

BIOLOGIE VÉGÉTALE

PIERRE BOISTARD

Président de la section

JACQUES JOYARD

Rapporteur

Chantal Astier

Hélène Barbier-Brygoo

Alain-Michel Boudet

Michelle Bouvier

Jean-François Briat

Annie Dedieu

Serge Delrot

Claude Dessaux

Michel Dron

Christian Dumas

Pierrette Fleurat-Lessard

Jean-Michel Grienemberger

Bruno Gronenborn

Bernard Kloareg

Thierry Langin

Yves Meyer

Georges Picard

Paulette Schmitt

Danièle Werck-Reichhart

La biologie végétale se trouve actuellement à la confluence de deux évolutions. Tout d'abord, la discipline elle-même évolue, grâce au développement de nouvelles approches parmi lesquelles la génétique prend une place stratégique. D'autre part, une nouvelle perception des problèmes d'environnement, d'agriculture, d'alimentation et de santé fait prendre conscience de l'importance de l'objet même de la biologie végétale.

L'évolution de la discipline se traduit par la levée de barrières traditionnelles entre divers champs thématiques. C'est ainsi que physiologie et biochimie s'appuient de plus en plus sur la génétique. Réciproquement, les fonctions codées par les gènes deviennent accessibles à une analyse biochimique et physiologique. La biologie du développement manifeste déjà cette convergence, même si les processus se décrivent encore souvent de façon formelle par des relations génétiques d'épistasie ou de dominance. L'analyse des interactions entre plantes et autres organismes (en particulier les microorganismes pathogènes) bénéficie considérablement du développement de l'approche génétique. Cette évolution, accompagnée par le développement de compétences physiologiques fortes, le renforcement des interactions à l'interface chimie-biologie et le développement des outils de la biologie cellulaire doit permettre à la génétique d'exercer sa puissance d'analyse à un niveau d'intégration complémentaire de celui de la plante entière.

Avec la prise de conscience de l'importance de l'environnement, le monde végétal dans sa globalité retrouve une place centrale comme objet d'étude de la biologie. Dans l'univers urbanisé et technicisé de la fin du deuxième millénaire, les plantes sont souvent le plus proche contact de l'homme avec le monde vivant qui ne le renvoie pas immédiatement à lui-même et à ses angoisses. Le monde végétal livre aussi un diagnostic, facilement accessible, de l'état de l'environnement. Si les problèmes alimentaires essentiels ont été résolus dans les pays occidentaux, c'est essentiellement grâce aux progrès de l'agriculture. Ces problèmes demeurent aigus dans les pays en voie de développement, et leur gravité pourrait s'amplifier avec l'expansion démographique. L'objectif d'une agriculture respectueuse de l'environnement, mieux adaptée à des contextes locaux très divers, prenant en compte les besoins des utilisateurs, impose la poursuite et l'intensification de l'effort de recherche sur les végétaux impliqués dans la production agricole, effort en cohérence avec les évolutions thématiques récentes qui caractérisent la discipline.

On le voit : convergences thématiques et prise de conscience de l'importance de l'objet végétal pour l'homme et son environnement donnent à la biologie végétale une place bien identifiée dans le paysage des Sciences de la Vie. C'est ainsi que le champ couvert par la section 27 se distingue de celui des autres sections des Sciences de la Vie, d'une part, par le caractère très général de la thématique qu'il désigne et, d'autre part, par la délimitation de son objet d'études. Cette situation favorise en fait le dialogue entre membres d'une communauté scientifique marquée nécessairement par une forte pluridisciplinarité. La pratique de cette démarche s'étend à des modèles biologiques autres que les plantes au sens strict, mais faisant l'objet du même type d'approche pluridisciplinaire. Ainsi, l'étude des microorganismes photosynthétiques, des champignons ou des algues vient enrichir l'éventail des modèles biologiques utilisés.

Abréviations utilisées

CEPH : Centre d'Étude du Polymorphisme Humain
EST : Étiquettes de Séquences Transcrites
PCR : Polymerase Chain Reaction
QTL : Quantitative Trait Loci
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
YAC : Yeast Artificial Chromosome

1 - LA BIOLOGIE VÉGÉTALE ET SES ENJEUX

1. 1 ENJEUX SCIENTIFIQUES

L'autotrophie, caractéristique des plantes, est à l'origine de spécificités qui motivent des recherches de base sur le métabolisme de la cellule végétale. Les études du métabolisme et de la bio-énergétique cellulaire mettent en évidence la spécificité de la compartimentation au sein de la cellule végétale. La paroi cellulaire et la vacuole, qui occupent l'essentiel du volume cellulaire, imposent des contraintes considérables au fonctionnement de la cellule végétale. Leur connaissance est essentielle pour la compréhension de la physiologie de la plante (équilibre hydrique, croissance cellulaire...). À cette compartimentation fonctionnelle se superpose une compartimentation génétique particulièrement marquée puisque la cellule végétale est le produit de l'expression de trois génomes : nucléaire, mitochondrial et plastidial. Chacun de ces trois génomes interagit avec les autres, et l'étude du degré d'autonomie de l'expression génétique des organites de la cellule végétale est un des domaines de recherche les plus fascinants. L'analyse systématique de la structure du génome nucléaire est réalisée sur quelques plantes modèles, et en particulier sur une crucifère proche du colza, *Arabidopsis thaliana*, et sur une monocotylédone, le riz. Ces travaux concernent tous les domaines de recherche en biologie végétale et représentent un enjeu scientifique de premier plan.

Le schéma morphogénétique des plantes s'avère *a priori* fondamentalement différent de celui rencontré chez les modèles animaux et procaryotes dans les études de biologie du développement. En effet, au cours du cycle biologique, il n'y a formation que d'un nombre limité d'organes végétatifs et reproducteurs. Cependant, le mécanisme de la double fécondation, l'absence d'une lignée germinale, la croissance et la différenciation des tissus à partir de méristèmes, l'effet des contraintes de

l'environnement sur la morphogenèse et la croissance, sur les caractéristiques structurales et physiologiques des cellules végétales justifient une étude approfondie des mécanismes moléculaires mis en jeu. Les approches génétiques et moléculaires, appliquées à des systèmes modèles adéquats, permettent de disséquer des processus aussi complexes que la formation de la fleur, la pollinisation, la reproduction, le développement de la graine, la maturation du fruit...

L'extrême dilution des ressources nutritives dans l'environnement (CO_2 , ions minéraux, et souvent eau) fait que la plupart des cellules de la plante sont directement confrontées aux conditions environnementales, contrairement à leurs homologues du monde animal protégées par l'homéostasie du milieu intérieur. Les cellules des plantes supportent les conditions agressives d'un milieu extérieur continuellement fluctuant (carences en nutriments, stress hydrique, excès ou défaut de lumière, fluctuations brutales de la température, agressions par des agents pathogènes...). La lumière est un facteur de l'environnement ayant un impact majeur non seulement sur le métabolisme général, mais aussi sur la croissance et le développement de la plante.

Parmi les facteurs du milieu susceptibles d'interagir avec les plantes, les facteurs biotiques, en particulier les microorganismes (bactéries, champignons) et les virus, présentent un intérêt tout particulier. De nombreuses interactions entre plantes et microorganismes peuvent être bénéfiques pour la plante, comme c'est le cas pour les symbioses *Rhizobium*-légumineuses ou mycorhiziennes. Il faut rappeler que c'est la découverte de la capacité qu'ont certaines bactéries (*Agrobacterium tumefaciens* et *A. rhizogenes*) de transférer un fragment de leur ADN dans des cellules végétales qui a permis l'essor extraordinaire du génie génétique végétal. Dans de nombreux cas, des agents pathogènes variés ont le potentiel de parasiter des plantes et de provoquer des maladies. De fait, les interactions plantes-microorganismes sont d'une complexité extrême ; elles dépendent de la probabilité de rencontre des deux partenaires, du pouvoir infectieux de l'agent pathogène et de la capacité de la plante à résister à l'infection. Elles revêtent aussi une très grande spécificité qui, dans

de nombreux cas, dépend de la présence d'un seul gène chez le microorganisme (gène d'avrulence) et d'un seul gène chez la plante (gène de résistance). La détermination des bases moléculaires de cette interaction nécessite l'analyse des divers éléments du pouvoir pathogène (gènes du pouvoir pathogène, gènes d'avrulence) et des éléments de riposte de l'hôte (gènes de résistance, cascades de signaux et de transduction qu'ils induisent). Ces quelques remarques soulignent l'importance des enjeux tant scientifiques qu'agronomiques des travaux sur les interactions plantes-microorganismes.

Comprendre l'intégration de l'ensemble des processus physiologiques au sein de la cellule et des phénomènes contrôlant la vie de la cellule et conduisant à la croissance et au développement de la plante sont des enjeux majeurs de notre discipline. Pour cela, il est indispensable d'explorer les mécanismes moléculaires de communication inter- et intracellulaire. En particulier, il importe de comprendre comment un signal participe à la régulation d'un processus donné au sein de la plante, par exemple un processus de développement ou de défense contre un agent pathogène. Aux phytohormones classiques (auxines, acide abscissique, éthylène...) viennent s'ajouter d'autres médiateurs chimiques (acide jasmonique, acide salicylique, oligosaccharides, brassinolides, peptides divers...) qui gouvernent la morphogenèse et/ou les défenses des plantes. C'est aussi le cas du signal lumineux qui joue chez les plantes un rôle original et majeur dans de nombreuses étapes du développement. L'identification au sein d'un processus global des réponses élémentaires et précoces directement régulées par le signal étudié et exprimées au niveau cellulaire ou subcellulaire, l'analyse moléculaire et fonctionnelle des divers événements constituant des cascades de régulation, la caractérisation des récepteurs des signaux reconnus par les plantes constituent autant d'enjeux majeurs. Plus globalement, les études de l'intégration fonctionnelle des processus de signalisation, ou celle des messagers secondaires à l'échelle de la plante, sont encore plus ardues. Elles présentent un intérêt physiologique indéniable et des perspectives d'application tout à fait importantes.

1. 2 ENJEUX AGRONOMIQUES, ÉCONOMIQUES, INDUSTRIELS ET SOCIAUX

Le secteur clé d'applications de nos recherches concerne les productions végétales. L'évolution des politiques agricoles et la prise en compte de la nécessaire protection de la santé humaine et de l'environnement modifient en permanence les enjeux dans ce domaine. L'un des objectifs à atteindre est d'optimiser la production végétale, tout en limitant les nuisances sur l'environnement. À cet impératif de quantité s'ajoutent des exigences de qualité qui peuvent différer selon l'état de développement des pays et les conditions climatiques. La nécessité d'une plus grande prise en compte des besoins des utilisateurs (consommateurs des pays développés et du tiers-monde, industriels du secteur de l'agro-alimentaire, agriculteurs) dans le respect de l'environnement repose presque exclusivement sur le progrès scientifique et technique.

Les microorganismes pathogènes qui ont le potentiel de parasiter des plantes et de provoquer des maladies, parfois foudroyantes, sont à l'origine de 15 à 20 % de pertes de production agricole. Ce résultat, somme toute convenable, est dû à une lutte chimique intense et parfois à l'utilisation de variétés résistantes à l'agent pathogène. Or, actuellement, l'impact sur l'environnement ainsi que le coût élevé des pesticides utilisés en agriculture imposent une meilleure maîtrise de leur utilisation. Il est impératif d'une part, de favoriser la découverte de nouvelles molécules phytosanitaires plus efficaces, sans risques pour l'homme et son environnement et d'utilisation plus facile pour l'agriculteur, et, d'autre part, d'utiliser au mieux les résistances génétiques. Un autre objectif majeur est la création de nouvelles variétés mieux adaptées à des conditions climatiques difficiles (résistance à la sécheresse, adaptation aux milieux salins) ou permettant de mieux valoriser les intrants. Il faut souligner aussi l'intérêt des plantes comme source de molécules spécifiques d'intérêt économique, et donc adaptées à des objectifs industriels (plantes à taux de lignine réduite, graines oléagineuses à composition lipidique particulière...). En particulier, la grande variété des polymères glucidiques rencon-

trés chez les végétaux présentent un intérêt économique majeur.

Chacun des problèmes ainsi abordés nécessite la compréhension de fonctions à un niveau fondamental. La prise en compte des aspects quantitatifs et qualitatifs de production, la création de nouvelles molécules phytosanitaires imposent de mieux connaître les voies du métabolisme primaire et secondaire des plantes, en particulier celles intervenant dans le développement et la propagation des végétaux. En parallèle, il faut connaître de manière détaillée les modes de transport, les voies de métabolisation ou d'accumulation des pesticides et leur biodisponibilité au sein de la cellule végétale, non seulement sur quelques systèmes modèles, mais aussi sur les grandes espèces d'intérêt économique. La création de nouvelles variétés implique une parfaite maîtrise tant de la reproduction (fécondation, incompatibilité sexuelle, stérilité mâle cytoplasmique...) que des processus de régénération des cellules transformées, d'insertion et d'expression des gènes introduits. La valorisation des intrants demande une meilleure connaissance des mécanismes de régulation de la gestion de l'eau, ainsi que de l'assimilation et de la transformation des éléments nutritifs. Une meilleure connaissance des interactions plantes-agents pathogènes devrait permettre la conception de stratégies de lutte originales : stratégie "dérivée de l'agent pathogène" dans la lutte contre les infections virales (expression du gène de capsid virale ou d'autres séquences virales), ou stratégie basée sur l'utilisation des mécanismes naturels de défense des plantes dans la lutte contre les infections bactériennes ou fongiques. Tous ces enjeux imposent le développement de nouveaux outils, indispensables pour le travail de sélection, nécessitant le contrôle du cycle cellulaire, l'identification de gènes ou de portions de chromosomes impliqués dans les fonctions recherchées, la création de mutants d'insertion, QTL, marqueurs moléculaires tels que sondes RFLP, microsatellites... Ils imposent, d'autre part, de mettre en place les moyens d'apprécier et de préserver la diversité génétique affectant les fonctions en cause.

Les recherches en biologie végétale présentent aussi des enjeux importants pour la protection de l'environnement. Par exemple, les plantes présen-

tent d'excellentes potentialités comme bioindicateurs de pollution. L'utilisation de plantes accumulatrices ou à forte capacité de métabolisation devrait permettre de traiter à peu de frais des sites fortement pollués par des métaux ou des molécules organiques. De plus, la production de plantes transgéniques optimisées pour la phytoremédiation est possible grâce aux outils moléculaires disponibles.

Il faut enfin rappeler que la pharmacopée est née de l'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques. À en juger par les efforts actuellement déployés pour découvrir, parmi les substances naturelles d'origine végétale, de nouveaux agents antitumoraux ou anti-sida, les enjeux dans ce domaine sont considérables. Il suffit de penser à la vinblastine et au taxol, deux anti-tumoraux modernes, pour se convaincre de l'intérêt d'analyser l'immense réservoir que constitue le monde végétal.

Certains des enjeux agronomiques, économiques et industriels que nous venons d'évoquer concernent essentiellement certains grands groupes industriels, d'autres plutôt les agronomes et les chercheurs de l'INRA, presque tous impliquent une connaissance fondamentale spécifique au CNRS. Par exemple, bien que la création variétale ne soit pas un objectif du CNRS, l'étude de la stabilité d'un génotype et des mécanismes contribuant à son instabilité (transpositions, méthylations, co-suppression...) sont des problèmes fondamentaux dont l'étude est indispensable à l'émergence des outils biotechnologiques de l'avenir.

Enfin, on ne peut oublier les enjeux culturels associés aux recherches sur les plantes. Les relations des hommes avec les plantes ont un impact culturel majeur : depuis l'origine, le développement des diverses civilisations a été étroitement lié à la maîtrise de la culture de quelques plantes (blé, maïs, riz, pomme de terre, chou...). Au-delà des problèmes liés à la quantité et la qualité des aliments dont disposera l'homme au cours des décennies à venir, il faut souligner que l'homme du XXI^e siècle ne sera pas simplement un consommateur, mais qu'il cherchera à améliorer la qualité de son cadre de vie : les productions horticoles, les plantes ornementales et les arbres sont des éléments clés de la qualité de l'environnement urbain comme des paysages de nos campagnes.

2 - ÉVOLUTION ET TENDANCES

2. 1 DES OUTILS MOLÉCULAIRES NOUVEAUX SONT DISPONIBLES

Analyse des génomes nucléaires d'*Arabidopsis* et du riz

L'action coordonnée au niveau international pour analyser le génome nucléaire d'*Arabidopsis* avait deux objectifs principaux. Le premier était d'établir la carte physique de ce génome afin de faciliter le clonage positionnel de gènes et de disposer d'un support indispensable pour le séquençage complet. Le second objectif consistait à obtenir le plus grand nombre possible d'EST en séquençant partiellement des ADNc obtenus à partir de diverses sources.

La carte génétique du génome d'*Arabidopsis* s'appuie aujourd'hui sur 280 marqueurs donnant un phénotype visible et plus de 500 marqueurs moléculaires, principalement RFLP. En ce qui concerne la carte physique, plusieurs systèmes ont été développés pour produire des *contigs*. Parmi ces banques, la banque produite grâce à une collaboration CEPH-INRA-CNRS s'est avérée la plus performante, tant par la taille des inserts (450 Kb) que par son faible taux de chimérisme. À ce jour, la carte physique presque complète du chromosome IV (95 % de couverture en 4 *contigs*) a été publiée, et celles des chromosomes I, II et V sont attendues très prochainement. Celle du chromosome III nécessite probablement encore au moins un an de travail. Parallèlement, plus de 28 000 EST indépendantes ont été produites en quantité égale par un groupement de laboratoires américains et par les laboratoires français regroupés dans un GDR CNRS. Cet ensemble caractérise les produits de l'expression d'environ 8000 gènes différents dont 40 % ont pu être identifiés par homologie avec des gènes connus dans d'autres espèces.

Parallèlement au travail sur *Arabidopsis*, un effort comparable a été entrepris sur le génome du riz, dans le cadre du *Rice Genome Program* japonais. Ce projet a produit 10 000 EST rendues publiques, une carte génétique (avec 1600 marqueurs RFLP) ainsi qu'une collection de YAC dont l'ordonnement est en cours. Le séquençage des clones d'*Arabidopsis* et de riz permet de caractériser, pour une protéine donnée, les zones de séquence qui sont conservées chez ces deux plantes (mono- et dicotylédones), et donc probablement chez de nombreuses autres espèces végétales. Ces comparaisons permettent de définir des oligonucléotides pouvant permettre l'isolement des ADNc codant pour la protéine recherchée chez ces autres plantes. La comparaison des séquences d'*Arabidopsis* et de riz est donc susceptible de révéler des caractéristiques générales des génomes végétaux, ainsi peut-être que des spécificités des dicotylédones et des monocotylédones, ou l'effet de la domestication... L'analyse des séquences végétales a d'ailleurs permis de mettre en évidence deux faits saillants, insoupçonnables avant ces programmes de séquençages :

- *Le génome végétal comporte des gènes exprimant des protéines décrites précédemment uniquement chez des animaux et dans des situations qui n'ont pas leur correspondant chez les végétaux* : Cyclophiline (protéine réceptrice de la cyclosporine, médicament anti-rejet chez l'homme), un récepteur de neuroleptique, une hémoglobine, une protéine de synapse, un gène contrôlant le développement de l'aile chez la drosophile... Quels rôles jouent ces gènes dans la vie de la plante ?

- *De nombreux gènes constituent des familles multigéniques, dont les différents membres sont souvent si divergents qu'il est impossible de les identifier par hybridation, mais par contre ils correspondent à la même activité enzymatique ou fonction structurale*. De telles familles multigéniques n'ont pas été trouvées dans les EST humaines, et pourraient être caractéristiques de l'organisation du génome végétal.

L'après-séquençage systématique du génome

Intérêt d'une démarche génétique systématique

Partant du principe que certains gènes régulateurs devaient chez les plantes être homologues de gènes connus chez d'autres organismes (gènes à homéodomaines ou codant pour des protéines kinases ou des oncogènes), une recherche analytique par homologie a souvent été favorisée. Le danger principal d'une telle démarche est qu'elle focalise l'intérêt sur un type de protéine déjà identifié dans d'autres systèmes. À l'inverse, l'analyse génétique constitue une approche plus systématique sans *a priori* initial. De fait, on assiste actuellement à une explosion des approches génétiques en Biologie végétale. Appliquées à des systèmes modèles adéquats, elles permettent de disséquer des voies métaboliques, des processus de développement ou des voies de transduction de signaux. Les travaux sur les cascades de régulation par la lumière, l'éthylène ou l'acide abscissique sont les meilleures illustrations de la puissance d'une telle approche. Elle permet d'identifier divers éléments d'une cascade contrôlant une réponse à un signal donné, de préciser leur hiérarchie au sein de cette cascade, puis de cloner les loci ainsi caractérisés. Ces travaux révèlent que certaines des protéines actives dans ces cascades sont homologues de protéines procaryotes, alors que d'autres apparaissent comme des chimères associant des domaines fonctionnels présents sur des protéines distinctes dans d'autres systèmes eucaryotes.

Le développement d'approches génétiques est essentiel dans de nombreux autres domaines, par exemple pour l'étude des transports transmembranaires. On ne connaît actuellement chez les plantes aucun mutant de pompe, de canal ionique ou de canal à eau. Les pathologies liées à des mutations de gènes de canaux ioniques ont démontré l'importance de ces gènes dans le développement et la physiologie des organismes animaux. Chez les plantes, des mutations similaires, qui affecteraient des fonctions aussi fondamentales que la régulation hydro-minérale ou les réponses hormonales, devraient également provoquer des altérations

phénotypiques notables. Cependant, on ne dispose pas encore de crible de sélection simple pour isoler de tels mutants. À partir des données moléculaires obtenues sur les transporteurs, on peut envisager des approches alternatives pour perturber l'expression et l'activité des systèmes de transport afin de mieux comprendre leur fonction intégrée.

Les stratégies en cours de développement

Les outils désormais disponibles sont précieux tant pour l'analyse structurale du génome que pour l'accès aux gènes individuels. La première question qui se pose est la compréhension de la fonction des gènes. Les stratégies permettant d'aborder cette question ne sont pas nombreuses et généralement très lourdes, comme l'expression de séquences antisens. Bien que cette limitation ne soit pas rapportée dans la littérature, les nombreux échecs de l'approche antisens sont bien connus dans les laboratoires. Cette situation devrait s'améliorer avec le développement de promoteurs inductibles permettant de contrôler l'expression des séquences antisens. Au-delà de ces approches de génétique réverse classique, de nouvelles possibilités sont à explorer plus largement, comme la cartographie génétique des différents gènes qui permettra d'établir une éventuelle correspondance de ces loci avec des mutations déjà décrites, ou leur mutagenèse par inactivation insertionnelle dirigée.

- *Inactivation de gènes par recombinaison.* La voie utilisée communément chez la levure pour connaître la fonction d'un gène consiste à l'inactiver en modifiant sa séquence par recombinaison homologue avec une version altérée du gène portée par un plasmide introduit dans les cellules. La haute fréquence de recombinaison homologue chez la levure rend cette approche extrêmement efficace. Cette stratégie a pu être utilisée avec succès chez la souris, malgré un faible taux de recombinaison homologue. Chez les plantes, la fréquence de recombinaison homologue est très faible (10^{-5} à 10^{-6}), ce qui constitue un frein à la mise en œuvre systématique de cette approche, en dépit de quelques succès obtenus récemment chez *Arabidopsis* et le tabac. Compte tenu de l'importance de modifier un gène résident chez les plantes, tant pour analyser les fonctions des gènes que pour des applications biotechnologiques, la maîtrise de

la recombinaison homologue est essentielle. Il faut rappeler que la transformation du génome chloroplastique de *Chlamydomonas* s'effectue par recombinaison homologue. Cette algue unicellulaire est donc un excellent modèle pour comprendre les fonctions des protéines codées par le génome chloroplastique.

- *Stratégies d'accès aux gènes par mutagenèse.* Pour les espèces qui disposent – ou vont disposer prochainement – d'une carte physique complète du génome, couplée à une carte génétique fine, les gènes identifiés par mutagenèse classique pourront être clonés par positionnement, puis complémentation. La voie de la mutagenèse insertionnelle est également développée avec deux types d'outils, éléments transposables et ADN-T. Cette stratégie, développée à l'INRA de Versailles, devrait permettre de passer chez *Arabidopsis* du gène vers la fonction. Des pools d'ADN, provenant de lots ordonnés de mutants d'insertion d'*Arabidopsis*, devraient permettre de rechercher par PCR les mutants présentant un ADN-T inséré dans un gène particulier à l'aide d'un couple d'oligonucléotides, dont l'un est choisi dans le gène et l'autre dans l'ADN-T. Dans le cas du maïs, la Société Pioneer a développé une autre stratégie à partir d'une collection de mutants (transposons μ) recouvrant la totalité du génome. Il devient ainsi possible, à partir de la séquence d'un gène codant pour une protéine à fonction indéterminée d'obtenir le mutant correspondant ("*gene machine*"). Ces approches devraient bénéficier d'un soutien fort afin de poursuivre le développement des outils et permettre leur exploitation au bénéfice de l'ensemble de la communauté.

Passer du gène à la protéine

La description des processus physiologiques en termes moléculaires conduit nécessairement à une approche réductionniste des problèmes. Le saut d'une culture physiologique à une culture de biologie moléculaire laisse, dans beaucoup de cas, un fossé, celui de la protéine. Or la compréhension de la fonction des gènes implique que l'on travaille sur la protéine elle-même. L'utilisation de systèmes d'expression hétérologue (*Escherichia coli*, levure, ovocytes de Xénope, cellules d'insecte ou de mammifères) permet la production de protéines en vue d'une étude structurale et fonctionnelle. Cependant,

la présence de codons rares, la nécessité d'introduire les modifications post-traductionnelles indispensables, l'insertion de cofacteurs ou de centres métalliques, la localisation membranaire posent des problèmes souvent difficiles à résoudre sans une approche biochimique. L'expression de protéines recombinantes modifiées par mutagenèse dirigée ouvre de nouvelles perspectives pour les études fonctionnelles (compréhension des mécanismes de la catalyse ou du transport, spécificités et stabilité de la protéine...).

Vers des concepts nouveaux ?

Le problème de l'inactivation des transgènes et l'hérédité épigénétique est un défi majeur en génétique. Il y a encore quelques années, un des problèmes essentiels à résoudre pour développer les applications biotechnologiques dans le domaine végétal semblait être l'isolement de promoteurs appropriés conférant une expression spécifique dans un tissu ou à un stade de développement particulier. L'expression des transgènes, en revanche, ne semblait pas devoir poser trop de problèmes. Or, de multiples cas d'inactivation de l'expression de transgènes ont été rapportés, cette inactivation étant dépendante de la présence de plusieurs copies de séquences d'ADN homologues. Des cas analogues ont été rapportés chez la *Drosophile* et chez les champignons. Ils rappellent un certain nombre de situations biologiques non liées à la transgenèse et encore mal élucidées au plan moléculaire. Parmi celles-ci, on peut citer les phénomènes de "*variégation*" par effet de position chez la *Drosophile*, les phénomènes d'empreintes parentales chez les mammifères et les phénomènes de "*paramutation*" décrits dans les années 1950-1960 chez certaines plantes supérieures. Le développement des recherches dans ce domaine devrait aboutir à la découverte de nouveaux concepts concernant la régulation des gènes et l'hérédité épigénétique. Les modèles végétaux, mais aussi les champignons filamenteux, sont particulièrement bien placés pour jouer un rôle important dans cette aventure.

2. 2 LA CELLULE VÉGÉTALE, UN MODÈLE BIOLOGIQUE ORIGINAL AUX MULTIPLES POSSIBILITÉS

Organisation fonctionnelle de la cellule végétale

Bioénergétique et métabolisme cellulaire végétal

La complexité fonctionnelle du métabolisme végétal est bien illustrée dans les cellules à métabolisme de type C3 par la distribution des enzymes de la photorespiration écartelées entre trois compartiments : chloroplastes, peroxysomes et mitochondries. Si le métabolisme énergétique de la cellule végétale est basé sur les interactions entre chloroplastes et mitochondries, l'importance de ces organites dans le métabolisme de la cellule végétale va bien au-delà de leur rôle dans la photosynthèse et la respiration.

Ainsi, les mitochondries végétales constituent un excellent modèle pour l'étude de protéines spécifiques de cet organite. Le complexe de la glycine décarboxylase, qui catalyse une étape clé de la photorespiration, a été entièrement disséqué au plan moléculaire, structural et fonctionnel dans les mitochondries végétales, facilitant ainsi son étude dans d'autres systèmes (foie...). Ce système peut servir de modèle pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors des décarboxylations oxydatives catalysés par d'autres enzymes, bactériennes ou eucaryotes, intervenant dans la décarboxylation d'acides dicarboxyliques.

Par ailleurs, les particularités du métabolisme des cellules végétales confèrent à leurs mitochondries des propriétés spécifiques, comme l'illustre la découverte récente que la dihydrofolate réductase est, chez les plantes, une enzyme mitochondriale bifonctionnelle impliquée dans la synthèse du folate et du thymidylate. Les cellules animales, incapables de synthétiser le folate, forment le thymidylate grâce à une enzyme monofonctionnelle localisée dans le cytosol.

La caractérisation des fonctions métaboliques des compartiments de la cellule végétale est loin d'être achevée. L'approche biochimique est l'outil de base des travaux visant à élucider non seulement le fonctionnement des systèmes transducteurs d'énergie, le métabolisme du carbone, du soufre ou de l'azote, mais aussi le métabolisme secondaire. L'évolution des recherches dans ce domaine s'effectue dans des voies différentes avec :

- *L'étude biochimique, moléculaire et structurale des protéines.* Encore peu développées dans le cas des protéines membranaires, les études structurales ont bénéficié des programmes IMABIO ou Protéine 2000. Elles permettent de comprendre les interactions protéine-substrat, protéine-ligand ou, dans le cas de complexes, les interactions protéine-protéine. La recherche de nouveaux herbicides utilise ces approches afin de créer des molécules spécifiques des voies métaboliques végétales.

- *L'analyse in vivo du métabolisme cellulaire.* L'application de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à l'étude du métabolisme de la cellule végétale a ouvert des perspectives totalement originales. Il est ainsi possible d'étudier de façon dynamique et non destructive le statut énergétique de la cellule (phosphore 31) ou les flux métaboliques (carbone 13), et de suivre l'impact de carences ou de stress divers sur le fonctionnement de la cellule. L'intérêt essentiel de la RMN métabolique est de permettre une approche sans *a priori* du fonctionnement cellulaire, présentant ainsi des avantages comparables à l'outil génétique. D'ailleurs, ces deux approches sont complémentaires, certains aspects du métabolisme de plantes modifiées génétiquement pouvant être analysés grâce à la RMN. Les perspectives ainsi ouvertes sont encore peu explorées.

- *La création et l'utilisation de plantes transgéniques par surexpression ou à expression antisens.* Ces stratégies, généralement très lourdes, ont un intérêt souvent limité à cause de l'existence de familles multigéniques. Par ailleurs, ces expériences ne font souvent que confirmer la complexité des processus de régulation du métabolisme. Cependant, des succès incontestables justifient totalement cette approche pour la dissection de certaines voies métaboliques. C'est en particulier le cas

de la biosynthèse de la lignine dont la composition a pu être modifiée par génie génétique. Ces résultats ouvrent la voie à d'importantes applications biotechnologiques pour l'exploitation de la biomasse (par exemple en facilitant la délignification des pâtes à papier ou en augmentant la digestibilité des plantes fourragères).

Biogenèse et mise en place des structures spécifiques à la cellule végétale.

La spécificité de la compartimentation structurale et fonctionnelle de la cellule végétale est illustrée par l'existence d'une paroi cellulaire rigide, matrice extracellulaire très particulière, d'une énorme vacuole occupant l'essentiel du volume cellulaire, ainsi que de divers types de plastes (proplastides, étioplastes, chloroplastes, amyloplastides, chromoplastes...) qui sont le site de biosynthèse de nombreuses molécules essentielles à l'ensemble de la cellule (acides aminés, acides gras...).

La biogenèse des membranes végétales est organisée autour de deux pôles distincts, l'enveloppe limitante des plastides et le réticulum endoplasmique, contrairement aux cellules animales où le rôle central est dévolu au réticulum endoplasmique. Si l'enveloppe est impliquée dans la biosynthèse de composés spécifiques des plastides, le réticulum endoplasmique (associé à l'appareil de Golgi) joue un rôle clef dans la mise en place des systèmes endomembranaires et de la paroi cellulaire. La biosynthèse, la maturation et l'adressage des polysaccharides pariétaux et des glycoconjugués, et en particulier la biosynthèse des glycoprotéines végétales, sont des domaines où l'évolution des connaissances est actuellement rapide. Cependant, les processus d'exo- et endocytose restent mal connus, essentiellement pour des raisons pratiques (présence de la paroi, difficulté d'isoler les systèmes endomembranaires des cellules végétales). Des méthodes très diverses (de la biochimie à la microscopie confocale, en passant par les techniques d'immunocytochimie) sont mises en jeu pour parvenir à mieux comprendre ce processus dans la cellule végétale. La recherche de gènes homologues de gènes connus dans d'autres systèmes (levure...) devrait aussi permettre de progresser dans ce domaine.

L'étude des protéines membranaires impliquées dans les processus de biogenèse est encore à un stade embryonnaire, mais ce problème n'est pas propre aux systèmes végétaux. La biochimie et l'enzymologie des enzymes membranaires ou travaillant au contact des membranes sont appelées à se développer. C'est un domaine où les approches multidisciplinaires impliquant aussi la chimie et la physique semblent indispensables, non seulement à cause de la position stratégique des membranes, mais aussi pour des raisons techniques car l'étude biochimique des protéines membranaires, en particulier des protéines peu abondantes, reste difficile : la purification d'une protéine membranaire n'est jamais triviale, sa surexpression problématique, son analyse fonctionnelle toujours délicate, sa cristallisation et son étude structurale encore exceptionnelles. Il n'existe pas de méthode générale pour étudier une protéine membranaire. Cette remarque est encore plus valable pour les protéines n'ayant pas d'activité enzymatique facilement mesurable (récepteurs, canaux ioniques...).

Compartmentation et transport

La rigidité de la paroi permet l'établissement d'une pression de turgescence intracellulaire essentielle pour l'équilibre hydrique de la plante ou la croissance cellulaire. Le maintien de cette pression implique des flux d'ions, de solutés et d'eau à travers le tonoplaste ou le plasmalemme. La vacuole, en stockant passagèrement des anions métabolisables tels que NO_3^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , ainsi que des cations, contribue fortement à la régulation du métabolisme général. Ce sont essentiellement les densités et les caractéristiques cinétiques des transporteurs des membranes plasmique et vacuolaire qui déterminent les concentrations ioniques dans le cytosol. Des outils performants (électrophysiologie, en particulier patch-clamp) permettent de mettre en évidence des propriétés de transport spécifiques du plasmalemme ou du tonoplaste, mais la caractérisation biochimique des protéines impliquées est extrêmement délicate. Ces dernières années ont vu croître les données moléculaires concernant les systèmes de transport transmembranaires chez les plantes. Des gènes codant pour des pompes électrogènes (en particulier H^+ -ATPases, pyrophosphatase) et des systèmes de co-transport avec les protons (hexose, saccharose, acides aminés, nitrate)

ont été isolés, de même que les premiers gènes codant pour des canaux ioniques (canaux potassium entrants, canaux de type ClC) et des canaux à eau. Dans beaucoup des exemples cités, c'est l'utilisation de systèmes d'expression fonctionnelle hétérologue qui a permis l'isolement de ces gènes et/ou la caractérisation fonctionnelle de leurs produits. Ces approches ouvrent la voie aux études fines du fonctionnement *in vitro* de ces transporteurs. L'intégration de ces données au niveau de la cellule représente une voie de recherche majeure pour les années à venir. En effet, les cellules de garde des stomates, qui régulent les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère, constituent à l'heure actuelle le seul modèle végétal sur lequel une telle intégration a été réalisée au plan fonctionnel.

Différenciation, vie et mort des cellules

Expression des trois génomes de la cellule végétale

Le séquençage systématique des génomes végétaux permet désormais l'analyse de leur organisation, et facilite l'identification des gènes et de leurs fonctions. Ainsi, il importe de développer les études fonctionnelles du génome nucléaire (transcription *in vitro*, l'analyse des séquences répétées ou des éléments transposables) grâce aux outils moléculaires désormais disponibles. L'analyse des génomes végétaux donne aussi la possibilité de comprendre comment des séquences qui ont une origine commune ont progressivement acquis des fonctions distinctes ; c'est aussi l'accès aux mécanismes moléculaires qui contrôlent la diversité génétique et la spéciation. Il est enfin possible de mieux comprendre l'origine du matériel génétique des organites, d'analyser les contraintes qui régissent la répartition des gènes entre organites et noyau, ainsi que le degré d'autonomie de l'expression génétique des organites.

La structure et les séquences comparées des génomes chloroplastiques montrent une très grande homologie chez toutes les plantes étudiées, et il est probable que le séquençage des génomes chloroplastiques d'autres espèces n'apportera pas d'informations supplémentaires importantes. Aussi, l'inté-

rêt se porte plutôt actuellement sur les génomes mitochondriaux. Cependant, l'étude des mécanismes d'épissage en *trans* sur le génome chloroplastique et sur les protéines régulatrices de la répllication ou de la transcription des gènes des ARNr chloroplastiques montre l'importance de poursuivre l'étude fonctionnelle du génome chloroplastique.

Le génome mitochondrial de *Marchantia* a été entièrement séquencé, plusieurs groupes se sont attaqué aux génomes d'*Arabidopsis*, du maïs et du riz. La situation est bien différente de celle des chloroplastes. En effet, le génome mitochondrial montre une grande plasticité, et la détermination de la séquence complète du génome mitochondrial d'une plante supérieure n'arrêtera pas l'effort de recherche sur les autres plantes. Les raisons sont multiples. Tout d'abord, la structure de ce génome fait toujours l'objet de débats. De gros efforts ont été faits pour caractériser des cytoplasmes normaux et les cytoplasmes mâle-stérile dont l'importance est évidente pour la production de semences hybrides. La stérilité mâle cytoplasmique (*cms*) se caractérise par des remaniements qui mettent en jeu des phénomènes de recombinaison mitochondriale. Des éléments de réponse à ces problèmes peuvent être apportés par les études réalisées chez les champignons filamenteux, en particulier *Podospora anserina*. Le second point qui explique l'intérêt des recherches sur l'ADN mitochondrial des plantes est son originalité. L'analyse du génome mitochondrial de *Marchantia* a révélé la présence de gènes qui ne sont pas présents dans les mitochondries des animaux ou des champignons (gènes codants pour les protéines impliquées dans la biogenèse des cytochromes *c*, pour un transporteur ABC, pour une sous-unité du complexe I...). L'étude de la transcription du génome mitochondrial commence, avec la mise au point de systèmes *in vitro*. Cependant, une des caractéristiques de la mitochondrie végétale est que beaucoup de transcrits sont épissés en *cis* comme en *trans*. Le phénomène d'édition des ARN est post-transcriptionnel et l'on connaît maintenant un grand nombre de sites d'édition. Si l'on parvient à reproduire *in vitro* l'activité d'édition, il devrait être possible d'analyser et de disséquer les structures mises en œuvre dans l'édition des ARN.

Totipotence de la cellule végétale et régulation du cycle cellulaire

La totipotence est la propriété qu'ont les cellules végétales de se différencier et de réinitier leur cycle cellulaire. L'étude des gènes impliqués dans la réinitiation du cycle cellulaire (entrée en phase G1) dans les protoplastes de cellules du mésophylle permet d'isoler des facteurs qui régulent le retour à l'état juvénile. Des perspectives nouvelles ont été ouvertes dans ce domaine avec la démonstration d'une interaction physique entre la protéine Rep d'un gémiovirus (*Wheat Dwarf Virus*) et une protéine de rétinoblastome (Rb) humain, impliquée dans la réinitiation du cycle cellulaire. Ce travail a conduit à l'isolement d'un homologue de la protéine Rb chez le maïs. En ce qui concerne la phase S, l'activation des gènes d'histones sert de modèle pour la mise en évidence de facteurs intervenant dans l'induction de la transition G1-S. L'étude du cycle cellulaire est un des domaines où une recherche de gènes homologues de gènes connus dans d'autres systèmes (cellules animales, levures...) a permis de nombreux succès : caractérisation d'activité de type "cycline-dépendent kinase" (CDK) ; de cyclines mitotiques, d'un homologue de *suc1* de *S. pombe* chez le tabac... L'association de ces cyclines à une kinase de type *cdc2*, ainsi que les cascades de phosphorylation/déphosphorylation au niveau des CDK, des tubulines et des laminines, constituent des éléments moteurs de la dynamique de la phase M. Les homologues avec d'autres systèmes n'excluent cependant pas des propriétés originales. Ainsi, un des éléments de cette dynamique, caractéristique de la cytotrière végétale, est la localisation de l'activité centrosomale à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, et non pas ponctuellement au niveau des centrosomes comme dans les cellules animales. De fait, l'immobilité des cellules végétales et la présence d'une paroi rigide imposent une organisation différente du cytosquelette pour la mise en place d'une cellule à polarité définie au sein d'un tissu.

Un des facteurs de progrès dans les recherches sur le cycle cellulaire repose sur la culture de cellules végétales synchronisables. Ainsi, la mise au point d'une technique permettant la synchronisation d'une suspension de cellules de tabac BY2 a fait tomber un verrou technologique. La

généralisation de cette technique à d'autres cellules en culture devrait permettre de caractériser avec précision les périodes au cours desquelles s'expriment cyclines et éléments régulateurs du cycle cellulaire. La complémentation de mutants de levure ainsi que la stratégie double-hybride devrait permettre l'identification de gènes codant pour d'autres facteurs de régulation.

Cellules reproductrices et double fécondation

La pollinisation et la fécondation sont des étapes clefs de la reproduction qui soulèvent des problèmes spécifiques aux plantes. D'autre part, la double fécondation confère une grande originalité au modèle végétal. Les mécanismes moléculaires mis en jeu commencent à pouvoir être analysés. La pollinisation fonctionne en sens inverse du système immunitaire des animaux : en effet, elle permet une reconnaissance et un rejet du soi (l'autopollen), en privilégiant l'acceptation du non soi (l'allopollen). Au niveau moléculaire, la famille multigénique S a joué un rôle clef dans l'évolution des plantes à fleur, de la même manière que le complexe majeur d'histocompatibilité a pu le faire chez les mammifères. Chez le chou (*Brassica oleracea*), crucifère proche d'*Arabidopsis thaliana*, cette famille S est constituée d'au moins trois gènes liés physiquement et codant pour une glycoprotéine (S-locus glycoprotein ou SLG), un récepteur kinase putatif (S-locus receptor kinase ou SRK) et une autre protéine (S-locus anther ou SLA) à la fonction inconnue. En outre, la reconnaissance mâle-femelle constitue un des systèmes les plus avancés pour l'étude des interactions ligand-récepteur chez les plantes.

Depuis sa découverte à la fin du siècle dernier, le mécanisme de la double fécondation n'a pas été élucidé, essentiellement parce qu'elle est inaccessible à l'expérimentateur autrement que par l'observation cytologique statique. L'analyse cellulaire et moléculaire de cette double fécondation passe par la mise au point de modèles capables de mimer *in vitro* la fécondation *in planta*. Une première étape décisive a été réalisée grâce à l'isolement successif de spermatozoïdes polliniques viables, véritables protoplastes naturels car dépourvus de paroi, puis des gamètes femelles fonctionnels. Dans une seconde étape, la fécondation par elle-même a été

réalisée en reproduisant de manière dynamique toutes les étapes de la fécondation *in planta* (adhésion, reconnaissance gamétique, fusion membranaire, caryogamie). Grâce à cette avancée, la double fécondation peut désormais être analysée au niveau fonctionnel aussi bien à l'échelle moléculaire que cellulaire. C'est un nouveau verrou technologique qui vient d'être levé, aux applications importantes aussi bien pour l'analyse de la formation d'une semence que pour la sélection et la création de nouvelles variétés.

La cellule végétale face aux agressions d'agents pathogènes

Les divers éléments du pouvoir pathogène (gènes de pathogénicité, gènes d'avirulence, gènes de résistance...), sont variables d'un pathogène à l'autre et d'un hôte à l'autre, et affectent soit la sévérité de la maladie, soit la capacité de provoquer des symptômes. La défense des végétaux contre les microorganismes pathogènes met tout d'abord en jeu des barrières mécaniques au niveau cellulaire. La paroi des cellules végétales et surtout la cuticule des cellules épidermiques représentent l'obstacle majeur à la pénétration des pathogènes. La découverte récente d'hydrophobines, protéines de petite masse moléculaire et de nature très hydrophobe, et probablement impliquée dans l'attachement des spores fongiques à la surface foliaire, confirme l'importance de la nature hydrophobe de la cuticule pour comprendre les étapes initiales de l'interaction des champignons phytopathogènes avec les plantes. Des signaux moléculaires (éliciteurs) sont alors émis par les microorganismes ou par les tissus agressés. Ces éliciteurs peuvent être de nature chimique très variée (oligosaccharides, oxylipines...). L'activation intense des défenses crée un état de résistance (réaction d'hypersensibilité) qui devient parfois systémique et durable, elle se manifeste souvent par la formation de lésions localisées. Cette réaction rassemble de nombreux phénomènes biologiques : réactions membranaires, peroxydation de lipides membranaires, mort cellulaire, mais aussi transduction de signaux aussi bien entre les cellules qu'au sein de la cellule qui conduisent à la mise en place de mécanismes de défense (renforcement des barrières mécaniques, production de protéines de défense...).

Des interactions de type gène pour gène entre plantes et divers pathogènes (virus, bactéries, champignons, nématodes) ont été identifiées. Elles seraient à l'origine de l'activation rapide des mécanismes de défense de la plante. Des gènes d'avirulence bactériens ont été clonés et séquencés, d'autres ont également été mis en évidence chez les virus et les champignons. Ainsi, le produit du gène *avrBs3* de *Xanthomonas campestris* fonctionnerait comme "éliciteur spécifique" de la réponse hypersensible. La contrepartie végétale d'un gène d'avirulence microbien est le gène de résistance correspondant. L'identification de tels gènes est un résultat particulièrement marquant de ces dernières années. Le premier gène de résistance cloné, *Pto*, code pour une sérine/thréonine protéine kinase. Les recherches dans ce domaine vont tenter d'analyser les relations structure/fonction des protéines impliquées ; d'identifier les gènes impliqués dans les cascades de transduction ; de comprendre les mécanismes biochimiques et cellulaires permettant d'expliquer comment des gènes homologues peuvent contrôler des agents pathogènes aussi différents que des virus, des bactéries, des champignons, des nématodes.

La mort cellulaire

On ne connaît rien des bases moléculaires de la mort cellulaire chez les végétaux. Ce processus concerne aussi bien les mécanismes de résistance aux agents pathogènes (hypersensibilité) que le développement normal des plantes (dégénérescence du suspenseur de l'embryon, différenciation des vaisseaux conducteurs du xylème, sénescence des pièces florales après fécondation ou des feuilles en automne). Des mutants dits de mort cellulaire ont été isolés chez le maïs (mutants *lsd*, pour *lesion stimulating disease*) et *Arabidopsis* (mutants *lsd* et *acd*, pour *accelerated cell death*). Ces mutants ont des phénotypes caractéristiques de la réponse hypersensible typique des interactions incompatibles : ils présentent des niveaux élevés d'acide salicylique et accumulent des protéines de défense. Les mutations *lsd* n'ont pas été caractérisées mais pourraient être associées à des dysfonctionnements de la production de radicaux libres. Il existe de sérieux arguments en faveur d'un lien entre surproduction d'ions superoxyde et la mort cellulaire chez ces mutants. C'est clairement un domaine de recherche en pleine émergence.

2. 3 COMPRENDRE L'INTÉGRATION DES DIVERS PROCESSUS PHYSIOLOGIQUES DANS LA PLANTE

La connaissance des bases moléculaires et cellulaires des fonctions physiologiques des plantes a progressé de façon spectaculaire au cours des dernières années. Cette progression a pu laisser croire que l'élucidation des chaînes d'événements qui régulent ces fonctions était proche. Il faut admettre qu'une longue marche est encore indispensable pour disséquer les combinaisons subtiles et les couplages multiples allant du gène à la réponse physiologique. De plus, le développement des approches cellulaires et moléculaires a pu faire oublier que la molécule analysée *in vitro* fait partie d'une cellule et d'un organisme au sein desquels elle exerce une fonction. L'intégration physiologique des processus métaboliques, bioénergétiques ou de signalisation individuels au niveau de la plante entière (système, interactions tissulaires au sein d'un même organe, interactions organes-organes) vise à combler le fossé qui existe entre les aspects moléculaires et cellulaires et l'expression globale dans la plante.

Intégration des voies métaboliques dans la plante entière

L'étude du métabolisme carboné a permis de préciser le rôle de chaque compartiment de la cellule dans la biosynthèse du saccharose et de l'amidon (rôle du transporteur de phosphate/triose-phosphate de l'enveloppe des chloroplastes et du transporteur d'hexose-phosphate de l'enveloppe des plastides non chlorophylliens, importance du fructose 2,6-bisphosphate et de la phosphorylation de la saccharose synthase dans la régulation de la synthèse du saccharose...). D'autre part, la découverte d'herbicides touchant la biosynthèse d'acides aminés a stimulé l'intérêt pour l'élucidation de leurs voies de biosynthèse qui étaient très peu étudiées jusqu'alors. On comprend mieux à présent comment et où sont synthétisés les acides aminés. Notre bonne connaissance des phénomènes mis en jeu repose sur une approche biochimique et cellulaire forte, complétée par une approche moléculaire

solide réalisée à partir d'enzymes purifiées, et par une approche intégrée avec l'utilisation de techniques telles que la RMN et l'approche génétique. Par contre, on connaît encore mal comment le saccharose (et les autres molécules organiques), produit dans le cytosol des organes dits *source* (en fait les tissus foliaires), est exporté vers les tubes criblés du phloème puis transporté vers les divers organes dits *puits* (les tissus non chlorophylliens, racines et méristèmes par exemple). Les recherches dans ce domaine tentent d'évaluer le rôle joué par les systèmes de co-transport H^+ /saccharose et par les plasmodesmes, rôle confirmé par des expériences de génétique. Ainsi, des constructions antisens sous contrôle d'un promoteur phloème spécifique entraînent une inhibition de l'exportation du saccharose hors de la feuille. De même, des plantes surexprimant les protéines de mouvement du virus de mosaïque du tabac au niveau des plasmodesmes exportent bien moins de composés organiques vers les racines. Enfin, des mutants présentant une déficience en plasmodesmes accumulent de l'amidon dans les feuilles. Les questions posées concernent la physiologie de la plante dans sa globalité, en interaction avec son environnement biotique ou abiotique.

Les cellules compagnes, modèles de différenciation cellulaire

Le co-transport H^+ /saccharose s'effectue de l'espace pariétal jusque dans les cellules compagnes associées aux tubes criblés. La membrane de ces cellules est enrichie en H^+ -ATPase du côté qui fait face aux cellules assimilatrices. L'exportation du saccharose est sous la dépendance étroite de la respiration. En effet, chaque fois qu'une molécule de saccharose est transférée de la cellule compagne à une cellule du phloème, une molécule d'ATP est consommée par la H^+ -ATPase. De fait, les cellules compagnes présentent une très forte densité en mitochondries... Les mécanismes de cette différenciation polarisée de la membrane et ceux qui conduisent à l'accumulation de mitochondries restent à élucider. La mise en place des cellules compagnes et des tubes criblés implique des problèmes de différenciation cellulaire et de développement de la plante.

Les plasmodesmes, voies de passage privilégiées des métabolites et de certaines macromolécules, sont aussi exploités par des virus pour leurs mouvements de cellule à cellule

Chez certaines plantes, le transport des sucres de cellule à cellule s'effectue exclusivement à travers les plasmodesmes. Il s'agit souvent de sucres comme le raffinose, le stachyose... D'autre part, la microscopie confocale a permis de montrer que les plasmodesmes constituent des voies de passage privilégiées pour les produits de gènes homéotiques (*Knotted-1*). Enfin, lorsqu'une plante est attaquée par des virus, le matériel infectieux présent dans une cellule envahit les cellules voisines *via* les plasmodesmes. L'étude des plasmodesmes couvre donc des champs thématiques allant de la régulation du métabolisme à l'étude des mécanismes de résistance des plantes à des infections virales et la définition de la gamme d'hôte d'un virus.

Mouvements de sève et systémie

Connaître les mécanismes contrôlant les flux de sève (système) est important pour mieux comprendre comment s'effectue l'alimentation des organes puits, le transport de pesticide, ou comment est régulé l'équilibre hydrique de la plante, herbacée ou ligneuse. Au plan structural et fonctionnel, les travaux actuels s'orientent vers l'étude de la différenciation et le fonctionnement des cellules du phloème, mais aussi du xylème (un exemple remarquable de mort cellulaire programmée). La connaissance de ces mécanismes est essentielle pour tous les processus de croissance et développement, car la plante doit en permanence ajuster l'utilisation de ses ressources par les tissus hétérotrophes comme les méristèmes, dans des conditions environnementales fluctuantes. Ils participent aux réactions de type SAR (Systemically Acquired Resistance) pour lesquelles un effet local d'élucitation lors de l'attaque d'un agent pathogène s'accompagne d'un effet différé, systémique et durable potentialisant la réponse à une attaque ou une élucitation ultérieure. Dans le cas de certaines attaques virales, le matériel infectieux lui-même gagne les vaisseaux conducteurs et envahit la plante de façon systémique : ces mouvements à longue distance restent très mal compris. De telles

études présentent des perspectives d'application tout à fait importantes.

Certains transporteurs sont le produit de familles de gènes spécifiquement exprimés dans certains territoires

La complémentarité fonctionnelle de levures mutantes a permis de cloner une série de transporteurs impliqués dans l'absorption, à travers la membrane plasmique, de glucides, d'acides aminés, de peptides. Ces résultats démontrent l'existence de familles multigéniques de transporteurs dont l'expression dans le temps et dans l'espace est particulière et étroitement contrôlée. Ainsi, divers transporteurs de saccharose ou de glucose existent, les uns sont spécifiques des organes sources, d'autres des organes puits. En ce qui concerne les acides aminés, on trouve chez *Arabidopsis* au moins cinq transporteurs différents qui, bien que possédant une spécificité large, diffèrent par leur affinité pour les acides aminés hydrophobes et basiques. Leur expression est différente selon les organes végétatifs et reproducteurs. Le rôle physiologique d'autres transporteurs qui ont été identifiés reste pour le moment mal ou pas compris (par exemple, le transport de peptides dans les tissus foliaires adultes). Comprendre le rôle physiologique de ces transporteurs implique l'étude de leur expression au cours du développement de la plante ainsi que leurs réponses à différents types de stress ou de signaux. L'importance pratique de ces transporteurs, pour la nutrition de la plante et pour le chargement des organes puits, impose des travaux sur des plantes d'intérêt agronomique (céréales, légumineuses).

Un nouveau concept en émergence : les produits du métabolisme primaire comme régulateurs de l'expression génique chez les végétaux

On a souvent parlé de signaux métaboliques à longue distance pour décrire les interactions entre métabolisme du carbone et métabolisme azoté. Ces signaux permettent à la plante de réguler la production de composés dans les organes source en fonction des besoins des organes puits. Ils circulent de manière systémique. L'étude du rôle des glucides comme régulateurs de l'expression des gènes est actuellement en pleine expansion. Ces gènes

sont surtout impliqués dans la photosynthèse (expression inhibée) ou dans les réactions de défense de la plante (expression stimulée). Les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore connus, mais ils impliquent vraisemblablement une forme phosphorylée (encore inconnue) d'un hexose. La régulation de l'expression génique par les glucides mettrait en jeu le système sécrétoire de la cellule. L'intrication, déjà notée, entre glucides et expression de gènes de défense a récemment été soulignée par la construction de plantes surexprimant de l'invertase dans différents compartiments de la cellule (paroi, cytoplasme, vacuole). Chez les plantes surexprimant de l'invertase pariétale ou vacuolaire, mais non chez les plantes surexprimant de l'invertase cytoplasmique, on note une surexpression des gènes de défense, une augmentation de la teneur en callose et en acide salicylique, et une meilleure résistance aux agressions virales.

Intégration des processus de développement et de morphogenèse, et des relations plantes / autres organismes

Les végétaux présentent une plasticité extraordinaire en réponse aux facteurs (biotiques ou abiotiques) de l'environnement. Les processus de développement ou les relations des plantes avec d'autres organismes impliquent à des niveaux divers des mécanismes moléculaires de communication inter- et intra-cellulaire dont la compréhension permet de replacer les observations dans un contexte physiologique, celui de la plante entière.

L'exemple de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses témoigne de ces avancées

L'étude du développement du nodule racinaire fixateur d'azote, principalement sur le système modèle *Rhizobium meliloti*-*Medicago sativa*, a conduit à la découverte des signaux moléculaires échangés entre les deux partenaires. La meilleure compréhension du rôle des flavonoïdes spécifiques exsudés par la plante dans l'activation des gènes de nodulation de la bactérie, ainsi que la découverte des signaux de type lipo-oligosaccharidiques (facteurs de nodulation ou Nod) ont permis d'élucider les bases de la spécificité d'hôte. Les lipo-oli-

gosaccharides sont constitués d'une chaîne d'unités N-acétylglucosamine intervenant comme signaux bactériens déclenchant la nodulation. La "décoration" de ces molécules (longueur et nombre de doubles liaisons de la chaîne acylée, présence ou non de groupes acétyl, sulfate, fucose ou fucose sulfaté) modifie leur activité et détermine les spécificités d'hôte.

Analyse des cascades de transduction de signaux

Les processus de développement ou les relations des plantes avec d'autres organismes impliquent la production de signaux soit par l'environnement, soit par la plante elle-même ou les organismes qui interagissent avec elle. La compréhension de ces processus nécessite l'analyse des réponses cellulaires (protéines de défense, gènes induits par des stress environnementaux, modifications du potentiel électrique transmembranaire, modifications de l'activité des pompes, canaux ioniques et symports...), l'analyse moléculaire des cascades de transduction, l'identification moléculaire et fonctionnelle des intermédiaires des cascades de régulation, la caractérisation des récepteurs.

Dans une première étape, les données concernant les mécanismes de signalisation chez les animaux ont souvent servi de cadre conceptuel à l'étude des cascades de transduction chez les plantes. Cette option s'est révélée justifiée, puisque de nombreux éléments largement conservés (protéines kinases et phosphatases, protéines G, facteurs de transcription, calciprotéines, messagers secondaires tels que ions Ca^{2+} ...) ont été mis en évidence chez les plantes. Toutefois, la prise en compte de diverses caractéristiques des végétaux conduit à une certaine prudence dans la transposition pure et simple des modèles de signalisation des animaux aux végétaux. Par exemple, la quasi-ubiquité de certaines phytohormones suggère que leurs actions pourraient être essentiellement auto-crines. De même, l'existence généralisée de plasmodesmes offre des possibilités de communication directe entre cellules. L'étude des voies de signalisation de la lumière chez les plantes a montré tout récemment que le modèle végétal peut servir de base à l'exploration du modèle animal. Une étude

menée sur *Arabidopsis* a révélé l'implication de protéines (produits des gènes *COP* et *DET*) dont on pensait qu'elles étaient spécifiques du contrôle du développement des plantes par la lumière. Or des protéines fortement apparentées sont présentes chez la *Drosophile* et chez l'homme, où l'on ne connaît pas encore leur fonction. Ainsi, des plantes comme *Arabidopsis* pourraient constituer des modèles d'analyse de processus cellulaires humains au même titre que la levure ou la *Drosophile*.

Enfin, la membrane plasmique a des partenaires potentiels dans la transduction de signaux au sein de la cellule, tant pour la génération de signaux primaires ou de messagers secondaires (paroi, vacuole, plastes) que pour la perception directe de certains de ces signaux (tonoplaste, enveloppe des plastes). La compartimentation des processus de signalisation est un facteur de régulation mal connu mais essentiel pour l'intégration fonctionnelle de ces processus à l'échelle cellulaire.

Un paradoxe : des signaux hormonaux sans récepteurs et des récepteurs orphelins

La caractérisation de récepteurs demeure un enjeu majeur dans le domaine de la signalisation hormonale chez les plantes. En effet, aucun récepteur n'a été réellement caractérisé, c'est-à-dire à la fois identifié au plan moléculaire et replacé dans le contexte fonctionnel d'une cascade de signalisation associée à une réponse. La plupart des travaux fondés sur la recherche de protéines présentant une affinité de liaison pour un signal ont été limités par le manque de tests fonctionnels de l'activité de ces protéines. L'identification récente de réponses élémentaires à un signal donné, comme la modulation de l'activité de canaux ioniques ou la modification de l'expression de gènes spécifiques, devrait permettre dans un avenir proche de combler ces lacunes. Du côté des approches génétiques, malgré la variété de mutants de réponses hormonales isolés, aucun mutant de protéine réceptrice ne paraît avoir été obtenu (à l'exception du mutant de réponse à l'éthylène *etr1*). Ceci est lié à la difficulté de mise au point de systèmes efficaces de sélection de mutants de réception, mais aussi au caractère éventuellement létal de telles mutations. La mise au point de nouveaux cribles de sélection ciblés sur le fonctionnement de protéines réceptrices devrait

donc être engagée, avec un intérêt particulier pour la recherche de mutants conditionnels.

Le paradoxe est la description d'un nombre croissant de gènes codant pour des protéines fortement apparentées à des récepteurs décrits chez les cellules animales, mais dont les ligands potentiels chez les plantes restent à découvrir. L'exemple le plus frappant concerne la famille des récepteurs kinases transmembranaires ("receptor-like protein kinases" ou RLK). Les protéines RLK comportent un domaine sérine-thréonine kinase cytoplasmique, un seul domaine transmembranaire, et se répartissent en trois classes en fonction de la structure de leur domaine extracellulaire. Chez *Brassica*, certains de ces récepteurs sont impliqués dans la réponse d'auto-incompatibilité. Certains des gènes de résistance aux pathogènes codent pour des protéines apparentées aux protéines RLK, ce qui suggère que ceux-ci pourraient être impliqués dans les réponses de défense des plantes. Le rôle éventuel des protéines RLK dans la signalisation hormonale reste à explorer. C'est un domaine de recherche en pleine émergence.

2. 4 PRISE EN COMPTE DE LA DIVERSITÉ DES MODÈLES BIOLOGIQUES

Si l'essentiel des travaux réalisés dans notre discipline concernent les plantes supérieures, d'autres matériels biologiques, tels que les microorganismes et les algues, sont utilisés. Cette diversité vient enrichir remarquablement notre compréhension des processus biologiques chez les végétaux. Elle reflète aussi le choix de systèmes modèles les mieux adaptés aux problèmes biologiques étudiés.

Parmi les microorganismes photosynthétiques, les micro-algues, les bactéries photosynthétiques ou les cyanobactéries sont devenus des systèmes modèles exceptionnels pour l'étude des mécanismes et des structures impliqués dans la photosynthèse (photosynthèse oxygénique et anoxygénique). Elles présentent de nombreux avantages sur les plantes supérieures (reproductibilité et facilité de culture, facilité d'obtention de mutants, cristallisation des protéines membranaires). Ainsi, la première cristallisation d'une pro-

téine membranaire permettant une résolution à l'échelle atomique a été réalisée sur les centres réactionnels photosynthétiques bactériens (Michel, Deisenhofer et Huber, Prix Nobel de Chimie, 1988). Une partie importante des travaux sur le photosystème I est réalisée sur les centres réactionnels de *Chlorobium limicola* ou d'*Heliobacterium* sp. Enfin, l'étude de la collecte de la lumière par les systèmes antennaires est en général réalisée sur des procaryotes (bactéries pourpres et cyanobactéries), même si la cristallisation bidimensionnelle du LHC-II (light-harvesting complex-II) de plante supérieure a été réalisée avant celle du LHC-I de *Rhodospseudomonas*.

La diversité des algues marines constitue un abondant réservoir de modèles extrêmement originaux. Par rapport aux plantes terrestres, les algues marines possèdent des caractéristiques biochimiques, physiologiques et génétiques propres dont les plus évidentes sont l'adaptation physiologique à l'environnement marin, la présence de plastes bruns ou rouges, la composition des parois cellulaires, les cycles de reproduction à générations autonomes et parfois très hétéromorphes. Ainsi, on peut analyser avec les zygotes de *Fucus* les interactions entre le cytosquelette et la matrice pariétale. De même, les génomes plastidiaux et mitochondriaux des algues brunes ou rouges sont des outils de choix pour étudier la structure et l'évolution des génomes. Enfin, le rôle signal d'oligosaccharides pariétaux a été démontré dans la relation hôte-parasite entre *Chondrus crispus* et l'algue verte *Acrochaete opercula*.

La grande variété des polymères glucidiques rencontrés chez les végétaux implique des recherches aussi bien sur les plantes supérieures que chez les algues ou les champignons. Ainsi, les polymères pariétaux des champignons comme *Saprolegnia monoïca* sont originaux car ils sont constitués de cellulose, comme les plantes vertes et certaines bactéries, de b-1,3-glucanes comme les plantes vertes, et de chitine. De même, la biosynthèse des polysaccharides matriciels de parois d'algues permet de faire des parallèles intéressants avec les autres modèles : si la phase squelettique des parois des algues est semblable à celle des parois primaires des plantes terrestres, les algues renferment des mucilages très spécifiques dont

beaucoup sont sulfatés, contrairement aux polysaccharides des autres végétaux, mais comme les glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire des animaux. L'intérêt scientifique des recherches sur la biosynthèse des polysaccharides des parois des algues est renforcé par leur importance économique, en particulier pour l'industrie agro-alimentaire.

Enfin, l'intérêt des champignons pour la biologie végétale ne se limite pas aux recherches sur les champignons phytopathogènes. Les champignons font l'objet de travaux originaux sur la *structure et la stabilité et l'expression des gènes et des génomes, le métabolisme et la physiologie, la biologie du développement et de la reproduction*. Ainsi, les champignons filamenteux peuvent ouvrir des pistes originales pour aborder les problèmes liés à la reproduction sexuée. On peut citer à titre d'exemple les études sur *Podospora anserina* chez qui un véritable lignage cellulaire a été identifié dans l'organe femelle fécondé. Un rôle inattendu pour les peroxyosomes a été découvert lors d'une étape critique du développement sexué et pour la maturation des spores (la transition cellule mitotique/cellule méiotique). Dans un autre domaine, les recherches récentes concernant la plasticité des génomes de champignons a permis de montrer le rôle des éléments transposables dans la création de la variabilité génétique (par exemple chez *Fusarium oxysporum*), et d'identifier deux mécanismes d'inactivation de gènes chez *Neurospora crassa* et *Ascobolus immersus*. De plus, la mise en évidence récente de systèmes de type "prion" chez plusieurs champignons filamenteux (par exemple, le système d'incompatibilité S/s chez *Podospora anserina*) permet d'envisager une analyse génétique des mécanismes moléculaires à l'origine du phénomène.

CONCLUSION

Des enjeux croissants doivent nous conduire à améliorer nos connaissances sur les végétaux. Les plantes présentent de nombreuses spécificités (photosynthèse, voies métaboliques particulières, multiplicité des génomes, présence d'organites originaux, grandes capacités d'adaptations aux paramètres de l'environnement...) qui en font des systèmes biologiques irremplaçables pour décrypter des comportements vitaux uniques ou représentatifs de lois générales.

La progression des connaissances en biologie végétale a été ponctuée, comme dans d'autres domaines, par des avancées bénéficiant de modèles biologiques adaptés ou de percées technologiques novatrices. La période récente vient d'apporter de nouveaux moyens génétiques et moléculaires d'investigation (séquençage systématique et cartographie des génomes, collections de mutants d'insertion...) qui donnent une nouvelle dimension aux études de biologie des plantes. L'exploitation de ces outils a démontré leur efficacité. Ils doivent être pleinement valorisés, mais ils n'auraient cependant à eux seuls qu'une efficacité limitée : une biochimie et une biologie cellulaire fortes sont nécessaires pour faire correspondre des séquences d'ADN à des entités protéiques fonctionnelles ou pour affiner ou créer des cribles de sélection de mutants adaptés. De même, les résultats de la transgénèse éclairent de façon nouvelle la connaissance du métabolisme et conduisent à réécrire des schémas traditionnels (redondance de voies métaboliques et d'étapes enzymatiques...). L'étude des voies de signalisation doit exploiter conjointement les outils de la génétique, de la transgénèse et de la biologie cellulaire (électrophysiologie, microinjection, analyse d'image) si possible sur des systèmes unicellulaires adaptés. Enfin, la compréhension des voies métaboliques spécifiques des végétaux et du fonctionnement des enzymes impliquées, la modélisation des sites actifs, la connaissance physico-chimique des membranes et des phases solubles, l'analyse fine des interactions entre récepteurs et ligands hormonaux ou ioniques, le développement d'outils pharmacologiques ne pourront vraiment progresser qu'en amplifiant les recherches à l'interface chimie-biologie.

Les plantes représentent le premier maillon des chaînes alimentaires. Les végétaux fournissent à l'homme non seulement la base de sa nourriture, mais aussi de nombreux matériaux pour la construction, l'habillement, la santé... Or, il est prévu au cours des trente prochaines années une augmentation considérable de la population mondiale, d'environ quatre milliards d'individus. L'un des objectifs à atteindre est donc d'optimiser la production végétale, tout en limitant les nuisances sur l'environnement. À cet impératif de quantité s'ajoutent des exigences de qualité qui peuvent différer selon l'état de développement des pays et les conditions climatiques. Ces données impliquent des recherches fortes sur le modèle végétal, par exemple en vue de faciliter l'adaptation d'espèces plus résistantes à la sécheresse ou aux milieux saumâtres arides et plus résistantes aux attaques par des agents pathogènes. Au-delà de ce problème d'importance géopolitique, les exigences nutritionnelles des pays développés conduit à envisager l'optimisation de la composition chimique des aliments d'origine végétale. L'amélioration des plantes peut reposer sur des critères beaucoup plus sophistiqués : teneurs relatives en acides gras, accroissement des teneurs en antioxydants et en vitamines, introduction d'antigènes ou d'anticorps à effets thérapeutiques. Par ailleurs, les plantes synthétisent de très nombreux produits (polymères glucidiques, protéines, lipides, mais aussi vitamines, métabolites secondaires, substances hormonales) souvent sans équivalent dans le monde animal ou microbien, et bien souvent indispensables au fonctionnement des cellules animales. Les plantes constituent donc un immense réservoir de molécules utiles dont

l'inventaire n'est pas encore terminé et dont la diversité pourrait parfois être "contrôlée" par les moyens du génie génétique. La connaissance des voies métaboliques, des mécanismes de diversification des flux carbonés et la transgénèse peuvent être des auxiliaires permanents pour répondre à ces objectifs nouveaux. Enfin, les plantes représentent l'élément central de notre environnement souvent menacé par des retombées néfastes des activités industrielles ou de l'agriculture intensive. Mieux comprendre leurs réactions à ces stress pour (avant de les supprimer) les rendre plus tolérables, introduire de nouvelles stratégies phytosanitaires, exploiter les plantes pour réduire les pollutions (détoxification, phytoremédiation...), mieux adapter leur composition chimique à des filières de transformation industrielles actuellement polluantes sont des orientations qu'il faut encourager.

Ces quelques éléments visent à montrer que la demande sociale, qui ne peut être actuellement déconnectée des choix prioritaires en matière de recherche, peut s'avérer extrêmement forte dans des domaines où la connaissance des plantes sous-tend des problèmes majeurs d'environnement, de nutrition et de santé.

Référence

Images de la Recherche française en Biologie Végétale (1996)
Texte rédigé par la section 27 du Comité national et édité par le Département des Sciences de la Vie du CNRS.