

## **Biologie moléculaire des plantes**

M. Joseph SCHELL, professeur

Le cours de cette année a porté sur l'étude des mécanismes d'action des phytohormones, aussi bien des phytohormones classiques telles que les auxines, cytokinines, l'éthylène, l'acide abscissique, que des signaux plus récemment reconnus tels que les brassinostéroïdes, les polyamines, l'acide salicylique et les jasmonates.

Alors que dans tous ces cas de réels progrès ont été récemment obtenus, il reste vrai que nos connaissances sont encore très partielles et permettent un niveau de compréhension fort différent selon les signaux que l'on considère. C'est ainsi que pour l'éthylène et l'acide abscissique les modèles que l'on peut décrire sont relativement bien définis, tandis que pour ce qui est des auxines et cytokinines la situation est nettement plus complexe et encore fort incomplètement comprise.

Dans les cours nous avons passé en revue l'état des connaissances à propos de ces différents signaux les uns après les autres :

### **Cours sur les Mécanismes d'Action des Auxines**

#### **Séminaire du Dr. Hélène Barbier-Brygoo**

*Institut des Sciences Végétales, Gif-sur-Yvette*

*Thème : Nouvelles Conceptions à Propos des Mécanismes d'Action des Auxines*

Le mécanisme d'action des auxines fascine la communauté scientifique des sciences végétales depuis de nombreuses années, néanmoins les progrès enregistrés jusqu'à présent sont relativement décevants et il n'est toujours pas possible à ce jour de proposer un modèle unique. Ceci est dû très vraisemblablement au fait que les fonctions des auxines, bien connues des physiologistes végétaux, sont pléiotropes et que cette pléiotropie correspond à plusieurs mécanismes très différents. Il faudra donc exploiter diverses stratégies expérimentales pour éclairer ces mécanismes. La stratégie traditionnelle est celle de la biochimie qui consiste

à étudier le mécanisme de perception en identifiant les protéines (receptrices) capables de fixer une auxine marquée.

Dans notre laboratoire à Cologne, le Dr. Klaus Palme et son équipe ont synthétisé des dérivés azido, marqués au tritium, d'auxines et d'inhibiteurs du transport polaire d'auxines (NPA :Naphthylphtalamic Acid). Ces dérivés ont permis de marquer par photoaffinité une série de protéines de poids moléculaires différents (22, 23+24, et 60 Kd). L'analyse fonctionnelle, ainsi que la détermination de la séquence des cDNA's codant pour ces protéines, montrent qu'elles ont des fonctions très différentes. Ainsi la protéine de poids moléculaire de 22 Kd est un récepteur localisé dans le lumen du reticulum endothélial qui, cependant, peut être retrouvé à la surface cellulaire dans certaines circonstances. La protéine de 60Kd est une glucosidase capable de libérer des cytokinines actives au départ de conjugués inactifs. Les protéines pm 23 et 24 sont localisés dans la membrane cellulaire et sont probablement actives en tant que régulateurs de l'« auxin-efflux carrier », ce qui explique que ces protéines sont capables de lier non seulement l'inhibiteur (NPA) de transport polaire d'auxines, mais aussi l'IAA (c.a.d. l'indole acide acétique qui est l'auxine végétale la plus répandue). L'observation la plus marquante est que les protéines pm 23 et pm 24 doivent former un complexe que l'on peut retrouver associé aux structures microtubulaires du cytosquelette. De plus, cette association avec le cytosquelette est modulée par la présence d'auxines.

Une autre approche qui paraît être très performante est celle de la mutation par activation de l'expression génétique en absence de signaux régulateurs (par exemple de phytohormones). Cette méthode expérimentale était déjà le sujet de notre cours de l'année académique 1994-95 et est basée sur le concept suivant : Le but est d'élucider les réseaux de communication enclenchés par l'interaction du signal régulateur et son récepteur spécifique. Les chaînes de relais de signalisation communiquent l'effet des signaux à des cibles intracellulaires. Chaque relais de signalisation doit aboutir, en fin de compte, à la régulation de l'activité de certains programmes génétiques cibles. En conséquence si, par mutation, on devait activer l'un ou l'autre de ces programmes cibles de manière permanente, ces mutants seraient caractérisés par le fait qu'ils peuvent se passer du signal pour la mise en action d'une partie de leur programme. Le Dr. R. Walden et son équipe dans notre laboratoire à Cologne a réussi à obtenir de tels mutants et, comme l'insertion peut servir d'étiquette moléculaire, il est relativement aisé d'isoler par clonage le gène muté et de vérifier par transgénèse que ce gène activé est bien capable de stimuler la division cellulaire en absence du signal. Au moins six classes de gènes différents, dont l'activation permet la division cellulaire en absence d'auxines, furent ainsi obtenues.

Le clonage de l'un de ces gènes, l'*axi-1* (auxin independent growth-1), a démontré qu'il s'agit vraisemblablement d'un gène codant pour un type nouveau d'activateur de transcription qui n'est cependant transporté dans le noyau cellulaire qu'en présence d'auxines. Dans la plante normale ce facteur de régulation

de l'expression génétique a donc besoin d'auxines non seulement pour être exprimé, mais aussi pour être transporté vers le noyau cellulaire. Récemment, en collaboration avec le groupe du Dr. T. Bisseling à Wageningen au Pays-Bas, nous avons pu démontrer que ce même gène (axi-1) peut également être induit par certains lipo-oligo-saccharides (LCO's) apparentés au signaux bactériens (de *Rhizobium*) qui sont essentiels pour induire la nodulation des racines de plantes légumineuses. De plus, nous avons pu démontrer que l'activation de axi-1 induit la production et sécrétion par les cellules végétales d'oligopeptides codés par un gène de noduline (ENOD40) (cet aspect a été présenté dans un cours et un séminaire le 17 Avril 1996 à l'Institut des Sciences Végétales (ISV) à Gif/Yvette et des développements futurs feront l'objet d'un cours et d'un séminaire à Toulouse (groupe du Prof. J. Denarié) dans le courant de l'année académique 1996-97.

L'étude du transport polaire des auxines a également bénéficié de l'analyse moléculaire d'un gène muté d'*Arabidopsis* (pin mutant). Le gène pin fut isolé par l'équipe du Dr. Klaus Palme à Cologne en collaboration avec le groupe du Prof. H. Saedler et il fut démontré qu'il s'agit d'une protéine avec 622 résidus d'acides aminés avec 10 domaines hydrophobes qui sont localisés dans les extrémités N et C de la protéine et sont capables de traverser la membrane cellulaire. Cette protéine peut donc soit faire partie d'un récepteur soit d'un transporteur capable de former une pore hydrophile. Il reste à déterminer si et dans quelles circonstances la protéine pin est associée avec la matrice cellulaire ou avec le cytosquelette.

#### SÉMINAIRE

La modification du potentiel électrique transmembranaire de protoplastes de tabac par l'auxine constitue l'une des réponses cellulaires les plus précoces à cette hormone (revue dans Barbier-Brygoo (1995) *Crit. Rev. Plant Sci.* **14** 1-25). L'étude de la modulation de cette réponse membranaire à l'auxine par des anticorps dirigés contre la protéine fixatrice d'auxine majeure du coléoptile de maïs (*Zm-ERabp1*) a montré que les sites de perception impliqués étaient apparentés à cette protéine de maïs et localisés sur la face externe de la membrane plasmique. Certains anticorps ont une activité antagoniste de celle de l'auxine (Barbier-Brygoo et al. (1991) *Plant J.* **1**, 89-31). Par contre, un anticorps dirigé contre une région de la *Zm-ERabp1* représentant un site potentiel de fixation d'auxine exerce une activité agoniste de la réponse électrique des protoplasts (Venis et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7208-7212). L'ensemble de ces données a permis de proposer un modèle d'organisation des unités perceptrices d'auxine à la surface cellulaire, constituées d'une unité fixatrice d'auxine associée à une protéine transmembranaire.

L'identification moléculaire de ces deux éléments constituant un récepteur d'auxine fonctionnel sur la membrane plasmique constitue l'un des objectifs du Dr. Barbier-Brygoo. Son groupe a récemment isolé deux ADNc de tabac codant

pour des protéines fixatrices d'auxine homologues de la ZmER-abp1. L'étude fonctionnelle de l'une de ces protéines (Nt-ERabp1) a montré qu'elle était présente et active sur la membrane plasmique. L'équipe a également exploré le rôle éventuel de la région C-terminale des protéines Zm-ERabp1 et Nt-ERabp1 dans leur interaction avec la membrane plasmique en testant l'effet de peptides reproduisant les extrémités C-terminale de chaque protéine sur la réponse membranaire des protoplastes de tabac. Ces peptides induisent une hyperpolarisation de la membrane plasmique, reproduisant ainsi les effets des faibles concentrations d'auxine, ce qui souligne l'importance fonctionnelle de cette région de l'abp1.

Un autre objectif est d'analyser les mécanismes moléculaires par lesquels l'auxine modifie la polarisation de la membrane plasmique. En appliquant la technique de patch-clamp à des protoplastes de tabac, un canal anionique voltage-dépendant et régulé par phosphorylation a été caractérisé. L'activité de ce canal est modulée par l'auxine et par l'anticorps agoniste D16, ce qui indique un rôle potentiel du récepteur d'auxine dans la régulation du canal (Zimmermann et al. (1994) *Plant J.* 6, 707-716).

Il restera ensuite à déterminer si les récepteurs d'auxine présents sur la membrane plasmique et impliqués dans la réponse électrique membranaire sont également responsables de l'activation de réponses à l'auxine plus intégrées comme la régulation de l'expression de gènes spécifiques, l'élongation ou la division cellulaire.

## **Cours sur les Mécanismes d'Action des Cytokinines**

### **Séminaire du Dr. Michel Laloue**

*Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA — Centre de Versailles*

*Thème : Rôle et Mode d'Action des Cytokinines*

Par la méthode de mutation par activation de l'expression génétique en absence de signaux régulateurs (voir plus haut sous Mécanismes d'Action des Auxines), quatre mutants sous forme de cals de tabac capables de se développer en absence de cytokinines dans le milieu de culture furent isolés et nommés *cyi*-4. De chacun de ces mutants nous avons régénéré des plantes qui toutes ont les mêmes phénotypes aberrants : croissance naine, racines moins nombreuses et plus courtes, feuilles plus rondes. La croissance de ces mutants est plus lente et les fleurs ne produisent pas de pollen et sont stériles (avec une stérilité mâle aussi bien que femelle). Ces plantes furent donc propagées en culture de tissus. Les cals de tous les mutants *cyi* (c.-à-d. *cyi*-1,2,3 et 4) peuvent être propagés en absence d'auxines et de cytokinines. Cependant les cals des mutants *cyi*-1 et *cyi*-4 ne peuvent pas se propager en présence seulement de cytokinines, c.-à-d. si ces mutants ne requièrent pas la présence d'auxines en absence de cytokinines, ils ont néanmoins besoin d'auxines en présence de cytokinines. Les mutants *cyi*-1,2 et 4 par ailleurs ne sont pas sensibles à des concentrations d'auxines qui sont toxiques pour des cals du type sauvage, tandis que *cyi*-3 est sensible à ces concentrations toxiques.



Les taux d'auxines et de cytokinines mesurés dans des cals de chaque mutant ne sont pas sensiblement différents de ceux mesurés dans des cals du type sauvage.

Dans le cas de *cyi-3* nous avons pu démontrer que l'ADN étiqueté comporte un élément de transposition et que ces séquences confèrent à des cals de tabac la capacité de se diviser en absence de cytokinines et d'auxines. Dans le cas du mutant *cyi-1* une séquence d'ADNc permet la division en absence de phytohormones (cytokinines et auxines). Le fait inattendu, mais probablement important, est qu'il s'agit d'une séquence de 960 paires de bases qui ne peut cependant coder que pour deux peptides. Une série de délétions nous a permis de démontrer que c'est un peptide de seulement 22 acides aminés qui est responsable de la croissance en absence de phytohormones. Ces nouvelles données expérimentales ont été intégrées dans une description des connaissances déjà acquises à propos de l'accumulation et l'action des cytokinines, publiée en 1994 par A. Binns (*Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol. Biol.* (1994) **45** : 173-196).

#### SÉMINAIRE

Les cytokinines constituent une des cinq classes d'hormones végétales dont l'archétype est la zéatine. Ce sont des purines N6-substituées présentes également dans les plantes sous les formes riboside et nucléotide. L'équipe de Dr. Laloue cherche à élucider leurs rôles et les mécanismes de leur action suivant trois approches qui sont l'identification et la caractérisation de mutants perturbés dans les réponses aux cytokinines, la recherche de protéines cibles des cytokinines, le clonage de gènes codant pour des enzymes du métabolisme des cytokinines chez les plantes modèles *Nicotiana plumbaginifolia* et *Arabidopsis thaliana*.

Les résultats marquants exposés concernent :

i) la caractérisation de mutants EMS de *Nicotiana plumbaginifolia* (1) qui semblent affectés dans une voie de transduction du message hormonal cytokinine impliquant l'interaction calcium/calmoduline ;

ii) l'identification d'une protéine thylacoidienne affine des cytokinines chez *Nicotiana plumbaginifolia* et le pois grâce à l'utilisation d'une sonde de photoaffinité (2) ;

iii) le clonage, par complémentation fonctionnelle de mutants d'*E.coli*, d'un deuxième ADNc d'adénine phosphoribosyltransférase chez *A.thaliana* qui code pour une APT spécifique des cytokinines (3). Cet ADNc pose la question de la nature du gène qui est muté chez le mutant résistant à la 2.6-diaminopurine (DAP) déficient en activité APT. Les travaux en cours visent à cartographier les deux gènes ainsi que la mutation qui confère la résistance à la DAP et à analyser le rôle et l'expression de ce deuxième gène, notamment en relation avec le métabolisme des cytokinines.

## PUBLICATIONS

1. NOGUÉ, F., MORNET, R. et LALOUÉ, M. (1995) The response of a cytokinin resistant mutant is highly specific and permits a new bioassay. *Plant Growth Reg.* **17** :87-94.

2. DIAS, M. MORNET, R. LALOUÉ, M. (1995) Synthesis, azidotetrazole equilibrium studies and biological activity of 1-(2-azido-6-chloro-pyrid-4-yl)-3-phenylurea, a photoaffinity labeling reagent for cytokinin-binding proteins. *Bioorg. Med. Chem.* **3** :361-366.

3. SCHNORR, K.M., GAILLARD, C., BIGET, E., NYGAARD, P. and LALOUÉ, M. (1996) A second form of adenine phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana* with relative specificity towards cytokinins. *Plant J.* **9** :891-898.

### **Cours sur le Mécanisme d'Action de l'Éthylène**

#### **Séminaire du Dr. J.C. Pech**

*École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse*

*Thème : Éthylène, Mécanisme d'Action et Génie Génétique*

Pour le moment l'étude du mécanisme d'action de cette phytohormone gazeuse est, en comparaison avec nos connaissances à propos d'autres phytohormones, la plus avancée (l'étude de l'acide abscissique étant peut-être une exception). Tous les outils sont en place pour une compréhension détaillée du mécanisme d'action de cette hormone végétale. Le fait que l'activité de cette hormone n'est pas absolument indispensable à la survie des plantes en laboratoire nous permet d'obtenir des mutations sans que celles-ci rendent la plante mutée non-viable. En effet, l'éthylène joue surtout un rôle dans la régulation de la maturation des fruits (tomate, melon etc.) et quand la plante doit réagir à des modifications de facteurs du milieu (lumière, pathogènes etc). Les outils dont les chercheurs disposent aujourd'hui sont :

1. la disponibilité de mutants
2. la capacité de manipuler *in planta* la biosynthèse de l'éthylène (plantes transgéniques)
3. des connaissances physiologiques à propos de la biosynthèse et de la nature d'analogues, d'antagonistes et d'inhibiteurs de l'éthylène.

Il est généralement admis aujourd'hui que des récepteurs sont à l'origine du mécanisme de perception du signal qui résulte en définitive dans l'activation de la transcription de certains gènes cibles. En effet, l'inhibition du métabolisme (par oxydation) de l'éthylène n'empêche pas les réponses à l'éthylène. Des récepteurs potentiels, montrant une activité affine spécifique localisée dans la membrane, furent isolés et purifiés au départ de différents tissus végétaux (tabac, fèves, tomates).

## Études de mutants

### I. Mutants de perception (insensibles à l'éthylène)

Les publications les plus importantes sont :

a) mutants etr (ethylene response or resistant) Bleecker, Estelle, Somerville, Kende (1988) *Science* **241**, 1086. C. Chang, S.F. Kwok, A.B. Bleecker et E.M. Meyerowitz (1993) *Science* **262**, 539.

b) mutants ein (ethylene insensitive) pas de réponse (triple) même en présence d'éthylène. Roman, Urbansky, Kieber, Rothenberg, Ecker (1995) *Genetics* **131**, 1343.

### II. Mutants de réponse constitutive : ctr

Réponse (triple) même en absence d'éthylène. Kieber, Rothenberg, Roman, Feldmann, Ecker (1993) *Cell* **72**, 427.

### III. Mutants de biosynthèse

a) Plantes transgéniques exprimant l'antisens d'un gène de biosynthèse de l'éthylène (ACC synthase ; ACC oxidase) Hamilton et al. (1990) *Nature* **346**, 284. Oeller et al. (1991) *Science* **254**, 437.

b) Plantes transgéniques exprimant des gènes de métabolisme de l'éthylène. Exemple : une ACC déaminase procaryotique. Klee et al. (1991) *Plant Cell* **3**, 1187.

c) Surproduction d'éthylène : eto (ethylene overproducer). Le phénotype est similaire à celui des mutants ctr (constitutive triple response) mais il y a surproduction d'environ 40 fois par rapport à des germes étiolés de type sauvage. La mutation doit être en amont de l'ACC oxidase puisque l'activité de cette enzyme est normale. Guzman et Ecker (1990) *Plant Cell* **2**, 513. Kieber et al. : sous presse

L'existence de ces mutants et aussi d'autres mutants a permis de faire une analyse d'épistasie par croisement et analyse du phénotype de mutants doubles. Les résultats de ces analyses ont été publiés par Roman et al. (1995) *Genetics* **139**, 1393.

## SÉMINAIRE

L'éthylène joue un rôle essentiel dans la maturation des fruits climactériques. Sa voie de biosynthèse, maintenant bien connue, comprend deux étapes clés, la conversion de la S-adenosylmethionine en ACC et la conversion de l'ACC en éthylène. Ces deux étapes sont catalysées respectivement par l'ACC synthétase et l'ACC oxydase. Les gènes codant pour ces deux enzymes ont été caractérisés et on commence à connaître certains éléments de leur régulation.

Le groupe du Dr. J.-C. Pech s'est surtout consacré à l'étude de la famille de gènes codant pour l'ACC oxydase. Trois gènes, transcriptionnellement actifs, ont été isolés chez le melon et leur expression différentielle a été étudiée au cours du développement et sous l'effet de différents stimuli. CM-ACO1 est induit dans les fruits mûrs et en réponse à la blessure et à un traitement à l'éthylène. CM-ACO2 est détectable à de faibles niveaux dans des hypocotyles étiolés. CM-ACO3 est essentiellement exprimé dans les fleurs. Une caractérisation préliminaire du promoteur de CM-ACO1 indique la présence d'éléments de réponse à l'éthylène.

Afin de distinguer les événements de la maturation dépendant ou non de l'éthylène, le groupe du Dr. Pech a cherché à inhiber l'expression du gène codant pour l'ACC oxydase par stratégie des ARN antisens chez le melon. Ils ont ainsi généré une lignée de melon dont la synthèse d'éthylène a été réduite de plus de 99 %. Il en résulte un blocage de la maturation sur pied et après récolte qui peut être levé par application d'éthylène exogène. Il s'agit du premier exemple de modification de la maturation d'un fruit, autre que la tomate, et présentant une atténuation aussi forte de la biosynthèse d'éthylène. Ce matériel a permis d'identifier certains processus éthylène-dépendants (ramollissement, activité de certaines enzymes de dégradation de la paroi, coloration de l'écorce...) et certains processus éthylène-indépendants (couleur de la chair, activité de certaines enzymes de dégradation de la paroi, biosynthèse de certains arômes). Il présente donc un grand intérêt sur le plan théorique pour élucider les mécanismes de maturation des fruits. Il revêt également un intérêt appliqué pour la création d'hybrides commerciaux ayant une meilleure aptitude à la conservation.

#### PUBLICATIONS

LASSERRE E., BOUQUIN T., HERNANDEZ J.A., BULL J., PECH J.C., BALAGUÉ C. (1996) Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Mol. Gen. Genet.* **251** :81-90.

AYUB R., GUIB M., BEN AMOR M., GILLOT L., ROUSTAN J.P., LATCHÉ A., BOUZAYEN M., PECH, J.J. (1996) Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnology* **14**, July 1996.

#### **Cours sur Les Brassinostéroïdes en tant que Régulateurs de Croissance** **Séminaire du Prof. P. Benveniste**

*Institut de Botanique, Strasbourg*  
*Thème : La Biosynthèse de Stéroïdes*

La fonction physiologique chez les végétaux de stéroïdes du type ecdysone a été élucidée expérimentalement dans notre laboratoire à Cologne par le Dr. Csaba Koncz et son équipe. Un étiquetage par insertion d'un élément T-DNA à partir d'un vecteur *Agrobacterium* a permis l'isolement d'un mutant cpd (constitutive,

photomorphogenic, defective) d'*Arabidopsis thaliana*. Ce mutant cpd fut localisé sur le chromosome 5 — 14.3. Ce mutant ne permet pas l'élongation de l'hypocotyle dans l'obscurité et de la tige sous la lumière. Il s'agit donc d'un mutant nain qui est en plus déétiolé puisque des gènes tels que SSU Rubisco et CAB qui, dans le type sauvage, sont induit par la lumière, sont dans ce mutant transcrit également dans l'obscurité. Le gène cpd fut isolé et sa séquence indique qu'il s'agit d'un gène qui code pour une cytochrome P450 (CYP90) qui est homologue d'hydroxylases de stéroïdes animaux. Le phénotype mutant peut d'ailleurs être corrigé par addition au milieu de culture de précurseurs de la synthèse de brassinostéroïdes pour autant qu'il s'agisse de précurseurs avec un groupe hydroxyl sur le carbone 23. On peut également corriger le phénotype mutant par complémentation et expression ectopique d'un ADNc cpd dans des plantes transgéniques. Ces études démontrent donc bien le rôle physiologique joué par des stéroïdes végétaux (brassinostéroïdes). Ces stéroïdes sont impliqués dans la régulation négative par des phytochromes de l'expression de gènes nucléaires induits par la lumière ainsi que dans une régulation positive de l'élongation de l'hypocotyle dans l'obscurité et dans le développement de la fertilité mâle et l'élongation des cellules de la tige sous la lumière. En plus, certains gènes impliqués dans la réponse aux stress abiotique sont apparemment régulés négativement par les stérols végétaux tandis que des gènes impliqués dans la réaction aux pathogènes sont régulés positivement par ces stérols.

L'étude du rôle de stéroïdes végétaux est donc d'une grande signification aussi bien d'un point de vue fondamental que d'un point de vue appliqué (stimulation de la croissance, résistance au pathogènes etc).

#### SÉMINAIRE

Les stérols jouent un rôle très important, en général, chez les eucaryotes. Ils sont d'abord des constituants des membranes et participent aux fonctions majeures de ces dernières. Ils sont également des précurseurs de composés à activité biologique élevée comme par exemple les brassinostéroïdes dans le cas des végétaux supérieurs. Alors que la biosynthèse des stérols est maintenant connue dans ses grandes lignes chez les plantes supérieures, la régulation de cette biosynthèse n'a fait l'objet que de travaux restreints. L'équipe du Prof. Benveniste a entrepris de combler cette lacune en utilisant deux approches complémentaires : l'isolement de mutants touchés dans la voie de biosynthèse des stérols et l'expression *in planta* de gènes codant pour la biosynthèse des stérols par transformation génétique stable.

La mutagenèse aux UV de protoplastes de tabac amphidiploïdes suivie d'une étape de sélection avec un inhibiteur de la biosynthèse des stérols (IBS) phytotoxique a permis d'isoler un mutant surproducteur de stérols (LAB 1-4). La surproduction à un stade de développement indifférencié (cal) est d'un facteur 10, elle concerne les stérols de fin de chaîne ainsi que les intermédiaires biosynthétiques, elle fait apparaître plusieurs étapes limitantes dont les étapes catalysées

par les stérol-C-méthyltransférases, elle se traduit par une accumulation spectaculaire d'esters de stérols concentrés dans des gouttelettes lipidiques cytosoliques alors que la teneur en stérols libres reste comparable à celle d'un génotype sauvage. Enfin la surproduction de stérols est responsable de la résistance vis à vis de l'IBS utilisé lors de la sélection. Le rôle majeur joué par l'HMGCoA réductase est suggéré par l'activation de cette enzyme chez le mutant et confirmé par transformation stable de tabacs avec un cDNA d'*Hevea* codant pour cette enzyme. Les tabacs transgéniques ont en effet montré un phénotype de surproduction de stérols identique à celui du mutant. Le clonage de la mutation LAB 1-4 ainsi que l'analyse moléculaire de son rôle dans la surproduction de stérols sont en cours au laboratoire du Prof. Benveniste.

Chez *Arabidopsis thaliana*, un mutant STE 1 obtenu par traitement à l'EMS présente un phénotype d'accumulation de  $\Delta^7$ -stérols à la place des  $\Delta^5$ -stérols du génotype sauvage a été isolé. Dans ce cas la mutation porte probablement sur la  $\Delta^7$ -stérol-C5-désaturase. Pour le montrer le mutant STE 1 a été transformé avec un gène codant pour une stérol C5-désaturase de levure et une complémentation partielle a pu être observée dans les plantes transgéniques. Afin de réaliser une complémentation avec l'enzyme homologue, un cDNA codant pour une  $\Delta^7$ -stérol-C5-désaturase d'*Arabidopsis* a été isolé par complémentation fonctionnelle d'un mutant de levure déficient (erg 3) avec une banque d'*Arabidopsis* dans un vecteur levure. Ce cDNA est maintenant utilisé pour cloner la mutation STE 1 et effectuer la complémentation homologue du mutant.

D'après les résultats antérieurs, les stérol-C-méthyltransférases apparaissent comme étant des points privilégiés de la régulation de la biosynthèse. Dans ce contexte un cDNA codant pour une stérol C-méthyltransférase a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* et sa fonction démontrée par expression chez un mutant erg 6 de levure déficient en zymostérol-C-24 — méthyltransférase. La position précise de cette méthyltransférase dans la chaîne de biosynthèse ainsi que son rôle physiologique sont en cours d'étude grâce en particulier à la transformation stable de tabac et d'*Arabidopsis* avec ce gène en orientation sens et antisens.

Le laboratoire du Prof. Benveniste dispose ainsi des outils (clones de cDNA, IBS) et des procédés (expression dans la levure et *in planta*) permettant de manipuler à la hausse ou à la baisse les flux biosynthétiques conduisant aux stérols et d'en étudier les conséquences physiologiques et les applications biotechnologiques.

## **Cours sur Le Mécanisme d'Action de l'Acide Abscissique (ABA)**

### **Séminaire du Dr. Jérôme Giraudat**

*Institut des Sciences Végétales, Gif-sur-Yvette*

*Thème : Analyse Génétique des Cascades de Signalisation de l'Acide Abscissique chez Arabidopsis*

Avec l'éthylène, l'acide abscissique (ABA) est aujourd'hui l'hormone végétale la mieux comprise du point de vue du mécanisme d'action.

#### I. Effets physiologiques

Régulation de la croissance et du développement

##### a) des graines

Germination : l'ABA joue surtout un rôle lors de la maturation parce qu'elle induit la dormance ;

Développement : la résistance à la dessiccation de nombreuses graines est due à l'action de l'ABA ;

##### b) de tissus végétatifs

Des réponses adaptatives à la sécheresse ou à une salinité élevée sont régulées par l'ABA.

#### II. Biosynthèse

Celle-ci est en principe bien connue en partie par l'étude de mutants défectueux de la biosynthèse de l'ABA. Il s'agit d'une sesquiterpénoïde avec l'acide mévalonique comme précurseur. Pour pouvoir expérimentalement contrôler la teneur en ABA chez diverses plantes, il faudrait que l'on dispose des gènes végétaux responsables de la biosynthèse de cette phytohormone. Or, à ce jour, seulement un de ces gènes a été cloné, celui codant pour une xanthine époxydase de *N. plumbaginifolia* (le gène ABA-2) qui est l'homologue du gène ABA-1 d'*Arabidopsis*. Il faudrait donc isoler d'autres mutants de biosynthèse de l'ABA pour pouvoir cloner les gènes correspondants. Il est heureux qu'un consortium s'est formé en Europe qui compte s'attaquer à cette tâche.

#### III. Mécanisme d'action

L'acide abscissique régule la réponse de tissus végétaux à la sécheresse. Il existe cependant des gènes impliqués dans la réponse à la sécheresse qui ne sont pas régulés par l'ABA puisqu'ils sont actifs après dessiccation dans des mutants défectueux pour la synthèse de l'ABA (Yamagushi et al. (1995) *J. Plant Res.* **108**, 127 et Gosti et al. (1995) *Mol. Gen. Genet.* **246**, 10).

Par l'emploi de méthodes d'étiquetage de gènes par insertion soit d'éléments de transposition, En/spm ou Ac/Ds, soit de T-DNA il est possible d'isoler des

mutants qui devraient permettre d'élucider le mécanisme responsable de cette fonction de l'ABA.

A l'Institut Max Planck de Cologne l'équipe dirigée par le Dr. D. Bartels du groupe du Prof. F. Salamini en collaboration avec le Dr. R. Walden de notre laboratoire a pratiqué l'étiquetage de gènes par insertion d'un T-DNA qui provoque l'activation de gènes normalement induits par l'ABA en absence d'ABA (voir Mécanisme d'Action des Auxines et des Cytokinines). Comme des cals de la plante de résurrection, *Craterostigma plantagineum*, qui survit parfaitement à une sécheresse intense, ne sont pas capables de survivre à la sécheresse en absence de l'ABA, il était possible de sélectionner des cals mutants à phénotype dominant, qui résistent à la dessiccation en absence d'ABA. C'est ainsi qu'un gène codant probablement pour un acide ribonucléique (RNA) régulateur a été isolé.

#### SÉMINAIRE

L'acide abscissique (ABA) est une hormone qui régule divers processus physiologiques importants chez les végétaux supérieurs : la maturation et la germination de la graine, et la tolérance des tissus végétatifs à des conditions environnementales de stress hydrique (1). Le but ultime de l'équipe de J. Giraudat est d'élucider le réseau de transduction de l'ABA dans la plante, en utilisant l'espèce modèle *Arabidopsis* qui facilite l'utilisation conjointe de la génétique et de la biologie moléculaire. Le groupe de M. Koornneef avait isolé dans cette espèce divers mutants « insensibles » à l'ABA, qui correspondaient à trois loci distincts : ABI1, ABI2 et ABI3 (2). Les analyses phénotypiques suggéraient que ces protéines ABI participaient à des cascades partiellement distinctes assurant respectivement la régulation par l'ABA du développement de la graine (ABI3), et des réponses des tissus végétatifs au stress hydrique (ABI1 et ABI2).

L'équipe du Dr. J. Giraudat a isolé le gène ABI3 par clonage positionnel (3) et montré qu'il est exclusivement exprimé dans les graines (4). La protéine ABI3 est vraisemblablement un activateur transcriptionnel. ABI3 ne contrôle qu'une sous-partie des gènes exprimés pendant l'embryogénèse tardive. De plus, les résultats indiquent qu'ABI3 semble médier le contrôle de tels gènes cibles à la fois par l'ABA endogène et par d'autres facteurs développementaux encore non identifiés (4).

Le gène ABI1 a été cloné par marche chromosomique (5). L'équipe a montré, par des expériences de complémentation phénotypique d'un mutant de levure et par des tests enzymatiques *in vitro*, que la protéine ABI1 possède un domaine catalytique actif de type protéine sérine/thréonine phosphatase 2C (6). En collaboration avec le laboratoire de Mike Blatt, il a été montré que l'expression de gène mutant dominant *abi1-1* dans des tabacs transgéniques inhibe la régulation de deux classes de canaux ioniques par l'ABA au sein des cellules de garde, et que cet effet est réversible par des inhibiteurs de kinase (7). L'ensemble de ces



résultats suggère un modèle très schématique dans lequel la phosphatase ABI-1 et une kinase détermineraient conjointement le degré de phosphorylation et par là l'activité d'un élément de transduction de l'ABA.

#### PUBLICATIONS

1. GIRAUDAT, J. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 232-238.
2. KOORNNEEF, M. et al. (1984) *Physiol. Plant.* **61**, 377-383.
3. GIRAUDAT, J. et al. (1992) *Plant Cell* **4**, 1251-1261.
4. PARCY, F. et al. (1994) *Plant Cell* **6**, 1567-1582.
5. LEUNG, J. et al. (1994) *Science* **264**, 1448-1452.
6. BERTAUCHE, N. et al. (1996) *Eur. J. Biochem.* sous presse.
7. ARMSTRONG, F. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9520-9524.

### **Cours sur Les Mécanismes d'Action de Polyamines, de l'Acide Salicylique et de Jasmonates**

#### **Séminaire du Dr. B. Fritig**

*Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), Strasbourg*

*Thème : Métabolisme et Rôle Physiologique de l'Acide Salicylique chez les Plantes, notamment dans les Phénomènes de Résistance Induite aux Agents Pathogènes*

#### **Séminaire du Dr. E. Blée**

*Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), Strasbourg*

*Thème : Métabolisme des Jasmonates*

#### 1. Les Polyamines

Le rôle physiologique des polyamines n'est pas bien défini et son mécanisme d'action est encore totalement inconnu. Par contre, des effets physiologiques sur le développement de la plante sont bien démontrés. Alors que d'autres phytohormones sont actifs à des concentrations de l'ordre du micromolaire, les polyamines ne le sont que pour des concentrations de l'ordre du millimolaire. En plus, la translocation dans la plante du site de synthèse à des sites cibles fonctionnels n'a pas vraiment été démontrée. C'est pourquoi on se pose la question de savoir s'il s'agit d'une hormone ou alors d'un messenger secondaire. Si les polyamines jouent un rôle en tant que messagers secondaires de phytohormones, on peut s'attendre à ce que des polyamines peuvent remplacer des phytohormones pour la régulation de certains phénotypes.

L'équipe du Dr. R. Walden et en particulier le Dr. Klaus Fritze s'est attaqué à ce problème en isolant des mutants de cals de tabac qui étaient résistants à des concentrations toxiques d'un inhibiteur de la synthèse de polyamines, c.-à-d. le

MGBG (methylglyoxal-bis (guanyl/hydrazone)). Les mutants dominants furent obtenus par la méthode de l'étiquetage par « gain de fonction » et résultaient de l'insertion au hasard dans le génome du tabac d'éléments de T-DNA particulièrement conçus dans ce but (Walden et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* **26**, 1521-1528).

C'est ainsi que plusieurs gènes furent isolés qui sont capables de conférer à des cals de tabac la capacité de se diviser en présence de concentrations de l'inhibiteur (MGBG) qui empêchent complètement la croissance de cals de type sauvage. Il fut démontré que ces gènes activés sont responsables d'une surproduction de polyamines. De plus, au moins un de ces gènes confère à des cals la capacité de se diviser non seulement en présence de l'inhibiteur MGBG mais aussi en absence de phytohormones tels que l'auxine et la cytokinine.

## 2. L'Acide Salicylique

Le cours s'est concentré surtout sur le phénomène de la RSA (résistance systémique acquise) en anglais SAR (systemic acquired resistance), phénomène qui est bien décrit plus loin dans le résumé du séminaire du Dr. B. Fritig. Ce phénomène est bien connu depuis de longues années mais ce n'est qu'après 1990 que l'on a fait de sérieux progrès dans la compréhension scientifique de ce phénomène.

Des mutants d'*Arabidopsis* (Cameron et al. (1994) *Plant J.* **5**, 715) incapables de réaliser une réponse locale de résistance (RLA : résistance locale acquise) sont néanmoins capables d'induire une résistance RSA ce qui démontre qu'une réaction hypersensible localisée peut contribuer mais n'est pas vraiment essentielle pour qu'une RSA puisse s'établir. En plus, l'équipe du Dr. J. Dangle autrefois à l'Institut Max Planck à Cologne, à présent à University of North Carolina, Dept of Biology, Chapel Hill/USA, a pu isoler des mutants qui donnent des lésions nécrotiques (du type de la réaction hypersensible) en absence de pathogènes. Certains de ces mutants induisent une RSA.

Nous savons que le signal qui est responsable de l'induction de la RSA est transporté dans le phloème. La concentration en acide salicylique est significativement plus élevée dans le phloème de feuilles infectées et l'addition exogène d'acide salicylique à des feuilles de tabac induit des gènes de résistance de manière systémique. Il est donc vraisemblable que l'acide salicylique soit le signal systémique.

## SÉMINAIRE

### 1. L'acide salicylique et la résistance induite chez les plantes.

L'acide salicylique (ou acide ortho-hydroxybenzoïque) est un composé phénolique affectant à distance et à faible dose de multiples processus physiologiques et est à ce titre considéré comme une hormone végétale. Il est d'autre part tenu pour l'une des composantes de la transduction du signal ou le signal lui-même

conduisant au phénomène de résistance induite chez un grand nombre de végétaux, en particulier lors de la réaction hypersensible. Celle-ci est un remarquable modèle de réponse de défense induite qui permet à une plante d'opposer une résistance efficace à des agents pathogènes aussi variés que des champignons, virus ou bactéries. Son déclenchement résulte d'une perception spécifique, par un groupe de cellules végétales, du microorganisme pathogène ou d'un de ses composants. Il en résulte la mort (nécrose) de ce groupe de cellules et, dans un anneau de cellules entourant les cellules mortes, un profond bouleversement de l'expression génique qui privilégie presque exclusivement les gènes de défense. Ces gènes codent pour des enzymes du métabolisme secondaire (synthèse d'antibiotiques ou de barrières mécaniques) et pour des protéines et enzymes à activité(s) antimicrobienne(s) direct(s). Leur très forte induction a pour conséquence le confinement du microorganisme au site d'attaque à son voisinage immédiat, créant ainsi une étroite zone d'immunité ou zone de « résistance locale acquise » (RLA). En dehors de cette zone apparaît également une résistance induite, d'intensité beaucoup plus faible. C'est la « résistance systémique acquise » (RSA), non spécifique de l'agent pathogène inducteur (elle réduit une deuxième infection par n'importe quel autre microorganisme) et perceptible jusqu'à des distances fort éloignées de la première attaque ou du premier traitement. Tout un sous-ensemble des modifications métaboliques de la zone RLA se retrouve à distance (zones RSA), bien qu'en beaucoup plus faible intensité.

Le fonctionnement de ce système suggère la production et la mobilité de signaux capables d'induire les gènes de défense. Il y a de nombreux arguments pour attribuer à l'acide salicylique (AS) le rôle d'un tel signal impliqué dans l'induction d'une forte résistance localisée (RLA) et dans le phénomène de la RSA. Ces arguments sont basés sur de bonnes corrélations, observées par plusieurs auteurs, d'inductions concomitantes de résistance et de réponses de défense après applications exogènes d'AS. L'équipe du Dr. Fritig, dont l'atout majeur est de disposer d'un très grand nombre de marqueurs de défense, a établi de bonnes corrélations entre cinétiques, sites de production de l'AS et stimulation d'une gamme de réponses de défense. Récemment, des arguments particulièrement convaincants ont été obtenus par une équipe américaine avec une approche élégante de génie génétique végétal permettant de cataboliser l'AS endogène : en conséquence, les réponses de défense de la zone RLA se trouvaient affaiblies et le phénomène RSA était complètement supprimé.

## 2. Biosynthèse de l'acide salicylique chez les plantes

Au vu de ces résultats, une modulation contrôlée du niveau endogène d'AS devrait permettre d'induire chez des plantes sensibles une résistance à des agents pathogènes. Cela implique d'élucider les voies de biosynthèse majeures d'AS chez les plantes, de caractériser les enzymes clés, cloner les ADNc, les exprimer dans des plantes transgéniques sous le contrôle de promoteurs inductibles par des agents pathogènes. A priori, l'AS peut être considéré comme un dérivé d'acide cinnamique, une des substances située en amont de la voie générale des phényl-

propranoides. Sa formation peut résulter d'une  $\beta$ -oxydation conduisant à l'acide benzoïque suivie d'une ortho-hydroxylation. Ces étapes pourraient également être inversées, avec une ortho-hydroxylation de l'acide cinnamique en acide o-coumarique précédant la  $\beta$ -oxydation en AS. Une équipe américaine a proposé un rôle central de l'acide benzoïque libre qui, lors de la réaction hypersensible, serait mobilisé à partir d'une réserve préexistante d'un conjugué et serait converti en AS par la benzoate 2-hydroxylase (BA2H) dont l'activité serait stimulée. Les résultats du Dr. Fritig, obtenus à l'aide d'inhibiteurs d'enzymes de la voie des phénylpropanoïdes et par marquage *in vivo* à partir d'acide cinnamique  $^{14}\text{C}$  et d'acide benzoïque  $^{14}\text{C}$  sont en contradiction avec ceux de l'équipe américaine. Ils démontrent que toute la production accrue d'AS se fait via la phénylalanine, que la BA2H n'est activée que de manière transitoire pour détoxifier l'acide benzoïque libre formé au début du stress, enfin que les intermédiaires biosynthétiques clés sont probablement des formes conjuguées (esters de CoA ?) de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque que Dr. Fritig propose de caractériser.

### 3. Les Jasmonates

L'acide jasmonique et son ester méthylique sont connus depuis plus de 30 ans. Néanmoins ce n'est que récemment que l'on sait que ce signal joue un rôle régulateur important des réactions végétales à différents « stress » abiotiques et biotiques. Ce sont des oxylipines et l'étude de leur mode d'action et de leur synthèse est actuellement en plein développement (voir séminaire du Dr. E. Blée). C'est ainsi que l'équipe du Prof. Parthier à Halle (Allemagne) a pu isoler une série de protéines induites par les jasmonates (il s'agit de JIPs : jasmonate induced proteins) et l'une de ces protéines est une RIP (ribosome inhibiting protein). Ce même groupe essaie aussi d'obtenir des mutants d'*Arabidopsis* qui ne seraient pas induits par les jasmonates.

### SÉMINAIRE

Parmi les oxylipines (nom générique donné aux dérivés d'acides gras oxygénés) impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, l'acide jasmonique, et/ou son dérivé ester méthylique, agiraient comme médiateurs dans la transmission des signaux générés lors de stress hydrique, mécanique, ou causés par une blessure ou un pathogène. Il a été montré que de tels stimuli provoquaient l'accumulation immédiate et transitoire des oxyliplines. Une des questions qui se pose actuellement est la régulation du taux de ces types de molécules signal dans les cellules végétales lors des réponses de défense de la plante. La formation d'acide jasmonique requiert, comme précurseur, l'acide linoléinique hydroperoxydé. Cet hydroperoxyde, formé par l'oxydation de l'acide gras insaturé sous l'action d'une lipoxygénase, peut être déshydraté par une enzyme, l'allène oxyde synthase, pour conduire à un composé très instable qui peut ensuite donner naissance au squelette cyclisé du jasmonate. Cependant, l'hydroperoxyde d'acide linoléinique est également substrat d'autres enzymes et peut donc se trouver en quantité limitante dans

la cellule végétale pour la formation d'acide jasmonique. On sait, par exemple, que cet hydroperoxyde peut être coupé par une lyase en aldéhydes et cétones aux propriétés antibiotiques. En outre, le groupe du Dr. Blée a montré dernièrement qu'il pouvait aussi être métabolisé par une oxygénase tout à fait originale : la peroxygénase. Cette enzyme catalyse le transfert d'un atome d'oxygène de l'hydroperoxyde, qui sera réduit en l'alcool correspondant, sur un accepteur comme un acide gras insaturé qui sera époxydé. Les activités des trois enzymes : lyase, allène, oxyde synthase, peroxygénase, entrant en compétition pour l'hydroperoxyde, doivent donc être placées sous un contrôle très strict. Or la régulation et la compartimentation de telles voies métaboliques sont encore très mal connues. Par exemple, nul ne sait actuellement quels sont les signaux qui favorisent l'une ou l'autre des branches de la voie biosynthétique des oxylipines en réponse à différentes conditions de stress. Un travail tout récent au laboratoire montre que la compartimentation des différentes enzymes impliquées pourrait être un facteur essentiel de cette régulation.

### **La Biotechnologie Végétale et la Biologie des Semences**

*Cours à l'invitation du GEVES à Beaucouze (Angers) dans l'Amphithéâtre de l'INRA*

Les nouvelles possibilités ouvertes par la technique du génie génétique surtout pour l'amélioration variétale furent évoquées. La conclusion principale est qu'il est certain aujourd'hui que dans un avenir très proche l'amélioration variétale sera basée surtout sur des connaissances scientifiques (science driven) et que la biologie moléculaire combinée avec des aspects de sciences végétales plus traditionnelles sera la source principale de ces connaissances. L'agriculture à l'avenir devra être non seulement productive d'un point de vue économique mais également plus respectueuse de l'environnement. Les connaissances devraient nous permettre de produire des cultures résistantes aussi bien aux stress biotiques (pathogènes, pestes, etc.) qu'aux stress abiotiques (éléments climatiques, sols, etc.) et aussi fournir des débouchés importants pour l'agriculture dans des domaines industriels (énergie, lipides, plastiques biodégradables, etc.). Ces progrès permettront ainsi à nos agriculteurs de trouver des alternatives valables à la jachère.

Lors du séminaire sous forme d'une discussion entre des semenciers et le Prof. Schell les besoins scientifiques et techniques des semenciers furent évoqués et discutés.

### **Cours sur Les Lipo-chitooligosaccharides**

#### **Séminaire du Prof. A. Kondorosi et des Drs. M. Crespi et M. Schultze**

*Institut des Sciences Végétales, Gif-sur-Yvette*

*Thème : Rôle et Induction de Nodulines chez le Tabac*

Si on veut un jour pouvoir réaliser la fixation de l'azote dans des cultures non-légumineuses, il faudrait connaître les éléments qui permettent aux plantes légumineuses d'établir une symbiose avec *Rhizobium* tandis que des plantes non-légumineuses (par exemple le tabac) sont incapables d'établir de telles symbioses. On a découvert récemment que *Rhizobium* produit des lipo-chitooligosaccharides (LCOs) (voir cours sur le Mécanisme d'Action des Auxines) et que ces LCOs jouent un rôle crucial dans le développement des nodules racinaires chez les légumineuses. Nous avons pu démontrer que les LCOs peuvent remplacer des phytohormones tels que des auxines et cytokinines pour stimuler la division cellulaire de plantes non-légumineuses et que cette stimulation dépend en large mesure de la nature de l'acide gras (cis — ou trans) attaché au LCOs. En plus, nous avons pu démontrer que le gène *axi-1* est induit non seulement par l'auxine mais également par les LCOs.

En collaboration avec l'équipe du Prof. T. Bisseling à Wageningen (Pay-Bas) nous avons pu démontrer que l'homologue dans le tabac du gène ENOD40 — codant pour une noduline précoce chez les plantes légumineuses — est induit par le produit du gène *axi-1* et qu'un peptide de 12 acides aminés est sécrété et permet aux protoplastes de tabac de résister à des concentrations toxiques d'auxines.

Les séminaires du Prof. Kondorosi et des Drs Crespi et Schultze ont permis de comparer les mécanismes d'action des LCOs tels que nous les avons analysés chez le tabac avec ceux étudiés par cette équipe chez la luzerne.

#### LISTE DES PUBLICATIONS

1995 — 1996

BEACHY, R., SCHELL-FREDERICK, E., and SCHELL, J. La biotechnologie végétale au service de la santé. *Diogène* 172, 97-110 (1995).

BEACHY, R., SCHELL-FREDERICK, E., and SCHELL, J. Plant biotechnology in the service of human health. *Diogenes* 172, Volume 43/4, 93-104 (1995).

HAUSMANN, L., SCHELL, J., and TÖPFER, R. Cloning of a cDNA coding for a glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Cuphea lanceolata*. In : « *Plant Lipid Metabolism* », J.-C. Kader, and P. Mazliak (Eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 534-536 (1995).

HEYRAUD-NITSCHKE, F., SCHUMACHER, S., LAUFS, J., SCHAEFER, S., SCHELL, J., and GRONENBORN, B. Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Res.* 23, 910-916 (1995).

JACH, G., GÖRNHARDT, B., MUNDY, J., LOGEMANN, J., PINSDORF, E., LEAH, R., SCHELL, J., and MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-109 (1995).

JOHN, M., RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., and SCHELL, J. Molecular biology in the land of nodules. *Biofutur* 142, 19-21 (1995).

KLECZKOWSKI, K., and SCHELL, J. Phytohormone conjugates : nature and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14, 283-298 (1995).

LAUFS, J., TRAUT, W., HEYRAUD, F., MATZEIT, V., ROGERS, S.G., SCHELL, J., and GRONENBORN, B. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3879-3883 (1995).

MAAS, C., REICHEL, C., SCHELL, J. and STEINBISS, H.-H. Preparation and transformation of monocot protoplasts. In : « *Methods in Cell Biology — Plant Cell Biology* », Vol. 50, D.W. Galbraith, H. Bohnert, and D.P. Bourque (Eds.), Academic Press, Orlando, pp. 383-399 (1995).

MAAS, C., and SCHELL, J. Gentechnologie und Umweltschutz in der Landwirtschaft. In : « *Bildung und Wissenschaft* » II/95, Inter Nationes e.V., Bonn (Ed.), Druckpartner Moser Druck + Verlag GmbH., Rheinbach, pp. 18-19 (1995).

MARTINI, N., SCHELL, J., and TÖPFER, R. Expression of acyl-[ACP] thioesterase in *Cuphea lanceolata* and transgenic rapeseed. In : « *Plant Lipid Metabolism* », J.-C. Kader, and P. Mazliak (Eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 495-498 (1995).

MARTINI, N., SCHELL, J., and TÖPFER, R. Expression of medium-chain acyl-[ACP] thioesterases in transgenic rapeseed. In : « *Rapeseed Today and Tomorrow* » Vol. 2 (Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, 4.-7. July 1995, Cambridge/U.K.), Organizing Committee GCIRC (Eds.), The Dorset Press, Dorchester, pp. 461-463 (1995).

MOORE, I., SCHELL, J., and PALME, K. Subclass-specific sequence motifs identified in Rab GTPases. *Trends Biochem. Soc.* 20, 10-12 (1995).

REICHEL, C., FELTKAMP, D., WALDEN, R., STEINBISS, H.-H., SCHELL, J., and ROSAHL, S. Inefficient expression of the DNA-binding domain of GAL4 in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 14, 773-776 (1995).

RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., WALDEN, R., CZAJA, I., MIKLASEVICS, E., WIENEKE, U., SCHELL, J., and JOHN, M. Growth of tobacco protoplasts stimulated by synthetic lipo chitoooligosaccharides. *Science* 269, 841-843 (1995)

SCHELL, J. Plant biotechnology : State of the art in developed countries and relevant safety considerations. In : « *Pan-European conference on the potential long-term ecological impact of genetically modified organisms* », Environmental encounters, No. 20, (Proceedings PEC, 24.-26.11.1993, Strasbourg), Council of Europe (Ed.), Council of Europe Press, Netherlands, pp. 25-34 (1995).

SCHELL, J. Progress in plant sciences is our best hope to achieve an economically rewarding, sustainable and environmentally stable agriculture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1, N° 1, 10-12 (1995).

SCHELL, J. Statement zur Gentechnologie. In : « *Gentechnologie — Ethik und wissenschaftlicher Fortschritt* » (Internationales Forum der Universität zu Köln gemeinsam mit der Stadt Köln, 23.6.1994, Historisches Rathaus Köln), Band 4, P. Mittelstaedt (Ed.), Bouvier Verlag, Bonn, pp. 31-33 u. 65-66 (1995).

SCHELL, J. Molecular breeding as well as chemical and biological protection methods have an important role to play to make integrated pest management a practical and desirable reality. *Agro-Food-Industry Hi-Tech Supplement*, Brighton Crop Protection 1995, 4-5 (1995).

SCHELL, J., PALME, K., and WALDEN, R. Molecular approaches to the study of the mechanism of action of auxins. In : « *Plant Hormones — Physiology Biochemistry and Molecular Biology* », P.J. Davies (Ed.), Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 354-371 (1995).

SCHULTZE, M., STAEHELIN, C., RÖHRIG, H., JOHN, M., SCHMIDT, J., KONDOROSI, E., SCHELL, J., and KONDOROSI, A. *In vitro* sulfotransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein : Lipochitooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2706-2709 (1995).

SUTER-CRAZZOLARA, C., BRZOBOHATY, B., GAZDOVA, B., SCHELL, J., and REISS, B. T-DNA integration in a new family of repetitive elements of *Nicotiana tabacum*. *J. Mol. Evol.* 41, 498-504 (1995).

TÖPFER, R., HAUSMANN, L., VOETZ, M., WALEK, J., SCHELL, J. and MARTINI, N. Genes for the improvement of the storage oil content of *Brassica napus*. In : « *Rapeseed Today and Tomorrow* », Vol. 2 (Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, 4.-7. July 1995, Cambridge/U.K.), Organising Committee GCIRC (Eds.), The Dorset Press, Dorchester, pp. 479-481 (1995).

TÖPFER, R., MARTINI, N., and SCHELL, J. Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268, 681-686 (1995).

KELLMANN, J.-W., KLEINOW, T., ENGELHARDT, K., PHILIPP, C., WEGENER, D., SCHELL, J., and SCHREIER, P. Characterization of two class II chitinase genes from peanut and expression studies in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 30, 351-358 (1996).

REICHEL, C., MAAS, C., SCHULZE, S., SCHELL, J., and STEINBISS, H.-H. Cooperative binding to nucleic acids by barley yellow mosaic bymovirus coat protein and characterization of a nucleic acid-binding domain. *Virology* 77, 587-592 (1996).

REINEMER, P., PRADE, L., HOF, P., NEUEFEIND, T., HUBER, R., ZETTL, R., PALME, K., SCHELL, J., KOELLN, I., BARTUNIK, H.D., and BIESELER, B. Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolu-



tion : Structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferase and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.* 255, 289-309 (1996).

REISS, B., KLEMM, M., KOSAK, H., and SCHELL, J. RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3094-3098 (1996).

SCHELL, J. Prof. G. Melchers celebrates his ninetieth (90th) birthday ! *Mol. Gen. Genet.* 250, 135-136 (1996).

SZEKERES, M., NEMETH, K., KONCZ-KALMAN, Z., MATHUR, J., KAUSCHMANN, A., ALTMANN, T., REDEI, G.P., NAGY, F., SCHELL, J., and KONCZ, C. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP 90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85, 171-182 (1996).

SCHELL, J. Transgenic plants and study of the regeneration of whole plants from individual cells. In : « *Das Ganze und seine Teile* » Europäisches Forum. Alpbach 1995, H. Pfusterschmid-Hardtenstein (Ed.), Ibero Verlag, Wien, pp. 515-516 (1996).

#### CONGRÈS

14/2/1995 : European Science Foundation (ESF) Workshop on : New Perspectives for Science in Europe/The Accountability of Scientists to Society. Paris (France). « Experiences from the field of plant biotechnology »

17/2/1995 : Conférences du Groupe des Laboratoires de Gif-sur-Yvette (France). « La biologie moléculaire végétale a un rôle essentiel à jouer pour résoudre le dilemme agriculture et environnement »

19-25/2/1995 : 7<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology / ECB7. Nice (Italy). « Expression of *Rhizobium* common *NOD* genes involved in the synthesis of lipooligosaccharides affects the development of transgenic tobacco »

23/2/1995 : Symposium on European Community's Biotechnology Programmes. Nice (France). « Example of a de-centralized network : molecular biology of plants (The AMICA initiative : plant molecular genetics for an environmentally compatible agriculture) »

15/3/1995 : Group of Advisors on Ethical Implications of Biotechnology (of the European Commission). Dinner with members of the group, President Zacher and Directors of MPI Köln. Hotel Königshof Bonn (Germany)

13-14/7/1995 : European Developmental Biology Congress (EDBC-95). Toulouse (France). « Experiments to study the mechanism of action of auxin-phytohormones ».

16/7/1995 : International Symposium on « Molecular Mechanism of Plant Signal Transduction Chains », organized by The Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo (Japan). « Mechanism of action of auxin and cytokinin

phytohormones : Lessons from *rol* genes, genetic tumors and gain of function T-DNA tagging ».

24-26/8/1995 : Evaluation « Swedish Strategic Network for Plant Biotechnology ». Stiftelsen för strategisk forskning (Bengt Karlsson). Stockholm (Sweden).

30/8-3/9/1995 : Fondation des Treilles. Colloque « Biotechnologies et Agriculture : Les Nouveaux Défis ». Tourtour (France). « Aspects génétiques, transgénèse »

24-26/9/1995 : International Conference « *Agrobacterium* and Beyond ». CNRS Institut des Sciences Végétales. Gif-sur-Yvette (France). « Identification and isolation of plant genes by 'gain of function' tagging with specialized T-DNAs »

25-28/9/1995 : Centenary of Louis Pasteur's Death. Marnes-la-Coquette (France). « Plant biotechnology is essential for an environmentally sustainable agriculture ».

26/9/1995 : Louis Pasteur and Industry in the 21<sup>st</sup> Century. Marnes-la-Coquette (France). « The role of biotechnology in the dilemma between production and protection of the natural resources ».

29/9/1995 : Ninth Forum for Applied Biotechnology (FAB). Gent (Belgium). « Crop Biotechnology — a necessity for an environmentally friendly and sustainable agriculture »

7-9/11/1995 : Frontiers in Biology in the 21<sup>st</sup> Century. The Salk Institute. La Jolla (USA). « Mechanism of action of phytohormones ».

14/11/1995 : Anniversary-Symposium ZMBH. Heidelberg (Germany). « Gene-activation tagging : an effective method to study the mechanism of action of growth factors in plants ».

19/12/1995 : Round Table Discussion « The New Landscape of Science : Open Borders between Nations, between Disciplines and between Academia and Industry » — organized by the Weizmann Institute of Science. Château du Lac — Genval. Brussels (Belgium).

20/12/1995 : Symposium on « Future of Community Research ». Brussels (Belgium).

25-27/1/1996 : Third DBMS Workshop on « Plant Cell Metabolism and its Regulation ». Villard de Lans (France). « Mechanism of action of auxins and cytokinins ».

17-19/1/1996 : International Workshop on « Biotechnology, Patents and Morality : Towards a Consensus ». University of Gent (Belgium). « Plant biotechnology and its future impact on science, agriculture and the environment ».

7-11/3/1996 : Annual Meeting EUROMOSS. Sorrento (Italy). 21-22/3/1996 : ILTAB Review (International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology). The Scripps Research Institute. La Jolla (USA).

25-27/3/1996 : Member of the Committee for the Review of Biological Sciences, University of Auckland. Auckland (New Zealand).

13-16/5/1996 : International Symposium in honor of Professor Ephraim Katzir's 80th birthday « Perspectives in Molecular Biology and Biotechnology ». Jerusalem (Israel). « Steroids and lipo-chitooligosaccharides play an important role in the control of plant growth ».

11-14/6/1996 : AGBIOTECH International Conference ABIC'96. Saskatoon (Canada). « Biotechnology for an economically rewarding as well as environmentally sustainable agriculture ».

16-18/6/1996 : Meeting in honour of the new Institute for Developmental Biology of the Tel Aviv University. Tel Aviv (Israel). « Growth factors and development in plants »