson et Franeck Chapeville, tous trois figures de proue de la biologie moléculaire en marche à Paris. Encore me fallait-il trouver un laboratoire d'accueil pour faire ce travail de DEA.

LES VÉRITABLES DÉBUTS DE MA CARRIÈRE DE CHERCHEUR

Sur les recommandations de Chapeville, j'ai frappé à la porte du laboratoire de Guy Pétrissant installé à Jouy dans le bâtiment de physiologie de la lactation du CNRZ. Guy Pétrissant avait une carrière atypique. Après une décennie de vétérinaire dans la Creuse, il s'était présenté à l'Inra qui l'avait embauché. Il s'intéressait aux mécanismes de synthèse des protéines. C'était une figure. Il commençait sa journée par la lecture d'un classique, durant mon stage les mémoires du cardinal de Retz, dont il extrayait des passages les plus brillants qu'il recopiait sur un tableau accroché au mur du labo pour l'éducation du laboratoire. Son ironie était mordante à l'égard de ceux qui manquaient de rigueur scientifique. En collaboration avec Chapeville il avait purifié le tARN initiateur de la synthèse des protéines par les ribosomes et montré qu'il s'agissait d'une formyl-méthionine.



© Inra / Collection Caboche.

Michel Caboche avec, à sa droite Guy Pétrissant, qui l'accueille en 1970 pour son stage de DEA de biologie moléculaire (réalisé à l'Université Paris 6 Pierre et Marie Curie) au sein de son laboratoire Inra installé au Centre national de recherche zootechnique (CNRZ) de Jouy-en-Josas dans le bâtiment de physiologie de la lactation.

de jeunes chercheurs avec lequel ils analysent les publications de la nouvelle science que constitue la biologie moléculaire (ce que l'on appelle aujourd'hui un « Journal Club »). Qui sont leurs élèves ? Le groupe des six polytechniciens de Michel Gillois, ainsi que Pierre Boistard, Jean Dénarié, Jean Echalié, Jean Mossé, Georges Pelletier. Ce n'est que bien longtemps après que j'ai réalisé combien ce « Journal club » nous avait apporté en nous ouvrant aux travaux pionniers du moment.

MA THÈSE AU LABORATOIRE DE GÉNÉTIQUE CELLULAIRE DE TOULOUSE (SEPTEMBRE 1970-SEPTEMBRE 1977)

L'APPRENTISSAGE DE L'ERREUR SCIENTIFIQUE

Avec Landry et Pétrissant, j'ai acquis un peu plus de rigueur que je n'en avais naturellement et j'ai découvert à cette occasion ces amoureux du travail bien fait et de la belle ouvrage que sont les biochimistes ! Chapeville était ravi de mon stage et il s'est évertué à me convaincre de venir faire ma thèse à l'Université Pierre et Marie Curie. De son côté, Gillois m'offrait l'accès à un laboratoire flambant neuf à Toulouse dans la belle région Midi-Pyrénées, assez près de la montagne et des rivières souterraines pour me convaincre.

Mon DEA en poche, je suis parti à l'Inra de Toulouse, malgré les avertissements de Chapeville, avec Claude Chevalet, Philippe Mulsant et Geneviève Echard. Marie-Claude avec qui je m'étais marié en Juillet, deux mois avant notre déménagement, avait été embauchée, elle aussi, dans le laboratoire (elle a travaillé avec Geneviève Echard).

L'idée de Michel Gillois était simple : faire de la génétique sur cellules somatiques haploïdes (l'intérêt étant de repérer chez les haploïdes les mutations récessives dont les effets phénotypiques sont invisibles à l'état hétérozygote) et repasser au stade diploïde pour constituer ainsi un cycle parasexuel. Cette idée était empruntée aux travaux de Jean Nitsch et ses collaborateurs (Jean Pierre Bourgin), qui avaient mis au point l'haplo-diploïdisation chez le tabac (génération de plantes haploïdes par culture d'anthères). Pour mener à bien le projet il fallait disposer d'une technique d'haploïdisation efficace sur cellules animales. Michel Gillois et Geneviève Echard avaient observé, disaient-ils, des mitoses haploïdes consécutivement à un traitement de cultures de cellules de bovins par une molécule apparentée à un acide aminé, la para-fluoro-phenylalanine (PFP). Les travaux avaient été publiés dans les compte-rendus de l'Académie des Sciences, ce qui me faisait penser qu'ils étaient pertinents. J'ai donc commencé à cultiver des cellules animales dans la perspective d'isoler des mutants à partir de cellules normales ou haploïdes, en m'évertuant à obtenir des conditions de prolifération cellulaire à faible densité pour faciliter l'isolement de ces mutants, sans besoin de « conditionnement » des milieux de culture.

Juste avant notre départ à Toulouse, Michel Gillois a été invité à donner une conférence dans le laboratoire du CNRS de Boris Ephrussi et Mary Weiss au Centre de génétique moléculaire de Gif-sur-Yvette. Boris

Ephrussi, GW Beadle et E. Tatum avaient démontré la relation un gène/une enzyme dans les années 1930 et 1940. Michel Gillois pensait que cette conférence allait consacrer ses travaux. En fait ce fut un fiasco : l'équipe d'Ephrussi a quitté la salle de conférence sans poser une seule question, en signe de réprobation après la présentation orale que Michel Gillois a fait de ses recherches.

Quelques mois après cette visite à Gif, notre laboratoire déménageait à Toulouse. Michel Gillois avait vu grand pour créer un laboratoire de génétique cellulaire. Une aile était constituée d'équipements importants (une énorme chaudière pour produire de la vapeur pour les autoclaves, un équipement de conditionnement d'air...) et une salle de travail comportant une vingtaine de postes de travail. Il y avait aussi un labo de cytologie et deux labos de biochimie. Arrivé à Toulouse, j'ai repris les lames utilisées par Michel Gillois et Geneviève Echarde, et j'ai observé au microscope les cellules préalablement traitées à la PFP, une molécule apparentée à un acide aminé qui était sensée, d'après des observations préliminaires induire des mitoses haploïdes. J'ai repéré des mitoses incomplètes (n chromosomes pris au hasard) mais pas de mitoses haploïdes (n chromosomes, un de chaque type). Ces mitoses incomplètes résultaient probablement des chocs osmotiques qui sont effectués pour « étaler » les chromosomes en métaphase. Les lignées haploïdes n'existaient pas. Mon sujet de thèse débutait bien mal !

Le climat se tendait entre moi et Gillois pour des questions scientifiques (la désapprobation de Boris Ephrussi tournait dans ma tête). Elles se dégradaient aussi car il se sentait perdre le contrôle du laboratoire, le personnel interagissant directement avec nous pour le règlement des problèmes (nous étions tous très jeunes).

LE DÉVELOPPEMENT DE LA GÉNÉTIQUE SUR LES CELLULES ANIMALES

Malgré cela, je persistais dans l'effort de faire de la génétique sur des cellules animales. Une difficulté cependant : les cellules animales cultivées *in vitro* gardent la « mémoire » du tissu dont elles sont dérivées. Par exemple, les cellules de rein de hamster syrien gardent la capacité de fabriquer de la méthionine à partir de l'homocystéine comme le tissu de rein dont elles proviennent. Par contre les cellules épithéliales ainsi que les cultures cellulaires qui en dérivent n'ont pas cette capacité. Et pourtant leur ADN est identique. Il y a donc une différence de phénotype entre ces deux types cellulaires dont la cause n'est pas une mutation, mais une régulation différente maintenue à long terme au cours de la culture de ces cellules. Ces différences sont dites épi-génétiques, et leur existence a été attribuée à une structuration différente de l'emballage de l'ADN, par la chromatine, dans les chromosomes. Ces mécanismes épigénétiques étaient pour l'essentiel encore inconnus à cette époque. La génétique des bactéries déjà bien développée dans les années soixante-dix avait montré, par ailleurs, que des mutations affectant un gène codant pour une enzyme de synthèse d'un acide aminé provoquent des auxotrophies. Par exemple, des mutations affectant la voie de synthèse de la méthionine pouvaient rendre la bactérie auxotrophe pour cet acide aminé, c'est-à-dire incapable de se multiplier sans méthionine dans le milieu de culture. Mais, comment distinguer une mutation d'une modification épigénétique ? Je m'étais dit que le traitement de cultures de cellules avec des agents mutagènes qui modifient l'ADN sélectivement devraient accroître la fréquence de mutations par rapport aux cultures non mutagénisées, alors que des processus épigénétiques ne devraient pas être modifiés par traitement mutagène. J'ai donc mis au point une méthode d'obtention de mutations à très faible fréquence qui devrait permettre de distinguer les deux types d'événements.

Sur la base de mes premiers résultats, je décidais d'aller trouver Gérard Buttin à l'institut Pasteur pour me conseiller dans la poursuite de mon travail de thèse. Il a accepté de me rencontrer une demi-journée par trimestre pour faire le point sur mon travail, tout en laissant Michel Gillois rester mon patron de thèse officiel. J'ai pu ainsi continuer ma recherche et préserver mes relations avec Michel Gillois. Au cours de cette seconde partie de mon travail, j'ai développé de fructueuses relations avec Jean-Pierre Bachellerie, François Amalric et Jacques Hatzfeld, avec le soutien enthousiaste de leur patron, le Professeur Jean-Pierre Zalta de l'Université Paul Sabatier à Toulouse. Zalta était un pionnier de la biologie moléculaire. Il manipulait les produits radioactifs de manière peu recommandable (c'est en tout cas ce que j'ai découvert quand j'ai suivi une formation à la manipulation de la radioactivité à l'institut national des sciences et techniques nucléaires (INSTN) du Commissariat à l'énergie atomique (CEA). Ultérieurement, j'ai aussi collaboré avec Claude Labonardière qui était dans l'équipe d'Alain Paraf de l'INA Paris-Grignon. Que ce soit à Toulouse chez Zalta ou à Grignon chez Paraf, il y avait une vie scientifique joyeuse et motivante entretenue par ces deux patrons de laboratoire.

Zalta, à qui je m'étais ouvert de mes relations difficiles avec Gillois, m'avait dit que c'était pour moi une chance et une excellente formation, car ceci m'avait obligé à faire face et à prendre mon indépendance scientifique ! Voir le côté positif des choses, ne pas se replier sur ses déboires, voilà deux conseils qui m'ont servi en de nombreuses circonstances.

Finalement, j'ai soutenu ma thèse en 1977 avec Gillois et Buttin dans mon jury ! Mais pour des raisons évidentes, ni l'un ni l'autre n'ont cosigné mes publications. Je dois beaucoup à Gérard Buttin, qui m'a évité le naufrage en cours de thèse. Il a cru en ma bonne foi et il a apaisé ce qui aurait pu devenir l'occasion de querelles répétées avec Michel Gillois. De cette période sont aussi nées plusieurs amitiés durables avec J. P. Bachellerie, C. Chevalet, P. Mulsant, et C. Labonnardière en particulier.

Que conclure de ce travail de thèse ? J'ai appris à induire des mutations dans des cultures de cellules somatiques et à isoler certaines classes de mutants caractérisables par des travaux de biochimie. Même si on ne pouvait pas développer un cycle parasexuel, on pouvait isoler des mutants de cellules somatiques diploïdes. Restait cependant une certaine frustration. La publication de travaux de génétique de cellules somatiques était souvent critiquée : êtes vous certain que vous avez obtenu des mutations, et pas simplement des variations somaclonales de nature épigénétique ? Pour être levé, ce doute au sujet des cellules somatiques nécessitait l'usage d'outils moléculaires. En 1975, la recherche de mutations dans les gènes en était encore à ses débuts et son emploi restreint à l'étude des bactéries.

DE TOULOUSE À VERSAILLES : DE LA GÉNÉTIQUE CELLULAIRE ANIMALE À LA BIOLOGIE CELLULAIRE VÉGÉTALE

LE CHOIX DU DOMAINE VÉGÉTAL ET DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE CELLULAIRE (LBC)

Dans le cadre des séminaires bibliographiques organisés par Gillois et Demarly, nos collègues végétalistes nous montraient des travaux de régénération de plantes à partir de tissus, travaux qui nous faisaient rêver. La génétique sur des cellules animales se révélait à la fois captivante et frustrante : on ne pouvait pas régénérer ces cellules en animaux viables. Il était, et est encore, impossible d'obtenir un animal à partir d'une cellule. Et à l'époque, on ne disposait pas des outils moléculaires que l'on a maintenant pour contourner cette limitation. Au contraire régénérer une plante à partir d'une cellule végétale isolée était possible pour certaines espèces comme le tabac. J'ai pensé qu'il y avait plus de perspectives à travailler dans le domaine végétal où il est possible de faire de la génétique aussi bien sur cellule isolée que sur plante entière grâce au processus de régénération. Grâce à la régénération on pourrait effectuer une analyse génétique de la base d'une variation de phénotype exprimée au niveau cellulaire. Une autre grande nouvelle était que l'on pouvait fusionner deux cellules végétales de deux espèces différentes et régénérer des plantes hybrides.

Régénérer, fusionner, c'était un savoir faire existant à Versailles, dans ce qui restait du laboratoire créé par Georges Morel, emporté par une crise cardiaque en 1974. Georges Morel restera une grande figure de la recherche sur les cellules végétales. On lui doit la mise au point de cultures de méristèmes permettant



© Inra.

Georges Morel entre le professeur Edward Cocking de l'université de Nottingham (inventeur des protoplastes de plantes), et le professeur Oluf Gamborg de Saskatoon (Canada), en septembre 1972, sortant d'un restaurant à Versailles, lors du 1^{er} colloque international « Protoplastes et fusion cellulaire », présidé par Georges Morel, et organisé avec Jacques Tempé du CNRS.

d'éliminer les viroses dans les espèces multipliées par voie végétative, ainsi que la mise au point de techniques de multiplication des orchidées in vitro. On lui doit aussi le concept de transfert d'information génétique des bactéries de type *Agrobacterium* aux plantes qui sont leur cible, aboutissant à la formation de tumeurs appelées « crown gall ». Morel a eu l'intuition que les opines, qui sont des molécules marqueurs de ces tumeurs seraient révélatrices du transfert de gènes d'*Agrobacterium* à la cellule végétale. La réalité de ce transfert sera à la base de la production de plantes génétiquement modifiées, les fameux OGM.

Yves Chupeau et Jean-Pierre Bourgin, héritiers spirituels de Georges Morel, essayaient de survivre au traumatisme de son décès. Ils souhaitaient se séparer du laboratoire de Jacques Tempé. Ils ont initié le laboratoire de biologie cellulaire (LBC) avec deux autres scientifiques, Jacques Tourneur et Dominique Expert. En 1977, le LBC comprenait ces quatre scientifiques (Bourgin, Chupeau, Expert et Tourneur) et co-existait avec le laboratoire rival de Jacques Tempé. Jacques Tempé, au même titre que Yves Chupeau, était un héritier spirituel de Morel avec qui il avait découvert les opines, molécules synthétisées par les tumeurs de crown gall au bénéfice de l'*Agrobactérie* qui induit ces tumeurs et s'en nourrit (Jacques se plaisait à dire que la transformation par *Agrobacterium* est une colonisation génétique naturelle). Cependant, pas de communication entre les deux laboratoires, sauf pour des querelles de place. Consécutivement au décès de Georges Morel en 1974, les collègues du bâtiment auraient souhaité voir fermer le laboratoire de Bourgin et Chupeau. Malgré les démarches de Jacques Mossé en ce sens et après diverses péripéties, la direction de l'Inra ne l'a pas suivi, a nommé Jean-Pierre Bourgin directeur du LBC (à la suite de Gérard Comtesse nommé précédemment). Ainsi, sous la direction de Bourgin et Chupeau, grand intendant du petit royaume LBC, le laboratoire est devenu une terre de liberté où se sont retrouvés d'autres scientifiques qui vivaient mal là où ils avaient été affectés, venant d'autres départements de recherche que le département de Physiologie végétale auquel était rattaché le LBC. Ceux qui ont rejoint le LBC voyaient s'ouvrir de nouvelles perspectives pour développer des champs de recherche que, pour des raisons diverses, ils ne pouvaient mettre en œuvre ailleurs dans l'Inra. J'ai été le premier à frapper à la porte en 1977 et j'ai été bien reçu. Yves et Jean-Pierre m'ont accueilli à bras ouverts. Bourgin avait comme interlocuteurs le chef du département de physiologie végétale, à l'époque Claude Martin à l'Inra de Dijon, et le directeur scientifique des productions végétales, Jean Marrou.

Ma migration à Versailles a fait l'objet de discussions animées au département de Génétique animale. Bertrand Vissac qui le dirigeait voulait me garder à Toulouse et menaçait de freiner mon avancement si je n'obéissais pas. Après une discussion, arrosée d'un plein verre de whisky, avec Jacques Poly, vieux comparse et ami de Vissac, j'ai finalement été autorisé à rejoindre Versailles.



© Inra / Jean Weber

Jean-Pierre Bourgin, dans les années 1980, dans l'amphithéâtre du centre Inra de Versailles à l'occasion d'une journée consacrée à la présentation des travaux scientifiques des laboratoires de recherches du centre.

PARTICIPER À LA DYNAMIQUE SCIENTIFIQUE DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE CELLULAIRE

Y. Chupeau et J.-P. Bourgin avaient déjà, l'un et l'autre, acquis une réputation internationale. Yves, qui avait travaillé avec Georges Morel, avait obtenu les premiers hybrides somatiques issus de la fusion de protoplastes de deux espèces différentes, aboutissant ainsi à la création de tabacs hybrides synthétiques. Quant à Jean-Pierre, lors de son diplôme d'étude approfondie (DEA) chez Jean Nitsch, il avait mis au point une technique d'obtention de plantes haploïdes à partir de cultures d'anthers de tabac. Haploïdiser une plante permettait d'en dévoiler les caractères récessifs éventuellement indésirables et la sélection d'haploïdes performants permettait, ensuite, la construction de génotypes « élites » par haploïdisation suivie d'une diploïdisation.

Jean-Pierre partageait mon intérêt pour la génétique cellulaire. D'une manière parallèle à la mienne sur cellules animales, il avait mis au point un crible sélectif (résistance à la valine) qui lui avait permis d'isoler, à partir de cultures de *N. plumbaginifolia* haploïdes, des colonies de cellules résistantes à cet acide aminé. La régénération de plantes à partir de ces colonies a permis de faire une analyse génétique des phénotypes de résistance à la valine. Ce travail démontrait qu'il était possible de faire des travaux de génétique cellulaire sur une plante de manière analogue aux travaux de génétique bactérienne.

Il y avait cependant une difficulté technique à résoudre pour permettre ces travaux : pour sélectionner une colonie mutante dans une culture de cellules, il faut que cette colonie puisse se développer sans la coopération



Michel Caboche en 1977, au laboratoire de biologie cellulaire, s'initie à la préparation de protoplastes.

© Inra.

des cellules voisines (conditionnement du milieu). Dans le règne animal des milieux permettant la croissance clonale, croissance d'une cellule isolée, et non d'un amas de cellules, avaient été mis au point. Il restait à faire la même chose pour les cultures de cellules végétales, tâche sur laquelle je me suis concentré.

J'ai eu la grosse surprise de constater que les milieux de culture établis pour cultiver des cellules végétales étaient en fait toxiques pour ces cellules cultivées à faible densité ($\text{ex} \leq 100$ cellules/ml). Cette toxicité est due à la présence d'auxine à forte concentration dans les milieux de culture usuels. J'ai pu montrer que l'emploi d'acide naphthalène acétique, une auxine synthétique et stable dans les milieux de culture à des concentrations micromolaires permet la croissance clonale des cellules mutantes. Ce résultat s'est par la suite révélé très utile pour préciser les facteurs qui contribuent à la régénération de tissus.

Ce petit travail montre que la notion de croissance clonale, qui était perçue comme importante par les chercheurs travaillant sur les cellules somatiques animales, peut l'être également pour les cellules végétales, alors que la question n'était même pas posée. Cela illustre une situation fréquente, à savoir que lorsque l'on change de domaine de recherche on peut apporter un regard neuf sur certains aspects.

Le bilan de mes deux premières années passées à Versailles, en 1978 et 1979, a été très positif. Je m'étais initié aux techniques de biologie cellulaire végétale et en particulier de régénération de plantes à partir de colonies cellulaires. Les travaux que Bourgin menait sur la résistance à la valine m'avaient convaincu de la possibilité de faire de la génétique cellulaire sur cellules végétales, en employant *N. plumbaginifolia* comme matériel d'étude. Il y avait cependant une pierre qui manquait à l'édifice. Je souhaitais pouvoir analyser les mutants issus de cribles cellulaires avec les outils de la biologie moléculaire. Il me semblait nécessaire de comparer les processus de mutations opérant au niveau plante entière avec les processus de mutations opérant in vitro en cultures de cellules afin de pouvoir répondre à la question de l'existence possible de processus de mutation spécifiques en conditions in vitro.

L'accès aux gènes permettrait d'étudier ce qui se passe, mais en 1979 ce n'était pas trivial de cloner un gène de plante et de l'étudier in vitro. Aux Etats-Unis, par exemple, les connaissances moléculaires en biologie végétale étaient encore réduites. Dans le laboratoire pionnier de Laurence Bogorad, John Bedbrook avait commencé à caractériser le génome chloroplastique des plantes en 1977 et cloné par un ADNc de la petite sous unité de la Rubisco en 1980. En France, la seule équipe qui s'efforçait de cloner et étudier des gènes de plantes était l'équipe de Jacqueline Fleck du laboratoire de virologie de Léon Hirt à l'Institut de biologie moléculaire des plantes (IBMP) du CNRS à Strasbourg qui étudiait elle aussi le gène de la Rubisco du tabac. Je me suis résolu à faire un stage postdoctoral qui me permettrait d'acquérir un savoir faire en biologie moléculaire. Je décidais donc de partir aux Etats-Unis.

POST DOCTORAT AUX ETATS-UNIS : APPRENDRE LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

En Septembre 1979, j'ai quitté Versailles pour rejoindre le laboratoire de Karl Gordon Lark à l'Université d'Utah à Salt Lake City. Cette université visait l'excellence en essayant de recruter les meilleurs scientifiques. Ainsi, dans le bâtiment de biologie où je travaillais se trouvait le laboratoire de Ray Gesteland, ancien directeur adjoint de Cold Spring Harbor Laboratory, financé par la prestigieuse fondation Howard Hughes ainsi que les laboratoires réputés de Bruno Oliveira et John Roth. Le laboratoire de Gordon m'avait attiré. Gordon avait fait des travaux de premier plan sur la réplication de l'ADN chez *E. Coli* et sa régulation par la disponibilité des nutriments. Dans son laboratoire, il y avait plusieurs équipes travaillant sur ce thème et une nouvelle équipe étudiait la réplication de l'ADN dans des cellules végétales. De ce fait, les techniques de biologie moléculaire mises au point sur les bactéries pouvaient être utilisées pour les travaux sur les plantes. Gordon de son côté était intéressé par mes « fraîches » connaissances en biologie cellulaire végétale. À mon arrivée nous avons eu d'emblée une discussion serrée. Gordon me voyait dans le laboratoire comme le biologiste cellulaire de service mais, de mon côté, je voulais apprendre les nouvelles techniques de biologie moléculaire. Il a accepté que je fasse du moléculaire quand j'ai fait valoir le fait que mon financement postdoctoral était assuré par l'Inra et que si nécessaire je pourrais avec mon salaire aller travailler dans un autre laboratoire du bâtiment, celui de Ray Gesteland. Finalement, Gordon a été content de me garder comme biologiste moléculaire débutant dans son laboratoire. L'ambiance du labo était unique. Nous étions trois postdocs, Gerd Weber venu d'Allemagne, Ruth Roman, mexicaine et moi. En janvier 1980, l'équipe s'est élargie avec l'arrivée de trois postdocs chinois.

Dans le laboratoire de K.G. Lark, j'ai surtout collaboré avec Ruth Roman. Pour elle, la réussite de sa recherche conditionnait l'obtention d'un poste d'enseignant chercheur à l'Université de Mexico, situation bien différente de la mienne déjà sur poste Inra. Pour étudier la réplication de l'ADN dans des cellules végétales, il nous

fallait extraire cet ADN après incorporation de bases nucléotidiques marquées et l'analyser. Extraire l'ADN de cellules végétales cultivées en suspension n'est pas aisé car ces cellules sont très difficiles à casser. Pour des raisons de facilité d'extraction de l'ADN, nous avons donc choisi de travailler avec des noyaux de cellules de soja que Ruth m'a appris à purifier à partir de préparation de protoplastes. Ces noyaux étaient incubés avec des bases nucléotidiques marquées (au ^{32}P ou au tritium) durant une période assez courte (30 min).

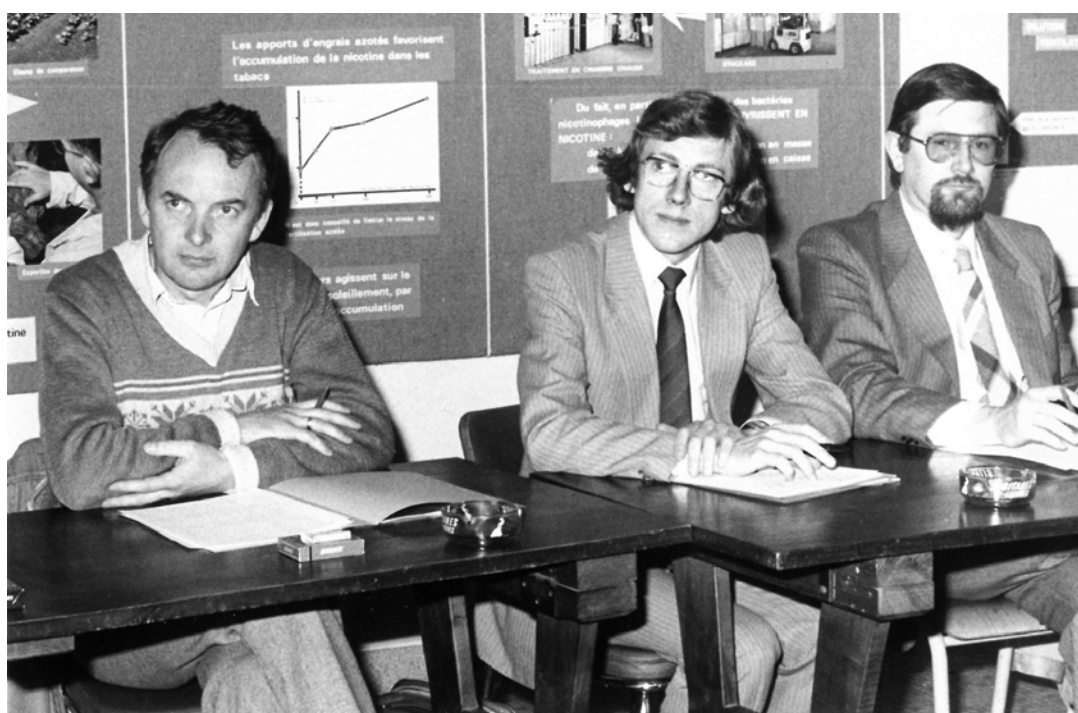
De ce travail nous avons conclu que plusieurs mécanismes de réplication sont à l'œuvre lorsqu'une cellule végétale réplique son ADN. Ces résultats nouveaux ont été publiés dans les Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) et bien accueillis. Malheureusement, ce modèle d'étude (cellules de soja en culture) n'était pas adapté à une analyse génétique (les cellules de soja cultivées in vitro ne peuvent pas être régénérées en plantes viables, de plus elles ont un génome complexe issu d'une tétraploïdisation récente). Bien que les cultures en suspension de cellules de soja se soient révélées adaptées à des approches biochimiques, ce modèle expérimental n'était pas idéal. Outre leur génome complexe, elles ne constituent donc pas un modèle d'étude adapté à une analyse génétique. Tout au long de ma carrière scientifique, j'ai appris à anticiper les avantages et les difficultés qui résultent du choix d'un modèle expérimental.

LE RETOUR EN FRANCE : IMPORTER LES COMPÉTENCES EN BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

A mon retour des Etats-Unis, en 1980, j'ai rejoint la petite équipe de Bourgin et Chupeau qui m'avait accueilli trois ans plus tôt, apportant des compétences nouvelles en biologie moléculaire, attestées par la présence du « Maniatis » livre de chevet des biologistes moléculaires dans ma petite bibliothèque. Mais que faire muni de ces connaissances nouvelles ? Jean-Pierre continuait son projet de génétique cellulaire sur la résistance à la valine. Une nouvelle recrue, Annie Marion-Poll est venue en thèse avec Jean-Pierre et j'ai d'abord suivi son travail avec lui. Après mûre réflexion, je me suis décidé à étudier la voie d'assimilation du nitrate, fonction essentielle dans le règne végétal. J'avais été le spectateur d'un thésard malchanceux du laboratoire de Ray Gesteland, qui étudiait sans grand succès l'assimilation du nitrate dans des cellules de soja que K. G. Lark lui avait passé. Je pouvais faire mieux !

La réalisation de ce projet devait s'étaler sur une période de quelques huit années, il a impliqué le recrutement de plusieurs chercheurs au laboratoire et engendré de nombreuses collaborations. Bien que cette aventure ne se soit pas déroulée de manière linéaire, trois phases distinctes peuvent être distinguées : l'isolement et la caractérisation de mutants nitrate réductase chez *Nicotiana plumbaginifolia* ; le clonage du gène de la nitrate réductase (Nia) chez la même espèce ; et l'étude de la régulation du gène Nia chez *Nicotiana plumbaginifolia* et la tomate.

137



A l'Institut du Tabac de Bergerac au début des années 1980, réunion scientifique avec la SEITA, Michel Caboche avec, à sa gauche, un étudiant et René Delon Directeur de l'Institut de Bergerac.

ETUDE DU MÉTABOLISME AZOTÉ CHEZ *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA* : ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE MUTANTS NITRATE RÉDUCTASE DÉFICIENTS

Le modèle d'étude *Nicotiana plumbaginifolia* mis au point par Jean-Pierre me semblait idéal pour lancer un projet d'étude du métabolisme azoté. Avec l'aide de Annie Marion-Poll, nous avons rapidement mis au point un crible de sélection de colonies cellulaires résistantes au chlorate dérivées de protoplastes haploïdes de *N. plumbaginifolia*. Ce crible était conçu pour permettre la croissance clonale des colonies survivant à l'application du chlorate. Cette résistance au chlorate résultait de l'absence d'activité nitrate reductase, enzyme qui convertit le chlorate en chlorite, une molécule qui détruit les chloroplastes et tue les cellules. Les colonies résistantes au chlorate étaient testées sur trois milieux différents : le milieu sélectif contenant du chlorate ; un milieu de culture contenant du nitrate comme seule source azotée ; un milieu de culture témoin contenant de l'azote réduit (succinate d'ammonium). La résistance au chlorate se révélait associée à l'incapacité d'utiliser le nitrate tout en gardant l'aptitude à utiliser l'ammonium. Les colonies résistantes pouvaient être régénérées sur le milieu contenant du succinate d'ammonium.

Les plantes ainsi régénérées à partir de colonies résistantes au chlorate ne peuvent pas se développer sur leurs propres racines, même en présence d'ammonium. Restait à faire leur analyse génétique. Nous avons dû utiliser un subterfuge pour passer ces plantes résistantes au chlorate en serre et les faire fleurir, condition indispensable pour des études génétiques. Elles ne se développaient pas sur leurs racines, même en présence d'ammonium et nous avons dû greffer ces plantes sur des porte greffes de *N. tabacum*. Jacques Goujaud, technicien de serre remarquable, a apporté une aide précieuse en effectuant des dizaines de greffes nécessaires à ces travaux. De cette manière il était possible d'obtenir des rameaux fleuris à partir des greffes et d'être certains que ce ne sont pas des rejets du porte greffe qui ont poussé. L'analyse des autofécondations et des fécondations croisées par *N. plumbaginifolia* « sauvage » a montré que les plantes chlorate résistantes transmettent l'incapacité à utiliser le nitrate dans leur descendance comme un marqueur génétique récessif. Les graines chlorate résistantes semées sur nitrate seul développent des plantules albinos, ce qui indique un étroit couplage entre photosynthèse et assimilation du nitrate. Un grand nombre de mutants ont été obtenus et caractérisés.

Jérôme Gabard et Frédérique Pelsy ont croisé deux à deux ces divers mutants pour établir les groupes de complémentation. S'ils sont affectés sur le même gène les graines issues des croisements seront, comme les parents, incapables de pousser sur nitrate. Ainsi nous avons constitué sept groupes de complémentation

différents dont la nature biochimique restait à préciser. Un criblage supplémentaire de mutants dans une population M2 de graines mutagénisées de *N. Plumbaginifolia* a permis de compléter cette collection. Les mutants étaient sélectionnés sur la base d'un phénotype chlorotique sur nitrate, supprimé par transfert sur succinate d'ammonium. Plus tard, un criblage de même type a permis d'isoler des mutants NR-de tomate.

Thérèse Moureaux et Chistian Meyer ont mis au point les dosages de l'activité nitrate reductase (NR) et leurs analyses biochimiques ont montré que tous les mutants étaient, comme attendus, déficients pour l'activité NR. Comment expliquer un tel résultat ? En fait, pour être fonctionnelle, la NR doit comporter un cofacteur dans sa structure, cofacteur qui intervient dans la réaction catalysée par la NR. Ce cofacteur appelé MoCo comporte un atome de molybdène qui joue un rôle clef dans la réduction du nitrate en nitrite par la NR. Ce MoCo est aussi nécessaire à d'autres enzymes (Ex : l'ABA aldehyde oxydase intervenant dans la synthèse de l'acide abscissique). De ce fait, les mutants de MoCo sont à la fois déficients pour la NR mais aussi pour la synthèse d'ABA, ce qui les rend hypersensibles à la déshydratation (l'ABA contrôle la fermeture des stomates des feuilles lorsqu'elles manquent d'eau) et difficiles à cultiver en serre même greffés. Six gènes différents interviennent dans la voie de biosynthèse du MoCo.

Les travaux récents de Ralph Mendel ont permis d'élucider la fonction biochimique précise de ces gènes. Nous sommes entrés en contact avec Andreas Muller et Ralph Mendel lorsque nous avons caractérisé nos premiers mutants NR car nous savions qu'Andreas Muller avait obtenu un (double) mutant NR de tabac.

Andreas Muller et Ralph Mendel travaillaient en Allemagne de l'Est, à Gatersleben, et je leur ai rendu visite pour échanger nos expériences et nos graines de mutants ! Ils ne pouvaient pas venir en Europe de l'Ouest et nos

Travail de greffage permettant d'étudier les mutants déficients pour la nitrate réductase (NR), réalisé en serre par Jacques Goujaud sur le site de l'Inra de Versailles, dans les années 1990.



© Inra / Jean Weber



© Inra.

visites étaient un grand événement pour eux comme pour nous. Andreas avait pris le risque de continuer à faire de la génétique, science interdite dans le bloc de l'est où les idées de Lyssenko régnaient encore en 1982. Pionnier de la génétique d'*Arabidopsis*, Andreas parlant de mutant disait avec un fort accent allemand « one is no one », ce qui veut dire que la sagesse du généticien est de ne caractériser un gène que si on dispose de deux mutants différents affectés dans ce même gène. Il peut se révéler que certains mutants soient de structure très complexe (ex : délétions, translocations, etc...) et difficiles à analyser.

Une des observations intrigantes du travail d'analyse génétique était la présence de phénomènes de complémentation intragénique au locus du gène de structure de la NR (*Nia*). Les travaux de biochimie et d'immunochimie développés au sein de notre équipe par Pierre Rouzé et sa thésarde Isabelle Cherel ont permis d'expliquer ce phénomène. Pierre, en association avec Jeanne Grosclaude, avait utilisé des préparations de NR de maïs purifiées pour obtenir des anticorps monoclonaux reconnaissant différents domaines de cette enzyme (appelés épitopes). Un des monoclonaux avait la propriété d'abolir la réaction catalysée par la NR (conversion du nitrate en nitrite). En présence de ce monoclonal, l'enzyme restait cependant capable d'effectuer des réactions d'oxydoréduction de substrats synthétiques. Nous avons pu analyser les fonctions conservées dans les NR de différents mutants, et montrer que la structure chimérique de la NR lui permet de reconstituer une chaîne complète de transfert d'électrons à partir de deux mutants affectés dans deux domaines catalytiques différents. Ainsi, une cascade de transfert d'électrons complète est reconstituée en faisant passer les électrons d'une sous unité de l'enzyme à l'autre. Ce résultat illustre la puissance de l'outil génétique pour analyser une réaction catalytique complexe.

À gauche : pot à la bibliothèque de physiologie végétale à Versailles, bâtiment 2. Sur la table, des plants de *Nicotiana plumbaginifolia*. De gauche à droite, Pierre Rouzé, Marie France Dorbe, Michel Caboche, Francisco Pinto, Claire Zehnacker, Pierre Carol, Isabelle Cherel.

À droite : bibliothèque de physiologie végétale à Versailles, bâtiment 2. De gauche à droite, Pierre Rouzé, Michel Caboche, Jacques Tourneur et Claire Zehnacker.



Jean-François Morot-Gaudry, du laboratoire Métabolisme et nutrition des plantes, avec Michel Caboche, lors de l'inauguration, en 1988, de nouveaux laboratoires au 2^{ème} étage du bâtiment B au centre Inra de Versailles.

ETUDE DU MÉTABOLISME AZOTÉ CHEZ *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA* : CLONAGE DU GÈNE NIA, DE LA NITRATE RÉDUCTASE

Parallèlement à ces travaux de biochimie, j'ai initié avec Bernard Commère un travail de biologie moléculaire visant à cloner le gène de la nitrate reductase. Bernard avait appris à purifier des ARN messagers par immunoprécipitation dans le laboratoire de Claude Gigot à l'IBMP à Strasbourg. Pour réaliser cette expérience, il nous fallait disposer d'un anticorps dirigé contre la NR. Pierre Rouzé, Isabelle Cherel et Thérèse Moureaux nous ont apporté les anticorps dont nous avions besoin. Bien que disposant des anticorps nécessaires à la purification de ribosomes engagés dans la synthèse de NR, l'entreprise s'est révélée délicate du fait du peu d'abondance du transcrite de la NR dans les tissus de tabac. Par contre, cette approche s'est révélée fructueuse pour cloner la glutamate synthase et la glutamine synthétase.

J'ai changé de stratégie pour la NR. Aux Etats-Unis, Ron Davis avait développé un système de clonage de gènes basé sur l'emploi de λ gt11, un vecteur d'expression phagique. Ce système de clonage dans un vecteur phagique était beaucoup plus performant que les vecteurs plasmidiques usuellement utilisés. Ce vecteur comporte un site de clonage dans lequel un fragment d'ADNc peut être inséré. Cet insert sera transcrit et traduit au cours d'un cycle d'infection du phage. Le site de clonage peut être utilisé pour cloner une préparation d'ADNc totaux (mélange de nombreux ADNc), chaque phage recombinant donnant lieu à une plaque dans laquelle un ADNc particulier est exprimé.

Disposant d'un anticorps dirigé contre une protéine d'intérêt particulière il devient possible, par immunochimie, de déceler avec l'anticorps le phage recombinant qui exprime cette protéine, et d'en extraire l'ADNc qui code pour la protéine étudiée. J'ai été me former dans un laboratoire du CEA, chez André Sentenac qui depuis peu avait utilisé cet outil chez la levure, et j'ai rapporté le savoir-faire à Versailles. Pour m'aider, un postdoc américain, Roger Calza est venu dans notre équipe grâce au soutien financier de l'Inra. Roger venait d'Idaho et considérait sa venue en France comme une aventure à gros risques (dans le dictionnaire français-anglais qu'il avait emporté, il n'avait pas trouvé la traduction de « tooth paste » en Français, il était donc venu avec un stock de dentifrice d'une année, convaincu de l'absence de ce produit en France). Roger avait l'expérience de purification d'ARN messagers et de production d'ADN complémentaires. Son expérience nous a été très utile.

Eric Huttner, un jeune thésard est venu compléter notre petite équipe, ainsi que Jocelyne Kronenberger dont les qualités d'ingénieur ne se sont jamais démenties. Tous deux ont appris à utiliser le vecteur d'expression et à gérer la partie microbiologique du projet. En six mois nous avons réussi à mettre la main sur un phage recombinant exprimant un morceau de la NR. La fréquence de ce type de clones dans la banque était faible, de 1/3000. Le choix de la stratégie s'est donc révélé primordial. À ce stade du projet, Eric Huttner et Roger Calza faisaient la course à qui serait le premier pour le succès ! Cependant, ils n'étaient pas seuls à devoir être remerciés car la qualité des anticorps employés a été déterminante dans la réussite du projet. Finalement, c'est à Michel Vincentz que le séquençage des inserts des clones recombinants a été confié. En association avec Pierre Rouzé, il a décelé dans la séquence des clones analysés la présence d'une séquence de cytochrome b5 et de cytochrome b5 reductase, signatures attendues dans la séquence de la NR. Ce travail clef de notre équipe a été publié dans *Molecular Genetics and Genomics* (MGG), en 1987, c'est-à-dire six années après le démarrage du projet, et quelque mois après l'équipe de Howard Goodman (du Boston General Hospital), avec laquelle nous étions en concurrence. Contrairement à cette équipe, nous avions une importante ressource génétique et biochimique à exploiter par la suite, et le laboratoire est ainsi devenu mondialement reconnu pour ses travaux sur l'assimilation du nitrate.

ETUDE DU MÉTABOLISME AZOTÉ CHEZ *NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA* ET CHEZ LA TOMATE : UNE RÉGULATION SOPHISTIQUEE...

Les gènes Nia de la tomate et du tabac ont ensuite été clonés, ce qui a diversifié et facilité les approches permettant l'étude des différents niveaux de régulation de la NR. Ce travail, exaltant mais complexe, a été une œuvre collective qui a impliqué plusieurs chercheurs, ingénieurs et techniciens du laboratoire, ainsi que des thésards et des post-doc, mais il a aussi entraîné plusieurs collaborations.

L'identification d'un ADNc de la NR a permis d'analyser les divers niveaux de régulation auxquels est soumise l'expression de cette enzyme, grâce à la technique de « northern blot ». Le nitrate s'est confirmé, ainsi que la lumière, être inducteur de l'expression du transcrite de la NR. Deux routes peuvent conduire du signal lumineux à l'induction de la NR. Via la photosynthèse qui génère des sucres dans les tissus chlorophylliens, et via les réponses photomorphogénétiques qui mettent en jeu les photorécepteurs (Phytochromes, cryptochromes, etc...). Lee Pratt et Marie-Michèle Cordonnier ont été des pionniers de la purification et de l'étude biochimique des phytochromes à l'Université d'Athènes en Grèce (Etats-Unis). Pour faciliter nos travaux

de physiologie, Françoise Vedele a cloné une nitratre réductase de tomate. Une collaboration avec le laboratoire de Maarten Koornneef nous a donné accès à des mutants de phytochrome et des mutants NR- de tomate. Lee et Marie-Michèle venus en séjour sabbatique au LBC ont confirmé le rôle des phytochromes dans l'expression de la NR chez la tomate. Les mutants NR affectés dans la fonctionnalité de l'apoenzyme ont été analysés par Christian Meyer, Pierre Rouzé, Isabelle Cherel, Thérèse Moureaux et Sylvie Pouteau. Ils ont montré que l'enzyme est constituée de trois domaines catalytiques interagissant pour convertir le nitrate en nitrite. Les mutants ponctuels de NR surproduisent le transcrit de l'apoenzyme tout comme des plantes traitées par le tungstate chez lesquelles une NR non fonctionnelle est produite (travaux de Ming de Deng). Ces observations montrent que l'expression de la NR est réprimée par l'accumulation d'azote réduit. Michel Vincentz a de son côté montré que la disponibilité d'une source carbonée (ex : saccharose) induit l'expression de l'enzyme. C'est donc l'équilibre source carbonée/azote réduit qui contrôle la voie d'assimilation. Michel Vincentz a montré que ces régulations peuvent être abolies sans compromettre la survie de la plante en remplaçant le gène *Nia* par un construit exprimant constitutivement le messager du gène *Nia* (35S NR). Fabienne Galangeau, Ming de Deng et Françoise Vedele ont mis en évidence l'expression circadienne du transcrit de la NR chez des plantes cultivées soumises à un cycle jour-nuit. Ces régulations ont été retrouvées aussi dans la tomate. Cette expression circadienne du transcrit de la NR « prépare » la plante à assimiler le nitrate lorsqu'elle reçoit de la lumière.

Hervé Vaucheret a effectué un travail de thèse remarquable en clonant les deux gènes *Nia* homéologues du tabac (son travail sera à nouveau évoqué plus loin dans le paragraphe décrivant les techniques de clonage de gènes). Par la suite, il a utilisé les techniques de gènes rapporteurs pour caractériser la régulation transcriptionnelle des gènes *Nia*. Le travail a été compliqué par une forte fréquence de construits inactifs dans les transgéniques étudiés. Sur la base de ces observations, Hervé a suspecté puis démontré l'existence de mécanismes épigénétiques de « silencing » le conduisant à un ensemble de découvertes de premier plan dans ce domaine émergent. Avec Hervé Vaucheret, nous partageons le goût pour les approches génétiques et nous nous comprenons bien. Il a rapidement pris son indépendance. Ayant cloné un gène *Nia* de tomate, Marie France Dorbe et Françoise Vedele ont pu compléter efficacement un mutant *Nia* de *N. plumbaginifolia* par transfert direct de gènes.

L'apoenzyme de la NR s'est révélée être soumise à une régulation post transcriptionnelle dont Laurent Nussaume a montré qu'elle fait intervenir un mécanisme réversible de phosphorylation de la partie N terminale de l'enzyme. Laurent est un scientifique bouillonnant d'idées et il fait une belle carrière au CEA.

141



© Inra / Jean Weber.

Exposé de Michel Caboche en novembre 1991, lors de la visite au Laboratoire de biologie cellulaire de Federico Mayor, directeur général de l'Unesco, et de ses collaborateurs en visite à l'Inra de Versailles.

Il a soutenu deux thèses, l'une en France au LBC et l'autre en Angleterre au John Innes Institute. Durant cette même période, nous avons cloné le gène de nitrite réductase de tabac. À nouveau, Hervé Vaucheret a observé des phénomènes de « silencing » en étudiant des tabacs porteurs d'un construit anti sens de la nitrite réductase NiR. Au cours de sa thèse, Jean-Denis Faure a montré que la NiR était co-réglée avec la nitrite réductase au niveau transcriptionnel. De son côté, Patrice Crété a étudié l'expression de la nitrite reductase (au niveau de la protéine). Il a montré que la lumière intervient dans un processus post-transcriptionnel de régulation de l'expression de la nitrite reductase. Une collaboration avec les équipes de Mark Stitt et Hiromichi Morikawa a montré le rôle signalétique du nitrate accumulé dans la tige et producteur de NO. En parallèle à ces travaux, Françoise Vedele a étudié la famille des transporteurs de nitrate, elle aussi co-réglée avec la NR. Certains des gènes de la voie de biosynthèse du cofacteur à Molybdène (gènes *Cnx*) ont été étudiés à Versailles par Tine Hoff, posdoc venue du Danemark.

Avec la réorganisation du LBC en 1998, l'équipe NR a constitué avec les collègues du laboratoire du métabolisme une nouvelle unité de Nutrition azotée des plantes (NAP). Françoise Vedele en a assuré la direction au sein de ce qui deviendra plus tard, après les années 2000, l'Institut Jean-Pierre Bourgin. Elle s'est concentrée sur le transport et la régulation du métabolisme azoté. Ce n'était pas un travail facile que de créer une unité cohérente au niveau des axes de recherche avec des scientifiques de divers horizons, pour certains depuis une trentaine d'années sur leur sujet favori. Françoise a réussi dans son entreprise et le recrutement d'Anne Krapp a confirmé le pouvoir d'attraction de cette unité en concurrence avec l'Inra de Montpellier.

Pour l'ensemble de ce travail, j'ai reçu le prix Philip Morris en 1990, peu après le colloque de Bombannes (Gironde) organisé par Frédérique Pelsy. Ce prix concrétisait le succès d'une entreprise engagée en 1982 pour étudier de manière moderne une fonction importante chez une plante. Ce travail initié sur *N. plumbaginifolia* a été poursuivi sur la tomate, puis sur *Arabidopsis* reflétant à lui seul les différentes phases de réflexion qui ont eu cours au sein du LBC au fil des ans sur différents sujets. Divers projets de biotechnologie ont été initiés sur cette voie d'assimilation du nitrate, ce qui nous a obligé à faire des dépôts de brevet, une pratique encouragée par l'Inra. Ces brevets n'ont pas abouti à des applications, mais ils ont au moins permis à l'équipe NR d'obtenir des contrats de partenariat industriel dans le cadre des appels d'offre de la Commission européenne.

LA TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE DES PLANTES

L'analyse moléculaire de la fonction d'un gène comprend plusieurs étapes. Dès les années 1970, les gènes de bactéries étaient identifiés par mutation, clonés et séquencés. Leur analyse fonctionnelle reposait ensuite sur l'emploi de techniques de modification de ces gènes, en particulier la mutagenèse dirigée, suivie de leur réintroduction par transformation génétique dans la bactérie d'où ces gènes provenaient. La transposition de ces méthodes d'analyse des gènes bactériens aux gènes eucaryotes a pris du temps. La levure faisait exception et il a été possible d'exploiter le processus de recombinaison homologue dans *Sacharomyces cerevisiae* pour étudier les gènes de cette espèce. Les cellules de mammifères étaient plus récalcitrantes et on utilisait une méthode barbare pour les transformer, qui consistait à faire avaler aux cellules des fragments d'ADN précipités au phosphate de calcium. Dans le règne végétal en 1980 il n'y avait encore aucune technique permettant de transférer un gène cloné dans une plante, bien qu'un grand espoir reposait sur l'utilisation d'une bactérie, *Agrobacterium tumefaciens*, dont il avait été postulé par Georges Morel qu'elle transférait un ou plusieurs de ses gènes à la cellule végétale. Cette cellule ainsi transformée devenait une cellule tumorale (appelée « crown gall »), capable de proliférer sans apport d'auxine ou de cytokinine.

LE COLLOQUE DE LIÈGE SUR LA TRANSFORMATION GÉNÉTIQUE.

En 1977, le professeur L. Ledoux a organisé à Liège (Belgique) un colloque sur la transformation génétique des plantes auquel j'ai eu la chance de pouvoir participer. Ledoux y expliquait comment il injectait du plasmide de *E. Coli* dans la tige d'*Arabidopsis* et obtenait ainsi des descendants transgéniques. Rob Schilperoort montrait des photos, peu convaincantes, de tissus végétaux inoculés par *Agrobacterium* dans lesquels il voyait la bactérie transférer quelque chose à la cellule. D. Hess trempait du pollen de *Petunia* dans des préparations de plasmide pour obtenir des transgéniques par pollinisation. Finalement, ce colloque m'a donné l'impression que les travaux présentés n'étaient pas solides et que pour utiliser *Agrobacterium* il valait mieux être un bon microbiologiste, ce que je n'étais pas.

Jeff Schell étudiait les phages d'*Agrobacterium* dont il suspectait un rôle dans la transformation des cellules de crown gall tout comme nos collègues de Versailles Jacques Tournier et Dominique Expert. Jeff Schell

collaborait aussi avec Marc Van Montagu et tous deux avaient découvert les mégaplasmes d'*Agrobacterium* dont ils démontrèrent par la suite qu'ils sont porteurs des gènes de virulence de la bactérie qui lui permet de injecter l'ADN-T (T pour transféré) dans le génome de la cellule végétale. Cet ADN-T portait des gènes d'oncogénicité qui rendent tumorales les cellules végétales injectées. En 1980, Jeff et Marc ont mis au point une *Agrobactérie* « désarmée » capable de transférer son ADN-T, celui-ci ayant été préalablement délété des gènes d'oncogénicité qu'il porte et ces derniers étant remplacés par un gène de résistance à la kanamycine qui sera utile à la sélection de cellules puis de plantes transgéniques.

Francine Casse-Delbart, excellente microbiologiste du bâtiment de pathologie de Versailles, plutôt que suivre à Toulouse le groupe qui travaillait sur la fixation de l'azote, a préféré rejoindre le laboratoire de biologie cellulaire pour y animer une équipe étudiant *Agrobacterium* ; équipe constituée entre autres de Lise Jouanin, Christophe Robaglia, David Bouchez et Mark Tepfer, le frère de David. David Tepfer avait été embauché par l'Inra pour travailler dans l'équipe de Jacques Tempé. Ils s'étaient beaucoup intéressés à *Agrobacterium rhizogenes* qui génère des racines transgéniques que l'on peut multiplier très facilement. À partir de ces « hairy roots », on était capable de régénérer des plantes fertiles mais très perturbées dans leur développement. Jacques Tempé a quitté Versailles pour Orsay mais David, lui restait à Versailles où la direction de l'Inra lui construisait un laboratoire propre.

Jacques et David ont collaboré avec Marydell Chilton, venue du laboratoire de Eugène Nester (Pullman, Washington) pour faire les expériences décisives (Expérience de type Southern) montrant que *A. rhizogenes* injectait un morceau de son mégaplasme dans les « hairy roots » que cette bactérie provoque quand elle infecte une plante. Marydell avait réquisitionné tout le laboratoire de Jacques Tempé pour faire ses expériences. Au LBC, Lise Jouanin et Françoise Vilaine ont identifié un fragment du plasmide Ri qui porte les oncogènes d'*Agrobacterium rhizogenes*. Par la suite David Tepfer a continué le projet sur les hairy roots.

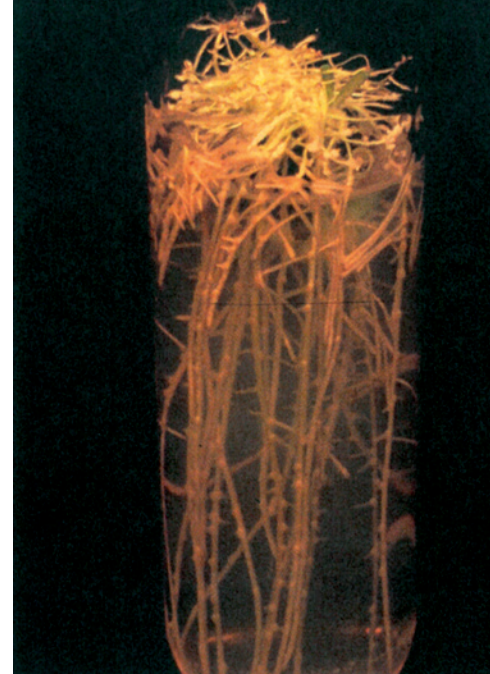
C'est aussi à cette époque que j'ai travaillé avec Marie Lacruz, ma dévouée secrétaire. Elle m'a aidé à démarrer les programmes de recherche sur le nitrate, la transgénèse, le développement d'*Arabidopsis*, la biologie des semences et le démarrage de géoplande.

LES LIPOSOMES VECTEURS DE TRANSFORMATION DES PROTOPLASTES DE PLANTES

De mon côté, j'ai décidé de développer une technique de transfert direct de gènes qui, à mes yeux, aurait comme avantage de ne pas reposer sur l'emploi de vecteurs porteurs d'oncogènes. Un an après mon retour des USA, j'ai suivi des cours sur la transformation génétique des eucaryotes, cours organisé par Rob Fraley, Mario Capecchi et J. Cooper au Cold Spring Harbor Laboratory (Etats-Unis), la Mecque de la biologie moléculaire. Cooper nous a initié au clonage d'oncogènes, Capecchi à la transformation par microinjection et Fraley à la transformation à l'aide de liposomes. Rob Fraley, issu du biomédical, est devenu par la suite grand patron de Monsanto, la société qui domine le marché des OGM ! Mario qui a développé la technique de production de souris Knock out chez les mammifères a reçu en 2007 (avec Martin Evans et Oliver Smithies) le prix Nobel de physiologie ou médecine. Je ne pouvais pas être à meilleure école !

J'ai tout d'abord essayé d'adopter les techniques efficaces sur cellules de mammifères aux cultures de cellules végétales. Si la microinjection avait fait ses preuves sur les cellules animales, sur protoplastes végétaux, elle s'est révélée être un cauchemard. Les protoplastes se comportaient comme des sphères dépourvues de rigidité que les aiguilles de verres perçaient de part en part. À l'institut de recherche sur le cancer de Villejuif, Miroslav Hill qui recherchait les oncogènes présents dans des cellules transformées par le virus du sarcome de Rous (RSV) m'a conseillé d'employer une technique de transfection à l'aide d'ADN précipité avec du phosphate de calcium. J'ai essayé de transfecter des protoplastes, ce qui n'a donné aucun résultat convaincant, probablement faute d'endocytose. C'est finalement la technique de préparation de liposomes, acquise dans le laboratoire de Jean-Marc Ducruet de l'Inra à Dijon, qui s'est avérée efficace.

Nous avons développé ce projet à six : Alain Deshayes venu du laboratoire de mutagenèse de l'Inra de Dijon, Pierre Rouzé venu du laboratoire de virologie de Paraf à l'INA Paris-Grignon, Philippe Guerche et Catherine Bellini, tous deux thésards, et Marie-France Dorbe technicienne d'A. Deshayes. Dans un premier temps, j'ai collaboré avec Pierre Rouzé pour optimiser l'infection de protoplastes de tabac par des liposomes chargés d'ARN du virus de la mosaïque du tabac (TMV), en détectant les protoplastes transfectés grâce à un anticorps contre la protéine virale. Puis, nous avons considérablement augmenté l'efficacité de la transfection en induisant la fusion des liposomes chargés d'ARN viral avec les protoplastes par traitement au PEG, agent de fusion de protoplastes bien connu. Cette technique efficace pour transférer des ARN pourrait-elle être aussi utilisée pour transférer de l'ADN ? Pour tester cette hypothèse, j'ai travaillé avec Alain Deshayes qui a conçu un vecteur plasmidique porteur d'un gène de résistance à la kanamycine fourni par l'équipe de Marc Van Montagu.



© Inra / Jean Weber.

David Tepfer, dans les années 1980 à l'Inra Versailles, montre une plante régénérée à partir d'une culture in vitro d'un hairy root induit par *Agrobacterium rhizogenes*.

Après fusion de liposomes chargés de plasmides avec des protoplastes de tabac, j'ai obtenu mes premières colonies résistantes à la kanamycine. La transformation a été ensuite améliorée par Philippe Guerche en perfectionnant la méthode d'électroporation puis en l'adaptant à d'autres espèces végétales. Catherine Bellini a de son côté effectué une analyse génétique des transgéniques et montré que dans la majorité des transgéniques obtenus le marqueur de résistance à la kanamycine était transmis comme un marqueur mendélien monogénique et dominant. Restait à confirmer que les transgéniques avaient bien intégré le gène de résistance à la kanamycine dans leur génome. Nos premiers essais donnaient des résultats troublants : on retrouvait bien des gènes de résistance à la kanamycine, mais leur structure était différente de celle du gène employé au départ. En fait, ces gènes de résistance étaient présents dans les bactéries de l'environnement des transgéniques. Le gène de résistance utilisé pour ces expériences a été retrouvé dans les transformants gardés sous forme de boutures en cultures stériles. Catherine a aussi observé les premières plantes dans lesquelles le marqueur introduit était « silencé » sans que nous réalisions bien de quoi il s'agissait. Ceci sera compris plus tard par Hervé Vaucheret.

Les procédés de transformation ont par la suite été diversifiés et améliorés, et aussi adaptés à d'autres espèces végétales. Nombreux sont les projets développés à Versailles, qui ont fait usage des techniques de transfert direct de gènes dans des buts de recherche ou d'applications biotechnologiques. Notons, en particulier, les travaux d'expression transitoire qui visent à étudier les promoteurs des gènes. Dans ce domaine de la transformation génétique le LBC était leader incontesté en France. Des collaborations industrielles ont vu le jour, en particulier avec Monica Gervais et Jean Michel Lemoullec de la société Roussel-Uclaf. Par la suite nous avons collaboré avec Georges Freyssinet de Rhone Poulenc, ce qui a abouti à des partenariats dans le cadre de BIOAVENIR, un programme où Rhone Poulenc recevait de l'argent du ministère de la recherche, qu'il utilisait pour soutenir les programmes de recherche publics qui lui plaisaient, dans le cadre de contrats contraignants en matière de publication, non sans amertume du côté public.

LES DÉBUTS DU CLONAGE ET DE LA CARACTÉRISATION DES GÈNES

Depuis les travaux pionniers de Thomas Hunt Morgan, la génétique a été utilisée pour identifier les gènes qui contribuent à une fonction biologique. Ce n'est qu'après la découverte de l'ADN qu'il est devenu possible d'associer à un gène une séquence ADN qui le caractérise. Mais comment accéder à cette séquence ? Parmi les nombreuses méthodes utilisables, j'ai illustré comment nous avons identifié un morceau de la séquence ADNc de la nitrate reductase. Un ADNc est une copie ADN d'un ARN messager mais pas le gène qui code pour cet ARN messager. Une découverte fondamentale de la biologie moléculaire, « le dogme », est l'enchaînement de deux étapes pour aboutir à la production d'une protéine à partir d'un gène, selon le schéma suivant :



On peut accéder à la séquence d'un gène de manière indirecte, en identifiant d'abord la séquence de l'ARN messager pour lequel il code, puis en recherchant le gène lui-même dans le génome par des techniques d'hybridation. C'est ce que nous avons fait pour cloner le gène *Nia* de la nitrate réductase. La taille d'un gène est très petite par rapport à celle d'un génome entier et la remontée du transcrit au gène était techniquement délicate dans les années 1980, comparable à la recherche d'une aiguille dans une botte de foin.

Pour ce qui concerne le gène *Nia*, c'est à Hervé Vaucheret, thésard aidé de Jocelyne Kronenberger, technicienne hors pair, que j'ai confié cette tâche. Après avoir construit une banque de fragments du génome du tabac dans un vecteur phagique, banque criblée avec une sonde cDNA radioactive, issue du messager du gène *Nia*, Hervé a identifié les deux gènes *Nia* présents dans le génome du tabac. Disposant des techniques de transfert de gènes mises au point à Versailles (transfert direct et transformation par une agrobactérie « désarmée »), il a essayé de compléter un mutant de nitrate réductase de *N. plumbaginifolia* avec son gène de nitrate réductase cloné. Il y est parvenu avec difficulté : une petite partie des transgéniques obtenus étaient devenus capables d'utiliser le nitrate comme source azotée, ce qui confirmait que le gène cloné était bien un gène *Nia*, mais la fréquence de complémentation était très faible. Il a ensuite construit des gènes rapporteurs de gènes *Nia*, en l'occurrence constitués du promoteur du gène de la nitrate réductase fusionné à la séquence codante d'une enzyme, la β -glucuronidase (GUS). De telles constructions introduites dans la plante permettent de visualiser où s'exprime un gène de la plante. L'enzyme GUS produite dans un tissu où le gène s'exprime est révélée par la fourniture d'un substrat incolore qui est converti en pigment bleu par l'enzyme. À nouveau, une petite partie seulement des transgéniques ayant intégré le gène rapporteur ont exprimé ce rapporteur



à un niveau décelable (de l'ordre de 5 %) et inducible par fourniture de nitrate. L'absence d'expression de la majorité des transgéniques obtenus était à nouveau intrigante.

La nitrite reductase est une enzyme qui réduit le nitrite en ammonium et il était intéressant de voir si elle serait co-réglée avec la NR qui contribue à la même voie métabolique. Des gènes de nitrite réductase ont été clonés par Hervé Vaucheret et Jocelyne Kronenberger et, à nouveau, des gènes rapporteurs de la nitrite réductase ont été construits et insérés dans le génome du tabac. L'analyse de ces transgéniques a donné à nouveau des résultats inattendus, en particulier l'observation de phénomènes d'extinction des gènes aussi bien résidents qu'introduits par transformation génétique. Hervé Vaucheret a compris qu'il avait affaire de manière répétée à un phénomène nouveau, d'inactivation épigénétique des gènes. Ainsi a-t-il débuté une grande aventure intellectuelle qui l'a rendu mondialement célèbre, aboutissant à la mise en évidence du rôle fondamental des petits ARN dans les régulations épigénétiques chez les eucaryotes.

Nos travaux menés sur les gènes de nitrate réductase et de nitrite réductase représentent une approche classique du clonage de gènes qui codent pour des enzymes ou des protéines que l'on peut purifier. Mais il existe de nombreux gènes qui codent des protéines totalement inconnues. Il faut d'autres approches pour les cloner. Une de ces approches, l'étiquetage, dérive des travaux de Barbara Mc Intosh. Généticienne du maïs, elle a mis en évidence des gènes « mutateurs » qui donnent aux mutations qu'ils induisent un caractère instable. Le caractère instable est comme un petit drapeau qui distingue le mutant identifié de toutes les autres mutations que peut renfermer un génome. Avec l'émergence de la biologie moléculaire, il est devenu possible d'identifier physiquement ces mutateurs dénommés transposons, et de les utiliser comme drapeaux/étiquettes moléculaires pour « pêcher » les gènes qu'ils inactivent en s'insérant dans leur séquence. Trois éléments, Ac, Spm et Mu, ont été identifiés au niveau moléculaire et on a pu les introduire dans le génome de diverses plantes pour y induire des mutations instables. À Versailles, Annie Marion-Poll a introduit un élément Ac fourni par Barbara Baker du Max Planck Institute for Plant Breeding Research (MPIZ) de Cologne dans le génome de *N. plumbaginifolia*. Annie a pu observer des mutations affectant la sensibilité des plantes à la deshydratation dans la descendance de plantes porteuses de Ac dans leur génome. Avec Elena Marin, sa thésarde, elle a cloné le gène de l'ABA aldehyde oxydase, une des étapes de la voie de biosynthèse de cette hormone. Le gène avait été muté par l'insertion de Ac dans sa séquence. Il a été isolé en utilisant Ac, de séquence connue comme sonde moléculaire. C'était un beau résultat (qu'Annie Marion-Poll a présenté à diverses conférences internationales). Cependant il nous semblait que si nous isolions un élément mutateur déjà présent dans le génome du tabac, celui-ci serait plus efficace que Ac pour induire des mutations. Que ce soit le maïs (ou le mufler étudié par Heinz Saedler), ce sont les transposons résidents dans les génomes de ces espèces qui ont été le mieux exploités. Les efforts déployés pour utiliser Ac/Ds en système hétérologue par de nombreux laboratoires ont abouti à des succès limités.

LA DÉCOUVERTE DE Tnt1, RÉTROTRANSPONSON FONCTIONNEL DU TABAC

Avant de rejoindre Versailles, Alain Deshayes s'était intéressé aux instabilités génétiques du tabac. Il avait étudié une mutation instable chlorophyllienne appelée Tl. Il considérait cette mutation Tl comme indicatrice de la présence d'un élément mutateur dans ce tabac. Alain a proposé à Marie-Angèle Grandbastien de venir à Versailles faire sa thèse sur ce sujet afin de confirmer l'existence d'un tel élément, de le cloner puis de le caractériser. C'est sur ce projet que Marie-Angèle a obtenu une bourse de thèse.

Pour débiter ce travail il a été proposé d'utiliser le système de sélection de protoplastes résistants à la Valine, mis au point par Jean-Pierre Burgin, pour tester l'hypothèse qu'avec le mutant instable Tl, la fréquence de colonies résistantes à la valine serait augmentée de manière significative. L'idée étant ensuite de « piéger » cet élément transposable dans le gène *Nia* du tabac que nous avions le projet de cloner et qui servirait de sonde pour le cloner. Il fallait une bonne dose d'optimisme pour mener un tel travail !

Marie-Angèle a tout d'abord construit un génotype de tabac haploïde porteur de Tl et hétérozygote pour une mutation d'un des deux gènes *Nia*. De ce fait, le tabac obtenu ne possède qu'un seul gène *Nia* fonctionnel, et des mutations récessives *Nia* ont un phénotype NR déficient. Par la suite, Marie-Angèle a sélectionné des mutants NR dans ce génotype haploïde selon la technique mise au point chez *N. plumbaginifolia*.

Pour leur caractérisation moléculaire, Marie-Angèle Grandbastien a travaillé avec un post doc suisse, Albert Spielmann, qui avait une bonne expérience de la biologie moléculaire. Comme Hervé Vaucheret, ils ont construit une banque de fragments génomiques du génotype NR dans le phage λ . En utilisant une sonde ADNc de NR pour cribler la banque, ils ont obtenu des gènes *Nia* dont l'analyse a montré qu'ils avaient été mutés par insertion d'un gros fragment d'ADN. S'agissait-il d'homologues des mutateurs du maïs ? Non ! Le séquençage de cet insert d'ADN dans la NR a révélé des homologies de séquence avec les rétrovirus animaux mais aussi Ty, un élément génétique mutateur de la levure qui génère des copies par reverse transcription, copies qui s'insèrent dans le génome et provoquent des mutations. Cet élément génétique, appelé *Tnt1* est un élément transposable d'un type différent des mutateurs de B. McClintock qui peuvent s'exciser du site où ils sont insérés et de ce fait induire une réversion du phénotype mutant qu'ils induisent. *Tnt1* au contraire produit des copies qui s'insèrent de manière irréversible dans des sites nouveaux du génome. Ils provoquent donc des mutations stables et leur accumulation fait « grossir » les génomes. La structure moléculaire de *Tnt1* s'apparente à celle d'un rétrotransposon. Notre rétrotransposon *Tnt1* est un des rares transposons fonctionnels isolés ! Sylvie Pouteau a identifié le transcrit de *Tnt1* (un ARN de 5,5 kb très difficile à mettre en évidence du fait de sa taille et de sa concentration faible), confirmant la fonctionnalité de ce mutateur. Ce travail publié dans la revue *Nature* a eu un fort impact dans la communauté scientifique.

Les travaux complémentaires de Sylvie Pouteau ont montré que l'insertion de *Tnt1* provoquait des perturbations de la transcription dans les gènes cibles. Les travaux de Marie-Angèle Grandbastien et ceux de ses concurrents ont montré que les génomes de plantes (et d'animaux) sont « bourrés » de rétrotransposons de divers types. Ainsi, Christian Meyer a identifié de nouvelles classes de rétrotransposons chez *N. plumbaginifolia*. *Tnt1* néanmoins s'est révélé difficile à utiliser. Hélène Lucas, venue de Clermont-Ferrand, a réussi à introduire et à faire fonctionner *Tnt1* chez *Arabidopsis*, tout en constatant une rapide inactivation du rétrotransposon dans la plante receveuse. C'est finalement chez la luzerne que notre collègue Pascal Ratet de l'Institut des Sciences du Végétal au CNRS de Gif-sur-Yvette, a pu exploiter *Tnt1* pour des travaux d'étiquetage de gènes chez une légumineuse. Marie-Angèle Grandbastien a poursuivi ses travaux sur les rétrotransposons et étudié leur rôle dans le fonctionnement des génomes de plantes. Malgré les succès d'Annie Marion-Poll et de Marie-Angèle nous n'étions pas arrivés à mettre au point un système d'étiquetage des gènes performants pour étudier le tabac ou *N. plumbaginifolia*. Ceci nous a amenés à remettre en question le choix de *N. plumbaginifolia* comme modèle expérimental. De plus, une méthode efficace de production de mutants d'insertion par Agroinfiltration est venue conforter le choix d'*Arabidopsis* par la suite.

LA BIOLOGIE DU DÉVELOPPEMENT AU LABORATOIRE DE BIOLOGIE CELLULAIRE

LES LIMITES DU MODÈLE NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA

Mes travaux sur la croissance clonale de cellules dérivées de protoplastes m'avaient fait découvrir l'importance de deux classes de molécules : les auxines et les cytokinines. Toutes deux sont des phytohormones impérativement nécessaires à la multiplication de cellules végétales en culture. De plus, pour l'auxine il n'en fallait

pollen. Les plantes capables de raciner, issues du croisement, sont des haploïdes dérivés d'un gamète mâle. On peut donc ainsi faire du transfert de cytoplasme par cette méthode. Ce fut là ma première collaboration avec Georges.

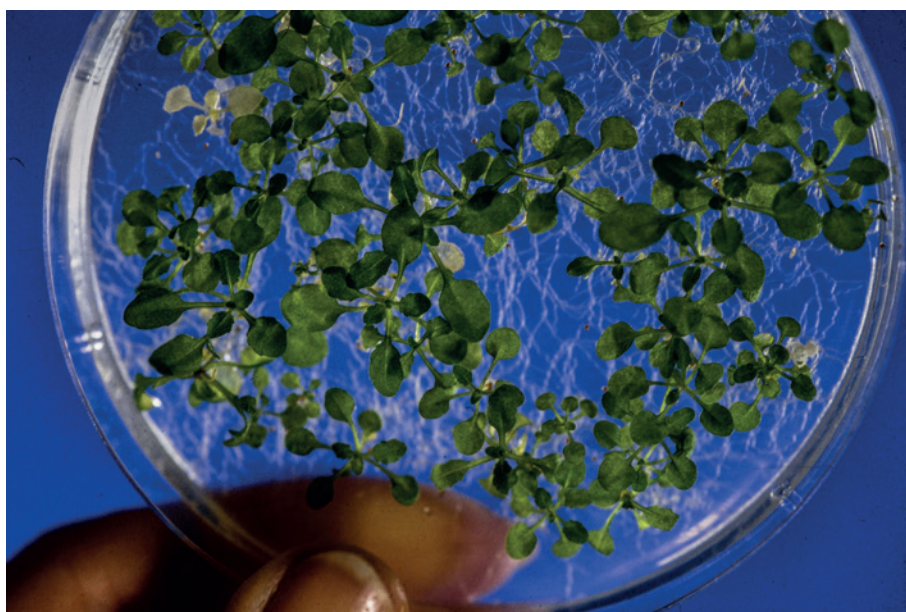
Jean-François Muller avec qui j'ai travaillé, était un expérimentateur doué. Il avait développé la dissection des méristèmes sous la direction de Georges Morel. Chez *N. plumbaginifolia* il a obtenu des colonies résistantes à l'ANA, analogue cytotoxique de l'auxine, qu'il a régénéré. Elles avaient toutes un double phénotype : enroulement marqué des feuilles et fertilité réduite. J'ai collaboré avec l'équipe de Jean Guern à l'ISV pour effectuer leur caractérisation électrophysiologique. Le mutant racinaire montrait une modification importante des doses d'auxine induisant la dépolarisation membranaire.

Rémy Bitoun et Philippe Rousselin sont venus en thèse poursuivre le travail engagé avec quelques surprises au bout du chemin : trois mutants auxine-résistants isolés par des stratégies différentes se sont finalement révélés ADH déficients ABA déficients. L'ABA est une hormone de stress. Il est vraisemblable que le stress causé par une dose excessive d'auxine induit la production d'ABA et le blocage de la croissance. Ceci nous a amenés à collaborer avec l'équipe d'Emile Miginiac (Université Paris 6) sur ces mutants ABA déficients (50,95) et sur d'autres projets (caractérisation de mutants de phytochrome chez *N. plumbaginifolia* (83,94), Yvan Kraepiel travaillant à l'interface des deux équipes. Marc Jullien, Professeur à l'INA P-G et Michel Laloue, scientifique CNRS du laboratoire de Jean Guern ont rejoint le petit groupe qui travaillait sur l'auxine. Les connaissances de Michel Laloue dans le domaine du métabolisme des cytokinines et son projet d'identifier un récepteur de cytokinines nous ont stimulés à initier en complément une approche de génétique pour étudier le mode d'action des cytokinines. Jean-Denis Faure a effectué une thèse sur ce sujet. Il a identifié trois classes de mutants résistants à la zeatine et perturbés dans le métabolisme azoté. Les cytokinines intervenant dans les relations source puits, ces mutants semblaient s'en rattacher. À ce stade nous avions une préoccupation collective grandissante : *N. plumbaginifolia* choisi pour sa commodité d'emploi en culture in vitro/biologie cellulaire était une spécialité de Versailles. Très peu d'équipes étrangères l'avaient choisi comme modèle. Rester sur le modèle *N. plumbaginifolia* avait ses attraits. En particulier sur tous les travaux menés sur cette espèce émanant de Versailles, il y avait peu de concurrence avec d'autres laboratoires et donc peu de problèmes de publications.

LA CONSTRUCTION D'UNE ÉQUIPE GAGNANTE AUTOUR D'UNE NOUVELLE PLANTE MODÈLE : *ARABIDOPSIS THALIANA*

Alors que les approches moléculaires étaient en train d'exploser chez les végétaux, la publication d'une carte RFLP du génome d'*Arabidopsis* en 1988 fut pour moi un avertissement. Des cartes RFLP étaient élaborées sur diverses espèces cultivées à des fins d'amélioration des plantes. Mais surtout, ces cartes permettent de localiser avec précision les gènes identifiés dans cette espèce et d'engager des approches de clonage positionnel pour les isoler. Le premier gène d'*Arabidopsis* cloné par cette approche est *Abi 3* identifié par Jérôme Giraudat, en 1992, dans le laboratoire de H. Goodman. Or, chez *N. plumbaginifolia* nous n'avions même pas de carte

147



Plantules *Arabidopsis* semis *in vitro*, Inra Versailles.

© Inra / Jean Weber.

L'équipe scientifique travaillant sur *Arabidopsis* à Versailles en 1995. De droite à gauche, C. Camilleri, D. Bouchez, J. Kronenberger, T. Desnos, M. Lacruz, M. Caboche, J. Amsellem, H. Hofte, H. Chiapello, J. Traas, E. Gendreau, T. Desprez, B. Courtial, Y.H. Feiler, M. Delarue.



© Inra / Jean Weber.

génétique détaillée des gènes déjà identifiés et nous ne pouvions pas faire de clonage positionnel faute d'outils nécessaires. Mais, ce qui m'a décidé à utiliser *Arabidopsis*, c'est le fait que la taille du génome d'*Arabidopsis* s'est révélée être une des plus petites du règne végétale, alors que celle du génome de *N. plumbaginifolia* était très grande. En 1990, nous avons donc commencé à introduire cette espèce modèle à Versailles. Bien qu'elle ait des limites notoires en biologie cellulaire, elle s'est révélée, avec le temps, un outil fantastique pour faire l'étude génétique d'une plante. Cette évolution ne s'est toutefois pas faite sans quelques difficultés d'adaptation.

Parti d'une équipe de taille réduite, le LBC a accueilli, formé puis recruté de jeunes collègues à l'issue de leur thèse. Annie Marion-Poll et Marie-Angèle Grandbastien sont arrivés tout d'abord, Christian Meyer, Christophe Robaglia, David Bouchez ensuite. Une dynamique était créée. Pourquoi cette arrivée en masse ? Le laboratoire avait une situation de monopole en matière de transgénèse et, par exemple, nos collègues de l'IBMP Strasbourg et de l'Institut de biologie des plantes (IBP) de l'université d'Orsay nous enviaient cette expertise. Par ailleurs les travaux sur la transgénèse, sur la NR, sur la stérilité mâle cytoplasmique et sur l'étiquetage de gènes avaient impressionné les dirigeants de l'Inra. Jean Marrou, directeur scientifique des productions végétales à l'Inra, en particulier venait régulièrement au LBC faire aveu d'inculture moléculaire et nous demandait d'expliquer l'intérêt agronomique des progrès faits en biologie moléculaire végétale au LBC. En une décennie les effectifs sont passés de la dizaine à la soixantaine de personnes, et la venue de postdocs de l'étranger est devenue régulière.

En 1990, j'ai proposé de créer une nouvelle équipe étudiant *Arabidopsis* dans le laboratoire, équipe qui d'une part apprendrait à utiliser les ressources génomiques de cette espèce, et si possible apporterait sa propre contribution à la création ces nouvelles ressources. D'autre part je prévoyais d'utiliser ce savoir faire pour étudier une fonction importante en biologie végétale. La demande de création d'une équipe *Arabidopsis* à l'Inra pouvait sembler une provocation. Pourquoi étudier une mauvaise herbe plutôt qu'une plante cultivée ? En France seule l'équipe de Bernard Lescure en faisait usage à Toulouse et sous forme de cultures de cellules. J'ai pu convaincre Alain Coléno, qui avait succédé à Jean Marrou comme directeur scientifique des productions végétales, de l'intérêt d'un tel projet qui nous mettrait en contact/concurrence avec les meilleures équipes travaillant sur cette espèce modèle. Plutôt que de reconvertir tout le laboratoire sur ce nouveau projet, l'idée était de convier quelques collègues du LBC à rejoindre l'équipe en formation et demander un fort soutien de la direction en créant des postes de scientifiques. Le démarrage de ce projet a coïncidé avec une réorganisation du bâtiment et l'installation de l'équipe *Arabidopsis* au sous sol de ce bâtiment.

Dès 1990, nous avons donc commencé à introduire cette espèce modèle à Versailles, non sans difficultés d'ailleurs. Ce n'est pas sans regrets que nous avons abandonné le modèle de biologie cellulaire que constituent les protoplastes haploïdes de *N. plumbaginifolia*, modèle développé par Jean-Pierre Bourgin et Yves Chupeau.

ni trop/ni trop peu. Elle était cytotoxique à des concentrations faibles (1 μM). J'ai étudié le mécanisme par lequel les cellules, lorsqu'elles sont présentes à une concentration élevée dans le milieu de culture, sont capables d'inactiver l'auxine par conjugaison avec certains acides aminés.

Ceci m'a amené à collaborer avec Jean-Jacques Leguay (qui revenait de postdoc au laboratoire de K. Gordon Lark à l'Université d'Utah à Salt Lake City où il avait pris ma suite), et Gabriel Aranda un chimiste de l'école polytechnique. Aranda utilisait un mutagène puissant, l'EMS, comme solvant organique. Nous avons fait une étude structure/cytotoxicité sur un assez grand nombre d'analogues de l'IAA, l'auxine « naturelle » dont certains sont très cytotoxiques (ex : l'ANA) et d'autres non (ex : piclorame). Avec Annie Marion-Poll, nous avons poursuivi l'étude des relations auxine/acides aminés. Comme l'auxine est une molécule intervenant dans de nombreux processus physiologiques, il me semblait important d'identifier le rôle physiologique de la fonction cible de la cytotoxicité. Mon approche a été de sélectionner des mutants résistants à l'auxine en culture à faible densité. Chez *N. tabacum*, j'ai obtenu des lignées cellulaires résistantes à l'ANA qui après régénération avaient un phénotype de déficience racinaire et de ce fait étaient multipliées par greffage. Ces mutants Racine-déficients (*Rac*) ont trouvé un usage biotechnologique.

Georges Pelletier, lui aussi arrivé au laboratoire pour poursuivre ses travaux sur la stérilité mâle cytoplasmique (CMS Ogura), a proposé d'utiliser un homozygote *Rac* pour le croiser avec un tabac normal donneur de



Plantules *Arabidopsis Thaliana*, Inra Versailles.

© Inra / Collection Caboché.

Il s'était avéré bien adapté à l'étude du métabolisme du nitrate, mais *Arabidopsis* malgré ses limites notoires en biologie cellulaire s'est révélé un outil fantastique pour faire l'étude génétique d'une plante. Frédérique Pelsy et Jacques Goujaud (puis Catherine Bellini) ont dû résoudre des problèmes de climats (serres très chaudes et trop humides utilisées pour cultiver *Arabidopsis*) et se débarrasser de larves d'insectes présentes dans le terreau qui grignotaient les racines des plantules ! Dès 1992, nous étions en état de marche, capables de faire des mutagénèses de graines à l'EMS et de produire les populations M2 nécessaires à nos criblages, non pas sur cultures de cellules comme chez *N. plumbaginifolia*, mais sur semis et criblages de plantes entières.

J'ai choisi d'étudier le développement de l'hypocotyle de la plantule d'*Arabidopsis*. Nous savions déjà que l'élongation de l'hypocotyle est régulée par la lumière, via les phytochromes, et que diverses hormones (auxine, éthylène, gibbérellines, etc...) interviennent dans ce processus pourtant d'apparence simple. En plus de l'engagement de Catherine Bellini, David Bouchez, Pierre Rouzé et Véronique Santoni sur ce nouveau projet, j'ai obtenu de l'Inra un poste de CR1 qui a permis le recrutement de Herman Hofte. Herman n'était pas un débutant. Il avait travaillé à Gand dans le laboratoire de Marc Van Montagu et il avait fait un très bon travail de recherche sur les aquaporines (protéines qui transportent l'eau) chez Martin Chrispeels à San Diego. Au même concours de recrutement j'ai récupéré un poste supplémentaire attribué à Jan Traas. Jan n'avait pas le CV d'Herman, mais il avait d'excellentes connaissances en cytologie et s'intéressait au cytosquelette depuis des années. Enfin Véronique Santoni est venue apporter ses compétences en biochimie et analyse 2D des protéines. C'est avec ce petit noyau de scientifiques que nous avons démarré le projet, ce qui a coïncidé avec une réorganisation du bâtiment et l'installation de l'équipe *Arabidopsis* au sous-sol de ce bâtiment.

BÂTIR UN PROJET SCIENTIFIQUE AUTOUR DE L'ÉLONGATION DE L'HYPOCOTYLE D'ARABIDOPSIS

Le développement de la plantule après sa germination est radicalement différent selon qu'il a lieu en présence de lumière (photomorphogénèse) ou en absence de lumière (skotomorphogénèse). Le concept clef du projet hypocotyle est la mutagénèse à saturation, démarche conçue et mise en œuvre par Christiane Nusslein-Volhard pour étudier le développement de la drosophile. L'idée est d'inventorier tous les gènes qui contribuent à une fonction, de façon à disposer de plusieurs allèles mutants pour chaque gène. Une analyse des groupes de complémentation des mutants identifiés, et leurs relations de dominance permet de constituer au moins en partie le réseau des régulations affectant le processus. L'étape suivante est de cloner tous les gènes et d'étudier l'expression spatio-temporelle des protéines pour lesquelles ils codent, ainsi que leurs interactions. Ce type d'approche a permis d'identifier de nombreuses voies de signalisation du développement. Le pionnier de cette démarche expérimentale dans le domaine végétal est Gerd Jurgens qui a étudié l'embryogénèse d'*Arabidopsis*.

Pour initier cette étude de l'hypocotyle il nous a fallu faire un travail de description du mécanisme d'élongation, et du processus d'endoreduplication de l'ADN qui l'accompagne dans chaque cellule. C'est Emmanuel Gendreau, supervisé par Herman Hofte et Jan Traas, qui a montré le rôle des phytochromes dans ce processus d'endoreduplication. Pour effectuer ce type d'étude il a fallu doter l'équipe de Jan Traas d'équipements performants en cytologie. L'opportunité d'un prix de la fondation Alexander Von Humboldt qui m'a été décerné avec le soutien de Jeff Schell du Max Planck Institut de Cologne et nous a permis d'acquérir les équipements nécessaires.

Un premier objectif a été de mettre au point une technique de visualisation des coupes fixées au métacrylate. En effectuant cet inventaire des gènes dont la mutation provoque un défaut de fonctionnement de l'hypocotyle, nous avons pu constituer des groupes de mutants ayant un phénotype apparenté et analyser leur allélisme éventuel. Ainsi les mutants dé-étiolés/fusca ont des morphologies proches et interviennent dans des voies de signalisation communes. Les mutants montrant un hypocotyle déformé ont été rapidement suspectés par Herman Hofte d'être, au moins pour partie d'entre eux, des mutants de paroi. D'autres classes mimaient des traitements hormonaux, etc. Ce travail de criblage était effectué sur une population M2 de plantes mutagénisées à l'EMS.

Nos études sur les gènes impliqués dans les processus d'élongation de l'hypocotyle ont également induits d'autres projets. Ainsi, un projet d'étude du fonctionnement du méristème apical a été initié et a conduit à un travail de modélisation de son fonctionnement ; de même, une petite équipe a été créée pour l'étude de l'induction florale. Il faut également évoquer dès à présent le travail entrepris par le groupe de Georges Pelletier afin d'établir une collection de mutants d'*Arabidopsis* par insertion de l'ADN-T après infection par *Agrobacterium*. Le principe de cette méthode est d'inoculer par infiltration une agrobactérie

porteuse d'un gène de résistance à un herbicide, le Basta. Une collection de 50000 mutants d'insertion ADN-T a ainsi été constituée par l'équipe de Georges et maintenue en serre. C'est une ressource formidable car elle permet (souvent mais pas toujours) d'identifier le gène responsable de la mutation visuellement observée dans la collection.

J'ai eu un grand plaisir à effectuer avec Catherine Bellini les criblages visuels de ces mutants d'hypocotyle. Nous étions stupéfaits par la diversité des morphologies des mutants que nous observions. Ce fut pour moi un des plus forts moments de ma carrière scientifique. Nous avons caractérisé en détail plusieurs de ces mutants dont certains étaient, de plus, étiquetés.

QUELQUES DÉCOUVERTES

SuperRoot (Sur 1) est un mutant récessif dont l'hypocotyle se couvre de racines adventives semblables aux « hairy roots » induits par *Agrobacterium rhizogenes*. Marianne Delarue et Catherine Bellini ont effectué sa caractérisation. C'est un surproducteur d'auxine et on peut mimer son phénotype en incubant un hypocotyle de type sauvage sur un milieu contenant une auxine. Sur 1 est une porte d'entrée à l'étude du métabolisme de l'auxine chez les crucifères. Sur2 isolé par Marianne Delarue, a un phénotype proche de Sur1 et contribue à la même fonction.

Procuste (Prc 1) est un mutant spécifiquement déficient pour l'élongation de son hypocotyle à l'obscurité (105). Thierry Desnos, thésard de Herman s'est investi à fond dans sa caractérisation. Le mutant prouve que le processus d'élongation est régi par au moins deux voies de signalisation distinctes à la lumière et à l'obscurité. Le gène *procuste* code pour une cellulose synthétase, membre d'une famille multigénique aux fonctions diverses. Herman a par la suite axé ses recherches sur la biogénèse de la paroi, domaine dans lequel il est maintenant mondialement réputé.

Ton 1 est un mutant nain au phénotype spectaculaire. La plante à fleur ne dépasse pas 2 cm de haut ! Jan Traas a montré que ce mutant ne fait plus de bande de pré-prophase, une des étapes du cycle cellulaire chez les plantes qui positionne les plans de division cellulaire et oriente la croissance de la plante. De ce fait le lignage cellulaire est perturbé dans tous les tissus de la plante. Malgré cela *Ton 1* fabrique tous les organes d'une plante. Ceci apporte la preuve que chez les plantes la genèse des organes n'est pas déterminée par le lignage cellulaire mais par la position des cellules les unes par rapport aux autres. Ce travail publié dans *Nature* a contribué à la renommée du LBC. L'analyse moléculaire de *Tonneau* a été effectuée par Philippe Nacry sous la direction de David Bouchez. Ce fut un travail ardu car le mutant *Ton 1* était issu d'un remaniement complexe du génome. Philippe de plus s'est fait voler sa sacoche de mobylette avec le manuscrit de sa thèse, quelques semaines avant sa soutenance. David et Martine Pastuglia poursuivent ces travaux qui apportent des informations précieuses sur les mécanismes imbriqués de la division et de l'élongation cellulaire chez les plantes.

Pasticcino (Pas 1, 2 et 3). Ces mutants sont issus d'un criblage similaire à celui qui nous avait permis d'isoler les mutants *Zea* de réponse aux cytokinines mutants identifiés chez *N. plumbaginifolia*. Paola Vittorioso a effectué un postdoc sous la direction de Catherine Bellini pour caractériser ces mutants hypersensibles aux cytokinines à qui elle a donné le nom de gâteaux italiens. Jean-Denis Faure au retour de son postdoc aux USA a caractérisé ces mutants au niveau moléculaire et il a montré qu'ils identifiaient une voie de signalisation nouvelle chez les plantes, la voie des sphingolipides (intervenant dans le transport de l'auxine et la morphogénèse).

Argonaute (Ago 1), qui est certainement le plus connu des mutants identifiés au LBC chez *Arabidopsis* (*Ago1*). Avec des feuilles cylindriques dépourvues de limbe ce mutant évoque les plantes du carbonifère. Catherine Bellini lui trouvait ressemblance à une petite pieuvre nommée Argonaute, d'où le nom choisi, pour ce mutant, sans rapport à la mythologie grecque. En plus de sa morphologie ce mutant manifeste une résistance énorme aux auxines de synthèse telles que le piclorame. Argonaute a été cloné par David, et le travail correspondant publié dans EMBO J. Par la suite Hervé Vaucheret a découvert que ce mutant était allélique à l'un des mutants affectés dans les mécanismes de silencing, qu'il étudiait lui aussi au LBC. La protéine Argonaute est la RNase qui détruit les transcrits cibles des petits ARN vecteurs du « silencing ». Deux équipes du même laboratoire étudiaient le même gène sans le savoir ! Ceci illustre la pléiotropie des fonctions dans lesquelles un même gène peut être impliqué. Nous en verrons d'autres exemples. En parallèle à ce travail de Hervé sur les mécanismes de silencing, Catherine Bellini a étudié le rôle de l'auxine dans la formation des racines adventives. Elle a mis en évidence le rôle d'Argonaute dans la formation de ces racines et à cette occasion initié une collaboration avec Goran Sandberg à l'Université d'Umea en Suède. D'autres gènes ont été découverts, mais restent à étudier (Ex Mutants Cristal). Pour compléter ce tableau, il faut aussi mentionner le démarrage d'un projet d'étude du fonctionnement du méristème apical, projet conduit par Jan Traas et Parick Laufs, son thésard. Certains gènes du cycle cellulaire ont été caractérisés à cette occasion par Heidi Feiler. Ce projet a donné naissance à un travail de modélisation du fonctionnement du méristème apical travail qui a suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique et certainement contribué à sa nomination comme directeur du laboratoire LPRD à la suite de Christian Dumas à l'ENS de Lyon.

Une dernière initiative a été la création d'une équipe de recherche sur le développement d'Arabidopsis : avec Yves Chupeau, nous nous sommes efforcés de convaincre Sylvie Pouteau et Valérie Gaudin à créer une petite équipe étudiant l'induction florale. Après divers rebondissements il reste de cette initiative un projet conduit par Valérie qui a identifié des mutants précoces affectés dans le gène Lhp1 qui s'est révélé avoir un rôle central dans le fonctionnement de la chromatine.

La présentation de ces divers thèmes de recherche illustre l'activité intense qui s'est construite sur le modèle Arabidopsis au LBC dans les années 1990. Le travail de caractérisation des mutants a donné lieu à des découvertes importantes sur le développement de l'hypocotyle et permis, au cours de cette période 1996-1999, de nombreuses publications dans des revues internationales. Et, au delà de la renommée du laboratoire qui s'est trouvée renforcée, plusieurs scientifiques ont acquis, à cette occasion, une réputation mondiale. Cependant, quelle que soit la satisfaction et la fierté du travail accompli, je dois reconnaître qu'au départ nous avions une double crainte.

D'une part, nous craignions de perdre le soutien de la direction de l'Inra qui nous jugerait trop fondamentalistes. Mais force est de constater que sur ce point, nous avons été régulièrement soutenus par la direction de l'Inra, Alain Coléno en particulier. D'autre part, nous redoutions de ne pas être compétitifs avec les laboratoires universitaires étudiant Arabidopsis un peu partout sur la planète. Sur ce point nous avons prouvé notre capacité à publier dans les meilleurs revues et nous occupons une place mondialement reconnue dans divers domaines. Reste préoccupante la taille de certaines des équipes, trop petites à mon avis pour garder longtemps une capacité de leader. Le projet d'étude de l'élongation de l'hypocotyle sur lequel nous avons bâti notre projet scientifique s'est émietté en petits groupes dirigés chacun par un chercheur sur poste Inra ou CNRS, réduisant ainsi notre force de frappe. La contrepartie de cet émiettement, c'est la diversité des approches qui permet à ceux qui viennent au LBC d'avoir une vue large et attractive de ce qu'est la biologie végétale.

LE DÉVELOPPEMENT DE LA GÉNOMIQUE D'ARABIDOPSIS EN FRANCE ET AU LBC

LES DÉBUTS : LA PRODUCTION D'EXPRESSED SEQUENCED TAGS (EST)

La génomique est un ensemble de technologies qui permettent de faire une étude systématique des gènes présents dans un génome et de leur fonction. Un événement important marque la montée de la génomique au niveau mondial. En 1992, Craig Venter publie un article dans la revue Nature présentant une liste de 2 672 EST issus d'ADNc de transcrits du cerveau humain (EST : Expressed Sequenced Tags). Son travail a consisté à séquencer systématiquement les inserts d'une banque d'ADNc construite dans un plasmide bactérien. Cette démarche systématique lui a permis d'identifier 2 500 gènes « nouveaux » avec un minimum de travail.

Les travaux de génomique sur les plantes ont commencé à se développer au cours des années 1990, dans le sillage des travaux menés sur le génome humain. Aux Etats-Unis, ces travaux ont bénéficié du soutien politique du Sénat renouvelé année après année. Paradoxalement, ce n'est pas l'USDA (United States Department of Agriculture,) mais la National Science Foundation des USA (NSF) qui a été chargée de promouvoir ce développement de la génomique végétale.

En France nous avons suivi l'exemple de Craig Venter, relayé par les travaux de Charles Auffray au Génomique. Nous avons décidé à Versailles de nous associer à quelques laboratoires travaillant sur Arabidopsis pour effectuer un travail similaire de production d'EST. Chaque laboratoire a construit une banque ADNc de ses tissus favoris et en a effectué le séquençage systématique. En 1993, notre groupement de recherche (GDR Arabidopsis comprenant neuf équipes, financé par le CNRS) publiait un inventaire de 1 152 gènes (non redondants), dans lequel chaque équipe a par la suite trouvé son bonheur (en l'occurrence un gène intéressant à étudier dans le cadre de leur thème de recherche).

C'est aussi à l'occasion de ce projet EST que le LBC, en l'occurrence Pierre Rouzé associé à Alain Charpentreau de l'Inra Toulouse a développé une base de données de séquences EST consultable sur le web. Ce travail représentait une première mondiale sur Arabidopsis, et de nombreux laboratoires ont repris par la suite notre démarche, en particulier Tom Newman et Chris Somerville. Des approches bioinformatiques ont été développées pour analyser ces ressources en gènes séquencés. La disponibilité de cDNA répertoriés nous a incités à faire quelques essais de puces à ADN. Il y avait une suspicion internationale à notre sujet, nos collègues craignant une rétention d'information (pas d'accès aux séquences et/ou aux clones) et il a effectivement fallu faire pression sur certains collègues français pour qu'ils acceptent de donner accès à leurs ressources.

LE SÉQUENÇAGE DES GÉNOMES VÉGÉTAUX (YAC)

En 1996, un consortium international coordonné par André Goffeau, biologiste de l'Université catholique de Louvain, a publié dans la revue *Science* la séquence complète du génome de la levure. Ce travail a réellement ouvert la voie à l'inventaire systématique des gènes d'un être vivant (avant même le séquençage intégral du génome d'une bactérie *Helicobacter pylori*, séquencé par l'équipe de Craig Venter en 1997). C'est en particulier le génome humain qui est devenu la nouvelle priorité internationale de séquençage génomique, mais les végétalistes se sont eux aussi organisés pour étudier et séquencer intégralement le génome d'une plante, l'Arabette des dames, *Arabidopsis thaliana*. (Programme intitulé "Multinational Coordinated *Arabidopsis thaliana* Genome Research Project"). En particulier un soutien au séquençage de son génome est initié dès 1995 (création de l'AGI, *Arabidopsis* Genome Initiative). Comme chez la levure le principe du séquençage était d'effectuer l'opération en deux temps. Une première étape consistait à effectuer une couverture complète du génome à l'aide de fragments génomiques clonés chevauchants. Ces clones chevauchants étaient propagés après clonage/insertion dans un vecteur levure, dit YAC (Yeast Artificial Chromosome). Ils comportaient des inserts d'une taille de 50 à 500 kilobases. Par la suite chaque clone était séquencé en « Shot Gun » et les séquences obtenues étaient assemblées en utilisant le logiciel BLAST pour déterminer leurs chevauchements. Nos concurrents n'ont pas été très soigneux et leurs banques YAC comportaient une grande proportion d'inserts chimériques (deux morceaux d'ADN provenant de deux chromosomes différents dans un même clone) qui ne s'assemblaient pas correctement créant ainsi beaucoup de confusion.

Le GREG (Groupement de recherches et d'études sur les génomes crée par Piotr Slominski, directeur du Centre de Génétique Moléculaire du CNRS à Gif-sur-Yvette de 1971 à 1991) a été la première initiative nationale de recherche sur les génomes, et c'est dans ce cadre que nous avons pu obtenir le soutien de projets sur les génomes végétaux, en particulier la construction et l'organisation d'une banque YAC couvrant le génome d'*Arabidopsis*. Ce programme GREG était trop beau pour durer (ses détracteurs critiquaient le gaspillage de crédits) et il a été clôturé en 1996, peu après mon départ en année sabbatique au Japon, au RIKEN, à l'automne 1996. Le GREG était très novateur dans son fonctionnement. Il procédait par appel d'offres et les projets soumis pouvaient inclure des fonds pour embaucher des Contrats à durée déterminée. Un comité d'expertise international sélectionnait les projets.

C'est dans ce contexte que j'ai constitué et coordonné un consortium de cinq laboratoires dont le but était de réaliser une carte physique du génome d'*Arabidopsis*, préalable à son séquençage et à son utilisation pour des projets de marche chromosomique. Les équipes de Jérôme Giraudat, Michel Delseny, Michel Dron, Claude Gigot, Bernard Lescure Jean-Claude Kader et Régis Mache se sont associées pour mener à bien ce travail. L'équipe de Daniel Cohen du CEPH (Centre d'Etude de Polymorphisme Humain), experte dans la technique YAC a été approvisionnée en ADN d'*Arabidopsis* de très haut poids moléculaire, isolé à partir de protoplastes. Une banque de 1 150 clones YAC dont les inserts ont une taille moyenne de 450 kb et comportant seulement 5% de clones chimériques a été construite. Les clones YAC ont été assemblés par cartographie d'EST selon la technique de PCR dans les cinq laboratoires partenaires. Une fois le génome couvert, les inserts clonés et séquencés ont fourni les séquences assurant la couverture de ce génome.

Le travail basé sur EST et sur le séquençage YAK a présenté un pas important dans la génomique des végétaux.

LA COLLECTION DE MUTANTS D'INSERTION DANS LE GÉNOME D'*ARABIDOPSIS* (ADN-T)

Parmi les projets de génomique développés à Versailles, la création d'une collection de mutants d'insertion dans le génome d'*Arabidopsis* a suscité un grand intérêt de la communauté internationale. L'histoire commence avec l'idée de Kenneth A. Feldman d'incuber des graines d'*Arabidopsis* avec une agrobactérie porteuse d'un gène de résistance à un antibiotique. Ken affirmait obtenir à faible fréquence des transgéniques dans la descendance des graines imbibées transgéniques qu'il sélectionnait à l'aide d'un antibiotique. Lors d'un voyage aux Etats-Unis, en 1995, j'ai visité quelques laboratoires à réputation sulfureuse pour me faire une opinion de leur travail. À Urbana Champaign j'ai vu la tentative d'obtenir des transgéniques de maïs en traitant du pollen par un plasmide, mais le résultat n'était pas convaincant. À l'université de Cornell, John Sanford développait la biolistique. Un de ses étudiants utilisait un canon à particules pour envoyer des billes couvertes de plasmide dans des pelures d'oignon et révéler l'expression de GUS aux points d'impact. Ça ne m'a pas paru sérieux, bien à tort, car la biolistique est toujours employée contrairement aux liposomes ! J'ai rendu visite à Ken qui travaillait chez Zoecon, une start up californienne. Il m'a présenté son travail, mettant en évidence un processus de transformation « in planta » nouveau. Virginia Walbott prédisait "If he is wrong, his scientific life is dead !" La technique d'incubation des graines avait donné des résultats, et ceci seulement

dans son laboratoire, et de manière irrégulière. Il avait de cette manière, obtenu des dizaines de milliers de transgéniques dont certains montraient des mutations liées au marqueur de transformation/sélection. L'accès à cette ressource était bloqué par Zoecon ... sauf accord de propriété industrielle donnant tous les droits à cette firme. J'étais convaincu par le travail de Ken.

A mon retour des Etats-Unis, nous avons constitué un petit groupe de réflexion (David Bouchez, Georges Pelletier, Nicole Bechtold, Jeff Ellis alors en séjour sabbatique au LBC et moi). David a tout d'abord construit

SÉJOUR SABBATIQUE AU RIKEN (JAPON), SEPTEMBRE 1996 – AOÛT 1997

En 1995, face aux difficultés rencontrées pour la création et l'installation du laboratoire de biologie des semences, j'ai souhaité prendre une année sabbatique pour approfondir mes connaissances dans divers domaines et réfléchir à la poursuite de mes recherches, voire à de nouvelles orientations. J'ai tout d'abord frappé à la porte du laboratoire de Jerry Fink, généticien de la levure *S. Cerevisiae*. Jerry et ses collègues s'intéressaient à la biosynthèse de l'auxine à partir du tryptophane chez les plantes, la levure étant utilisée pour reconstruire cette voie de biosynthèse. Son laboratoire était installé à l'institut Whitehead, à Boston. Je pensais venir avec mes enfants, mais les frais d'étude étaient très élevés, et j'ai renoncé à ce projet, Jerry n'ayant pas de bourse à me proposer pour résoudre ce problème.

J'ai par ailleurs été invité à un colloque au Japon organisé par Roland Douce au mont Hiei pour célébrer les travaux pionniers du Professeur Akazawa. C'est ainsi que j'ai découvert les programmes de recherches du RIKEN appelés International RIKEN frontier programs. Mais pourquoi ce « Frontier program » ? Les frontier programs avaient pour but de désenclaver la recherche au Japon où la majorité des équipes fonctionnaient en circuit fermé (langue Japonaise, langue principale des laboratoires, absence d'expérience internationale des scientifiques recrutés, consanguinité). Dans les laboratoires du Frontier program, la langue principale était l'anglais, plus de 50% des effectifs était non Japonais, et l'ensemble des personnels était sous contrat de type Cdd.

Un de ces programmes établi à Tokyo portait sur l'étude des plantes. Il était dirigé par deux scientifiques de renommée internationale : d'une part Dick Kendrick, ami de Maarten Koornneef, et intéressé par les processus de photomorphogénèse impliquant les phytochromes chez la tomate et, d'autre part, Yuji Kamiya intéressé par les gibbérellines, leur synthèse et leur mode d'action chez *Arabidopsis* et la tomate. L'un et l'autre étaient supervisés par le Professeur Nobutaka Takahaschi, découvreur de la voie de biosynthèse des gibbérellines. De fait ils avaient une liberté totale de choix de leurs recherches.

Finalement, j'ai choisi de prendre mon année sabbatique au Laboratory for photoperception and signal transduction dirigé par le Professeur Dick Kendrick. J'ai bénéficié d'un contrat de « visiting professor » de l'« Eminent scientist invitation program ». Mon intérêt scientifique était de pouvoir travailler sur un thème en rapport avec l'un des programmes de recherche développés à Versailles sur l'élongation de l'hypocotyle. Au RIKEN Wakoshi on travaillait sur les gibbérellines, les brassinostéroïdes, et la modulation de l'hypocotyle par la lumière, trois domaines se rattachant aux mécanismes d'élongation. Je me suis installé à Wakoshi le 1^{er} Septembre 1996 jusqu'au 31 Août 1997. Durant mon séjour, je me suis remis à la paillasse. Si j'ai choisi de travailler chez Dick Kendrick, c'est en particulier pour m'initier à l'étude de la photomorphogénèse chez les plantes.

Dans un premier temps j'ai voulu valider l'identité d'une série de mutants au phénotype supernain, isolés à Versailles. Un test de complémentation par fourniture de brassinostéroïdes synthétisés par des collègues argentins s'était révélé négatif, et par ailleurs les mutants étaient insensibles aux GAs (gibbereline). J'ai collaboré avec un collègue du RIKEN, le Dr Fujiyoka. Ce dernier m'a approvisionné en brassinostéroïdes qui se sont révélés capables de réverser le nanisme des mutants que j'avais ramenés de Versailles. Il m'a fallu de la diplomatie car Fujiyoka travaillait par ailleurs avec Joanne Chory au Salt Institute (San Diego aux Etats-Unis). J'ai raté de peu l'identification génétique de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes. Sylvère Pagant a poursuivi ce travail de caractérisation en venant faire un séjour au RIKEN.

Disposant de sondes moléculaires pour mesurer le niveau d'expression de gènes de biosynthèse des gibbérellines et des brassinostéroïdes, j'ai étudié le couplage de ces deux voies de biosynthèse. Une mutation de la voie de synthèse des GAs (*ga1*, *ga4*) provoque une forte augmentation de l'expression de ces gènes de biosynthèse des GAs. Ceci peut être expliqué par un mécanisme de dérepression de la voie en l'absence du produit final. De même une mutation de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes (Ex : *det2*, *cpd*) provoque une forte augmentation de l'expression de ces gènes de biosynthèse des brassinostéroïdes. Cependant il n'y a pas de couplage entre les deux voies : une mutation de la voie de synthèse des GAs n'induit pas la surexpression de gènes de la voie des brassinostéroïdes, et réciproquement. Les deux classes de molécules n'ont pas des effets redondants.

J'ai été ravi de faire de la biologie moléculaire au RIKEN (clonage dans un vecteur bactérien, PCR, northern blot, interrogation de bases de données, Fasta et Blast, etc.), ce que je n'avais plus le temps de faire à Versailles. Mon séjour s'est agréablement complété avec la visite de nombreux laboratoires universitaires où j'ai été invité à donner des conférences sur nos travaux à Versailles.

un vecteur *Agrobacterium* conférant la résistance à un herbicide, le Basta, plus commode d'emploi qu'une résistance à un antibiotique. David a réussi à reproduire les expériences de Feldman et à augmenter les fréquences de transgéniques obtenus. L'ADN-T du vecteur comportait un piège à promoteur à l'extrémité de l'ADN-T, en l'occurrence une séquence codante GUS dépourvue de promoteur. Feldman avait montré que les transformants étaient tous hétérozygotes pour l'insertion d'ADN-T, ce qui était peu compatible avec le transfert d'ADN dans la graine. David Bouchez inocula des plantes entières après recepage et améliora encore la fréquence de transformants.

C'est finalement Georges Pelletier et Nicole Bechtold qui ont eu l'idée d'aller un peu plus loin en recherchant des transgéniques dans les descendances de plantes inoculées par infiltration d'inflorescences. À notre grand étonnement, l'analyse des transgéniques montrait quelque fois des remaniements diaboliques. Cette approche permit d'obtenir, en moyenne, une centaine de transgéniques par plante agroinfiltrée, soit une centaine de fois plus que l'inoculation de graines. Toutes les conditions étaient réunies pour générer une collection de mutants d'insertion. Pour la réaliser il fallait des serres et du personnel, ce qui venait d'être donné à Georges Pelletier, nommé directeur du laboratoire de génétique de Versailles. Une collection de plus de 50 000 lignées d'insertion a été créée par l'équipe de Georges installée dans les nouveaux locaux du département Génétique et amélioration des plantes (GAP) à Versailles.

Pour exploiter au mieux cette collection, en 1995, un nouveau GDR Arabidopsis a été constitué sur le thème de l'analyse fonctionnelle du génome d'Arabidopsis, incluant des équipes de l'Inra et du CNRS et coordonnée par Georges Pelletier et Michel Delseny. Le programme a stimulé de manière efficace la création de nombreux projets initiés par la découverte d'un gène « étiqueté », et ceci à une fréquence moyenne de 20 % des phénotypes mutés étiquetés. Il faudra attendre Génoplante pour exploiter la collection par une approche dite de « génétique reverse » qui va de la séquence du gène au phénotype muté et à la fonction.

Nous avons obtenu une couverture de 94 % du génome par cette technique. Sur cette base l'assemblage des séquences génomiques d'Arabidopsis a été considérablement simplifié et la banque YAC-CIC a été mondialement utilisée par les travaux de clonage positionnel et par le séquençage contribuant ainsi à la renommée du laboratoire de biologie cellulaire. Plusieurs laboratoires du CNRS, dans la foulée, ont contribué au séquençage d'*Arabidopsis*. Nous avons choisi à Versailles de promouvoir la participation du Génomoscope comme partenaire français et de travailler sur l'annotation de ce génome séquencé.

À ce stade, nos collègues de l'industrie ne voyaient pas d'intérêt à utiliser la collection ADN-T, sauf la nouvelle start up « Crop Design » qui a collaboré avec le Laboratoire de biologie cellulaire pour identifier des gènes du cycle cellulaire. Du côté de la recherche, la direction de la valorisation de l'Inra n'a pas considéré la possibilité de breveter cette technologie révolutionnaire, mais a mis un certain nombre de contraintes sur la distribution des lignées produites à Versailles ce qui n'a pas été apprécié par la communauté internationale de recherche sur Arabidopsis.

LE LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES SEMENCES (LBS) AU SEIN DE L'INA PARIS-GRIGNON (1996 - 1998)

UN PROJET SCIENTIFIQUE AMBITIEUX MAIS UN ÉCHEC IMMOBILIER

À Versailles, au LBC ma situation était inconfortable depuis le décès de Jean-Pierre Bourgin survenu en 1994. Nous étions deux à être prêts à prendre la succession de Jean-Pierre, Yves Chupeau, dans la logique de gestionnaire qu'il avait eu jusque là, et moi-même qui m'étais investi dans la création d'équipes nouvelles au sein du LBC et dans divers projets où je jouais le rôle de porte parole du laboratoire (Programmes Cadre 4, 5 et 6 de la Commission européenne, AMICA, Programme de biologie du développement du MRT, GDR Arabidopsis, TAIR, etc.). Yves Chupeau tenait beaucoup à prendre la direction du LBC, certainement par fidélité à la mémoire de Jean-Pierre. Bien que beaucoup au LBC souhaitent que je succède à Jean-Pierre, j'ai renoncé à engager une bataille avec Yves sur cette question. Avec le recul des années, Yves Chupeau était certainement un meilleur directeur que moi pour répondre aux exigences administratives de l'Inra. Un autre chemin s'est ouvert pour moi.

En 1995, j'ai été sollicité par Paul Vialle, à l'époque directeur de l'INA Paris-Grignon, pour prendre un poste de professeur dans cette école d'ingénieurs renommée. Sa proposition me semblait intéressante à condition d'associer ce poste à la création d'un nouveau laboratoire sur le site de l'INA, laboratoire qui serait pour les étudiants une vitrine de la recherche agronomique. Marc Jullien, professeur du département de biologie de l'INA m'a fortement encouragé à prendre cette responsabilité. L'école avait été longtemps un établissement qui donnait naissance à des vocations scientifiques, mais ces dernières années les élèves avaient boudé les

métiers de la recherche. Nombreux étaient ceux qui à cette époque choisissaient de travailler au Crédit agricole ou dans les chambres d'agriculture. En prenant le poste de professeur consultant, j'espérais susciter des vocations de chercheurs parmi les étudiants. Ayant pris mes fonctions, il me fallait choisir une nouvelle thématique de recherche, plutôt que de « racoler » une des équipes de LBC et de ce fait affaiblir ce que j'avais contribué à construire. Depuis la fermeture du laboratoire des protéines crée par Jean Mossé à Versailles il n'y avait plus de laboratoire travaillant sur la biologie de la graine à l'Inra, thème de recherche essentiel pour un institut d'enseignement dédié à la recherche agronomique. J'ai donc décidé de créer un laboratoire d'étude des graines, intitulé laboratoire de biologie des semences. Il fallait constituer une équipe sur ce thème et créer des locaux de recherche à l'INA pour l'accueillir. En attendant de disposer de ces locaux, l'équipe s'est constituée provisoirement sur Versailles. J'ai eu la chance de recruter Loïc Lepiniec à son retour de post doc à Gand dans le laboratoire de Dirk Inzé. C'est avec lui que j'ai bâti la nouvelle équipe.

Notre projet visait à utiliser la collection de mutants d'insertion ADN-T générée par la technique Versaillaise d'Agroinfiltration. 50 000 lignées avaient été produites et multipliées dans le laboratoire de génétique dirigé par Georges Pelletier. Loïc Lepiniec a entrepris l'inventaire des lignées ségrégeant des mutants affectés dans la graine. Le criblage était très vaste au départ et incluait les mutants embryons léthaux, les mutants déficients pour le remplissage des graines, les mutants de structure et de couleur de l'enveloppe de la graine etc.. Bertrand Dubreucq qui est venu en thèse dans notre équipe avant d'être affecté à l'Inra de Bordeaux (où il n'est finalement pas parti !) a effectué un premier crible identifiant les mutants défectifs pour la germination. Au cours d'un séjour dans le laboratoire de Maarten Kornneef il a aussi caractérisé des lignées T-DNA dans lesquelles l'insertion s'était produite de telle manière que la séquence GUS située à l'extrémité de l'ADN-T se retrouve placée sous le contrôle d'un promoteur de la plante (technique de trappe à promoteurs) et exprimée dans un des tissus de la graine. De tels promoteurs sont utiles pour caractériser le développement de la graine et par exemple pour révéler l'absence d'un tissu particulier chez un mutant de la graine. Bien qu'aïdés par une technicienne et un ingénieur, la tâche était immense, et à vrai dire trop vaste. J'ai demandé à Loïc Lepiniec de renoncer à étudier les mutants affectés dans l'embryogénèse pour ne garder que les mutants de remplissage, ainsi que les mutants affectés dans l'enveloppe de la graine. Il a fini par s'y résoudre devant l'ampleur du travail à accomplir.

Deux recrutements importants ont converti ce qui était au départ une nouvelle équipe du LBC en laboratoire autonome. Anne Marie Lescure, Directeur de recherches du CNRS, qui travaillait à Grenoble dans le laboratoire de Régis Mache a souhaité se rapprocher de sa famille en région parisienne et je lui ai proposé de rejoindre le LBS. Elle apportait avec elle un projet d'étude de la phytase du maïs, enzyme impliquée dans la mobilisation des réserves en phosphore de la graine à sa germination. Je lui ai demandé si elle accepterait de co-diriger avec moi le nouveau laboratoire, ce qu'elle a bien voulu faire. Sa venue à Versailles a fait le bonheur de tous au LBS. À sa retraite, Annie Marion-Poll prendra sa succession.

Stabilisé en effectifs et dans ses thèmes de recherche en 1999, le LBS n'a pas, en revanche, vu aboutir le projet de création des locaux de recherche du LBS au sein de l'INA P-G. Un projet architectural important devait aboutir à la rénovation complète du département de biologie de l'INA et à la création de 1500 m² de laboratoires. L'INA était maître d'œuvre et recevait un soutien de l'Inra. Le projet s'est révélé beaucoup plus difficile à réaliser que prévu... et s'est soldé par un échec. Cet échec est dû à un défaut majeur de traçabilité de l'utilisation des fonds Inra versés à l'INA pour la réalisation du projet. Une fois les fonds versés par l'Inra, il s'est avéré que l'INA manquait probablement des fonds nécessaires à sa propre contribution aux travaux, a demandé à l'Inra une « rallonge » augmentant au fil des mois jusqu'à atteindre plusieurs millions de Francs. La direction de l'INA avait certainement jugé, à tort, que je n'oserais jamais arrêter ce projet et que mes bonnes relations avec le directeur général de l'INA permettraient d'obtenir tous les fonds nécessaires, y compris pour des travaux autres que ceux prévus pour l'implantation du laboratoire. Je me suis senti utilisé comme otage par l'INA dans cette opération et ceci m'a amené à renoncer à réaliser cette implantation. De ce fait les équipes du LBS sont restées sur le site de Versailles et travaillent dans des conditions difficiles faute de place suffisante malgré les efforts de réorganisations effectuées. Un projet de réimplantation des laboratoires sur le site de Versailles dans le bâtiment des sciences du sol est resté à l'étude année après année.

Cette situation qui a perduré a créé au fil des années a suscité des ressentiments justifiés chez nos collègues du LBC, et ce n'est qu'à la création de l'Institut Jean-Pierre Bourgin en 2004 que cette source de conflit a été définitivement supprimée, du fait d'une réorganisation générale des différentes équipes de biologie végétale à Versailles. Cinq ans après sa création en 1995, le laboratoire de biologie des semences comprenait dix chercheurs du fait de la venue de collègues de divers laboratoires : Christine Rochat et Jean-Pierre Boutin du laboratoire de nutrition azotée des plantes ; Annie Marion-Poll ; Anne-Marie Galle, chercheur Inra venue de l'université Paris VII) et, enfin, Philippe Grappin enseignant chercheur travaillant avec Marc Jullien à l'INA P-G.

LES RÉUSSITES SCIENTIFIQUES DU LBS

Les recherches menées au LBS avaient pour objectif d'étudier les mécanismes de développement et de remplissage de la graine ainsi que les processus de dormance et de germination. Quatre axes de recherche y ont été développés, regroupés en deux thèmes, depuis sa réorganisation conjointe avec l'unité de Nutrition azotée des plantes et le LBS à la fin de 1999. Dans ces différents thèmes de recherche, le laboratoire de biologie des semences a acquis une excellente réputation en France. Sur certains projets, il est devenu leader mondial (voie de biosynthèse des flavonoïdes, contrôle transcriptionnel de la maturation de la graine, biosynthèse de l'ABA). Mon seul regret est que j'aurais aimé élargir les recherches du LBS sur les graines à une espèce de grande culture, céréale de préférence.

CONTRÔLE DU REMPLISSAGE DE LA GRAINE

Ce thème a été développé par Bertrand Dubreucq et Sébastien Baud (jeune et brillant chercheur exposant son travail de manière limpide) et Nathalie Berger. Une centaine de mutants affectés dans le développement et/ou le remplissage de la graine sont caractérisés en collaboration avec cinq autres équipes. Ces mutants issus de la collection de lignées ADN-T ont donné accès à divers gènes d'intérêt pour l'accumulation de réserves dans les graines. Par exemple la caractérisation d'un mutant embryon léthal a permis d'identifier une classe de gènes intervenant dans la glycosylation des protéines de réserve et leur accumulation dans les corps protéiques.

Afin de focaliser les recherches sur les régulateurs du développement et remplissage de la graine, une étude systématique a été entreprise pour identifier des facteurs de transcription exprimés dans la graine et étudier leur fonction par une approche de génétique reverse. Des approches génétiques (e.g. simple et double hybride) et biochimiques (coprécipitation) ont été également développées pour identifier des cibles et des partenaires de ces protéines. Actuellement 4 mutants de facteurs de transcription affectés dans le développement / le remplissage de la graine sont en cours de caractérisation par la petite équipe de Bertrand Dubreucq (rôles de *Lec2*, *Fus 2*, *Abi 3*, et *Wri 1* dans l'accumulation des réserves. *Wri 1* s'est révélé spécifiquement impliqué dans la synthèse et le stockage des réserves lipidiques (travaux de Sébastien Baud)

MÉTABOLISME ET RÉSERVES LIPIDIQUES DE LA GRAINE

Développé par Christine Rochat, Martine Miquel, Jean-Pierre Boutin, Jean-Marc Routaboul et Sébastien Baud, ce thème porte plus particulièrement l'accumulation des réserves carbonées (glucides et lipides) au cours du développement de la graine d'*Arabidopsis*. Des études ciblées visent à étudier l'expression spatio-temporelle d'enzymes et de transporteurs intervenant dans les voies métaboliques mises en place au cours du développement de la graine pour la synthèse et le stockage des réserves carbonées. Des travaux d'analyse fonctionnelle des gènes correspondants portent sur leur caractérisation biochimique et cytologique. Ainsi, la Diacyl Glycérol Acyl Transférase et l'Acétyl CoA carboxylase (ACCase) ont été identifiées au niveau moléculaire. Cette dernière enzyme est la cible des mutations *Pas 3* identifiées par le groupe de Jean Denis Faure (LBC-INA).

Les lipides sont stockés sous forme d'oléosomes, véritables réservoirs à triglycérides. La surface de ces oléosomes est tapissée de protéines particulières, les oléosines, dont une partie est hydrophile et l'autre hydrophobe. Martine Miquel étudie le mécanisme par lequel la taille des oléosomes est contrôlée par les oléosines disponibles.

ETUDE DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES EXPRIMÉE DANS L'ENVELOPPE DE LA GRAINE

Sur ce thème Nathalie Nesi et Isabelle Debeaujon ont identifié de nombreux gènes intervenant dans cette voie de biosynthèse qui joue un rôle essentiel dans la qualité des produits végétaux (antioxydants, tannins, pigments, etc.) et Jean-Marc Routaboul a développé les outils analytiques (Spectrométrie de masse en particulier) nécessaires à l'identification de ces flavonoïdes.

L'enveloppe de la graine est aussi étudiée au sein de l'équipe, car elle est le siège de processus physiologiques importants (transport des métabolites vers l'embryon en particulier) et sa composition constitue au même titre que les réserves accumulées dans l'embryon, une des composantes de sa qualité. L'équipe étudie en particulier l'accumulation des flavonoïdes dans l'enveloppe de la graine, et caractérise les gènes impliqués dans le contrôle de leur biosynthèse. Divers gènes « transparent testa » contribuant à cette voie de biosynthèse ont été identifiés, dont trois gènes régulateurs et deux enzymes impliquées dans les étapes aval de la voie de biosynthèse.

Jean-Marc Routaboul a développé les outils analytiques (Spectrométrie de masse en particulier) nécessaires à l'identification de ces flavonoïdes en collaboration avec l'équipe de Jacques Einhorn (Inra Versailles Phytopharmacie) et celle de Véronique Cheynier (Inra Montpellier, département de Transformation des produits végétaux).

ETUDE DE LA DORMANCE ET DE LA GERMINATION DE LA GRAINE

Le rôle de l'ABA dans la dormance des graines et la synthèse de cette hormone sont étudiés par Annie Marion-Poll, Helen North, Anne Frey et plusieurs thésards. L'acide abscissique (ABA) est une hormone végétale qui joue un rôle déterminant dans le développement et la germination des graines et dans la tolérance des plantes aux stress. L'analyse moléculaire de la voie de biosynthèse de l'ABA, liée à celle des caroténoïdes dont cette hormone dérive, et l'étude de sa régulation présentent de multiples intérêts et constituent l'axe majeur de recherche de cette équipe. L'expression du gène de la zéaxantine époxydase a ainsi été analysée en détail afin d'évaluer sa contribution à la régulation de la synthèse d'ABA lors d'un stress hydrique et au cours du développement des graines. L'équipe étudie également d'autres étapes de conversion des caroténoïdes précurseurs de l'ABA, en particulier la synthèse de néoxanthine et son clivage en xanthoxine. Un nouveau thème a été récemment développé par Helen North. Il porte sur l'étude du mucilage de la graine (rôle et biosynthèse).

Marc Jullien et Philippe Grappin étudient les processus physiologiques qui accompagnent la levée de dormance et la germination des graines. En particulier Philippe Grappin a découvert et analysé les processus de réparation des protéines au cours du stockage des graines, un des résultats marquants.

Des approches protéomiques menées par Loïc Rajou complètent cette démarche. Ces approches consistent à réaliser des cartes protéiques par électrophorèse 2D, isolement des spots et analyse/identification en spectrométrie de masse MALDI TOF des produits de digestion tryptique. 350 protéines ont été repérées et identifiées sur les gels sur la base de leur séquence partielle. Un grand nombre d'entre elles montrent des variations quantitatives spécifiques du caractère dormant.

L'étude de la phytase porte sur la mobilisation des réserves minérales, thème initialement développé par Anne Marie Lescure et Sébastien Maugeness, et arrêté avec le départ à la retraite d'Anne-Marie.

Au terme de cette aventure, je ne mentionnerais qu'un seul regret, de nature scientifique, celui de ne pas avoir pu élargir les recherches du LBS sur les graines à une espèce de grande culture, céréale de préférence. En effet, au final, malgré les conditions matérielles initiales peu favorables le laboratoire de biologie des semences a acquis une excellente réputation en France, ce qu'attestent ses nombreuses publications. Sur certains projets il est même devenu leader mondial (voie de biosynthèse des flavonoïdes, contrôle transcriptionnel de la maturation de la graine, biosynthèse de l'ABA). Si l'implantation du LBS à l'INA P.-G. n'a pas abouti, toutefois il s'est fait à Versailles de la science de bon niveau.

LA RÉORGANISATION DES RECHERCHES EN BIOLOGIE VÉGÉTALE À VERSAILLES

Les conditions de travail ne s'étaient pas fondamentalement améliorées durant mon absence et il fallu attendre l'année de mon retour du Japon, 1998, pour que soit mise en œuvre une nouvelle réorganisation, à laquelle j'ai contribué, de la recherche dans le bâtiment de biologie végétale de l'Inra de Versailles. L'objectif était d'aboutir à une meilleure lisibilité de l'organisation de la recherche effectuée au laboratoire du métabolisme (LM), au laboratoire de biologie cellulaire (LBC) et au laboratoire de biologie des semences (LBS).

En effet, des thèmes de recherche développés au LBC dans le domaine du métabolisme du nitrate par Christian Meyer, Françoise Vedele et H.N. Truong pouvaient avoir une synergie avec les travaux développés sur le métabolisme de l'ammonium par Bertrand Hirel au laboratoire du métabolisme. Il a donc été décidé de rattacher l'équipe travaillant sur le métabolisme du nitrate au LM et d'implanter cette équipe dans les locaux du LM. Par ailleurs l'équipe d'Annie Marion-Poll travaillant sur le métabolisme de l'ABA et son rôle dans la dormance de la graine, et l'équipe de Christine Rochat et Jean-Pierre Boutin étudiant le métabolisme carboné de la graine et son remplissage en amidon ont rejoint le LBS. Cette réorganisation aboutit à renforcer le thème « métabolisme azoté » du LM et étoffer le LBS en y adjoignant deux équipes travaillant sur la graine.

Le LBC a aussi de ce fait renforcé son identité dans le domaine de la biologie du développement. Cette réorganisation a été appréciée du Département de biologie. Un nouveau thème de recherche sur le phloème a été mis en place (Sylvie Dinant et Jean-Christophe Palauqui). L'équipe d'Herman Höfte initialement axée sur les mécanismes d'élongation s'est focalisée sur l'étude de la synthèse de la paroi et de la cellulose en particulier. L'équipe de Jan Traas a été renforcée afin d'atteindre une masse critique pour l'étude du fonctionnement du méristème apical. Une négociation avec la nouvelle société « Crop Design » a abouti à un partenariat de cette société avec les équipes de David Bouchez (identification de knock out dans des gènes de cycles

cellulaires) et l'équipe de Jan Traas (fonctionnement du méristème apical dans des mutants de gènes de cycle cellulaire).

À partir de juillet 1999, mes nouvelles charges m'ont amené à renoncer à suivre les programmes de recherche développées au LBC, faute de disponibilité. Les travaux de biologie du développement que j'avais initié dès 1985 avec Jean-François Muller (mutants hormonaux de Nicotianées affectés dans le développement racinaire ou foliaire) représentent aujourd'hui une activité majeure du laboratoire qui est devenu l'un des plus importants sites de recherche en biologie du développement végétal de notre pays, en compétition avec le LBDP de l'ENS de Lyon.

LE PROGRAMME GÉNOPLANTE : ÉTENDRE L'ÉTUDE DU GÉNOME AUX PRINCIPALES PLANTES CULTIVÉES

LA GENÈSE D'UN PROGRAMME SCIENTIFIQUE AMBITIEUX DANS LE CONTEXTE INTERNATIONAL DES ANNÉES 1990

La deuxième moitié des années 1990 a été marquée par l'essor des approches génomiques appliquée aux plantes cultivées. L'essor de la génomique dans le domaine végétal est, nous l'avons vu, axé sur l'étude du génome d'*Arabidopsis*. Il restait à faire bénéficier les plantes cultivées de cet essor. En 1997 la National Science Foundation élargit son soutien à la génomique des plantes cultivées telles que le maïs, la tomate, le soja, etc. Elle lance un programme d'inventaires EST sur trente espèces végétales cultivées avec un budget de 320 millions de dollars attribué à ce programme. Des entreprises comme Monsanto et Syngenta lancent leurs projets avec la perspective de breveter les gènes d'intérêt susceptibles d'une application en amélioration des plantes. La NSF est stimulée dans son effort par l'annonce faite par Monsanto, en 1997, de séquencer le génome d'*Arabidopsis* (travail effectué par sa filiale Cereon, en concurrence avec l'*Arabidopsis* Genome Initiative). Dès 1995, la création au Japon du Rice Genome Project pour séquencer le génome du riz laisse planer un doute sur l'accès public à cette nouvelle ressource. De leur côté, les sociétés Monsanto et Syngenta entreprennent aussi le séquençage du riz pour en breveter les gènes. Une course est engagée entre chercheurs du secteur public et firmes privées.

À ce stade, il faut faire le point sur l'état des recherches sur les génomes de plantes cultivées en France, et en particulier à l'Inra durant les années 1990. À titre d'exemple, *Pto* est un gène de résistance au pathogène *Pseudomonas syringae* identifié chez la tomate à l'Inra d'Avignon. En 1993 le laboratoire de Steve Tanksley aux USA clone ce gène *Pto*. Cette identification basée sur la technique de clonage positionnel est un exploit, plusieurs années de travail ayant été nécessaires pour aboutir. Il est aussi intéressant de noter que ce fut le premier gène de résistance aux maladies isolé chez une plante malgré la puissance du modèle d'*Arabidopsis*. J'avais effectué à mon retour du Japon une enquête sur les gènes considérés par l'Inra comme présentant un grand intérêt scientifique/agronomique. Cette enquête montrait qu'il y avait un nombre important de cibles agronomiques qui comme *Pto* mériteraient d'être identifiées au niveau moléculaire, donnant ainsi accès à leur fonction et à leurs orthologues dans d'autres espèces. Michel Dron avait obtenu un crédit d'un million de francs pour réaliser ce type de projet, mais faute d'infrastructures de génomique disponibles ce programme a échoué. Pour les autres cibles de biotechnologies végétales, à l'exception de la mise au point de techniques de transformation, le département de Génétique et d'amélioration des Plantes (DGAP) était distancé et l'essentiel de son savoir faire restait axé sur l'analyse QTL associée à l'utilisation des RFLP. Il n'y avait pas de projet de génomique en ce qui concernait les plantes de grande culture. De plus, il y avait au département de Génétique et amélioration des plantes (DGAP) une certaine défiance à l'égard de ces approches moléculaires jugées inadaptées à l'analyse de caractères quantitatifs.



© Inra / Collection Caboché.

Michel Caboché avec, à sa droite, Kendrick Dick (spécialiste de la photomorphogénèse chez la tomate aux Pays-Bas), pendant le séjour au RIKEN (Wakoshi) au Japon en 1996, lors d'une cérémonie du thé.

UN PARTENARIAT PUBLIC/PRIVÉ NOVATEUR

Du côté privé l'anxiété grandit, force est de constater que très peu de travaux de la recherche publique portent sur la génomique des plantes cultivées. La crainte de voir les gènes de plante brevetés en série aux États-Unis pousse nos collègues de l'industrie à s'organiser. Une société de biotechnologie, Biogemma, filiale de Limagrain et Pau-Euralys, est créée. Le 22 Juillet 1997, une réunion historique est organisée au siège de Rhône Poulenc. Alain Godard et Pascal Housset y accueillent Pierre Pagesse, président de Limagrain, Paul Vialle, directeur général de l'Inra, Guy Riba, directeur scientifique à l'Inra, Michel Debrand, Pierre Cathala et moi-même qui avait dû faire le voyage depuis le Japon.

La décision est prise d'unir les efforts publics et privés pour développer un programme national de Génomique végétale. On prévoit de collaborer pour analyser les génomes du Blé, du Riz, du Maïs, du Colza et d'exploiter la collection ADN-T pour identifier des gènes « d'intérêt agronomique ». Le 15 Octobre 1997 au siège de Biogemma, on convient de constituer un Groupement d'intérêt scientifique (GIS) ou un Groupement d'intérêt économique (GIE) « Biotechnologie des grandes cultures » qui soutiendra les objectifs communs des partenaires. Un nom est cherché pour ce GIE, ce sera GENOPLANTE, sur la proposition de Renaud Leblond, directeur du marketing stratégique et de la communication chez Limagrain agro-industrie. De nombreuses réunions seront nécessaires pour monter ce programme de génomique. Une réunion à l'hôtel Méridien Montparnasse est organisée en Octobre 1997. À cette réunion, on commence à bâtir l'organisation d'un programme de génomique qui pourrait inclure les objectifs suivants : machines à étiquetage de gènes chez Arabidopsis et Maïs ; analyse QTL chez le blé ; alliance sur le génome du riz avec le Japon ; recherche de cibles herbicides ; identification de gènes intervenant dans la digestibilité des parois ; identification de gènes de résistance aux pathogènes.

Divers points délicats sont aussi soulevés : Bases de données : une publique/une privée, ou une publique-privée ? les microsatellites d'Agrogène obtenus chez le blé sont-ils accessibles ? Des partenariats de l'Inra avec l'entreprise de sélection SERASEM, et Crop design sont-ils compatibles ?

L'implication de Limagrain, Pau-Euralys, Unigrain, Sofiprotéol et Rhône Poulenc se précise du côté du secteur industriel. Pierre Pagesse se révélera être un avocat de Génoplante aussi bien pour aplanir les difficultés entre partenaires que pour plaider la cause de Génoplante auprès des pouvoirs publics. Du côté public, Paul Vialle engage l'Inra dans le programme Génoplante dont il comprend l'importance pour son institut, malgré les



© Inra.

De nombreux scientifiques, français et étrangers, de haut niveau se sont retrouvés à la Conférence Jacques Monod « Signal transduction in embryogenesis and early development of Plant », qui s'est déroulée du 29 mai au 2 juin 1995 à Aussois (Savoie). Entre autres, Michel Caboche (en bas au centre, pull vert), Michel Delseny, Jacques Joyard, Hélène Barbier Brygoo, Jérôme Giraudat, Dominique Job, Martin Kreis, Raoul Ranjeva, Martine Devic, Dao Zhou, Anne-Marie-Lescure, Martine Gonneau, Loïc Lepiniec, Michel Laloue, Michel Herzog et Yves Henri. Parmi, les chercheurs étrangers, notamment Anthony Trewavas, David Meinke, John Harada, Winslow Briggs, Gerd Jurgens, Phil Benfey, Pere Puigdomenech, Maarten Koornneef, Saco de Vries, Erwin Heberle-Bors, Alistair M. Heterington et Kenneth A. Feldman.

oppositions internes. Sur son invitation, le CIRAD et l'ORSTOM rejoignent Génoplante, mais le CNRS hésite encore. On réfléchit aussi aux infrastructures de recherche nécessaires. Chez Limagrain/Biogemma on constitue une équipe de Génomique. Côté public on prend conscience d'un besoin en laboratoires dédiés à la génomique, laboratoires qu'il faudrait donc créer. Côté ministère de la recherche Claude Allégre, Ministre de l'Éducation nationale, de la Recherche et de la Technologie, en fonction depuis l'été 1997, prend conscience des enjeux de la génomique. Tandis que Paul Vialle informe le ministre de l'initiative en cours pour étudier les génomes des plantes, Alain Hénaut, son conseiller, le sensibilise notamment à l'importance de la bioinformatique pour soutenir ces recherches. Durant cette période, le ministère de la recherche lance des programmes incitatifs par création d'une Action Incitative Programmée génome (novembre 1997) qui inclut, en fait, une grosse part d'analyse fonctionnelle des gènes. Un budget de 200 MF est alloué aux génomes végétaux. Cette annonce stimule la mise en place du programme Génoplante qui sera présenté au ministère comme un ensemble déjà construit et évalué, plutôt qu'une soumission de projet dispersés.

En Janvier 1998, Renaud Leblond et Patricia Wattenberg, directrice du service juridique de l'Inra, sont chargés de préparer un premier projet de statut juridique du programme, qui sera soumis pour avis au ministère. Ce programme est axé sur la génomique végétale, les programmes de biotechnologie aboutissant à la production d'Organismes génétiquement modifiés (OGM) n'étant pas inclus par prudence, bien que l'intérêt de ces techniques ne fasse pas de doute chez les partenaires. En effet, l'hostilité aux OGM est devenue générale avec les assauts de GreenPeace et des faucheurs de la Confédération paysanne conduite par José Bové. L'ORSTOM et le CNRS rejoignent le groupe de travail, mais ni Nestlé ni Syngenta qui pourtant frappent à la porte. En effet, les partenaires publics et privés partagent une vision très nationale du programme (il faut lutter contre la mainmise des multinationales, et de Monsanto en particulier).

En Février 1998, une réunion donne naissance, d'une part au comité stratégique (CS) du GIS, qui comptera onze membres (cinq privés et six publics, dont le CNRS), et d'autre part à une Directoire opérationnel qui comptera également onze membres (6 privés et cinq publics). La réunion est présidée par Jean Claude Sabin, président de Sofiprotéol. Le comité stratégique comprendra Claude Lescoffit (président du comité exécutif de Biogemma), Bernard Desprez (Bioplante), Francis Gallibert (CNRS), Gérard Pascal (Inra), P. Querre (IRD), Alain Weil (CIRAD), P. Thilousborde (Sofiprotéol), Guy Riba (Inra) et les trois fondateurs de Génoplante Alain Godard (RP), Pierre Pagesse (Limagrain) et Paul Vialle (Inra). Paul Vialle sera nommé président de ce CS, qui se donne pour mission de mettre en place un programme national de génomique végétale d'ici l'été 1998. Il nomme le directoire opérationnel constitué de Philippe Evrard, directeur financier de l'Inra, M. Delseny (CNRS), P. Dumas de Vaux (Inra), Michel Dron (CNRS) et moi-même. Côté privé le directoire comprend M. Boucly (Pau-Euralys), M. Debrand (Biogemma), P. Cossu (Limagrain), Georges Freyssinet (directeur scientifique de Rhône-Poulenc), A. Dini (Rhône-Poulenc) et Bernard Desprez (invité). J'accepte de prendre la direction du Directoire Opérationnel qui va mettre en place le programme.

161

MA PRISE DE RESPONSABILITÉ DANS LA MISE EN ŒUVRE DE GÉNOPLANTE

Le contenu de Génoplante est esquissé au cours des mois qui suivent. Deux types de programmes seront menés, avec un statut juridique différent : un programme « technologique » incluant les travaux menés sur espèces modèles et un programme « espèces de grande culture ». Le directoire opérationnel est chargé de mettre en place ces deux programmes qu'il construira sur la base d'appels d'offre. Ces programmes sont bâtis et suivis par différents comités thématiques dont les membres sont pour moitié du secteur public et, pour moitié, du secteur privé. Cinq comités sont thématiques génériques/technologiques : analyse fonctionnelle du génome d'*Arabidopsis* ; bioinformatique ; nouveaux outils d'analyse des génomes ; génomique du riz ; cibles importantes chez les plantes cultivées. Les autres comités thématiques concernent des espèces : blé ; maïs ; colza ; pois ; tournesol.

A ce stade beaucoup reste à faire pour transformer le projet de GIS en un programme validé scientifiquement, agréé par tous les partenaires sur une base juridique commune. Une réunion est organisée les 3 et 4 Septembre 1998 à l'IFOCAP (Institut de Formation des Cadres Paysans) à Draveil par Limagrain, pour préciser la structure juridique, le mode de fonctionnement de Génoplante et les programmes de recherche. Divers types de statuts juridiques sont comparés. On choisit un mode de gestion en Sociétés En Participation (SEP) des différents programmes de recherche et on effectue un premier chiffrage du projet (un milliard de Francs sur cinq ans, salaires inclus). En fait, il faudra attendre l'automne 2001 pour que, en association au GIS Génoplante, une structure juridique de type SAS, appelée Génoplante Valor, soit créée. Cette structure assurera le dépôt et la gestion des brevets ainsi que les SEP qui étaient le programme et fixent les droits d'entrée des partenaires dans ces différents programmes.

Le 28 Avril 1998 au cabinet du premier ministre, Lionel Jospin, on confirme la volonté du gouvernement d'assurer un soutien financier au programme. La création de Génoplante coïncide avec le souci du ministère de soutenir le développement d'une industrie dans le domaine de la génomique, en particulier à Evry. Ce programme est présenté au conseil scientifique des programmes génome du ministère qui le valide. Le ministère de l'agriculture apporte aussi son soutien à Génoplante. Une conférence de presse est organisée le 23 Février 1999 à l'occasion de la signature du contrat de collaboration entre les partenaires au siège de l'Inra. Claude Allègre intervient à cette réunion pour confirmer son soutien au programme. Mais, ce n'est que quelques mois plus tard, en mai 1999, que Dominique Laborde est recrutée par l'Inra pour assurer l'administration de Génoplante. Il était temps ! Elle a eu la volonté nécessaire pour empêcher l'enlisement de projets quelle qu'en soit la cause (technique, juridique, politique, y compris les blocages provoqués par la mauvaise foi de certains participants !). Il aura donc fallu près de deux ans pour que la structure Génoplante surmonte les risques d'enlisement et que soient applanies l'essence des tensions entre les participants. Mais l'aventure Génoplante restera un exemple d'initiative public-privé réussie.

Un premier appel d'offre Génoplante est lancé le 30 Mars 1999. Les projets soumis sont évalués par les comités thématiques. Leur contenu final et leurs financements sont actés par le comité stratégique sur proposition du directoire opérationnel en Juillet 1999. Une réunion est organisée à Dourdan le 13 Septembre 1999 pour faire se rencontrer les coordinateurs des programmes et les membres des comités thématiques. Le démarrage effectif des programmes Génoplante, phase 1 s'échelonne de Février 1999 pour les programmes « Espèces » démarrés avant l'heure, à Janvier 2000 pour les programmes « Génériques », démarrés lorsque les fonds nécessaires auront été rendus disponibles. Cette première phase de programmes était prévue pour deux ans. Le coût global de ce premier programme Génoplante est estimé à 520 MF sur deux ans. Il se constitue de 94 projets de recherche mobilisant 150 ETP de jeunes scientifiques et ingénieurs recrutés sur contrat en plus de 250 chercheurs ETP/an sur poste impliqués dans ces programmes. Un premier colloque est organisé à Montpellier à la Grande Motte du 25 au 27 Septembre 2000 où sont présentés les différents programmes et les résultats obtenus. Il prend l'aspect d'un colloque de prise de contacts entre partenaires des projets. 350 personnes impliquées dans les programmes peuvent se rencontrer et prendre connaissance des programmes en cours. Un second colloque, qui présentera le bilan de la phase I se tiendra du 1er au 3 Octobre 2001 au Futuroscope de Poitiers.

Pour évaluer les résultats du programme Génoplante un conseil scientifique est créé et validé par le comité stratégique et le ministère de la recherche. Il est constitué d'experts internationaux reconnus (Président : Francesco Salamini ; Membres : Mark Stitt, Amos Bairoch, Takuji Sasaki, Javier Paz-Ares, Dani Zamir, Mark Lathrop et Jean-Pierre Décor). Il se réunit du 4 au 6 Octobre 2000, et ses conclusions sont élogieuses « Genoplante is the most important plant genome program in Europe. The Scientific Board's evaluation of what was presented is very positive. ». Un programme nommé GABI est créé en Allemagne sur le modèle de Génoplante et des accords de collaboration scientifique sont signés entre les deux pays dans le domaine de la génomique végétale. Bientôt un troisième partenaire, l'Espagne, viendra compléter le dispositif et donner une envergure européenne à ces programmes de génomique. Des appels d'offre trilatéraux seront lancés à intervalles réguliers, au rythme des programmes nationaux. Ces programmes trilatéraux seront par la suite intégrés au programme Européen « ERA Net for plant genomics ». Une concertation avec la NSF est aussi mise en place où Mary Clutter devait rencontrer régulièrement le Président de l'Inra et le président du Directoire de Génoplante pour une information mutuelle sur les objectifs des programmes de génomique végétale des deux pays.

A la fin de la première phase de Génoplante, début 2002, je quitte mes fonctions de président du directoire opérationnel de Génoplante et Georges Pelletier me succède dans cette lourde tâche. À la même époque il devient nécessaire de créer un poste de coordinateur scientifique des programmes. Dominique Job, du CNRS prend cette responsabilité de coordination. Il travaille en lien étroit avec le Directoire opérationnel et par ailleurs me succède pour représenter Génoplante à l'ERA Net. De mon côté, tout en continuant d'assurer la direction de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale, j'ai participé à la mise en place de la plateforme technologique « Plant for the Future » de la CEE, qui sera (peut être) par la suite une source d'inspiration des programmes du FW7 de la DG12.

Cet essor du programme Génoplante montre que nous n'avons pas perdu notre temps à le mettre en place. Plus tard, l'Agence Nationale de Recherche (ANR) n'a eu de cesse de gommer tout ce qui fait du programme Génoplante un programme qui répond à une demande particulière, celle du secteur semencier, un des rares secteurs économiques à rester créateur de richesses pour notre pays (qui est troisième producteur de semences derrière les USA et la Chine). Génoplante a produit des résultats expérimentaux de qualité (par exemple, séquence de la vigne), formé des stagiaires à la génomique (par exemple, experts en Bioinformatique), produit des brevets (par exemple Rfo) et permis la création de startup (AELRED).

L'IMPLANTATION D'UN LABORATOIRE DE GÉNOMIQUE VÉGÉTALE SUR LE SITE DE LA GÉNOPOLE D'EVRY EN 1999

UNE DÉCISION STRATÉGIQUE POUR L'INRA



© Genopole.

En parallèle au « montage » de Génoplante, les partenaires se préparent à mettre en place les infrastructures de recherche nécessaires. Chez Limagrain/Biogemma on constitue une équipe de Génomique, « RHOBIO », qui s'installe sur le site de la Génopole d'Evry. Le laboratoire sera dirigé par Rick De Rose. On contacte des sociétés de biotechnologie pour sous-traiter certains programmes. Sur le maïs en particulier, un important contrat est signé avec la société CELERA aux USA pour la production d'EST et l'analyse du transcriptome.

Côté public on prend conscience d'un besoin en laboratoires dédiés à la génomique, laboratoires qu'il faudrait donc renforcer ou créer. Le CIRAD renforce sa plateforme génomique à Montpellier pour y développer les programmes riz. La direction de l'Inra examine le projet d'implantation d'un nouveau laboratoire de Génomique végétale. Nos collègues du secteur privé nous proposaient de nous donner accès aux outils de génomique qu'ils prévoyaient de développer dans le laboratoire RHOBIO et de faire éventuellement de cette plateforme un laboratoire mixte public-privé. La proposition était séduisante mais dangereuse. Il était clair, par exemple, que nous n'aurions accès à ces outils que dans la mesure où ils seraient employés pour l'étude des espèces « prioritaires » de Génoplante (Blé, maïs, riz, colza, pois). Nous avions de notre côté de nombreux

Inauguration de l'Unité de recherche en génomique végétale (URGV) en avril 2002 au Genopole d'Evry, en avril 2002. Michel Caboche et, à sa gauche, Bernard Pau, directeur du département des Sciences de la vie du CNRS, Bertrand Hervieu, président de l'Inra, Marion Guillou, directrice générale de l'Inra, et Pierre Tambourin, directeur général du Genopole.

163



© Genopole.

La directrice générale de l'Inra, Marion Guillou, Bernard Pau du CNRS et Michel Caboche, en discussion avec des chercheurs et personnels de l'URGV, dont Harry Belcram (au centre), en avril 2002 au Genopole d'Ivry.



La ministre déléguée à la Recherche et aux Nouvelles technologies, Claudie Haigneré, en visite au Genopole d'Evry à l'URGV, en mars 2003, accueilli par Michel Caboche. Sur la photo de gauche ils sont entourés, à leur droite de Pierre Tambourin, et à leur gauche de Serge Dassault et de André Syrota, directeur des sciences du vivant au CEA. Sur la photo de droite, ils écoutent Vincent Colot, un chargé de recherche du CNRS accueilli au sein de l'URGV.



© Genopole.

objectifs qui ne concernaient pas l'une des cinq espèces élues par Génoplante. Plus grave à mes yeux : qu'en serait-il de l'accès aux outils de RHOBIO pour une collaboration hors Génoplante, par exemple avec des laboratoires universitaires étrangers. Aurions-nous la liberté d'opérer ?

Rapidement, avec Paul Vialle, nous sommes arrivés à la conclusion qu'il était impératif de créer un ou plusieurs laboratoires de génomiques à l'Inra pour disposer d'une liberté d'opérer complète en génomique végétale. En effet, nous avions des objectifs qui ne concernaient pas l'une des cinq espèces élues par Génoplante, nous ne voulions pas être contraints dans le développement de collaborations hors de génoplante avec des laboratoires universitaires étrangers, et enfin, nous redoutions que RHOBIO nous fasse payer au prix fort l'accès aux outils des prestataires de services de génomique.

Ainsi, en Juillet 1998 Paul Vialle décide la création de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV) sur le site de la Génopole à Evry. Pierre Tambourin, avec le soutien du Département de l'Essonne et de la ville d'Evry avait créé le Genopole, à proximité donc du laboratoire de génomique humaine financé par Téléthon, le Généthon dont la réputation scientifique n'était plus à faire. Par ailleurs, la Génopole avait attiré sur le site de nombreuses start-up de biotechnologies. La Génopole d'Evry était donc un lieu très attractif pour la création de l'URGV dont j'ai été nommé directeur, en cumul pendant un temps avec mes fonctions de président du directoire opérationnel de Génoplante.

LA CRÉATION DE L'UNITÉ DE RECHERCHE EN GÉNOMIQUE VÉGÉTALE (URGV)

A l'Inra, nous avons saisi l'opportunité de locaux disponibles pour établir un laboratoire de génomique végétale sur le site du Génomoscope. Cette implantation a été décidée en Juillet 1998 et le laboratoire a été fonctionnel dès la fin de l'année 1999, ce qui est exceptionnel pour un organisme public. Associé à la création du laboratoire un important effort de recrutement a été effectué en 1998 et 1999, soit en mobilité au sein de l'Inra (huit personnes) soit en ouverture de postes de scientifiques, ingénieurs et techniciens (treize personnes en Janvier 2000). Nous avons bénéficié du soutien actif du ministère de la Recherche, qui a fléchi la majorité des postes de scientifiques et ingénieurs sur l'URGV, l'Inra apportant les postes de techniciens.

Pierre Tambourin va faciliter ces deux implantations. Pour l'Inra, Jean-Paul Michel et Philippe Evrard suivent l'opération URGV. Dix millions de francs sont investis dans la création du laboratoire (moitié ministère, moitié Génopole). Il faudra moins d'une année pour mettre en place l'infrastructure nécessaire, les équipements étant échelonnés dans le temps.

Je me suis attaché à recruter des coordinateurs de projets qui prendraient ma suite pour coordonner les projets dont le financement serait assuré. Il fallait évidemment que l'expertise de ces coordinateurs soit adaptée aux programmes à développer, ce qui n'était pas évident au départ, très peu de scientifiques ayant une connaissance des approches de génomique. La qualité des scientifiques qui le constituent, plus que toute autre chose, fait la valeur d'un laboratoire, et j'ai dépensé beaucoup d'énergie pour identifier et recruter les chefs de projet de l'URGV. Le niveau de recrutement choisi était celui de CRI (chargé de recherche de première classe) en jargon Inra. Ce niveau requiert une thèse et une expérience internationale de recherche de type « postdoc » dans un laboratoire réputé. De plus une autonomie de recherche attestée par des publications



En 2003, après cinq années d'existence, Genopole édite une brochure présentant ses principaux acquis et ses grandes orientations scientifiques pour le futur : « il était une fois Genopole... 1998-2008 ».

© Genopole.

était un aspect important du CV des candidats. Cette autonomie n'est pas impérative pour les recrutements de type Chargé de recherches (CR1), qui sont faits habituellement à l'Inra et au CNRS. Pour moi, l'autonomie de recherche était un critère décisif. Pour évaluer cette autonomie, ce qui est difficile, j'ai demandé aux candidats éventuels de venir à l'URGV et de donner une conférence sur leur activité de recherche. Au début l'auditoire était limité mais déjà suffisant pour que le conférencier invité justifie les conclusions de ses travaux et expose ses domaines d'intérêt. Il a fallu écorner la règle stupide qui voulait que le directeur d'un laboratoire ne siège pas dans le jury de recrutement d'un futur collaborateur. C'est ainsi que j'ai pu recruter Abdelhafid Bendahmane, Boulos Chalhoub et Pierre Hilson. Par ailleurs, j'ai négocié la venue à Evry de trois chercheurs ayant déjà un poste permanent CR1 ou DR2, Ian Small, Alain Lecharny et Vincent Colot. Ian Small, seul « transfuge » issu de Versailles (Station de Génétique) nous rejoindra en 2003.

J'avais souhaité, comme pour la création du LBS, ne pas le faire en détruisant des équipes que j'avais souvent contribué à créer à Versailles, en récupérant leur coordinateur. Dans le contexte de la recherche et de la formation de personnes compétentes en génomique le ministre de la recherche, Claude Allègre, a attribué à l'Inra plusieurs postes d'ingénieurs et de scientifiques sous réserve qu'ils soient informaticiens ou bioinformaticiens. La même proposition avait été faite au CNRS qui par un tour de passe passe a reconverti ces postes en postes de biologistes ce qui a rendu furieux Claude Allègre qui a réaffecté ces postes à l'Inra. Quatre postes informatiques ont été affectés à l'URGV ainsi que trois autres postes en biologie. Au total en une année une douzaine de postes permanents ont été ouverts et pourvus, créant certainement un sentiment d'envie dans de nombreux laboratoires du département Génétique et Amélioration des Plantes (GAP) en attente de postes permanents depuis des années. Notons aussi quelques recrutements et réaffectations pour des scientifiques CNRS (Alain Lecharny, Vincent Colot) grâce au soutien du département des sciences de la vie (Jacqueline Godet). Le MENRT a fléchi la majorité des postes de scientifiques et ingénieurs sur l'URGV, et en particulier les postes bio informatiques, l'Inra apportant les postes de techniciens. Première recrue : Françoise Gélis qui assurera l'administration du laboratoire, suivie par Dominique Laborde après sa démission.

LA DIFFICILE GESTION ADMINISTRATIVE DE LA RECHERCHE

Lorsque la décision a été prise de créer l'URGV à Evry, j'étais installé à Versailles au sous-sol du bâtiment de biologie cellulaire avec Marie Lacruz ma fidèle secrétaire. Cette organisation avait ses limites. Marie était censée travailler pour le LBS et non pour le futur laboratoire. Après avoir recruté Dominique Laborde pour gérer Génoplante, le besoin d'un secrétariat pour l'URGV s'est rapidement fait sentir. Après plusieurs essais infructueux le département de génétique et d'amélioration des plantes m'a proposé de recruter Sabine Desbouis. J'avais besoin d'un administratif de haut niveau pour faire tourner le laboratoire et un poste d'ingénieur a été finalement ouvert à l'URGV, poste sur lequel a été affectée Françoise Gélis venue de l'administration centrale de l'Inra de Paris. Nous avons constitué un binôme efficace et nous avons été heureux de travailler ensemble pour mettre en marche le laboratoire. Françoise était un peu affolée de gérer le budget et les recrutements qui se succédaient à un rythme trépidant, et complètement inhabituel pour elle ! Très soucieuse du respect des règles administratives, elle voyait s'accumuler ordres de mission, procédures de recrutement, budget et dépenses du laboratoire, contrats de recherche et paiement de loyers (l'URGV a depuis sa création un statut de locataire qui a été source d'incompréhension entre la direction de l'Inra et le département GAP). En effet le département se voyait prélever le montant du loyer de l'URGV sur son budget, qui était normalement utilisé pour financer des actions de recherche. Après deux années de travail intense, Françoise a quitté l'URGV pour une autre aventure après m'avoir aidé à recruter son successeur, Arnaud Charpentier à qui j'ai donné le titre et les fonctions de directeur administratif du laboratoire. Il excellait dans les montages administratifs et financiers de contrats divers et variés (recrutements de personnels, contrats européens, Génoplante...). Les contrats Commission européenne étaient de ce point de vue un sommet dans l'art de faire compliqué ce qui pourrait être simple. Une troisième recrue, Jessica Maciel, assurait la gestion financière du laboratoire. L'URGV a fonctionné avec ce trio administratif dont je dépendais totalement pour faire tourner le laboratoire.

A l'URGV je me suis senti incompetent dans le domaine de l'administration du laboratoire, demandant à mes collègues d'exécuter des procédures que je ne savais pas moi même mettre en œuvre. Sentiment étrange d'avoir un pouvoir non justifié par une formation que je n'ai jamais eu le temps de recevoir, du fait du rythme effréné de la vie à l'URGV. Cette vie effrénée reposait à ses débuts sur des contraintes que je me suis imposées pour créer le laboratoire. Une façon simple de commencer aurait été de demander à l'Inra de me donner un financement de l'ensemble des programmes de démarrage. C'est ce que j'ai fait pour acquérir les équipements de base nécessaires à un laboratoire (autoclave, chambres de culture, salle blanche, congélateurs à -70°C , serveur informatique...). Pour financer les équipements nécessaires à la réalisation de programmes de

génomique, il m'apparaissait impératif que ces achats soient justifiés par une évaluation scientifique de la qualité des programmes qui en feraient usage. Pour être clair, je voulais éviter dans la mesure du possible les errements des financements des programmes Génopoles attribués sans programmes de recherche et à la tête du client. Pour créer et développer le Génoscope, Jean Weissenbach a rencontré le même type de problème et c'est la création d'un conseil scientifique, dirigé par Jean-Marc Egly, qui a validé ses projets et appels d'offres.

Mon collègue Ian Small a ensuite été pressenti pour me succéder à la direction du laboratoire. Il a été directeur adjoint dès son arrivée à Evry, et devait prendre ses fonctions de directeur en 2006. À l'Automne 2005 une proposition de direction d'un laboratoire de génomique végétale axé sur le métabolisme énergétique lui a été faite par l'université de Perth en Australie, proposition attrayante qu'il a acceptée. Dès l'hiver 2005, avec le soutien de l'Inra et du CNRS j'ai engagé la recherche d'un nouveau directeur. Il n'y avait pas de candidat interne au laboratoire. Alain Lecharny, DR2 CNRS affecté à l'Urgv ne souhaitait pas prendre la responsabilité de l'unité pour diverses raisons. Vincent Colot, DR2 CNRS était un autre candidat possible, de bonne visibilité scientifique. Il avait de son côté été contacté pour venir s'installer avec son équipe à l'ENS, où il y avait une forte volonté d'implanter une bonne équipe de biologie végétale., et il m'a confirmé très tôt son intérêt pour cette proposition qui semblait effectivement attractive. Les autres chefs de projet de l'URGV se sentaient (et étaient) tous un peu jeunes pour se lancer dans cette aventure.

Les recherches de candidats en France n'ont pas abouti, et c'est un appel d'offre international qui a permis de sélectionner Heribert Hirt, et de le recruter DR1 Inra. Heribert est un scientifique de réputation internationale, et il a déjà une expérience de la direction d'institut en Autriche d'où il vient. Une longue négociation a suivi pour assurer à Heribert le moyen de fonder son équipe étudiant les MAP kinases dans des conditions attractives. Heribert s'est installé au Printemps, dans un contexte difficile, du fait de l'agression dont a fait l'objet en février mon bras droit administratif, Arnaud Charpentier, et qui a complètement désorganisé le service durant un trimestre. J'ai vécu là les moments les plus difficiles de ma carrière professionnelle. À l'issue de cette expérience, je fais la recommandation d'étoffer d'une personne supplémentaire la petite équipe administrative de l'URGV. Cette équipe qui était écrasée de travail et fonctionnait déjà avec un gros



En 2005, se tient à Versailles le premier meeting de l'European Open Laboratory (UPRA), créé conjointement par le Laboratoire de biologie cellulaire l'Inra et du Umea Plant Center (Suède). Leurs directeurs respectifs, Anders Eriksson (à gauche) et Herman Höfte, signent la convention de coopération entre les deux organismes.



En arrière-plan Michel Caboche et, devant lui, Annie Marion-Poll en discussion avec Jacques Einhorn. À droite, Sylvain Chaillou.



Guy Riba, directeur général de l'Inra délégué aux Affaires scientifiques avec à sa gauche, Bernard Teyssandier de la Serve et Michel Lebrun, chef du département de Biologie végétale et Catherine Bellini. À sa gauche, Sylvie Dinant.



Yves Chupeau, président du centre Inra de Versailles, et Bernard Teyssandier de la Serve.



Loïc Lepiniec, Jacques Einhorn et Christian Meyer.

retard dans la gestion des factures, personnels CDD et missions diverses s'est disloquée complètement lorsque Arnaud Charpentier s'est retrouvé en congés de maladie forcé. Michèle Troizier et Dominique Sorin nous ont apporté une aide précieuse dans ces temps difficiles. La direction de l'Inra doit prendre conscience de la charge administrative croissante qui pèse sur les unités de recherche, et par exemple une unité qui comporte en permanence un tiers de CDD sur des contrats souvent hachés par des retards de décisions budgétaires génère un gros travail qui a lui seul nécessite une personne à 80% de son temps pour être fait en temps et en heure.

LES AVANCÉES SCIENTIFIQUES EN GÉNOMIQUE VÉGÉTALE

La génomique est un domaine de recherche aride. Pour nombre de scientifiques, elle se résume à une activité de recherche coûteuse qui permet de faire vite ce que l'on faisait lentement. Cela dit, faut-il concevoir un laboratoire de génomique seulement comme un lieu de production de ressources et de données ou aussi comme un site de recherches ? En génomique comme dans d'autres domaines, il vaut mieux être le premier à développer un nouveau concept que de reprendre les stratégies déjà développées par d'autres. À côté donc de projets destinés à combler un retard évident, l'URGV a développé des thèmes de recherche nouveaux en génomique, essentiellement grâce au recrutement de scientifiques capables d'innover dans ce domaine. La règle que je me suis fixé a été d'associer toujours des objectifs scientifiques au développement d'outils, ne serait-ce que pour valider concrètement ces outils sur un objectif précis (exemple : clonage positionnel d'un gène de grande importance agronomique associé à un outil de cartographie à haute résolution). Il est par définition difficile de prédire sur quels points ces recherches et innovations seront fructueuses. J'ai anticipé qu'elles se feront sur les différents thèmes prioritaires dont nous allons donner les grandes lignes.

L'ANALYSE FONCTIONNELLE DU GÉNOME D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

Le séquençage du génome d'*Arabidopsis* a apporté une moisson de nouveaux gènes identifiés sur une base bioinformatique. Chez les plantes comme pour d'autres organismes, la bioinformatique ne fournit pas de piste précise quant à la fonction possible de la moitié de ces gènes. Un immense chantier restait ouvert pour identifier les fonctions possibles de ces gènes « nouveaux ». Nous avons utilisé deux approches convergentes pour effectuer l'analyse fonctionnelle de ces gènes : les classer sur la base de leurs caractéristiques d'expression et développer une ressource permettant de relier séquence et fonction, ces deux approches étant interactives.

L'ANALYSE DE L'EXPRESSION DU GÉNOME

Les techniques émergentes en 2000 de « chips » et « microarrays » permettent d'étudier simultanément l'expression de nombreux gènes. Il est possible sur cette base de classer les gènes selon leurs caractéristiques d'expression comme ceci a été illustré chez la levure par P. Brown et ses collègues pour identifier les gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou la sporulation. J'ai recruté Pierre Hilson pour développer cette recherche. Il avait travaillé sur le rôle de l'auxine dans le développement racinaire à l'Université du Wisconsin. Il n'avait pas un profil de génomicien mais je l'ai recruté quand même pour initier au plus vite le programme de création d'une puce ADN du génome d'*Arabidopsis*. Nous devions collaborer avec l'équipe de RHOBIO pour faire ce travail, mais nos approches différaient totalement. RHOBIO avait acheté la technologie Amersham, alors que nous faisons tout nous-mêmes. De plus des accords de confidentialité interdisait notre accès aux données Amersham. C'était ubuesque ! Nous avons décidé de travailler sans concertation avec RHOBIO. Bien nous en a pris car les sondes employées par RHOBIO étaient cross-contaminées. Nous avons pris comme base de notre puce le génome d'*Arabidopsis* annoté, à partir duquel nous avons défini des GST (gene specific tags). Après amplification par PCR ces GST ont été spottés sur lame de verre grâce à notre équipement bio-robotics, bien choisi par Pierre Hilson. Après son recrutement par le VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) comme coordinateur expert en génomique végétale (ce qu'il était devenu), Vincent Colot est venu prendre la relève pour faire franchir les obstacles qui nous bloquaient. Ensuite, Jean Pierre Renou a été recruté pour prendre le poste libéré par Pierre Hilson. Vincent Colot et Jean Pierre Renou ont réussi à créer la puce CATMA dont la version 6 est produite à l'aide d'oligonucléotides de synthèse par la société nimblgen et utilisée douze ans plus tard.

Quatre développements méthodologiques étaient prévus sur ce projet à moyen terme :

- Comparer la technique « filtres haute densité » aux techniques « Chips » en interne et en collaboration (RHOBIO et CEA Evry). Sur ce point les filtres à haute densité ont été rapidement abandonnés.

- Augmenter le pourcentage des gènes représentés par une sonde sur la puce en s'appuyant sur une annotation de plus en plus précise. Ceci s'est concrétisé par six versions successives de CATMA

- Développer un inventaire de patrons d'expression des gènes dans les différents tissus d'Arabidopsis et dans des mutants de référence de manière à formuler des hypothèses sur le rôle possible de gènes nouvellement découverts dont le patron d'expression ressemble à un gène connu. Plus de 4000 hybridations ont été effectuées avec CATMA en 12 ans ce qui a permis d'étudier à quel gène connu s'apparente l'expression d'un gène inconnu, de manière comparable à l'approche menée sur Arabidopsis (GENVESTIGATOR)

- Développer des techniques de production de sondes complexes dérivées de petites quantités de matériel (les techniques Chips nécessitent de 1 à 10 µg d'ARN polyadénylé par hybridation) de manière à pouvoir étudier l'expression des gènes au niveau d'organes/tissus/cellules particuliers (ex : embryon au stade globulaire) ce qui est toujours en cours de mise au point 12 ans plus tard.

Ces objectifs nous ont amenés à développer des techniques de production d'ADNC « full length » utiles à l'annotation des gènes et donc à la construction de puces et l'analyse du transcriptome de cellules isolées.

LA CRÉATION D'UNE RESSOURCE PERMETTANT D'IDENTIFIER RAPIDEMENT UN MUTANT AFFECTÉ DANS UN GÈNE D'INTÉRÊT

Les techniques de recombinaison homologue ne sont pas utilisables en routine pour analyser la fonction de gènes de plantes par approche « knockout ». De ce fait la recherche de mutants affectés dans un gène de séquence connue s'est appuyée sur le tri PCR de collections de mutants d'insertion. Avec Loïc Lepiniec et Alain Lechamy, nous avons supervisé l'approche développée par David Bouchez et ses collègues sur la collection ADN-T de Versailles permet d'identifier pour 70 % des gènes étudiés au moins un mutant d'insertion dans une collection de 50 000 lignées. L'approche est délicate à mener et permet à une personne de trier la collection pour un gène d'intérêt en deux mois et demi environ. L'analyse de l'insertion par séquençage est nécessaire pour préciser les conséquences possibles de cette insertion sur la fonctionnalité du gène disrupté.

Nous avons décidé d'établir directement une ressource constituée par séquençage systématique d'une bordure de l'insertion ADN-T de chaque lignée produite à Versailles par la technique d'infiltration sous vide. Cette séquence bordure est isolée par restriction de l'ADN génomique de la lignée, ligation d'adaptateurs et amplifications successives à l'aide de primers spécifiques des adaptateurs et des bordures de l'ADN-T. Les séquences produites ont été utilisées pour constituer une base de données s'appuyant sur les séquences génomiques annotées et identifiant les insertions susceptibles d'avoir créé un « knock out ». Grâce aux talents d'organisatrice de Sandrine Balzergue ce travail a été finalisé en trois ans (50000 insertions analysées, dont 40000 retenues et installées dans la base de données Flagdb). Après avoir conduit ce projet avec une démarche qualité modèle, Sandrine a pris en charge les projets de RNAseq de l'URGV avec le même succès. L'éventail des insertions obtenues et séquencées a permis de faire une étude détaillée de la spécificité d'insertion de l'ADN-T dans le génome d'Arabidopsis.

Cette ressource financée par le programme Génoplatte a été rendue accessible aux laboratoires Inra et CNRS à la condition que puisse être assurée la protection industrielle des résultats obtenus conformément aux missions de nos organismes de recherche.

LES PENTATRICO PEPTIDE REPEAT

Un programme de génomique fonctionnelle a été introduit à l'URGV avec la venue en 2003 de Ian Small. Il apportait un projet d'analyse d'une énorme famille multigénique, la famille des PPR. Ces protéines codées par des gènes nucléaires interviennent dans les processus impliquant des ARN (Epissage, Editing, etc...). Ce projet a fait usage des outils de l'URGV et en a introduit de nouveaux comme le programme AGRICOLA (Développement d'une ressource pour l'analyse fonctionnelle des gènes par approche de RNA Interférence. L'objectif a été de créer une collection de vecteurs permettant d'inactiver spécifiquement chacun des gènes d'Arabidopsis, en utilisant des sondes spécifiques de ces gènes, sondes GST mises au point pour l'analyse du transcriptome d'Arabidopsis.

ANALYSE DU CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE DE L'EXPRESSION DES GÈNES DU CHROMOSOME 4 D'ARABIDOPSIS

L'étude des mécanismes épigénétiques de contrôle de l'expression des gènes est un domaine émergent de recherche en biologie. L'objectif a été d'étudier à l'échelle d'un chromosome entier (le Chromosome 4) les processus de méthylation de l'ADN et de modification de la chromatine. Ce programme coordonné par Vincent Colot, très fructueux, initié à l'URGV est maintenant poursuivi par l'équipe de Vincent Colot à l'ENS Ulm.

ANALYSE FONCTIONNELLE DES MAP KINASES D'ARABIDOPSIS

Ce programme fait suite au projet PPR mis en place par Ian Small et maintenant poursuivi par celui-ci en Australie. Un nouveau projet qui a pour but d'identifier les fonctions des MAP kinases a été initié, consécutivement au recrutement de Heribert Hirt comme directeur de l'URGV. Ce projet d'Héribert Hirt s'appuie sur une importante approche de protéomique visant à constituer des « peptide-chips » sur la base d'une analyse du phosphoprotéome d'*Arabidopsis* faite en spectrométrie de masse. Ces chips seront utilisés pour identifier les cibles des MAP kinases, permettant ensuite une analyse fonctionnelle de ces partenaires des MAP kinases.

L'ANALYSE DES GÉNOMES DE PLANTES CULTIVÉES

Les données accumulées sur les génomes modèles (séquences en particulier) permettent de faciliter l'étude des génomes plus complexes de plantes cultivées telles que blé, maïs et colza. Cependant il demeure nécessaire d'étudier aussi ces génomes, d'une part pour établir les similitudes d'organisation entre génomes modèles et génomes complexes ce qui est une condition nécessaire à l'exploitation des données obtenues sur ces génomes modèles, et d'autre part pour identifier directement au niveau moléculaire des cibles importantes sur ces génomes complexes (gènes et QTL d'intérêt).

ORGANISATION DES GÉNOMES COMPLEXES : LA SAGA DU CHROMOSOME 3B DU BLÉ

La couverture complète d'un génome par une collection de clones BAC chevauchants est une étape clef dans l'analyse de ce génome. Le projet YAC-SIC en est une illustration. Elle permet en premier de mener des programmes de clonage positionnel, mais elle apporte aussi un outil précieux aux travaux de synténie. Elle est enfin le point de départ des programmes de grand séquençage. Cependant cet objectif reste une gageure pour les très grands génomes végétaux tels que celui du blé. C'est Boulos Chalhoub que j'ai recruté pour développer ce projet. Boulos, après un passage à Versailles sur le pois, travaillait comme chef de projet chez Monsanto. Il avait un reel savoir faire en génomique et il sait faire marcher des projets qui semblent infaisable au commun des scientifiques.

Le blé dont le génome a une taille de 16 000 Mb (ce qui en fait un de plus grand génome végétal) est une espèce d'une importance agronomique majeure. Ce génome étant particulièrement complexe nous nous avons proposé d'adapter les outils de la génomique à son analyse (hexaploidie, présence d'une quantité énorme de séquences répétées...). L'objectif majeur de Boulos Chalhoub a été d'élaborer les outils permettant de travailler sur une zone chromosomique ou sur le génome complet du blé, tâche qui semblait hors de notre portée au départ du programme. Boulos a construit la première banque BAC du génome du blé. Grâce à une collaboration avec l'équipe de J. Dolezel, experte en « chromosome sorting » Boulos Chalhoub a réalisé la première banque BAC du chromosome 3B du blé. Cette banque a été exploitée par l'Inra Clermont-Ferrand. Un objectif important concerne l'identification moléculaire de gènes candidats pour des QTL. De nombreux programmes QTL sont développés ou prévus pour identifier les zones génomiques qui contribuent à certains caractères agronomiques particulièrement importants (résistances aux fusarioses, remplissage et qualité de la graine, caractères agronomiques...). Les programmes EST prévus dans le cadre de Génoplante sont destinés à fournir des candidats possibles pour ces caractères étudiés. 100 000 EST ont été produits dans le programme Génoplante puis cartographiés après clustering pour éviter les répétitions. En effectuant une PCR spécifique (grâce à des amorces dérivées de la partie 3' non codante des ADNc) sur les vingt et une lignées nullitétrasomiques du blé, les EST ont été répartis sur les bras des vingt et un chromosomes. Des approches de génomique comparative ont été menées par Boulos pour analyser les contextes génomiques de gènes particuliers intervenant dans la domestication du blé ou dans son aptitude à la panification (locus Ha)

GÉNOMIQUE DU COLZA ET DE LA VIGNE

Une des grandes découvertes de la génomique concerne la mise en évidence de similitude d'organisation des génomes d'espèces apparentées. La méthode la plus directe consiste à rechercher les orthologues de gènes cartographiés sur l'espèce modèle et de les cartographier sur le génome de l'espèce d'intérêt. Les données recueillies permettent d'identifier les fragments chromosomiques pour lesquels la synténie semble



Michel Caboche avec Georges Pelletier dans les serres de l'Inra de Versailles (collecte de graines d'*Arabidopsis thaliana*). La photo est parue en première page de La lettre de l'Académie des sciences (n° 24, automne 2008).

conservée, et les zones de rupture résultant de translocations au cours de l'évolution de ces espèces à partir des espèces ancestrales.

Ce travail de cartographie bénéficie du support de la technologie des banques BAC de grands fragments génomiques. Ayant constitué une banque BAC du génome du colza et du génome de la vigne, les techniques de « fingerprinting » associées à l'afp ont permis de constituer et d'ancrer les contigs. Ces techniques ont leurs limites, elles peuvent comporter un taux d'erreurs élevé, le séquençage systématique des Bacs étant d'un usage plus lourd mais aussi plus fiable. Elles ont été exploitées, avec Anne-Françoise Adam-Blondon, dans le cadre du programme de séquençage du génome de la vigne qui a permis de mettre en évidence un événement de triplication de ce génome au cours de l'évolution.

CLONAGE DE GÈNES DÉTERMINANT DES CARACTÈRES

Clonage positionnel

Le thème précédent décrit les contours d'un programme d'analyse des génomes du blé, du colza et de la vigne. Ces génomes, ainsi que d'autres comportent un certain nombre de gènes identifiés comme potentiellement importants à cloner et à caractériser au niveau moléculaire. Chez le colza, l'équipe de Michel Renard du département GAP à Rennes-Le Rheu a identifié plusieurs cibles qui présentent un intérêt à la fois fondamental et appliqué : gène de cléistogamie (Clg 1), gène Ren 1 (réactivité à un éliciteur, la cryptogène Rfo intervenant dans la restauration de fertilité de la stérilité mâle cytoplasmique Ogura. La base moléculaire de la cms Ogura est connue (travaux de F. Budar, département GAP à Versailles). Le gène mitochondrial responsable de cette stérilité a été identifié. L'objectif est d'identifier aussi le gène nucléaire capable de restaurer la déficience mitochondriale conférée par la mutation Ogura et d'en comprendre le rôle. Ce travail a nécessité une approche de clonage positionnel dans le génome du radis dont provient Rfo, travail effectué à Evry en lien avec l'Inra de Rennes. Le recrutement d'un coordinateur de ce projet était nécessaire. C'est Abdelhafid Bendahmane qui fut recruté. Abdel a acquis un savoir faire approfondi et de grande valeur scientifique sur le clonage positionnel des gènes durant son travail de thèse au John Innes Institute de Norwich. Son recrutement pour mener à bien le clonage de Rfo était idéal. En deux ans il a mené à bien le clonage de Rfo, juste à temps pour permettre à Génoplante d'assurer une protection industrielle du ce gène important pour la production d'hybrides.

Ce succès acquis, je prévoyais de développer des collaborations sur d'autres cibles génomiques : Clonage du gène Vat, impliqué dans la résistance du melon aux pucerons, (IXX) Clonage de divers gènes de résistance aux virus (eiF4E) Résistance au Nsv Tous ces objectifs de cartographie et de clonage positionnel nous ont amenés à prévoir la mise en place à Evry en service commun un atelier de génotypage à haut débit.

TILLING

Un second thème a été initié par Abdelhafid Bendahmane sur le TILLING. Je suis revenu d'un meeting organisé par la NSF à San-Diego où j'avais été très intéressé par un exposé de S. Henikoff qui avait identifié des mutations affectant un gène d'*Arabidopsis* par une technique de tri d'une population de plantes mutagenisées à l'EMS. En bref, un outil adapté à la génétique reverse utilisable sur plantes cultivées. Abdel a été rapidement convaincu comme moi de l'intérêt de cette technique. Après divers développements technologiques cette technique est devenue très fiable. Dix ans plus tard Abdelhafid Bendahmane a initié une foule de projets de TILLING sur diverses plantes cultivées : melon, concombre, pois, etc. ... Ceci a suscité un grand intérêt de la profession. Le contrôle du déterminisme du sexe chez une plante cultivée est un enjeu de première importance, sur lequel Abdel s'est par la suite investi avec son équipe.

BIOINFORMATIQUE ET SCHÉMA DE LA BASE DE DONNÉES POUR GÉNOPLANTE

L'une des caractéristiques majeures de l'approche génomique concerne la constitution de bases de données dont le but est de stocker et organiser les données pour qu'elles soient accessibles et consultables. Les génomes considérés sont soit des génomes modèles, comme *A. Thaliana* et le riz, soit des génomes de plantes d'intérêt agronomique. Une base de données, Flag db a été développée en premier lieu pour les données d'*A. Thaliana* selon un modèle qui était ensuite utilisable pour les autres plantes (Ex : Riz, vigne). L'idée centrale a été d'organiser les données produites par Génoplante en fonction de leur position chromosomique. L'exemple des génomes procaryotes et de la levure montre que cette approche est efficace pour réduire la redondance des données et des références à ces données.

La conception de la base de données, l'intégration des données, la création de l'interface et la sécurité de l'ensemble devaient faire l'objet d'une coopération étroite entre l'URGV et INFOBIOGEN (Guy Vaysseix) dans le cadre du soutien aux projets bioinformatiques végétaux et avec les Bioinformaticiens de

Génoplante-privé. La base de données intégrée devait être installée à INFOBIOGEN mais finalement c'est une base Génoplante db installée sur un serveur Inra qui a été développée, dans un nouveau service : l'URGI avec une base miroir coté privé. Les questions de sécurité, entre autres, faisaient problème. L'implantation de genoplents db à l'URGV n'était pas non plus souhaitée, l'équipe bioinformatique risquant de se transformer en équipe de maintenance, non disponible en interne pour développer les outils dont nous avons besoin (Ex CAT db, TILL db, etc.).

Alain Lechardy, le coordinateur de l'équipe bioinformatique a développé un programme d'étude des familles multigéniques sur *Arabidopsis*, important pour l'annotation et l'utilisation des données. La majorité des gènes d'*A. Thaliana* a au moins un paralogue, et de nombreux gènes font partie de larges familles multigéniques parfois spécifiques du règne végétal. Il s'appuie sur les connaissances acquises tous génomes confondus et passe par une classification précise des homologues en orthologues ou non-orthologues. En génomique fonctionnelle et en génomique comparée la détermination des orthologues, c'est-à-dire des gènes ayant la même fonction biologique dans des organismes différents, est donc une étape très importante pour laquelle un certain nombre de solutions ont été proposées. Une manière très performante de prédire l'orthologie entre gènes de plantes serait de fonder cette prédiction sur l'utilisation combinée des données de duplications intra et inter chromosomiques, des données de synténie et des données phylogénétiques d'une part et des données fonctionnelles d'autre part. (Projet Gene Farm, Coordinateur S. Aubourg).



Michel Caboche, en 2008, avec les personnels de l'Unité de recherche en génomique végétale.

En conclusion, la création de l'URGV associée à Génoplante a représenté pour moi de nombreux efforts et de frustrations, mais aussi de nombreuses satisfactions qui ont marqué la fin de mon activité scientifique active. Comme je l'ai indiquais en introduction, la progression de la maladie m'obligeait à réduire mes activités, aussi, j'ai dû organiser ma succession à la Direction de l'URGV. Je voudrais terminer en interpellant la direction de l'Inra pour qu'elle prenne conscience de la charge administrative croissante qui pèse sur les unités de recherche. Enfin, je me dois surtout de remercier toutes les personnes qui m'ont apporté une aide précieuse dans les temps difficiles comme dans les temps fastes.