



HAL
open science

Repères

Pascale Mollier

► **To cite this version:**

Pascale Mollier. Repères. *Biologistes du végétal et biotechnologies*, 20, Editions INRA, pp.118-125, 2019, Archorales, 2-7380-1435-6. hal-04207464

HAL Id: hal-04207464

<https://hal.inrae.fr/hal-04207464>

Submitted on 14 Sep 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

REPÈRES

PASCALE MOLLIER*

LA BIOLOGIE CELLULAIRE À L'INRA VERSAILLES, REPÈRES SCIENTIFIQUES

118

Depuis la création de l'Inra en 1946, les chercheurs en biologie moléculaire de l'Inra Versailles ont contribué de manière continue à la connaissance du fonctionnement du végétal. Ces avancées et découvertes scientifiques ont été favorisées très tôt par le renfort intellectuel de nombreux étudiants (PCMB, Université d'Orsay, AgroParistech), ainsi que par l'insertion des chercheurs dans les réseaux scientifiques internationaux. Elles sont aussi le fruit d'intenses et fréquents échanges entre les chercheurs, au sein de petites équipes partageant régulièrement leurs résultats voire leurs moyens. Quelques-unes de leurs avancées scientifiques majeures sont présentées ici.

Foisonnantes, les voies de recherche suivies utilisent une même propriété fondamentale de la cellule végétale : la « totipotence ». Cette propriété confère à la cellule, qu'elle soit embryonnaire ou différenciée, la capacité à régénérer une plante entière si on la cultive dans des conditions favorables. Les chercheurs de l'Inra ont largement tiré parti de cette propriété, unique au règne végétal, dans la perspective d'apporter des solutions à des problèmes agronomiques. La totipotence de la cellule végétale est ainsi à la base de travaux aussi divers que l'assainissement de plantes atteintes de virose, la multiplication *in vitro*, ou encore l'utilisation de protoplastes pour hybrider des génomes ou pour obtenir des mutants.

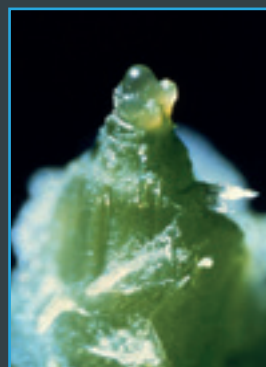
* Pascale Mollier est rédactrice en chef du Canal Science Web dans l'Unité Communication de l'Inra.

1 LES PREMIERS JALONS DE LA CULTURE *IN VITRO* : LA CULTURE DE CELLULES ET LA RÉGÉNÉRATION DE PLANTES

Dès 1939, le botaniste, professeur à la faculté des sciences de l'université de Paris, Roger-Jean Gautheret, réalise une culture *in vitro* de cambium, la couche de cellules située sous l'écorce et dont les divisions donnent le bois.



Cals d'*Epiphyllopsis*, un cactus ornemental, collection de tissus en culture *in vitro* de Georges Morel, 1970.



Apex de dahlia débarrassé des mini-feuilles qui constituent le bourgeon apical, 1955. L'explant utilisé par Georges Morel et Claude Martin est le minuscule dôme apical, qui nécessitait la mise au point de conditions de culture spécifiques des méristèmes.

En 1952, à l'Inra de Versailles, Georges Morel, inspiré par les travaux pionniers de Gautheret, développe l'ambition agronomique de guérir des plantes infectées par des viroses (dahlia, pomme de terre...). Il suit les indications de Pierre Cornuet, pathologiste à l'Inra de Versailles, qui avait révélé que les apex de plante étaient généralement indemnes de virus. Il réussit avec Claude Martin à cultiver les cellules des méristèmes qui sont indemnes de particules virales. En 1960, Georges Morel réalise la première multiplication végétative *in vitro* de l'orchidée, dont la généralisation dans les laboratoires du monde entier conduit à l'industrialisation du procédé pour la fourniture commerciale de très nombreux cultivars d'orchidées.

2 LES HAPLOÏDES, INTÉRÊT FONDAMENTAL ET UTILISATION EN AMÉLIORATION DES PLANTES

En 1967, Jean-Pierre Bourgin, alors étudiant en DEA au laboratoire de physiologie pluricellulaire du phytotron de Gif-sur-Yvette, obtient des plantes haploïdes de tabac en cultivant dans leurs anthères des grains de pollen immature, avant la formation des deux cellules reproductrices mâles. Les publications de Jean-Pierre Bourgin sont parmi les plus citées dans le domaine pendant 40 ans.



© Inra / Jean-Pierre Bougim



© Thierry Dore

Haploïde de tabac enraciné et Champ de tabac en fleurs (Alsace).

Une plante dite « haploïde » possède dans toutes ses cellules un seul stock de chromosomes (= n chromosomes). Un caractère récessif indésirable peut donc s'y exprimer sans être masqué par le caractère dominant porté par le chromosome homologue comme chez un organisme diploïde (= $2n$ chromosomes). Il est alors possible d'identifier les caractères récessifs indésirables et de sélectionner des haploïdes performants, qui sont ensuite transformés en plantes « élite » « pures » (ou homozygotes) en doublant, à l'aide d'agents chimiques comme la colchicine, le nombre de chromosomes (haploïdes doublés à $2n$ chromosomes).

Cette nouvelle possibilité d'obtenir des haploïdes sera largement mise à profit.

En effet, le potentiel de cette méthode en amélioration des plantes est énorme et elle a donné lieu à diverses techniques largement employées de nos jours pour l'amélioration de très nombreuses espèces cultivées. Quelques exemples de variétés issues de cultures d'anthers : 1974 : F211, variété japonaise de tabac ; 1978 : Lunghua 1, variété chinoise de riz. 1987 : Florin, variété française de blé ; 1989 : Adria et Mégal, variétés d'aubergine ; 1995 : Osir, variété de piment. Citons aussi Maris Haplona, variété de colza issue d'un haploïde spontané observé au champ (1976) et Mingo, variété canadienne d'orge issue de croisements interspécifiques (1980).



© Inra / Lucette Combes-Theremin

Hybride d'asperge obtenu en croisant deux lignées homozygotes haploïdes doublés.



© Inra / Robert Dumas et Vauk

Culture d'anthers d'aubergine.

3 RECHERCHE D'UN MODÈLE VÉGÉTAL

Dans les démarches plus fondamentales, les rapides progrès des connaissances que permettent les organismes modèles comme *Escherichia coli* ou encore la drosophile ont motivé les végétalistes pour choisir une plante modèle. Les tabacs ont fourni un bon support de mise au point technique, notamment pour la recherche des conditions efficaces de cultures de protoplastes. Cependant, les tabacs sont des amphidiploïdes (addition de deux génomes diploïdes), ce qui en limite l'utilisation en génétique somatique.

Jean-Pierre Bourgin et Yves Chupeau proposent dès 1976, d'utiliser *Nicotiana Plumbaginifolia*, plante diploïde, dont les cultures de protoplastes haploïdes permettent de sélectionner de façon efficace les mutations en culture *in vitro*. Cette espèce est effectivement largement utilisée par les biologistes du domaine, notamment par l'équipe de Michel Caboche pour la sélection de mutants déficients en nitrate réductase.



© Inra / J.P. Bourgin

Plante haploïde de *Nicotiana plumbaginifolia*, qui servira de plante modèle pour de nombreux laboratoires, 1976.



© Inra - H. Hébert, Can.

Inflorescence d'*Arabidopsis thaliana*, l'arabette des dames, arabette de Thalius, fausse arabette, plante annuelle de la famille des Brassicacées dont l'habitat naturel s'étend de l'Afrique du Nord à l'Europe et à l'Asie.



© Inra / Christophe Maic

Plante expérimentale : *Arabidopsis Thaliana*.

En 1989, c'est finalement l'Arabette, *Arabidopsis thaliana*, petite crucifère dont le génome est l'un des plus petits du monde végétal, qui est proposée comme plante modèle. Les graines minuscules, ainsi que la petite taille des plantes autorisent enfin la manipulation de grandes populations de plantes. La simplicité du génome simple en facilite la caractérisation, accélérée par les rapides progrès des techniques de séquençage. Dès 2000, le génome de l'Arabette sera séquencé.

Le recours à ce modèle dans le monde entier conduit rapidement à de nombreuses et rapides avancées fondamentales dont l'utilisation se prolonge encore actuellement.

Dès 1990, les équipes du laboratoire de Biologie Cellulaire de Versailles ont très activement adopté cette espèce modèle en participant aux démarches initiales de la génomique d'*Arabidopsis*.

4 LES PROTOPLASTES : UN OUTIL DE CONNAISSANCE ET DE CRÉATION D'HYBRIDES

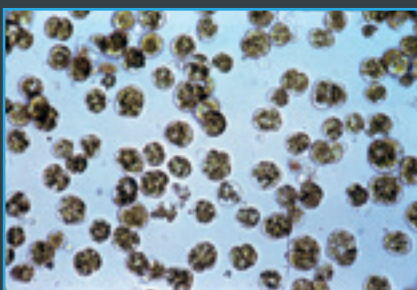


Descendance de laitues issues de culture de protoplastes, 1989.

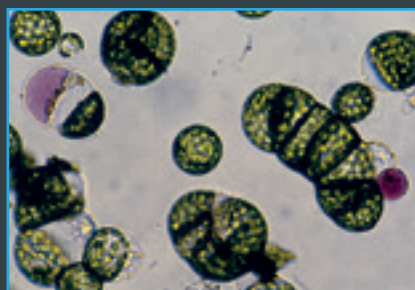
Dès 1971, Yves Chupeau contribue à la maîtrise de la production de protoplastes chez le tabac et à la régénération de plantes à partir de ces protoplastes. Le sujet est difficile à défendre car, à l'époque, les protoplastes sont considérés comme des « monstres sans avenir ».

Les protoplastes sont des cellules végétales dont la paroi a été digérée par des enzymes. Après régénération de cette paroi, ils se divisent et forment des colonies cellulaires, à l'instar des cultures bactériennes. Et surtout, dans des conditions de culture définies, ils peuvent régénérer des plantes entières. Ces cellules sont donc une véritable aubaine dans une activité d'amélioration des plantes. En effet, les très grandes populations de protoplastes obtenues pour chaque préparation (plusieurs dizaines de millions), fournissant potentiellement autant de plantes, facilitent la sélection de mutants biochimiques générés par l'action de rayonnements ou l'action de produits chimiques sur les protoplastes.

L'absence de paroi permet d'introduire dans les protoplastes des fragments d'ADN par électroporation ou par action de poly-éthylène-glycol. L'absence de paroi permet également fusionner des protoplastes d'espèces différentes par action de ce même produit et créer ainsi de nouvelles combinaisons nucléaires (hybrides) ou d'organites cytoplasmiques, comme le fait Georges Pelletier quelques années plus tard.



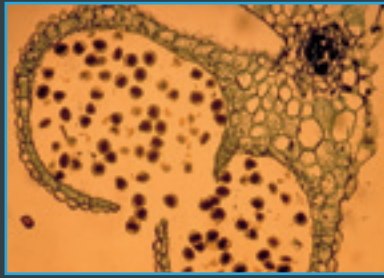
En culture *in vitro*, dans des conditions appropriées, pratiquement toutes les cellules dérivées de protoplastes de *N. tabacum xanthi* haploïde (SH6) se sont divisées, et permettront de régénérer des plantes.



Fusion de protoplastes de laitues, 1992.

5 LA STÉRILITÉ MÂLE CYTOPLASMIQUE

En 1983, Georges Pelletier obtient un colza mâle-stérile (donc uniquement femelle) en fusionnant des protoplastes. Cette avancée permet de produire à l'échelle agronomique des semences hybrides en croisant ces individus femelles par des variétés différentes, productrices de pollen, avec tous les bénéfices de l'hybridation en termes de vigueur et de performances. La première variété de colza hybride, Synergy, est inscrite en 1994 au catalogue officiel français par l'Inra et Serasem, et la plupart des colzas cultivés sont



Colza mâle fertile : les anthères contiennent des grains de pollen.

© Inra / Michel Renard.



Fleurs de colza mâle-stérile (à gauche) et mâle-fertile (à droite).

© Inra / Georges Pelletier.

aujourd'hui hybrides. Une nouvelle avancée de portée mondiale est également réalisée à Versailles, avec l'identification du gène de la stérilité mâle cytoplasmique, publiée en 1992.

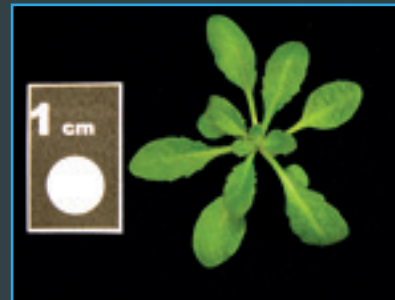
Pour obtenir un colza mâle stérile (et ultérieurement de manière similaire chez le chou), Georges Pelletier a réalisé des fusions entre des protoplastes possédant des génomes chloroplastiques et mitochondriaux de radis ou de colza. Il obtient à la fin des individus possédant un génome nucléaire de colza, des chloroplastes de colza et des mitochondries contenant le gène de stérilité mâle de radis.

6 LE MÉTABOLISME DE L'AZOTE

Dans les années 1980, des mutations créées dans des protoplastes de *Nicotiana plumbaginifolia* permettent à l'équipe de Michel Caboche d'identifier les gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote, dont le gène de la nitrate réductase, et de les isoler. Créer une mutation dans un gène permet en effet, en observant les effets sur la plante, de déterminer la fonction de ce gène. On peut ainsi répertorier les gènes impliqués dans une fonction (par exemple, croissance, floraison) et en comprendre les mécanismes élémentaires. Leur clonage donne accès à la protéine correspondante, dont l'étude permet de mettre en évidence les interactions avec d'autres facteurs, physiques ou biologiques.

L'utilisation de mutants permet également de décrypter les mécanismes de maturation de la graine. Le Laboratoire de biologie des semences, dans la lignée de ces travaux, est devenu par la suite leader mondial sur la voie de biosynthèse des flavonoïdes, le contrôle de la maturation de la graine et la biosynthèse de l'acide abscissique (hormone ayant un rôle dans le développement et la germination des graines et la tolérance des plantes au stress).

Un des mutants du gène de la nitrate réductase est dû à l'insertion du rétrotransposon Tnt1 caractérisé par Marie-Angèle Grandbastien. Il a été démontré depuis que les éléments transposables peuvent constituer une part très importante des génomes végétaux (plus de 85% chez le blé).



© Inra / Céline Richard-Morand.



© Inra / Céline Richard-Morand.

Plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 35 jours sur milieu enrichi en azote (en haut) et appauvri en azote (en bas).

7 LA COLLECTION DE MUTANTS D'ARABIDOPSIS THALIANA

En 1993, Georges Pelletier et Nicole Bechtold créent une collection de 60 000 mutants qui permet de couvrir, en probabilité, 95% de l'ensemble des 30 000 gènes d'*Arabidopsis* pour identifier leur fonction et les isoler.

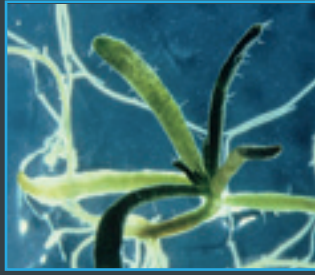
L'obtention de cette collection est rendue possible par la mise au point d'une méthode de transformation d'*Arabidopsis* particulièrement efficace, qui consiste à immerger des plantes en fleurs dans une suspension de bactérie *Agrobacterium tumefaciens* et à forcer l'entrée de la bactérie dans les inflorescences. Cette bactérie possède la particularité de pouvoir transférer un petit fragment d'ADN dans le génome de la plante. Lorsque ce fragment d'ADN s'insère dans un gène, il crée une mutation que l'on peut observer. Mais en plus, il « marque » le gène touché et permet de l'isoler par les méthodes de génétique moléculaire. Cette méthode de transformation « *in planta* » est beaucoup plus efficace que les procédés employés jusqu'alors : jusqu'à 5 plantes transformées par plante inoculée. Ce procédé a été repris depuis pour créer d'autres collections dans le monde (plusieurs centaines de milliers de lignées). Environ 1000 lignées de Versailles ont été distribuées chaque année dans 40 pays pour les études moléculaires. Un exemple de résultats obtenus par les équipes de Versailles grâce à la collection de mutants concerne l'identification de onze gènes impliqués dans la recombinaison méiotique. La recombinaison, processus universel dans le règne vivant, consiste en l'échange de fragments chromosomiques pendant la méiose, la méiose étant la division cellulaire qui est à l'origine de la formation des gamètes (contenus dans le pollen et le sac embryonnaire chez les plantes angiospermes).



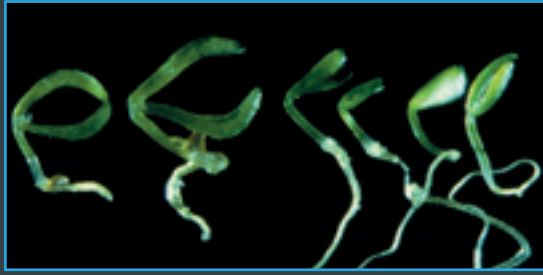
Collection de mutants d'*Arabidopsis thaliana*, dans les serres de l'Inra de Versailles, 1997.

8 EXTINCTION DE GÈNES ET ÉPIGÉNÉTIQUE

C'est en étudiant la surexpression du gène de la nitrate reductase, dans l'équipe de Michel Caboche, qu'Hervé Vaucheret met en évidence dans les années 1980 les phénomènes d'extinction de gènes et leurs mécanismes, impliquant des petits ARN qui empêchent l'expression d'un gène en détruisant l'ARN messager. Il devient par la suite un spécialiste mondial de la régulation dite « épigénétique », qui agit sur l'expression des gènes sans en modifier la séquence et qui conditionne la différenciation des cellules et la plasticité des organismes par rapport à l'environnement.



Mutant Argonaute.

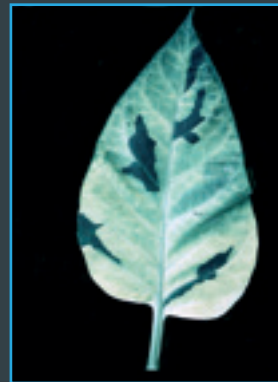
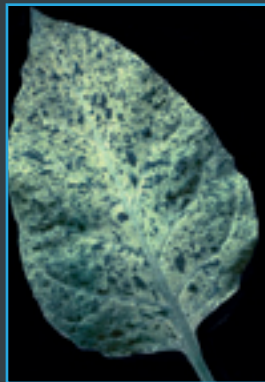


Mutant Argonaute d'*Arabidopsis thaliana*.

Les travaux d'Hervé Vaucheret recourent dans les années 2000 ceux de Catherine Bellini, qui étudie certains mutants obtenus dès 1990 par mutagenèse chimique sur les graines d'Arabette. Un mutant de développement particulier, baptisé Argonaute, mènera à l'identification d'une RNase qui détruit les transcrits cibles des petits RNA vecteurs de l'extinction, une enzyme nécessaire à l'initiation de l'extinction.

9 LES ÉLÉMENTS TRANSPOSABLES

A partir des travaux sur l'instabilité chlorophyllienne chez le tabac, initiés par Alain Deshayes à l'Inra de Dijon dans les années 1970, l'équipe de Marie-Angèle Grandbastien caractérise l'un des premiers rétro-transposons de plantes appelé Tnt1. La découverte des premiers éléments transposables végétaux a par ailleurs valu le prix Nobel de physiologie ou médecine, à l'américaine Barbara McClintock en 1983.



L'insertion de transposons dans le gène TL provoque une déficience chlorophyllienne. Cependant, ces mutations peuvent être réversibles car le transposon n'est pas stable. On observe différents modes de retour au phénotype sauvage (taille et fréquence des plages vertes) selon le moment où le transposon est excisé au cours de développement de l'apex.

Les éléments transposables sont des séquences répétées et mobiles, présentes en grande quantité dans tous les génomes. Les éléments transposables portent des gènes codant pour des enzymes qui leur permettent de se multiplier et de se déplacer de façon aléatoire dans le génome hôte, pouvant ainsi causer des mutations, délétères ou non. À ce titre, ces éléments transposables constituent un remarquable outil d'étiquetage des gènes.

En conclusion, les jalons et exemples présentés dans cette revue illustrent la puissante dynamique scientifique impulsée et soutenue dans la longue durée par les chercheurs en biologie moléculaire de Versailles. Cette dynamique, insérée dans le mouvement scientifique international, n'a cessé de s'amplifier tout au long des années 1990 et dans les années 2000, continuant à produire des avancées scientifiques remarquables à l'Inra de Versailles et dans d'autres laboratoires de l'institut.