

Biologie moléculaire des plantes

M. Joseph SCHELL, professeur

Les cours, ainsi que les séminaires en rapport avec les cours, ont porté sur l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires qui permettent aux plantes de se défendre quand elles sont exposées à des conditions d'environnement défavorables. Il s'agit ici encore d'un domaine de recherche fort actif et crucial pour l'avenir de l'agriculture.

Comme lors de l'année académique précédente, 6 cours ainsi que 6 séminaires furent donnés à l'INRA de Versailles, tandis que 3 cours et 3 séminaires furent donnés à Bonn dans le cadre de la Chaire Ernst Curtius qui, cette année, fut dédiée à la biologie moléculaire des plantes. En effet, en accord avec le Collège de France, l'Université de Bonn, par l'intermédiaire de son Recteur le Prof. Dr Borchard a demandé au Prof. Dr H. Schnabl à « Institut für Landwirtschaftliche Botanik » d'organiser ce cycle de cours et de séminaires. En pratique c'est le Dr Ruth Wingender qui s'est occupée de l'organisation à Bonn.

Cours d'Introduction (1)

Séminaire du Dr F. Tardieu

INRA, Laboratoire d'Écophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux, Montpellier

Thème : Relations Plante — Environnement — Intégrer les approches moléculaires et génétiques pour l'agronomie et l'environnement ?

Dans le cours d'introduction nous avons d'abord brièvement exposé le contenu prévu des leçons et des séminaires de l'année. Le cours avait comme thème : Les stress abiotiques en comparaison avec les stress biotiques. La définition des stress abiotiques selon le Dr D. Inzé est l'impact que peuvent avoir sur la croissance des plantes la température, l'eau, la lumière et la composition du sol (surtout en sels et en ions de métaux lourds). Nous avons argumenté que la logique et les faits veulent que les plantes réagissent de manière similaire aux stress biotiques (dont nous avons parlé pendant l'année académique 96-97) et aux stress abiotiques. Ainsi, certains mécanismes moléculaires, par exemple pour la transmission des signaux, peuvent servir dans la tolérance à plusieurs types de stress.

Puisque la machinerie génétique est conservée, beaucoup de principes peuvent s'appliquer à l'entière des organismes eucaryotiques et multicellulaires. Nous pouvons étudier l'expression des gènes cibles par la construction de gènes chimériques dont la partie codante, mais pas le promoteur avec ses éléments de régulation, a été remplacée par un gène dérivé d'une méduse et qui code pour une protéine fluorescente verte (« Green Fluorescing Protein/GFP »). Cette approche permet de se rendre compte de la régulation de l'expression d'un gène sans devoir sacrifier la plante transgénique. Comme on développe en ce moment aussi bien des microassays que des microchips avec lesquels on pourra étudier l'expression du génome complet d'un organisme complexe tel que la plante *Arabidopsis thaliana*, il devrait être relativement aisé d'obtenir ces gènes cibles.

En général on connaît de manière certaine peu de gènes cibles qui répondent au stress abiotique. Pour en savoir plus nous avons parlé d'une approche publiée récemment par M. Ishitani *et al.* (1997, *Plant Cell*, **9**, 1935-1949). Ces auteurs ont combiné une analyse de promoteurs avec un criblage génétique pour ainsi identifier plus d'une centaine de mutants d'*Arabidopsis* défectueux pour la réponse transcriptionnelle à des facteurs abiotiques et à l'application de certaines phytohormones. La plupart des mutants étaient récessifs et ne correspondaient pas à des gènes déjà connus. Il s'agit probablement de gènes impliqués dans la régulation et/ou la transduction de signaux primaires. Le fait qu'un bon nombre de ces mutants avaient une réaction anormale à plus d'un type de stress montre que les signaux produits par différents stress sont transmis par un même mécanisme qui doit être commun à plusieurs chaînes de transmission de signaux. Le plus grand nombre de mutants se retrouvaient dans les classes hosall et losall ce qui devrait rendre suspects les modèles existants. La vérité pourrait être bien plus complexe ! Cependant, les différentes cascades de transmission de signaux doivent converger à hauteur de certaines séquences-DNA qui règlent l'expression des gènes cibles. Il pourrait bien exister des éléments cis qui se lient à la même protéine. Cette protéine serait induite ou modifiée par plusieurs types de signaux abiotiques. Ishitani propose d'ailleurs un nouveau modèle basé sur une interaction complexe. C'est ainsi que l'on pourrait imaginer que les mutants de la classe all affectent l'expression de gènes régulateurs, qui à leur tour modifient l'expression de gènes dont les produits se lient à des éléments de séquences présentes dans plusieurs gènes réagissant à des stress différents. *Arabidopsis* pourrait bien avoir plus de 1 500 gènes codant pour des régulateurs de la transcription.

SÉMINAIRE (Dr F. Tardieu)

Deux problèmes cruciaux se posent :

(i) *Comment identifier les allèles qui donnent des avantages comparatifs à un génotype dans un environnement donné ?* Le rendement, les bilans d'eau et d'azote résultent de processus qui se déroulent pendant plusieurs mois. Ils intègrent plusieurs phases de développement de la plante. La transformation d'un gène peut avoir des conséquences inattendues lors d'une période aussi longue, au

travers d'effets cumulatifs, de modifications de l'architecture de la plante ou de durée des phases de développement. Même si l'ensemble du génome de l'espèce considérée était séquencé et que les fonctions des principaux gènes étaient connues, le problème resterait entier. On ne pourrait matériellement pas tester le comportement de chaque combinaison des allèles de chaque gène dans chaque environnement.

(ii) *Comment tester le comportement de génotypes et de pratiques culturales dans un environnement caractérisé par la variabilité pédoclimatique ?* Même si on considère une seule caractéristique climatique en un seul lieu, on constate une considérable variabilité à la fois entre semaines successives et entre années. Il en va de même pour les autres caractéristiques climatiques. Une approche empirique, consistant à comparer expérimentalement les résultats globaux de génotypes ou de pratiques culturales, nécessiterait une expérimentation d'au moins une dizaine d'années pour que les conditions climatiques explorées soient suffisamment représentatives.

La modélisation contribue à résoudre ces deux problèmes car elle permet de simuler la comparaison de génotypes et de pratiques culturales dans autant de conditions climatiques que l'on souhaite. Un modèle agronomique est un outil à qui on fournit les conditions environnementales (variables d'entrée : conditions climatiques, caractéristiques du sol) et qui prévoit les caractéristiques des plantes (surface foliaire, rendement ...) et de l'environnement (quantité d'eau ou d'azote dans le sol...) après un temps donné (variables de sortie). La construction du modèle met en jeu les principales fonctions et régulations de la plante, celles-ci étant représentées par des équations. Par exemple on construit les relations expérimentales puis les équations qui rendent compte quantitativement du comportement de la photosynthèse d'un génotype donné placé dans une gamme de rayonnement, CO₂ et teneur en eau du sol dans de multiples situations.

Les paramètres d'un modèle (exemple : pente de la relation entre vitesse de production d'ABA et état hydrique des racines) ont le même statut qu'un gène ou qu'un groupe de gènes chez une plante. C'est d'eux que dépend le comportement du génotype analysé dans un environnement donné. Une fausse « pléiotropie » est observée si on modifie un paramètre. Par exemple une modification de la vitesse de croissance foliaire affecte de nombreuses fonctions de la plante (photosynthèse et transpiration de la plante), mais aussi ses états hydrique, carboné et azoté et même son environnement (température, teneur en eau du sol après une période de transpiration ...). Plusieurs résultats importants pour la modélisation, ayant chacun des implications pour l'analyse des mécanismes moléculaires, ont été présentés.

Sur cette base on peut dire que :

1. Une contrainte environnementale (par exemple déficit hydrique de plusieurs semaines, température élevée ...) ne se traduit pas nécessairement par un stress au niveau cellulaire.

2. L'apparente diversité de comportement d'un génotype donné soumis à des environnements variés peut se réduire à un nombre limité de phénomènes, chacun représenté par une équation.
3. L'utilisation conjointe d'outils moléculaires et d'une approche de modélisation porte un regard nouveau sur la variabilité génétique, avec des résultats inattendus.

Références

1. Ben Haj Salah, H. and Tardieu, F. (1997) *Plant Physiol.* **114**, 893-900.
2. Ben Haj Salah, H. and Tardieu, F. (1995) *Plant Physiol.* **109**, 861-870.
3. Borel, Ch. *et al.* (1997) *Aust J. Plant Physiol.* **24**, 5.
4. Granier, Ch. and Tardieu, F. (1998) *Plant Physiol.* **116**, 991-1001.
5. Muller, B. *et al.* (1998) *Plant Cell and Environment* **21**, 149-158.
6. Tardieu, F. *et al.* (1996) *Plant Cell and Environment* **19**, 75-84.
7. Tardieu, F. and Simonneau, Th. (1998) *J. Exp. Botany* **49**, 419-432.

Cours (2) sur Les stress qui résultent de températures anormales

Séminaire du Prof. Fritz Schöffl

Universität Tübingen, Lehrstuhl für Allgemeine Genetik/RFA

Thème : Heatshock proteins and temperature tolerance of plants

Séminaire du Dr Michel Lebrun

Université Montpellier

Thème : La tolérance des plantes aux métaux lourds

Dans ce cours nous avons parlé du stress que peuvent subir des plantes du fait de leur exposition à des températures anormalement chaudes ou froides. En fait nous avons parlé surtout des travaux du Dr Murata (voir *Plant Physiol.* (1997) **115**, 875-879) qui s'est concentré à comprendre l'effet que peut avoir le froid sur la fluidité des membranes cellulaires végétales et comment certaines plantes peuvent mieux tolérer le froid que d'autres. Avant de s'attaquer aux végétaux, les chercheurs de l'équipe de Murata avaient d'abord étudié des cyanobactéries telles que *Anabaena variabilis* et *Synechocystis sp.* Ils ont pu démontrer que lorsqu'on soumet ces bactéries à un shift de température vers le bas de 10 °C à 15 °C, la croissance de ces bactéries s'arrête pour environ 10 h. Pendant cette période, les acides gras des lipides des membranaires sont désaturés. Quand le niveau de désaturation atteint un niveau suffisant, les bactéries recommencent leur croissance. La différence principale entre ces bactéries et les végétaux est que les acides gras des lipides membranaires végétaux sont déjà fort désaturés au départ. Cependant, quand les plantes tolérantes sont exposées au froid les acides gras sont pratiquement complètement désaturés (surtout 18:2 vers 18:3). L'équipe de Murata au Japon et celle de Heinz en Europe ont pu démontrer que quand le

taux d'acides gras saturés dans les lipides membranaires des chloroplastes était diminué ces plantes devenaient plus résistantes au froid. O. Ishizaki-Nishizawa *et al.* (Nature Biotech. (1996) **14**, 1003-1006) ont démontré qu'une mutation qui inactivait une désaturase cytoplasmique rendait ces plantes plus sensibles au froid. L'hypothèse principale de Murata et ses collaborateurs est que la fluidité des membranes joue un rôle dans la perception de la température ambiante.

SÉMINAIRE (Prof. F. Schöffl)

The heat shock (hs) response is a conserved reaction of cells and organisms to environmental stresses, especially to heat stress. This response is characterized by an immediate change in gene expression, a rapid induction of the synthesis of hs proteins (HSPs) and acquisition of thermotolerance. The central regulator of the hs response is the transcription factor HSF which recognizes and binds in its activated form the hs promoter sequence elements HSE (for review see 1).

From *Arabidopsis thaliana* a number of potential HSF-genes are known. Based on the conservation of sequences and structural elements within the DNA-binding and multimerization domains, HSFs fall in two different sub-groups, A and B. It has been demonstrated for members of subgroup A, AtHSF1 and AtHSF3, that these HSFs are constitutively expressed but remain in an inactive state at normal temperature (1, 2). Derepression of HSF activity was accomplished by either overexpression of HSF3 or HSF1-glucuronidase fusion protein in transgenic *Arabidopsis* plants. In such plants HSE-binding activity and the expression of HSPs are constitutive at temperatures of about 25 °C and above, indicating that the threshold for elicitation of the hs response was lowered significantly. Concomitantly, transgenic plants show an increase in the level of basal thermotolerance by about 2-4 °C. These findings suggest that HSPs and/or constitutive active HSFs are determinants for thermotolerance in plants (1). In contrast, AtHSF4, a member of subgroup B, was not activated for DNA-binding and consequently HSP expression and acquisition of thermotolerance following ectopic over-expression in transgenic *Arabidopsis* (2). This negative result is in accordance with as yet unpublished observations of other groups. Hence HSF-like factors of subgroup B seem to serve other as yet unknown functions during the heat shock response.

The exact mechanism of derepression of HSF-activity of factors belonging to group A is unknown. Models suggest that conformational changes are required and trans-active negative regulators such as for example HSP70 seem to be involved in feed back regulation of HSF activity and consequently the hs response (1). In addition covalent modifications, e.g. phosphorylation have also an effect on HSF activity (3). The involvement of other trans-active regulators of HSF activity is suggested by the influence of Abi3 on developmental expression of HSPs in seeds of *Arabidopsis* (1). The involvement of HSE sequences (4) and the detection of HSE-binding-activity in seed protein extracts indicate the invol-

vement of HSF in developmental expression of *hs* genes. However, the exact identity of the HSE binding factor, the mechanism of activation and control by *Abi3* are unknown.

Références

1. Schöffl F., *et al.* (1998) *Plant Physiol* (in press).
2. Prändl R., *et al.* (1998) *Mol Gen Genet* **258**, 269-278.
3. Reindl A., *et al.* (1997) *Plant Physiol* **115**, 93-100.
4. Prändl R., *et al.* (1996) *Plant Mol Biol* **31**, 157-162.

SÉMINAIRE (Dr M. Lebrun)

Les mécanismes de réponse des plantes à la toxicité métallique sont actuellement mal connus. Toutefois, trois principes de base peuvent être énoncés :

(i) la régulation de l'acquisition racinaire, du transport longue distance entre organes et de la distribution intracellulaire est nécessaire pour contrôler la surcharge métallique (Cohen C.K., 1998) ;

(ii) les nombreuses variations de l'environnement subies par les plantes peuvent conduire à une augmentation des concentrations intracellulaires de métaux. Des systèmes efficaces de stockage et de détoxification de ceux-ci doivent donc être activés dans ces conditions (Zenk M.H., 1996 ; Rea P.A., 1998) ;

(iii) en cas de dépassement des capacités de stockage des ions métalliques sous forme non toxique, la balance redox cellulaire sera déplacée vers un état pro-oxydant. L'activation par les métaux en excès des systèmes de détoxification des formes réduites de l'oxygène participera donc à la protection des plantes quand les contrôles opérant au niveau du transport et du stockage seront débordés (Vansuyt G., 1997 ; del Rio L.A., 1991).

Certains membres de la famille des Brassicaceae (*Thlaspi*, *Cardaminopsis*, *Alyssum*) sont à la fois tolérants et hyperaccumulateurs de métaux (Baker A.J.M., 1989). Ces plantes fournissent des modèles intéressants pour comprendre les mécanismes de réponse permettant la tolérance à des concentrations de métaux toxiques pour la majorité des plantes.

Mécanismes génétiques impliqués dans la résistance des plantes au nickel et au fer

Deux programmes ont été initiés et sont centrés autour des métaux de transition fer et nickel :

1. *recherche systématique de gènes de résistance au nickel par expression hétérologue dans la levure Saccharomyces cerevisiae :*

Une banque d'ADNc préparée à partir d'ARNm de racines de maïs carencés en fer a été utilisée pour isoler des inserts de plante capables de conférer à la

levure la capacité à croître sur un milieu contenant une concentration létale de Ni(II). Un premier criblage a conduit à isoler un ADNc de maïs présentant une identité de séquence protéique de 66 % avec une protéine High Mobility Group de la famille HMG I/Y impliquée dans la réponse à la lumière du phytochrome A3 d'orge (Nieto-Sotelo J., 1994). Cette HMG appartient à la famille des HMG I/Y (Grasser K.D., 1995). L'implication de ces protéines dans les mécanismes de réparation de l'ADN et la structuration de la chromatine chez les mammifères a conduit à faire l'hypothèse d'un lien possible entre leur expression et le contrôle de la génotoxicité du nickel (Wunderlich V., 1997). Parmi les métaux testés, la résistance obtenue est spécifique du nickel et du cobalt.

2. recherche systématique de mutants d'insertions d'ADN-T d'Arabidopsis thaliana présentant un phénotype de résistance au nickel et au fer :

L'accès à 20 000 lignées d'insertion d'ADN-T d'*A.thaliana* écotype WS a permis d'entreprendre un criblage basé, dans un premier temps, sur la sélection de phénotypes résistants aux métaux. Les conditions de criblage sur milieu toxique contenant du nickel ou du fer ont été mises au point. Un premier criblage de 10 000 lignées a permis d'isoler environ 20 lignées présentant un phénotype de résistance au nickel. Ce travail se poursuit par une confirmation des phénotypes observés et le criblage de mutants résistants à des concentrations toxiques de fer.

Références

- Baker, A.J.M. (1989) *Biorecovery* **1**, 81-126.
- Cohen, C.K. *et al.* (1998) *Plant Physiol.* **116**, 1063-1072.
- Cunningham, S.D. and Ow, D.W. (1996) *Plant Physiol.* **110**, 715-719.
- del Rio, L.A. *et al.* (1991) *Free Radic. Res. Commun.* **12-13**, 819-827.
- Grasser, K.D. (1995) *Plant J.* **7**, 185-192.
- Halliwel, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990) *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
- Lee, Y.W. *et al.* (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2547-2557.
- Nieto-Sotelo, J. *et al.* (1994) *Plant Cell* **6**, 287-301.
- Rea, P.A. *et al.* (1998) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 727-760.
- Vansuyt, G. *et al.* (1997) *FEBS Lett.* **410**, 195-200.
- Wunderlich, V. and Bottger (1997) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**, 133-140.
- Zenk, M.H. (1996) *Gene* **179**, 21-30.

Cours (3) sur La Sécheresse**Séminaire du Dr Dorothea Bartels***Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Cologne/RFA**Thème : The experimental study of drought resistance in plants***Séminaire du Dr Jean-Louis Prioul***Université Paris-Sud, Orsay**Thème : L'effet du stress hydrique sur le métabolisme carboné*

La sécheresse est souvent corrélée avec une salinité accrue du sol et une température ambiante élevée. Ce sont les facteurs principaux de l'environnement qui déterminent l'écologie des plantes. Il faut bien admettre que nous savons beaucoup plus des conséquences et même des mécanismes de la tolérance à la sécheresse que des effets d'un excès d'eau.

Plusieurs facteurs qui jouent un rôle dans la résistance à la sécheresse ont été identifiés :

1. Les sucres et acides aminés et autres « molécules solubles compatibles » ;
2. L'acide absisique (ABA) qui joue surtout un rôle de régulateur, par exemple en contrôlant par des mouvements d'ions K^+ l'ouverture des stomates des feuilles ;
3. Les produits des gènes LEA (Lati Embryonic Abundant) ;
4. La production de glycine-bétaine et la bétaine.

En exprimant dans le tabac transgénique le gène TPS₁ de la levure, qui code pour une trehalose 6-phosphate synthase, on obtenait des plantes dont les feuilles, même coupées, restaient fraîches après 24 h de sécheresse. Malheureusement leur taux de croissance était réduit d'environ 50 % (Holström *et al.* (1994) *Plant Journal* **6**, 749-758).

SÉMINAIRE (Dr D. Bartels)

Although desiccation is a normal event in seed maturation, tolerance to desiccation in other vegetative parts of plants is rare, and only a small number of higher plants are able to survive extreme desiccation. The African plant *Craterostigma plantagineum* (Fam. Scrophulariaceae) is a member of the so-called « resurrection plants » and has the unique ability to tolerate complete desiccation and to recover completely within 24 hours of rewatering (Gaff, 1971). Because of its resurrection phenomenon, *Craterostigma* represents an ideal experimental system to study the mechanisms by which a plant can survive desiccation. Desiccation in *Craterostigma* is characterized by massive changes in gene expression, and the accumulation of many specific gene products in leaves and root, related to diverse biosynthetic pathways (Bartels *et al.*, 1990 ; Bockel *et al.*, 1998 ; Ingram and Bartels, 1996). Based on biochemical properties and gene similarity, it has been suggested that some of these gene products contribute to

the protection of cellular structures during dehydration, perhaps in an analogous way to the late embryogenesis abundant (LEA) proteins which accumulated in developing seeds.

The expression of many desiccation-induced genes in *Craterostigma* is also regulated by the plant hormone ABA, suggesting that ABA is a key component of the signal transduction. This is further supported by the fact that *Craterostigma* callus tissue is rendered desiccation tolerant by treatment with exogenous ABA (Chandler *et al.*, 1997). Besides the major changes in protein expression on desiccation, significant alterations are also observed in carbohydrate metabolism during the dehydration-rehydration cycle. The following experimental approaches are being used to analyze the signal transduction from perception of water deficit to altered gene expression.

The following experimental approaches are being used :

Study of the promoters of ABA responsive genes and identification of associated specific DNA-binding proteins (see Nelson *et al.*, 1994 ; Michel *et al.*, 1994).

The isolation of mutants in the signal transduction chain by DNA activation tagging (see Furini *et al.*, 1997).

The identification of proteins interacting with DNA-binding proteins using the yeast two-hybrid system.

From these approaches two putative transcription factors have been isolated : one (HDZIP-1) is structurally closely related to the family of homeodomain leucine zipper gene family and the other (HSF-1) is related to the family of the heat shock transcription factors. (Frank *et al.* in press, Bockel, unpublished). Characteristic for both genes is that they are members of gene families, of which only one gene is responsive to drought and the corresponding transcripts are expressed before putative target genes.

By using a T-DNA tagging strategy, a mutant in the signal transduction pathway of the desiccation response has been isolated (Furini *et al.*, 1997). This approach was based on the fact that callus of *Craterostigma plantagineum* becomes tolerant to desiccation when cultured in the presence of ABA (Chandler *et al.*, 1997). The treatment induces the same set of transcripts which are expressed upon drying in the whole plant. Independently transformed callus lines were generated and screened for any which were capable of surviving severe dehydration in the absence of exogenously applied ABA. One such callus was isolated and analysis of RNA transcripts showed that genes were constitutively expressed in this callus which are usually only induced by ABA treatment or desiccation in non-transformed tissue. This indicates the gene downstream from the ABA-induced pathway had been T-DNA activated. The tagged gene (CDT-1) and corresponding cDNA clones were isolated, and CDT-1 was found to be present in multiple copies in the *Craterostigma* genome. DNA sequence analysis of cDNA and genomic clones revealed some unusual features of the cDT-1 gene, such as

the absence of a plausible open reading frame, and the presence of a stretch of adenosine residues. The mechanism of CDT-1 action is the subject of further research.

Références

- Bartels, D. *et al.* (1990) *Planta* **181**, 27-34.
Bockel, C. *et al.* (1998) *J. Plant Physiol.* **152**, 158-166.
Chandler, J. *et al.* (1997) *Physiol. Plant* **99**, 465-469.
Furini, A. *et al.* (1994) *Plant Cell Reports* **14**, 102-106.
Frank, W. *et al.* (1998) *The Plant Journal*, in press.
Gaff, D. (1971) *Science* **174**, 1033-1034.
Ingram, J. and Bartels, D. (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 377-403.
Nelson, D. *et al.* (1994) *The Plant Journal* **5**, 451-458.

SÉMINAIRE (Dr J.-L. Prioul)

Le caractère plurifactoriel des réponses à la contrainte hydrique rend peu praticable une approche gène par gène. Il faut donc une méthode qui permette de trier parmi les réponses ponctuelles celles qui sont pertinentes au niveau de la plante. C'est ce qu'apporte la génétique des caractères quantitatifs associée à l'utilisation des marqueurs moléculaire du DNA génomique (Prioul *et al.*, 1997). Cette approche qui permet de cartographier des locus à caractère quantitatif (QTL = quantitative trait loci) a été utilisée dans le travail présenté, en utilisant des lignées recombinantes de maïs comme matériel génétique. L'intérêt de la détermination des QTLs est de fournir, à la fois, la localisation des régions chromosomiques impliquées dans la valeur quantitative d'un caractère et pour chaque QTLs sa contribution à l'explication de la variabilité du caractère. Dans le cas présent, les variables choisis portent sur le métabolisme des deux glucides essentiels des plantes : le saccharose et l'amidon (Prioul, 1996). En parallèle, les autres caractères classiques impliqués dans les réponses à la sécheresse ont été mesurés. Une étude cinétique préalable sur les deux génotypes parentaux à l'origine des lignées recombinantes montre que la première manifestation de la contrainte est une augmentation de l'activité invertase qui coïncide avec des deux produits de la réaction d'hydrolyse du saccharose. La baisse de la photosynthèse, due à la fermeture des stomates, se produit un peu après mais ces deux réponses précèdent la perte de turgescence des feuilles de plusieurs jours.

L'ensemble des caractères physiologiques et biochimiques précités ont été ensuite mesurés au stade 4 feuilles adultes sur 120 lignées recombinantes. En moyenne 4-5 QTLs ont été obtenus pour chaque caractère. La première caractéristique de la répartition de tous les QTL sur les 10 chromosomes est d'être non

aléatoire. Ainsi, la position des QTL provenant de différents niveaux d'organisation, plante (matière sèche), organe (photosynthèse, stomates) et cellule (métabolisme glucidique) montre fréquemment des regroupements remarquables sur les chromosomes 1, 5 et 10, en particulier. Ceci suggère que certaines régions du génome jouent un rôle privilégié dans des fonctions importantes au niveau de la plante entière. La deuxième observation porte sur l'effet du déficit hydrique où l'on note que, tout caractère confondu, la position des QTL des plantes sous contrainte est largement disjointe de celle des QTL de plantes témoins. Des régions spécifiques du génome paraissent donc impliquées dans la réponse à la contrainte, ces régions contiennent aussi des QTL à tous les niveaux d'organisation. De plus, le nombre de QTL est plus élevé sous contrainte. L'ensemble de ces faits montre que la contrainte déclenche l'action de nouveau gène qui modifie la façon dont certaines fonctions essentielles sont contrôlées génétiquement.

La dernière question est la nature des gènes qui expliquent l'action des QTL. On adopte alors l'approche dite du « gène candidat » qui consiste à rechercher si au voisinage immédiat d'un QTL se trouvent des gènes dont la fonction est connue pour être reliée au caractère associé au QTL. Dans notre cas, trois co-localisations très pertinentes ont été trouvées entre, respectivement, un gène de Saccharose-P synthase (SPS), d'ADPglucose-pyrophosphorylase (AGP) et d'Invertase vacuolaire (INVv) et les QTL d'activité enzymatique correspondants. Ces co-localisations sont d'autant plus pertinentes que 1) pour la SPS une co-localisation au même locus du chromosome 8 a été obtenue dans une autre série de d'expériences (Causse *et al.*, 1996), 2) pour l'AGP le QTL d'activité foliaire correspond au locus du chromosome 1 de la sous-unité de l'enzyme spécifiquement exprimée dans les feuilles (Prioul *et al.*, 1994), 3) pour l'INVv le locus *ivr2* du chromosome correspond au seul des 6 gènes d'invertase dont l'expression est stimulée par la sécheresse dans les organes végétatifs (Kim *et al.*, 1998). Par ailleurs, le QTL à ce locus explique 17 % de la variabilité totale de l'activité (Pelleschi, 1997 ; Pelleschi *et al.*, 1998). La validation des gènes-candidats obtenus représente maintenant l'étape suivante.

Références

- Causse, M. *et al.* (1996) *Genome* **39**, 418-432.
Jeunemaître, X. *et al.* (1989) *Cell* **71**, 169-189.
Kim, J.Y. *et al.* (1998) (submitted).
Pelleschi, S. (1997) Thesis, Université de Paris-Sud, N° 5075.
Pelleschi, S. *et al.* (1998) *Plant Molecular Biology* (submitted).
Pelleschi, S. *et al.* (1997) *Plant Cell and Environment* **20**, 493-503.
Prioul, J.L. (1996) In : E Zamski, AA Shaffer, Ed. *Photoassimilate distribution in plants and crops*. Marcel Dekker Publisher, New-York, 549-593.
Prioul, J.L. (1994) *Plant Physiology* **104**, 179-187.
Prioul, J.L. *et al.* (1997) *Journal of Experimental Botany* **48**, 151-1163.

Cours (4) sur Le Stress Osmotique et Salin
Séminaire du Dr Pierre Berthomieux

Université Montpellier

Thème : La tolérance au stress salin et osmotique

En Californie et dans plusieurs régions européennes, par exemple l'Espagne, le problème principal de stress abiotique est celui de la condition des sols surtout par suite d'irrigation. Le stress salin va de paire avec le stress hydrique et le stress osmotique, mais on peut quand même observer des effets spécifiques des sels surtout à cause de l'action toxique de certains ions sur l'activité de certains enzymes. C'est surtout l'étude de la levure (J. Varela and W.H. Mayer (1996) *Microbiology* **142**, 721-731) qui nous permet de mieux comprendre les mécanismes qui s'enclenchent pour protéger les plantes du stress salin. Comme la toxicité de NaCl est due à des effets osmotiques et ionaires, on doit choisir des concentrations > 2 mM de NaCl pour ne mesurer que la toxicité ionaire, tandis que, par exemple, le sorbitol à une concentration équimolaire à 40 mM de NaCl nous permet de mesurer seulement un effet osmotique. L'étude du modèle végétale *Arabidopsis* a déjà fourni des mutants résistants, mais également hypersensibles au stress salin et est donc prometteuse.

Parmi les gènes végétaux induits par le stress salin on retrouve 1) les gènes LEA, 2) des gènes codant pour des transporteurs membranaires tels que des ATPases de la membrane plasmique, 3) des gènes régulateurs OR (« osmotic response »), 4) des gènes de photosynthèse (CAM), 5) des gènes généraux dont les produits sont impliqués soit dans la synthèse de certaines protéines soit dans la dégradation d'autres protéines.

Comme la réaction au stress salin est fort complexe, on ne peut pas espérer employer des gènes de tolérance pour obtenir des plantes transgéniques résistantes au stress salin à moins de trouver des gènes régulateurs qui contrôlèrent un grand nombre de gènes structurels. Il se pourrait que des mécanismes qui sont capables de mesurer la turgescence cellulaire soient impliqués dans le mécanisme de résistance, par exemple en changeant l'interaction entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique. Nous avons discuté la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle et parlé des séquences FRE et ABARE. Comme les quantités de protéines OR ne corrôlaient pas toujours avec les quantités des ARN messagers correspondants on devait en conclure qu'une régulation post-transcriptionnelle devait aussi jouer un rôle. Strizhov *et al.* (1997) *The Plant J.* **12**, 557-569 ont démontré dans notre laboratoire à Cologne que *Arabidopsis* contient deux gènes P5CS (Δ^1 pyrroline-5 carboxylate synthase) qui contrôlent l'accumulation de la proline sous stress salin, et que cette accumulation dépend de l'ABA et est réglée par les gènes ABA₁, ABI₁ et HXR₂. Il est probable que ce soit le gène At P₅CS₂ qui est responsable de l'osmoprotection des cellules qui se divisent dans les méristemes.

SÉMINAIRE (Dr P. Berthomieux)

Le stress salin est un stress complexe qui se manifeste simultanément sous trois formes :

— la présence de sel dans le sol diminue la disponibilité en eau pour les plantes : les plantes font face à un stress osmotique, semblable par certains côtés à un stress hydrique ;

— la présence de sel dans le sol perturbe fortement la nutrition minérale des plantes (potassium, nitrate...) ce qui est estimé être la cause majeure de la perte de rendement des cultures en sol salé ;

— le sel envahit les tissus, perturbe et ralentit alors le métabolisme puis conduit à la mort des tissus par « empoisonnement » lorsque la concentration de sel est trop importante.

Ces trois manifestations du stress salin sont indépendantes l'une de l'autre et les plantes ont développé différentes stratégies pour essayer de faire face. Le rôle important de la production de molécules osmoprotectrices a été établi en étudiant des plantes transgéniques surproduisant du mannitol (Tarczynski *et al.*, *Science* 259:508 1993 ; Thomas *et al.*, *Plant Cell Environ* 18:801 1995) et surtout de la glycine bêtaïne (Hayashi *et al.*, *Plant J* 12:133 1997). Des travaux menés chez la levure (Gaxiola *et al.*, *EMBO J* 11:3157 1992) et qui ont trouvé leur écho chez les plantes (Wu *et al.*, *Plant Cell* 8:617 1996) montrent que le maintien d'une nutrition potassique suffisante par la sollicitation de transporteurs de potassium à plus haute affinité que ceux utilisés en conditions normales est déterminant pour la tolérance au sel.

Chez les plantes, très peu de systèmes contrôlant le transport de sodium ont été identifiés. Un antiport sodium proton a été mis en évidence sur le tonoplaste chez les espèces tolérants au sel (Blumwald et Poole, *Plant Physiol* 83:884 1987). Il pourrait contribuer à la tolérance en participant à la détoxification du cytoplasme et en facilitant le stockage du sel dans la vacuole. De la même façon, un système d'échange sodium-potassium a été mis en évidence dont le rôle serait d'éliminer le sodium contenu dans le xylème, et ce afin de protéger les parties aériennes (Lacan et Durand, *Plant Physiol* 110:705 1996). Enfin, quelques données indiquent que le sodium peut franchir les membranes en utilisant des canaux potassiques. Ces données sont insuffisantes pour permettre d'étudier l'effet d'une éventuelle stratégie de modification de l'envahissement des tissus par le sel sur la tolérance. Notre travail a pour objectif d'essayer d'aborder cette question. Son premier objectif est d'identifier des déterminants moléculaires susceptibles d'intervenir dans le contrôle du transport du sodium dans les plantes. Nous avons développé une approche génétique pour identifier des mutants perturbés dans leur transport de sodium.

En triant 6 625 plantes survivantes obtenues par autofécondation de graines mutagénisées à l'EMS, nous avons identifié 4 lignées mutantes suraccumulatrices

de sodium dans leurs feuilles. Une de ces lignées a été caractérisée plus en détail aux niveaux génétique et physiologique. Cette lignée porte une mutation monogénique récessive que nous avons cartographiée au bas du chromosome III. Ce mutant a été nommé *sas1* pour « Sur-Accumulation de Sodium ». *sas1*, qui suraccumule spécifiquement le sodium et son analogue toxique le lithium, est plus sensible au stress salin que le type sauvage. En poursuivant l'étude physiologique, nous avons pu montrer que *sas1* accumulait plus de sodium dans ses parties aériennes mais pas dans ses racines. Nous avons aussi montré que la sève xylémique de *sas1* contenait 5 fois plus de sodium que celle du type sauvage, suggérant ainsi que le flux montant de sodium était perturbé chez *sas1*. Notre priorité est de cloner le locus correspondant à *sas1*.

Cours (5) sur Effets de la lumière : Les mécanismes de perception de la lumière, photopériodicité — floraison précise ou retardée
Séminaire du Professeur Georges Bernier

Université Liège/Belgique

Thème : L'induction florale

SÉMINAIRE

Les gènes codant des protéines à boîte MADS ont été découverts chez les plantes supérieures à l'occasion de recherches sur la morphogenèse des inflorescences et des fleurs (Yanofsky, 1995). Ces gènes sont importants car ils sont responsables, avec d'autres gènes, de l'identité des méristèmes floraux, d'une part, et des organes floraux, d'autre part. En outre, les protéines à boîte MADS sont des facteurs de transcription et les gènes correspondants sont donc impliqués dans des cascades d'activations géniques.

Chez l'espèce photopériodique de jours longs (JLs), *Sinapis alba*, le gène à boîte MADS dont l'expression est activée en premier au sein du méristème caulinaire suite à l'induction florale est le SaMADSA (Menzel *et al.*, 1996). Nous avons montré que, chez des *S. alba*, induits à fleurir par un unique JL, le gène SaMADSA est activé 1,5 jour avant les gènes à boîte MADS responsables de l'identité des méristèmes floraux (Bonhomme *et al.*, soumis). L'activation est initialement localisée aux cellules L3 de la zone centrale du méristème. Chez des plantes maintenues en jours courts (JCs) et donc végétatives, une activation de SaMADSA absolument semblable spatialement et temporellement a lieu suite à une unique application d'une hormone de la famille des cytokinines (CKs) (Bonhomme *et al.*, soumis).

A ce stade, nous nous sommes demandé si l'induction florale par un JL affecte le statut des CKs dans le méristème caulinaire de *S. alba* et, si oui, d'où provient le surplus de CKs détecté. Nos recherches ont montré que les teneurs en CKs du bourgeon apical et de la sève phloémienne circulant des feuilles au bourgeon sont effectivement rapidement accrues suite à l'exposition des plantes à un JL (Bernier

et al., 1993). Une partie au moins de ce surplus de CKs paraît être d'origine racinaire car la teneur en CKs de la sève xylémienne circulant des racines vers les feuilles est également augmentée dès les premières heures de l'induction florale.

La question se pose maintenant de savoir comment les racines peuvent réagir aussi rapidement à l'exposition de la partie aérienne des plantes à un JL. On sait que ce sont les feuilles adultes qui perçoivent le régime photopériodique auquel les plantes sont soumises (Bernier *et al.*, 1981). Nous avons démontré que, dès les quelques premières heures de l'induction par un JL, les feuilles de *S. alba* produisent un signal mobile qui est transporté dans la sève phloémienne jusqu'aux racines (Bernier *et al.*, 1993). Ce signal est un surplus de saccharose. Dans le cas d'une induction par un JL, ce surplus provient de l'extension de la période de lumière qui allonge la durée de la photosynthèse alors que, dans le cas d'une induction sans extension lumineuse, le surplus de saccharose provient de la mobilisation des réserves d'amidon (Bernier *et al.*, 1993). Cette conclusion a été étayée par l'utilisation du mutant *pgm d'A. thaliana*, dépourvu d'amidon, qui fleurit très bien lorsqu'il est induit par un JL mais fleurit très mal lorsqu'il est induit par un JC décalé (Corbesier *et al.*, 1998).

Ainsi, nous avons établi la séquence suivante d'événements :

(1) Induction florale foliaire, (2) Transport d'un surplus de saccharose foliaire vers les racines, (3) Transport d'un surplus de CKs racinaires vers les feuilles, (4) Transport d'un surplus de CKs foliaires vers le bourgeon apical, (5) Activation précoce du gène *SamADSA* au sein de la zone centrale du méristème. L'hypothèse proposée est que cette séquence constitue une partie du processus d'évocation (ou détermination) florale du méristème. Il est essentiel maintenant de définir la fonction de *SamADSA*.

Références

- Bernier G. *et al.* (1981) *The Physiology of Flowering*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Bernier, G. *et al.* (1993) *Plant Cell* **5**, 1147-1155.
- Corbesier, L. (1998) *Planta* (sous presse).
- Menzel, G. (1996) *Plant J.* **9**, 399-408.
- Yanofsky, M.F. (1995) *Ann. Rev. Plnt Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 167-188.

Cours (6) sur Le stress oxydatif (Ozone, H₂O₂, ROS, Catalase-Peroxdase, SOD**Séminaire du Dr Dirk Inzé***Université Gand/Belgique**Thème : Is H₂O₂ a secondary messenger for the induction of stress defence genes ?***Séminaire du Dr Jean-François Briat***INRA-ENSA-CNRS Montpellier**Thème : Nutrition ferrique et stress oxydatif***SÉMINAIRE (Dr D. Inzé)**

The damage caused to plants by exposure to environmental stress conditions is partially due to the inability to control excess production of active oxygen species (AOS) (Inzé and Van Montagu, 1995). AOS, such as superoxide, hydrogen peroxide (H₂O₂), the hydroxyl radical and lipid peroxides are highly reactive and destroy proteins, membranes and DNA, leading to cellular deterioration and eventually cell death. AOS also have beneficial function in plants. They are used in biosynthetic processes and recent evidence also suggests a role as molecular signals for the induction of stress-defence enzymes. Furthermore, a massive production of AOS (oxidative burst) during incompatible plant-pathogen interactions is thought to be crucial for restricting the spread of pathogens in the host. The defence mechanisms of plants against AOS are highly complex and consist of both enzymatic and non-enzymatic components. Superoxide is removed by superoxide dismutases, which are nuclear-encoded enzymes located mainly in the chloroplasts, mitochondria and cytosol (Bowler *et al.*, 1989 ; Van Camp *et al.*, 1990 ; Tsang *et al.*, 1991 ; Bowler *et al.*, 1992). H₂O₂ removal is accomplished by catalases and by peroxidases. Catalases are present as a gene family in plants and at least one of these isoforms is essential for normal development and for stress protection (Willekens *et al.*, 1994 ; Willekens *et al.*, 1995 ; Chamnongpol *et al.*, 1996 ; Willekens *et al.*, 1997). Peroxidases involved in antioxidant defence include primarily ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase. Activity of these peroxidases depends on the availability of ascorbate and glutathione. Understanding how ascorbate and glutathione biosynthesis and antioxidant gene expression are regulated will give important clues about regulatory proteins that control the antioxidant defence at the level of transcription, translation, and post-translation. In this context, promoters of superoxide dismutase (Hérouart *et al.*, 1993, 1994 ; Van Camp *et al.*, 1996) and ascorbate peroxidase genes as well as cDNAs encoding enzymes involved in ascorbate (Østergaard *et al.*, 1997) and glutathione biosynthesis have been isolated. Furthermore, evidence was obtained that glutathione biosynthesis is regulated by post-translational control of one of the biosynthetic enzymes (May *et al.*, submitted).

Previous work has shown that overproduction of single antioxidant enzymes has protective effects against oxidative stress induced by xenobiotics or ozone

(Bowler *et al.*, 1991 ; Van Camp *et al.*, 1994 ; Slooten *et al.*, 1995 ; Van Camp *et al.*, 1996). Nevertheless, better protection may be obtained when signal transduction pathways controlling multiple genes are manipulated, rather than individual defence components. To this aim, a substantial investment in basic research is required in order to identify the early signals that control defence responses. Over the past years, it has become clear that plant-borne signals such as ethylene, ABA, salicylate and jasmonate regulate many stress responses. Yet, the molecular events that are involved in sensing environmental stress and that lead to the synthesis of these plant-borne signals remain elusive. One of the mechanisms by which plants may sense environmental stress is through AOS formation and subsequent modification of the cellular redox state. AOS can react with cellular components and as such may directly influence signalling. In addition, AOS signals may be transduced through interaction with antioxidants. In accord with these models, it was found that salicylic acid and ethylene pathways for PR protein expression are activated by H₂O₂ (Chamnonpol *et al.*, submitted), while glutathione was shown to participate in the regulation of cell division in the root apical meristem (Sánchez-Fernández *et al.*, 1997).

References

- Babiychuk, E. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26224-26231.
- Bowler, C. *et al.* (1989) *EMBO J.* **8**, 31-38.
- Bowler, C. *et al.* (1991) *EMBO J.* **10**, 1723-1732.
- Bowler, C. *et al.* (1992) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 83-116.
- Chamnonpol, S. *et al.* (1996) *Plant J.* **10**, 491-503.
- Hérouart, D. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3108-3112.
- Hérouart, D. *et al.* (1994) *Plant Physiol.* **104**, 873-880.
- Inzé, D., and Van Montagu, M. (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 153-158.
- Kushnir, S. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10580-10584.
- Lepiniec, L. *et al.* (1995) *FEBS Lett.* **364**, 103-108.
- May, M.J. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.*, submitted.
- Østergaard, J. *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30009-30016.
- Sánchez-Fernández, R. *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2745-2750.
- Slooten, L. *et al.* (1995) *Plant Physiol.* **107**, 737-750.
- Tsang, E.W.T. *et al.* (1991) *Plant Cell* **3**, 783-792.
- Van Camp, W. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9903-9907.
- Van Camp, W. *et al.* (1994) *Bio/technology* **12**, 165-168.
- Van Camp, W. *et al.* (1996) *Plant Physiol.* **112**, 1703-1714.
- Van Camp, W. *et al.* (1996) *Plant Physiol.* **112**, 525-535.

- Willekens, H. *et al.* (1994) *Plant Physiol.* **106**, 1007-1014.
Willekens, H. *et al.* (1995) *Mol. Breeding* **1**, 207-228.
Willekens, H. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10450-10454.
Willekens, H. *et al.* (1997) *EMBO J.* **16**, 4806-4816

SÉMINAIRE (Dr J.-F. Briat)

L'intégration du métabolisme du fer et de l'oxygène, au niveau de la régulation de l'expression génétique, a reçu récemment une attention croissante (1, 2). Cependant, peu de choses sont actuellement connues sur la manière dont le génome des plantes perçoit les dommages oxydatifs et y répond. Pour comprendre ces mécanismes il est nécessaire d'identifier des gènes dont l'expression est activée à la fois par un excès de fer et par un traitement pro-oxydant.

Deux gènes de ferritines de maïs (*ZmFer1* et *ZmFer2*) ont été clonés et séquencés (3). Le gène *ZmFer1* a été cartographié à un seul locus sur le chromosome 4 alors qu'au moins deux loci, non cartographiés précisément, portent des gènes de la sous-classe *ZmFer2*. La détermination du point d'initiation de la transcription de ces deux gènes a permis de comparer leur région promotrice respective et de constater leur divergence, suggérant un contrôle différent de leur expression. L'utilisation de sondes spécifiques a confirmé ce point expérimentalement. Les transcrits des gènes *ZmFer1* et *ZmFer2* s'accumulent tous les deux en réponse à un traitement des plantes par du fer en excès, mais avec des cinétiques différentes. De plus seul l'ARNm *ZmFer2* s'accumule en réponse à un traitement par de l'acide abscissique (ABA) exogène, ou à un stress hydrique. La synthèse des ferritines de maïs en réponse au fer résulte donc d'une induction rapide, indépendante de l'ABA, du gène *ZmFer1*, et d'une induction moins spécifique, de stress, impliquant l'ABA pour activer l'expression des gènes *ZmFer2* (3, 4). L'induction par le fer du gène *Zmfer1* est indépendante de l'ABA et l'accumulation des transcrits correspondants est inhibée par des agents anti-oxydants comme le glutathion et la N-acétyl cystéine ; le gène *Zmfer1* est par ailleurs activé par un traitement avec du peroxyde d'hydrogène (5, 6). Ces résultats établissent un lien entre le métabolisme du fer et de l'oxygène chez les plantes. Une étude de la régulation de l'expression du gène *ZmFer1* a permis de définir une région de 15 paires de base dans le promoteur *ZmFer1* réprimant la transcription de ce gène dans des conditions de non-excès de fer. Le rôle de cette séquence dans la réponse du gène *ZmFer1* au peroxyde d'hydrogène reste à démontrer. Par ailleurs, l'activité du promoteur *ZmFer1* est régulée par des événements de phosphorylation / déphosphorylation puisque l'expression d'une fusion promoteur *ZmFer1*-GUS en présence d'un excès de fer est inhibée par des traitements avec l'acide okadaïque ou la calyculine A, deux inhibiteurs de sérine / thréonine phosphatase (6).

Le métabolisme de l'ascorbate et du fer sont liés (7), et l'accumulation excessive de fer dans les feuilles du mutant de tomate *chloronerva* a été corrélée avec

l'accumulation d'une ascorbate peroxydase (8), une enzyme impliquée dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène. En utilisant un système de cotylédons de colza et une sonde d'ascorbate peroxydase (apx) cytosolique nous avons observé une accumulation rapide et abondante d'ARNm apx, avec une cinétique et une dépendance de dose vis-à-vis du fer très similaires aux résultats établis pour l'expression des ferritines. Cette accumulation est également observée avec des cinétiques différentes en réponse à certains traitements pro-oxydants (paraquat et aminotriazole) mais pas avec l'apport de peroxyde d'hydrogène. Par ailleurs, cette activation des gènes d'apx par le fer est indépendante de l'ABA (9). Les séquences de 5' ADNc d'apx d'*Arabidopsis* étant disponibles, l'utilisation de sondes spécifiques a permis de démontrer que le gène *apx1* codant une ascorbate peroxydase cytosolique était régulé par le fer dans des cotylédons ou dans des cultures de cellules d'*Arabidopsis*. De façon tout à fait intéressante, une séquence identique à celle nécessaire au contrôle par le fer de l'expression du gène *ZmFer1* de ferritine de maïs se trouve dans le promoteur du gène *apx1* d'*Arabidopsis*. Par ailleurs, le gène *AtFer1* codant une ferritine d'*Arabidopsis*, a été cloné. Il est vraisemblablement régulé comme *ZmFer1* (10), et contient également cette séquence régulatrice.

Références

1. Hentze, M.W. and Kühn, L.C. (1996) Proc Natl Acad Sci USA **93**, 8175-8182.
2. Rouault, T.A. and Klausner, R.D. (1996) Trends Biochem. Sci **21**, 174-177.
3. Fobis-Loisy, I. *et al.* (1995) Eur J Biochem. **231**, 609-619.
4. Lobréaux, S. *et al.* (1993) EMBO J **12**, 651-657.
5. Lobréaux, S. *et al.* (1995) Plant J **8**, 443-449.
6. Savino, G. *et al.* (1997) J. Biol. Chem. **272**, 33319-33326.
7. Laulhère, J.P. and Briat, J.F. (1993) Biochem J **290**, 693-699.
8. Herbick, A. *et al.* (1996) Plant Physiol **111**, 533-540.
9. Vansuyt, G. *et al.* (1997) FEBS Lett. **410**, 195-200
10. Gaymard, F. *et al.* (1996) Biochem J **318**, 67-73.

Cours dans le cadre de la chaire Ernst Curtius

Cours (7) sur Le rôle des stéroïdes végétales

Séminaire du Dr Bernd Reiss

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Cologne

Thème : Gene targeting and homologous recombination in plants

Lors de la première leçon nous avons parlé du rôle joué par les stéroïdes des plantes, surtout de nos travaux sur le mutant d'*Arabidopsis cpd* publiés en partie dans Cell (Szekeres *et al.* (1996) **85**, 171-185). Ce mutant a une insertion unique

de T-DNA dans un gène qui code pour une hydroxylase de stéroïdes du type cytochrome P450 (*cyp90*). Nous avons pu démontrer que des précurseurs de stéroïdes végétales (brassinoides) portant un groupe OH sur l'atome C23 étaient capables de restaurer le phénotype du mutant *cpd* et que le gène ou son produit était contrôlé négativement par des brassinoides (Mathur *et al.* (1998) *Plant J.* **14**, 593-602).

SÉMINAIRE

Gene targeting has proved to be extremely useful in the analysis of gene function in higher mammals, enabling the replacement of a given gene by an *in vitro* manipulated copy. In plants, however, gene targeting has turned out to be extremely inefficient.

Gene targeting relies heavily on homologous recombination. Therefore, the low gene targeting frequencies observed in plants may reflect the fact that the enzymatic machinery promoting homologous recombination is not sufficiently expressed at the time of transformation and thus DNA integration occurs by illegitimate recombination. Therefore, shifting the ratio of random integrations toward homologous recombination or gene conversion events would constitute an important step towards development of gene targeting in plants. Recombination pathways in *E. coli* are well characterised. The RecA protein promotes the key step in homologous recombination, search for homology, recognition of sequence identity and physical exchange of homologous DNA strands. Recently it became apparent that there are eukaryotic proteins which are structural and functional homologues of RecA.

In order to analyse whether or not RecA expression can stimulate homologous recombination in plants, *recA* transgenic plants were generated. To prevent exclusion from the eukaryotic nucleus, a nuclear localisation signal was fused to RecA to yield nt-RecA. Fusion of RecA to a nuclear localisation signal leads to efficient accumulation in the nucleus while authentic RecA equilibrated freely in the plant cell. Both, RecA and nt-RecA were shown to be functional in recombination in plant cells by two independent assays. Resistance to mitomycin C reflects the cell's capacity for homologous recombination. Cells from *nt-recA* transgenic plants had 3 times the repair capacity of wild type cells in this assay. The contribution of RecA to cell survival was considerably lower. Intrachromosomal recombination is a more direct assay for homologous recombination. Homologous recombination at an artificial repeat consisting of two non-functional *npt II* genes sharing sequence homology in such a way that a functional *npt II* gene would be generated was stimulated 5 and 10 times, respectively, by RecA and nt-RecA.

The results shown above demonstrate that the prokaryotic recombination protein RecA is capable to interact, directly or indirectly, with the plant homologous recombination machinery. Overexpression of this single protein stimulates ho-

mologous recombination in plants. We are planning to use this feature to improve the frequencies of gene targeting in plants. Gene targeting experiments with various artificial and natural target genes are in progress.

Cours (8) sur Le gène *PRL1*

Séminaire du Dr Klaus Salchert

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Cologne

*Thème : The T-DNA mutant *PRL1**

Lors de cette leçon nous avons parlé du rôle régulateur du gène *PRL1* dans l'expression génétique et de l'effet de la lumière, du métabolisme du carbone et de la phytohormone cytokinine sur l'activité de ce gène.

SÉMINAIRE

The T-DNA mutant *prl1* (pleiotropic regulatory locus) displays a complex phenotype, including inhibition of root growth in the light and dark and inhibition of hypocotyl elongation in the dark. The *prl1* mutation results in hypersensitivity to glucose and sucrose, as well as in transcriptional derepression of genes that are regulated by glucose and/or cytokinin.

Analysis of the protein sequence deduced from the cDNA indicated that PRL1 is a 54 kDa protein carrying 7 C-terminal β -transducin repeats characteristic for regulatory WD-40 repeat proteins in eukaryotes (2).

The PRL1 protein was localized in the nucleus of wild type seedlings by immunolocalisation, whereas in the *prl1* mutant no protein was detectable by immunological methods, showing that *prl1* is a null mutant.

PRL1 specifically interacts both in the yeast two hybrid system and in vitro binding experiments with a novel a-importin, ATHKAP2. a-importins are part of a bigger complex responsible for the import of proteins into the nucleus (3). Although PRL1 is found in the nucleus, direct evidence showing that ATHKAP2 is transporting PRL1 into the nucleus is missing so far.

In addition, two PRL1 partners may directly be involved in controlling auxin sensitivity of the *prl1* mutant. PIP-I (PRL1 interacting protein I) is a homologue of bacterial and eukaryotic amidases, including the Agrobacterium T-DNA encoded IaaH indolacetamidase (9). In Agrobacterium this amidase catalyzes the conversion of inactive IAM (indolacedamid) into active auxin IAA (indolaceta-mid) in the tryptophan dependent auxin biosynthetic pathway. Surprisingly, a similar auxin biosynthetic pathway does not appear to be used by plants. Nevertheless, it was demonstrated in plants that radioactively labeled tryptophan is converted into labeled IAA (10). The second PRL1 partner in this pathway is PIP-L (PRL1 interacting protein L) which shows homology to bacterial proteins that are known to be regulators amidases homologous to PIP-I (11).

The best characterized interaction of PRL1 is its binding to the Arabidopsis homologs (AKIN10 and AKIN11) of the yeast SNF1 protein kinase (12). In yeast, the SNF1 kinase plays a key role in the derepression of glucose repressible genes (13). Both Arabidopsis kinases AKIN10 and AKIN11 are able to phosphorylate a specific substrate (the SAMS peptide) which is also phosphorylated by the yeast SNF1 kinase (14). PRL1 inhibits the phosphorylation of SAMS peptide by AKIN10 and AKIN11 in vitro. As SNF1p in yeast, the activity of AKIN10 and AKIN11 is negatively regulated by glucose in dark-grown Arabidopsis seedlings. In contrast, glucose increases the activity of SNF1-like kinases in light grown Arabidopsis seedlings, indicating a connection with light signaling. In light grown prl1 mutant seedlings, the activity of AKIN10 and AKIN11 is increased, which together with the in vitro data, shows that PRL1 is a light- and glucose-dependent negative regulator of AKIN10 and AKIN11.

In summary, our data show that PRL1 is a regulatory protein which is coordinating several light-, glucose- and hormone-regulated biosynthetic and signal transduction pathways in Arabidopsis.

Références

1. Nemeth *et al.* (1998) submitted.
2. Neer *et al.* (1994) Nature **371**, 297-300.
3. Percipalle *et al.* (1997) J. Mol. Biol. **266**, 722-732.
4. Lin *et al.* (1996) J. Biol. Chem. **271** (25), 15034-15044.
5. Aletta, J. (1998) TIBS **23**, 89-91.
6. Johnson *et al.* (1995) J. Bio. Chem. **270** (29), 17442-17456.
7. Lim *et al.* (1996) Plan. Mol. Biol. **30**, 373-379.
8. Burgess *et al.* (1991) Cell Regul. **2**, 87-93.
9. Schroder *et al.* (1984) Eur. J. Biochem. **138**, 3387-3391.
10. Bialek *et al.* (1992) Plant Physiol. **100**, 509-517.
11. Kobayashi *et al.* (1993) Eur. J. Biochem. **217** (1), 327-336.
12. Bhalerao *et al.* (1998) submitted.
13. Ronne, H. (1995) TIGS **11** (1),12-17.
14. Dale *et al.* (1995) FEBS Lett. **361**,1165-1171.

Cours (9) sur Les méthodes d'analyse de la fonction des gènes chez les plantes

Séminaire du Dr Leo Gälweiler

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Cologne

Thème : Polar Auxin Transport : Isolation and characterization of the genes PIN1 and PIN2

A l'occasion de cette troisième leçon à Bonn nous avons passé en revue les différentes méthodes, développées dans notre Institut, qui devraient permettre de

définir la fonction d'un gène donné (« functional genomics »). Nous avons passé en revue le criblage de gènes par :

1. insertion de transposons ;
2. recombinaison homologue (« gene targeting ») ;
3. insertion de T-DNA spécialement construit pour produire soit une activation soit une inactivation d'un gène donné (« gain or loss of function tagging »).

SÉMINAIRE

The intriguing phenotype of *Arabidopsis thaliana pin1* mutants (*Atpin1*) has been known since 1959 (1). These mutants develop naked, pin-shaped inflorescences and show phenotypic alterations concerning number, size, shape and position of lateral organs (2,3,4,5).

Okada *et al.* (1991) found that chemical inhibition of polar auxin transport in wild type *Arabidopsis thaliana* mimicked the *Atpin1* phenotype (3). Moreover, auxin transport assays using stem segments of *pin-formed* mutants demonstrated a drastic loss of auxin transport capacity, suggesting that an essential component for auxin transport was affected by the *pin-formed* mutation.

We identified 3 allelic transposon insertional *Atpin1* mutants (*Atpin1::En111*, *Atpin1::En134*, *Atpin1::En349*) generated by the activity of the maize transposon *En-1* in the heterologous host *Arabidopsis thaliana* (5). Southern blot analysis with the progeny of a heterozygous *Atpin1::En134* mutant plant identified the *En-1* transposon insertion responsible for the disruption of the *AtPIN1* gene. Genomic DNA from homozygous *Atpin1::En134* mutants was used to isolate transposon flanking DNA from the tagged locus. The resulting PCR fragment served as a probe to isolate homologous clones from wild type *Arabidopsis* genomic and cDNA libraries. DNA sequence analysis of the *Atpin1::En111*, *Atpin1::En134*, *Atpin1::En349* alleles demonstrated that in each case the *En-1* element inserted into the first exon of the *AtPIN1* gene, consisting in total of 5 exons. Northern blot expression analysis showed the absence of *AtPIN1* transcripts in *Atpin1* mutants including the *pin-formed* mutant indicating null mutation phenotypes. Thus, data from genetic analysis, physical mapping and gene expression studies provided conclusive evidence that the cloned *AtPIN1* gene corresponded to the *PIN-FORMED* locus (4, 5).

AtPIN1 cDNA sequence analysis revealed a full-size open reading frame coding an AtPIN1 protein of 622 amino acids. Hydropathy analysis and application of structure predicting algorithms indicated that the AtPIN1 protein consisted of 8 to 12 transmembrane segments interrupted by a predominantly hydrophilic, central region. Since similar topologies have been described for various of pro- and eukaryotic transport proteins (6, 7, 8), it was reasonable to assume that AtPIN1 may fulfill a transmembrane transport function. To immunolocalize the protein, we raised polyclonal antibodies against a truncated version of a recombinant

AtPIN1 protein. Western blot analysis using the affinity purified anti-AtPIN1 antibodies localized specific signals in *Arabidopsis* microsomes matching the predicted molecular mass of 67 kDa for AtPIN1. In transverse sections of *Arabidopsis* inflorescence axes parenchymatous xylem and cambial cells were specifically labeled by anti-AtPIN1 antibodies. In longitudinal sections from the *Arabidopsis* inflorescence axes AtPIN1 specific signals were observed at the basal side of parenchymatous xylem.

Histological *Atpin1::En134* mutant analysis revealed a massive increase of vascular tissue at positions, just below where young, auxin synthesizing leaves were connected to the axial vascular system. This observation supports the view that poor basipetal transport in *Atpin1* mutants caused stowage of auxin coming from the leaves leading to an activation of xylem proliferation (9, 10). Chemical inhibition of polar auxin transport in wild type plants, grown in the presence of 1-Naphthylthalamic acid (NPA), an inhibitor of cellular auxin efflux (11), caused very similar alterations in radial vascular pattern formation indicating that the genetic defect in *Atpin1* mutants correlates with a defect of cellular auxin efflux.

The proposed membrane protein topology for AtPIN1, its localization at the basal end of auxin transport competent cells (9, 12, 13), the drastic reduction of polar auxin transport and the altered vascular pattern formation in the *Atpin1* mutants suggested that AtPIN1 either represents an auxin efflux carrier or an important co-localized regulator of this carrier.

Based on sequence homology to AtPIN1, the AtPIN2 gene of *Arabidopsis thaliana* mapping to chromosome 5 (115.3 cM) was cloned. Northern blot analysis and *in situ* hybridization demonstrated AtPIN2 expression in root tips. AtPIN2 specific immunostaining was observed in cortical and epidermal root cells covering a region from the meristematic to the elongation zone. Furthermore the AtPIN2 signals were polarly localized to the basal side of epidermal cells.

For functional analysis the insertional mutant *Atpin2::En701* was identified in a transposon mutagenized *Arabidopsis* population (14). The AtPIN2 disruption by *En-1* insertion into the second exon caused agravitropic root growth and an increase in auxin sensitive root elongation. Due to the AtPIN2 immunolocalization pattern and homology to AtPIN1 the *Atpin2::En701* mutant phenotype can be explained by the loss of auxin redistribution and basipetal auxin transport in epidermal and cortical cells which is controlling the gravitropic growth of roots (15, 16).

Références

1. Goto, N. *et al.* (1987) *Arabidopsis Inf. Serv.* **23**, 66-71.
2. Goto, N. *et al.* (1987) *Jap. J. Genet.* **66**, 551-567.
3. Okada, K. *et al.* (1991) *Plant Cell* **3**, 677-684.
4. Bennett, S.R.M. *et al.* (1995) *Plant J.* **8**, 505-520.

5. Gälweiler, L., Changhui, G., Müller, A., Wisman, E. & Palme, K. (1998) submitted.
6. Singer, S. J. (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 247-296.
7. Marger, M.D. & Saier, Jr, M.H. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 13-20.
8. Logan, H. *et al.* (1997) *Physiol. Plant.* **100**, 1-15.
9. Lomax, T.L. *et al.* (1995) In : *Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology* (Davies, P.J., ed.). Martinus Nijhoff Publishers, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, 509-530.
10. Sachs, T. (1981) *Adv. Bot. Res.* **9**, 151-262.
11. Rubery, P.H. (1990) *Symp. Soc. Exp. Biol.* **44**, 119-146.
12. Morris, D.A. & Thomas, A.G (1978) *J. Exp. Bot.* **29**, 147-157.
13. Jacobs, M. & Gilbert, S.F. (1983) *Science* **220**, 1297-1300.
14. Wisman, E. *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* in press.
15. Evans, M.L. (1991) *Plant Physiol.* **95**, 1-5.
16. Estelle, M. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1589-1591.

LISTE DES PUBLICATIONS

1997 — 1998

GADELLA Jr, T.W.J., VEREB Jr, G., HADRI, A.-E., RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., JOHN, M., SCHELL, J., and BISSELING, T. : Microspectroscopic imaging of nodulation factor-binding sites on living *Vicia sativa* roots using a novel bioactive fluorescent nodulation factor. *Biophys. J.* **72**, 1986-1996 (1997).

JACH, G., PINSORF, E., and SCHELL, J. : Direct isolation of poly A⁺ RNA from transgenic tobacco leaves with Oligotex. *Qiagen News* **1**, 20-21 (1997).

JOHN, M., RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., WALDEN, R., and SCHELL, J. : Cell signalling by oligosaccharides. *Trends Plant Sci.* **2**, 111-115 (1997).

KENDALL, H.W., BEACHY, R., EISNER, T., GOULD, F., HERDT, R., RAVEN, P.H., SCHELL, J.S., and SWAMINATHAN, M.S. (Eds.) : « *Bioengineering of Crops* » Report of the World Bank Panel on Transgenic Crops. Environmentally and Socially Sustainable Development Studies and Monographs Series 23, Worldbank, Washington (1997).

MAAS, C., SIMPSON, C.G., ECKES, P., SCHICKLER, H., BROWN, J.W.S., REISS, B., SALCHERT, K., CHET, I., SCHELL, J., and REICHEL, C. : Expression of intron modified *NPT II* genes in monocotyledonous and dicotyledonous plant cells. *Molecular Breeding* **3**, 15-28 (1997).

MOORE, I., DIEFENTHAL, T., ZARSKY, V., SCHELL, J., and PALME, K. : A homolog of the mammalian GTPase Rab2 is present in *Arabidopsis* and is expressed

predominantly in pollen grains and seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 762-767 (1997).

REINDL, A., SCHÖFFL, F., SCHELL, J., KONCZ, C., and BAKO, L. : Phosphorylation by a cyclin-dependent kinase modulates DNA binding of the Arabidopsis heat-shock transcription factor HSF1 in vitro. *Plant Physiol.* 115, 93-100 (1997).

REISS, B., KOSAK, H., KLEMM, M., and SCHELL, J. : Targeting of a functional *Escherichia coli* RecA protein in the nucleus of plant cells. *Mol. Gen. Genet.* 253, 695-702 (1997).

RÖHRIG, H., SCHMIDT, J., WIENEKE, U., WALDEN, R., SCHELL, J., and JOHN, M. : *N*-Acyl galactosamine inhibition of lipo-chitooligosaccharide action. In : « *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture* » (NATO ASI Series, Vol. G 39), A. Legocki, H. Bothe, A. Pühler (Eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 59-62 (1997).

SCHELL, J. : Cotton carrying the recombinant insect poison Bt toxin : no case to doubt the benefits of plant biotechnology. (Commentary) *Current Opinion Biotech.* 8, 235-236 (1997).

SCHELL, J. : How might biotechnology contribute to the improvement of the environment ? In : « *How Can Biotechnology Benefit the Environment ?* » Report of A European Federation of Biotechnology (EFB) Task Group on Public Perceptions of Biotechnology and The Green Alliance (Workshop, 13.01.97, National Museum, London), p. 12 (1997).

SCHELL, J. : Plant biotechnology and its future impact on science, agriculture and the environment. In : « *Biotechnology, Patents and Morality* », S. Sterckx (Ed.), Ashgate Publishing Ltd., Aldershot/UK., pp. 66-71 (1997).

SCHELL, J. : Biotechnik in der Pflanzenzucht. *EUMagazin* 11, 15-19 (1997).

SCHELL, J. : Les biotechnologies végétales contribueront à rendre l'agriculture intensive à la fois productive et plus respectueuse de l'environnement. *Biofutur Spécial* 172, 62-63 (1997).

SCHELL, J. : Umsetzungsdefizite zwischen Wissenschaft und Praxis. (Tagungsbericht VDL-Forum 1997 « Biotechnologie-Standort Deutschland — Bis zum Jahr 2000 die Nr. 1 in Europa ? ») *VDL-Journal* 10, 10 (1997).

SCHULTE, W., TÖPFER, R., STRACKE, R., SCHELL, J., and MARTINI, N. : Multi-functional acetyl-CoA carboxylase from *Brassica napus* is encoded by a multi-gene family : indication for plastidic localization of at least one isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3465-3470 (1997).

SLABAUGH, M.B., HUESTIS, G.M., LEONARD, J., HOLLOWAY, J.L., ROSATO, C., HONGTRAKUL, V., MARTINI, N., TOEPFER, R., VOETZ, M., SCHELL, J., and KNAPP, S.J. : Sequence-based genetic markers for genes and gene families : single-strand conformational polymorphisms for the fatty acid synthesis genes of *Cuphea*. *Theor. Appl. Genet.* 94, 400-408 (1997).

STRIZHOV, N., ABRAHAM, E., ÖKRESZ, L., BLICKLING, S., ZILBERSTEIN, A., SCHELL, J., KONCZ, C., and SZABADOS, L. : Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABAI*, *ABII* and *AXR2* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 12, 557-569 (1997).

WALDEN, R., REISS, B., KONCZ, C., and SCHELL, J. : The impact of Ti-plasmid-derived gene vectors on the study of the mechanism of action of phytohormones. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 45-66 (1997).

FIRST, N.L., SCHELL, J., and VASIL, I.K. : Prospects and Limitations of Agricultural Biotechnologies : An Update. In : « *Agricultural Biotechnology* », A. Altman (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 743-748 (1998).

MATHUR, J., MOLNAR, G., FUJIOKA, S., TAKATSUTO, S., SAKURAI, A., YOKOTA, T., ADAM, G., VOIGT, B., NAGY, F., MAAS, C., SCHELL, J., KONCZ, C., and SZEKERES, M. : Transcription of the *Arabidopsis CPD* gene, encoding a steroidogenic cytochrome P450, is negatively controlled by brassinosteroids. *Plant J.* 14, 593-602 (1998).

MATHUR, J., SZABADOS, L., SCHAEFER, S., GRUNENBERG, B., LOSSOW, A., JONAS-STRAUBE, E., SCHELL, J., KONCZ, C., and KONCZ-KALMAN, Z. : Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension. *Plant J.* 13, 707-716 (1998).

MOORE, I., GÄLWEILER, L., GROSSKOPF, D., SCHELL, J., and PALME, K. : A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 376-381 (1998).

UMEDA, M., BHALERAO, R.P., SCHELL, J., UCHIMIYA, H., and KONCZ, C. : A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5021-5026 (1998).

CONGRÈS

20-26/7/1997 : 11th International Congress on Nitrogen Fixation. Paris (France).

17-19/8/1997 : 8th European Congress on Biotechnology. « New and revisited hormones in plants ». Budapest (Hungary).

11-12/9/1997 : Perspectives in Plant Molecular Biology. Symposium on the occasion of superannuation (25th anniversary) of Prof. A. van Kammen. « Gene-tagging and plant-hormone action ». Wageningen (The Netherlands).

17-19/9/1997 : Annual Meeting of the Austrian Biochemical Society and the Austrian Society for Gene Technology and Genetics. « The use of gene technology to find and study new growth regulating chemical signals in plants ». Vienna (Austria).

20-28/9/1997 : Religion, Science & the Environment — Symposium II : The Black Sea in Crisis. « Plant molecular biology is essential if one wants to develop

an agriculture which is both productive (economically viable) and sustainable from the point of view of the environment ». Black Sea (sailing).

20/10/1997 : Lecture in the auditorium of the House of the « New German Länder », organized by the MPG. « No future for European agricultural policy without plant biotechnology ? ». Brussels (Belgium).

17/11/1997 : Journées Scientifiques Bio Avenir 1997. Rhône-Poulenc S.A. « Pourquoi les biotechnologies végétales ? ». Paris (France).

21/11/1997 : VDL-Forum « Biotechnologie-Standort Deutschland — Bis zum Jahr 2000 die Nr. 1 in Europa ? ». « Umsetzungsdefizit zwischen Wissenschaft und Praxis — Ein deutsches Problem ? ». Wissenschaftszentrum, Bonn (Germany).

12-14/12/1997 : International Symposium « Phytohormones and Signal Transduction ». Halle (Germany).

19/1/1998 : Internationale Grüne Woche Berlin 1998, Forum Biotechnologie. « “ The future of phytohormone research ”. » Grundsatzreferat zur Biotechnologie in Deutschland aus der Sicht der Forschung ». Berlin (Germany).

29/1-3/2/1998 : W.I.S. World Economic Forum, Second World Summit : Science Economy Society. Session « Genetics explosion : where are our genes taking us ? ». Davos (Switzerland).

11-13/5/1998 : Science at the Turn of the Century — 20 Years of Wolf Prizes. « Fundamental knowledge can ensure the long-term success of plant biotechnology ». Jerusalem (Israel).

18-19/5/1998 : The 7th Otto Warburg Symposium : Antibiosis. « Antibiosis-Symbiosis : Agrobacterium, Rhizobium, and plants ». Göttingen (Germany).

14-19/6/1998 : IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century. « A discussion of pros and contras of plant genetic engineering for plant protection ». Jerusalem (Israel).