

Les hormones végétales

ANTONIO GRANELL • JUAN CARBONELL

Les hormones végétales sont des messagers chimiques que les cellules utilisent pour moduler leur développement et s'adapter à un environnement auquel les plantes, immobiles, ne peuvent échapper.

Au cours de l'évolution, les cellules, initialement isolées, se sont associées pour former des complexes pluricellulaires ; ceux-ci, au fil du temps, ont constitué les organismes supérieurs. Les activités de ces derniers se sont réparties dans des tissus et des organes à la suite de modifications structurelles et de spécialisations des groupes de cellules.

Cette nouvelle structuration a créé un besoin, celui d'une croissance harmonieuse dans l'espace et dans le temps. L'activité cellulaire s'est organisée au sein de ces nouvelles structures, chaque cellule recevant des informations issues d'autres cellules et de l'environnement. Les molécules déclenchant des réactions dans les cellules réceptrices ont d'abord été identifiées dans le monde animal ; elles sont dénommées hormones, d'après le terme grec qui signifie «mettre en mouvement». Leur synthèse, leur dégradation ou la variation de leur concentration sont des signaux captés et interprétés par les cellules munies des récepteurs adaptés.

Grâce aux expériences réalisées entre 1926 et 1928 par F. Went, à Utrecht, portant sur l'effet de la lumière sur la croissance du coléoptile d'avoine, le terme hormone fut également appliqué aux molécules végétales (le coléoptile est le nom donné à la gaine qui, chez les plantes monocotylédones, entoure l'épicotyle de la graine, la partie qui donnera la tige). Went s'est posé la question : comment les extrémités des plantes qui croissent en présence de lumière deviennent-elles la partie inférieure de la tige, les feuilles ou les racines ?

Les expériences de Went ont abouti à la découverte de l'auxine : cette substance voyage de la pointe de la plante, lieu de synthèse, jusqu'au coléoptile, où elle agit sur la croissance,

laquelle dépend de sa concentration. L'auxine a été la première hormone végétale identifiée. À partir des années 1950, on découvre d'autres hormones qui modulent la croissance et le développement des végétaux : gibbérellines, cytokinines, acide abscissique et éthylène. Outre ces phytohormones proprement dites, on identifie d'autres substances – polyamines, brassinolides, acide salicylique, acide jasmonique et ses dérivés, oligosaccharine, etc. – parfois assimilées à des hormones végétales. Il n'est pas évident que ces molécules agissent à distance, comme les hormones, et ces substances et les composés associés sont plutôt dénommés régulateurs de la croissance végétale, ou phytorégulateurs. Ces régulateurs ont une caractéristique commune : la capacité de commander et de modifier la croissance et le développement des plantes.

Aucun des régulateurs découverts dans les plantes n'exerce de fonction hormonale connue chez les animaux, pas plus que le système endocrinien des animaux n'a d'équivalent chez les plantes : les cellules des plantes et des animaux communiquent à l'aide de signaux chimiques différents. Il n'empêche que les éléments et les mécanismes intracellulaires qui règlent les réactions des plantes aux hormones sont analogues à ceux du règne animal.

Les plantes captent la lumière solaire, elles restent immobiles dans l'environnement et ne se conforment à aucun modèle précis dans leur première phase de développement. Les animaux, en revanche, se déplacent, utilisent différentes stratégies pour s'alimenter, et leur croissance est précisément orchestrée. La formidable capacité des plantes à se développer en s'adaptant à l'environnement, et la

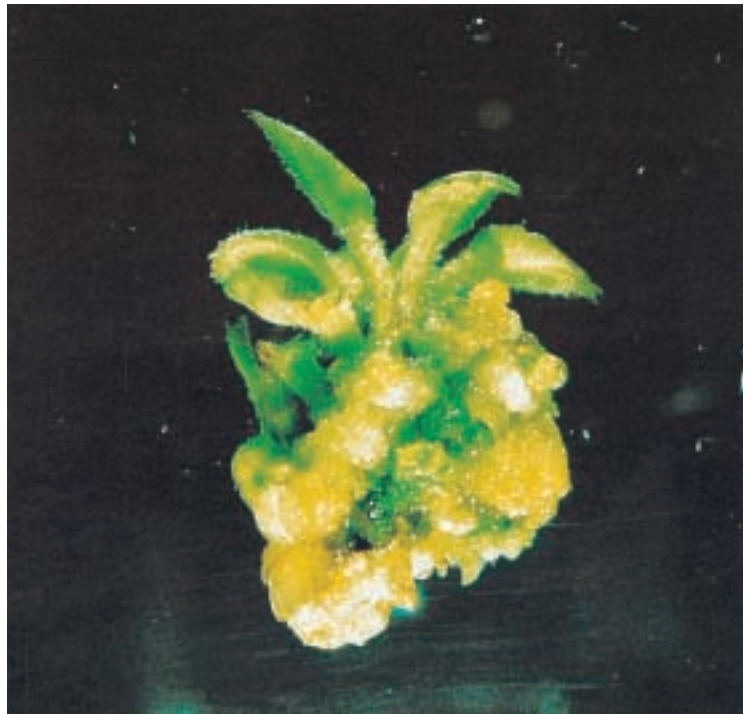
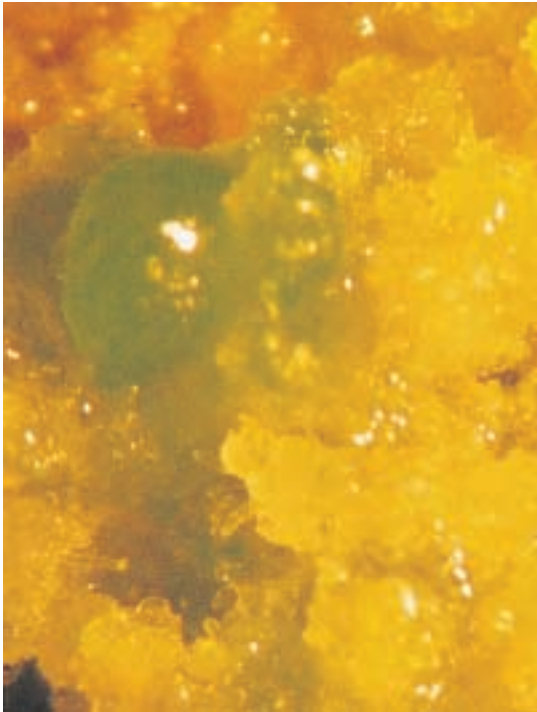
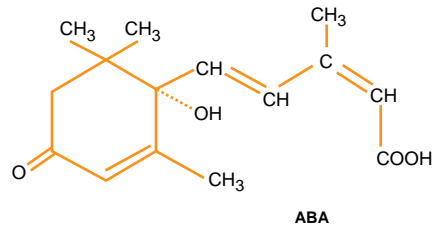
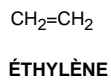
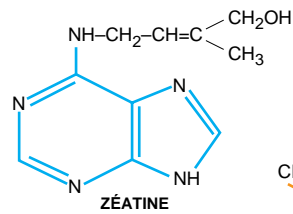
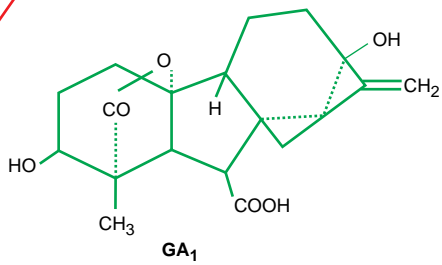
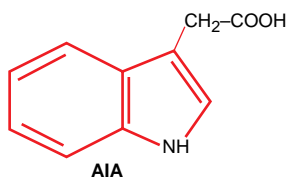
faculté des régulateurs végétaux à moduler ce développement, montrent la souplesse de la cellule végétale, la diversité et la richesse des phytorégulateurs. Ces caractéristiques ont-elles déterminé le choix spécifique d'un ensemble de messagers chimiques intercellulaires ? Les animaux et les plantes ont-ils des ancêtres communs où sont apparus les premiers mécanismes des réactions intracellulaires ?

Détermination du rôle des hormones

Les hormones végétales participent à de nombreux mécanismes physiologiques, et il n'est pas toujours aisé de déterminer si une seule hormone agit ou si une combinaison d'hormones différentes intervient. Dès lors, comment étudier l'action d'une hormone dans un tel labyrinthe de métabolites et de réactions ? Les chercheurs s'efforcent de mettre au point des dispositifs expérimentaux où une hormone déterminée joue un rôle unique ou prépondérant dans un mécanisme physiologique.

Pour cela, les physiologistes utilisent fréquemment des mutants dont la synthèse hormonale ou celle d'un élément de la chaîne des réactions est perturbée.

1. HORMONES ET RÉGULATEURS de la croissance végétale se regroupent en familles, dont les cinq éléments les plus représentatifs sont indiqués dans la partie supérieure : auxines (AIA, acide indolacétique), éthylène, gibbérellines (GA₁), cytokinines (zéatine) et acide abscissique (ABA). Les clichés illustrent la capacité des hormones végétales à réguler la croissance et la morphogénèse des cultures cellulaires. En faisant varier les proportions des hormones et des régulateurs, on peut obtenir des tissus peu différenciés (*cal, zone jaune*) ou déclencher la différenciation des bourgeons (*zone verte, en haut, à gauche*), des tiges (*en haut, à droite et en haut, à gauche*) et des racines (*en bas, à droite*).



Les physiologistes déclenchent ainsi, soit une synthèse permanente, soit un blocage, partiel ou total, de l'hormone. Si les mécanismes des réactions sont modifiés, l'hormone n'est plus active, ou n'est active que partiellement ; dans certains cas, la réaction est permanente, même en l'absence de l'hormone.

Les hormones et autres régulateurs commandent le programme de croissance des cellules végétales. Trois faits valident cette affirmation : les réactions des plantes aux changements de l'environnement déclenchées par les hormones ; les réactions, observées *in vitro*,

des cellules végétales à différentes phytohormones ; l'action de certains phytopathogènes.

Face aux changements de leur environnement, les plantes ne peuvent fuir : aussi modifient-elles leur vitesse de croissance et même leur programme de développement. Une plante qui croît dans une zone où la végétation est touffue et la lumière rare tend à s'affiner et à augmenter les distances internodales de sa tige (les distances entre deux ramifications sur la tige). Lorsqu'elle atteint des zones plus lumineuses, les distances inter-

nodales diminuent. Selon l'environnement, le méristème apical continue à former de nouvelles feuilles et de nouvelles tiges, ou modifie son programme de développement pour se transformer en méristème floral. Cet accroissement des distances internodales et cette différenciation florale sont commandés par des hormones.

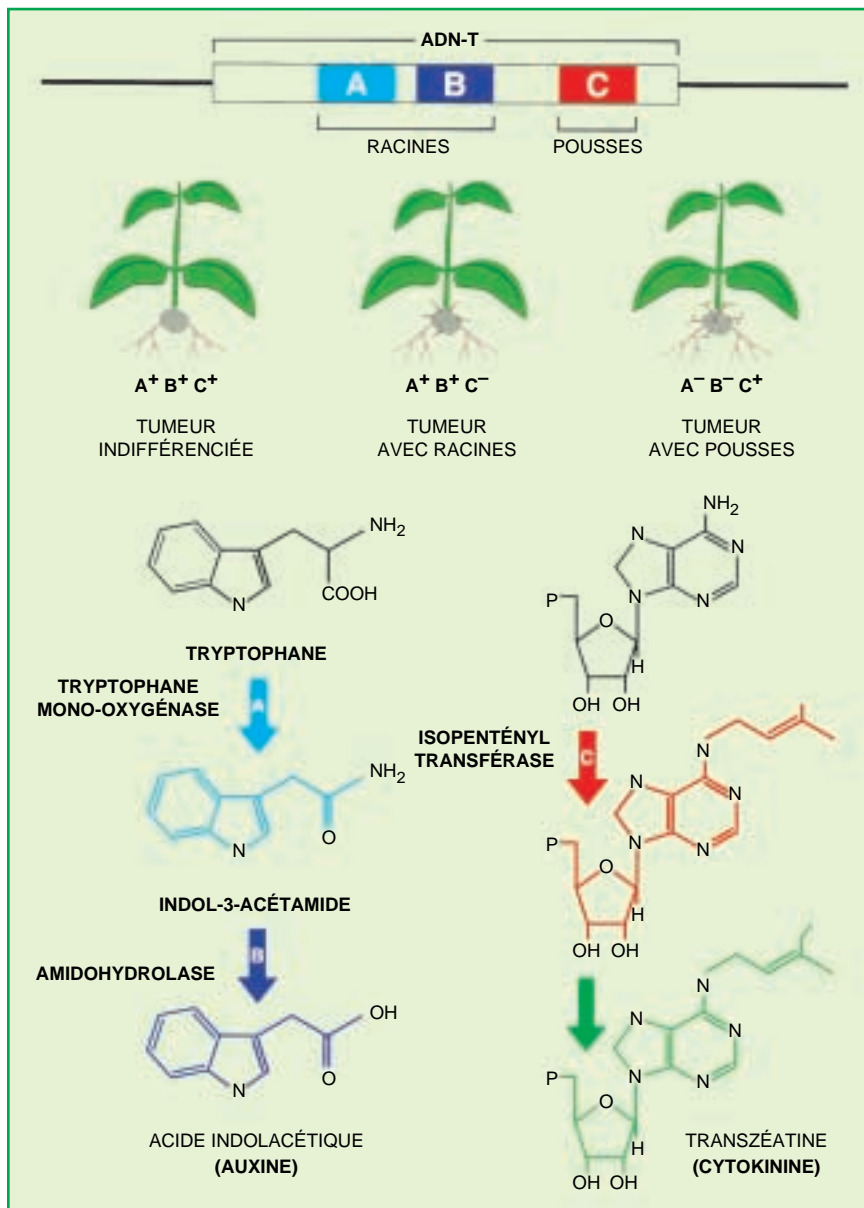
Les cellules des plantes sont dotées de la capacité spécifique de régénérer un organisme complet, même quand elles sont très différenciées. De surcroît, depuis les travaux novateurs de F. Skoog, de l'Université du Wisconsin, on sait que l'apport d'hormones ou de phytorégulateurs en quantités appropriées dans un milieu où croissent des cellules plus ou moins différenciées, déclenche la formation d'organes. Selon la proportion d'auxines et de cytokinines, les cellules donnent naissance à des tiges, à des racines ou à des tissus indifférenciés. Les proportions nécessaires diffèrent d'une espèce à l'autre : la régénération des plantes dépend des phytorégulateurs et des espèces sur lesquelles ils agissent.

Le transfert des gènes

L'homme n'a pas été le premier à modifier le développement et la différenciation des plantes en perturbant les concentrations hormonales. Des millions d'années avant que l'homme ne découvre l'existence des hormones, certains pathogènes avaient développé des stratégies ingénieuses. Ainsi, lorsque la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* infecte les plantes qui y sont sensibles, elle déclenche des tumeurs en incorporant de l'ADN-T (ADN transféré) dans certains chromosomes de la plante ; ce fragment est incorporé dans le plasmide bactérien inducteur de tumeurs.

Des expériences de mutagenèse menées sur l'ADN transféré ont démontré que trois gènes, A, B et C, déterminent le phénotype de la tumeur. Selon le gène qui a été muté, on obtient une tumeur indifférenciée ($a^+ b^+ c^+$), une tumeur avec des pousses ($a^- b^- c^+$) ou une tumeur avec des racines ($a^+ b^+ c^-$). Des gènes contrôlent la production des auxines et des cytokinines, et les concentrations de ces hormones déterminent le phénotype de la tumeur.

Les biologistes utilisent la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* pour transférer de l'ADN dans des plantes qui y



2. INFECTION D'UNE PLANTE par *Agrobacterium tumefaciens*. L'organisme transfère aux cellules végétales un fragment d'ADN (l'ADN-T) contenu dans le plasmide bactérien inducteur de tumeurs. L'ADN transféré est porteur de gènes (A, B et C) qui permettent la synthèse d'acide indolacétique (auxine) et d'isopentényladénine, précurseur de la transzétatine (cytokinine), qui sont les hormones responsables du phénotype de la tumeur. Dans cette expérience, *Agrobacterium* conserve sa capacité de produire des tumeurs et, selon le gène qui est muté, les tumeurs ont des phénotypes différents.

sont sensibles, pour y introduire des gènes étrangers et créer des plantes transgéniques. Pour cela, ils emploient des plasmides «désarmés», c'est-à-dire des bactéries qui conservent les gènes permettant l'introduction d'ADN dans la plante, mais où les gènes pathogènes ont été remplacés par les gènes que l'on veut introduire. Les plantes transgéniques sont en tous points identiques aux plantes normales, hormis le caractère déterminé par le gène introduit. On a appliqué cette stratégie pour incorporer divers types de gènes, y compris ceux qui modifient la biosynthèse des hormones.

On détermine le mécanisme d'action d'une hormone par diverses stratégies expérimentales. On peut, par exemple, étudier le lien entre l'augmentation ou la diminution de la concentration endogène d'une hormone et un mécanisme physiologique particulier tel que la croissance ou un changement métabolique. Une deuxième stratégie consiste à inhiber la production d'une hormone, à observer quel mécanisme est perturbé, puis à tenter de rétablir le comportement normal grâce à l'apport exogène de cette hormone.

Avec la première stratégie, les botanistes ont étudié pourquoi une faible concentration en gibbérellines entraîne une distance internodale quasi nulle chez les pois nains. Que se passe-t-il quand nous ajoutons de l'acide gibbérellique? Les distances internodales augmentent et atteignent celles des plantes normales. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que, si de nombreux mécanismes sont perturbés par l'apport exogène d'hormones, les effets observés ne permettent pas toujours de déduire que l'hormone est présente à l'état naturel, et qu'elle joue un rôle physiologique.

La stratégie de l'inhibition

La synthèse hormonale a d'abord été inhibée expérimentalement par voie chimique, mais les progrès des techniques de génie génétique

permettent de nouvelles stratégies pour bloquer cette synthèse. Pour ce faire, on introduit un gène qui code une enzyme de la biosynthèse d'une hormone, mais cet ADN est tel qu'il produit un ARN antisens, complémentaire de l'ARN messager. L'ARN antisens muselle l'ARN messager et la synthèse de l'hormone est inhibée.

Dans ce contexte, les chercheurs du laboratoire de A. Theologis, à Albany (États-Unis), ont introduit dans des plants de tomate un gène chimérique conçu pour bloquer la synthèse de l'éthylène (on bloque la synthèse de l'ACC synthase, l'enzyme qui synthétise l'acide aminocyclopropane carboxylique, un métabolite précurseur de l'éthylène). Le gène utilisé est constitué de deux éléments : le promoteur

35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (dont la fonction est d'assurer l'expression du gène) et le segment de l'ADN de tomate, qui est transcrit en ARN antisens (l'ARN antisens bloque l'ARN messager de l'ACC synthase et inhibe la synthèse de l'enzyme). Le gène s'insère dans l'ADN-T d'un plasmide bactérien inducteur de tumeurs désactivé, ce qui permet la transformation stable des plants de tomate.

Les tomates transgéniques synthétisent moins d'éthylène. Pourquoi? Parce que l'ARN antisens produit par l'ADN étranger se lie à l'ARN messager de l'ACC synthase, et la production de l'enzyme diminue. Sans précurseur, la production d'éthylène diminue et le fruit ne mûrit pas, du moins pendant la période normale. En

revanche, un apport d'éthylène déclenche la maturation. On en a déduit que l'absence de maturation est due à l'absence d'éthylène endogène, et non à d'autres facteurs qui auraient pu être perturbés au cours de l'expérience.

De même, D. Grierson, de l'Université de Nottingham, a bloqué la synthèse de l'ACC oxydase, l'enzyme qui catalyse la formation d'éthylène à partir de l'acide aminocyclopropane carboxylique. Ce blocage résulte lui aussi de l'introduction d'un gène antisens : la synthèse d'éthylène est inhibée, tandis que le précurseur ACC s'accumule.

On sait introduire des gènes qui codent des enzymes éliminant certains précurseurs de la synthèse d'une hormone : H. Klee et ses collègues, de la Société *Monsanto*, ont introduit dans des plants de tomate le gène qui code l'ACC désaminase ; cette enzyme, qui catalyse la dégradation de l'ACC en acide α -cétobutyrique, n'est pas présente dans la tomate à l'état naturel, mais la plante transformée la synthétise.

Le blocage de la synthèse de l'éthylène par l'une des procédures décrites empêche la maturation des tomates, ce qui démontre le rôle inducteur de l'hormone et la possibilité de contrôler la maturation par des techniques biologiques.



3. UNE ABSENCE DE GIBBÉRELLINES chez les plantes mutantes de pois *nana* provoque leur nanisme (à gauche). Chez les mutants *nana*, la synthèse de la GA_{12} -aldéhyde est bloquée et notamment celle de GA_1 , la gibbérelline qui déclenche l'augmentation des distances internodales. Quand on ajoute à des plantes naines de l'acide gibbérellique (GA_3), une autre gibbérelline active, les distances internodales augmentent, de sorte que les plantes *nana* traitées (au centre) atteignent la taille des plantes normales (à droite).

La biosynthèse de l'éthylène est assez simple, et l'on connaît déjà bon nombre des éléments qui interviennent dans sa régulation. Il n'en est pas de même pour les autres hormones, notamment pour les gibbérellines, une superfamille de plus de 90 composants. L'étude de mutants de maïs par B. Phinney et son groupe de l'Université de Californie, et les travaux menés sur le riz et sur les pois ont permis d'établir que seules quelques gibbérellines (principalement GA₁ et GA₃) ont un rôle d'hormones végétales.

Toutefois, la biosynthèse de la majorité des hormones reste à découvrir. Le nombre élevé de conjugués (des hormones agissant conjointement avec d'autres métabolites) rend difficile l'identification des hormones qui jouent un rôle direct sur le développement des plantes, et des molécules qui sont seulement des précurseurs d'hormones. En outre, il reste à identifier les enzymes régulatrices et, en définitive, les voies de synthèse *in vivo*. Ces formes conjuguées sont nombreuses, tout comme celles qui sont transportées d'une zone à l'autre de la plante.

Parfois, c'est le précurseur de l'hormone active qui migre (c'est le cas de l'ACC). Les conjugués et les précurseurs sont-ils les messagers intercellulaires les plus rapides et les plus nombreux qui permettent à la plante de s'adapter aux changements de l'environnement, ou cette adaptation est-elle assurée par les hormones végétales elles-mêmes?

Malgré la variété des tailles et des structures (de l'éthylène, un gaz simple, aux gibbérellines ou aux cytokinines à la structure complexe), toutes les hormones végétales ont des masses molaires faibles et une structure rigide. Contrairement aux protéines et aux acides nucléiques, les hormones ne traitent pas l'information elles-mêmes : le signal véhiculé par les hormones est reconnu, traité et transmis par les cellules cibles.

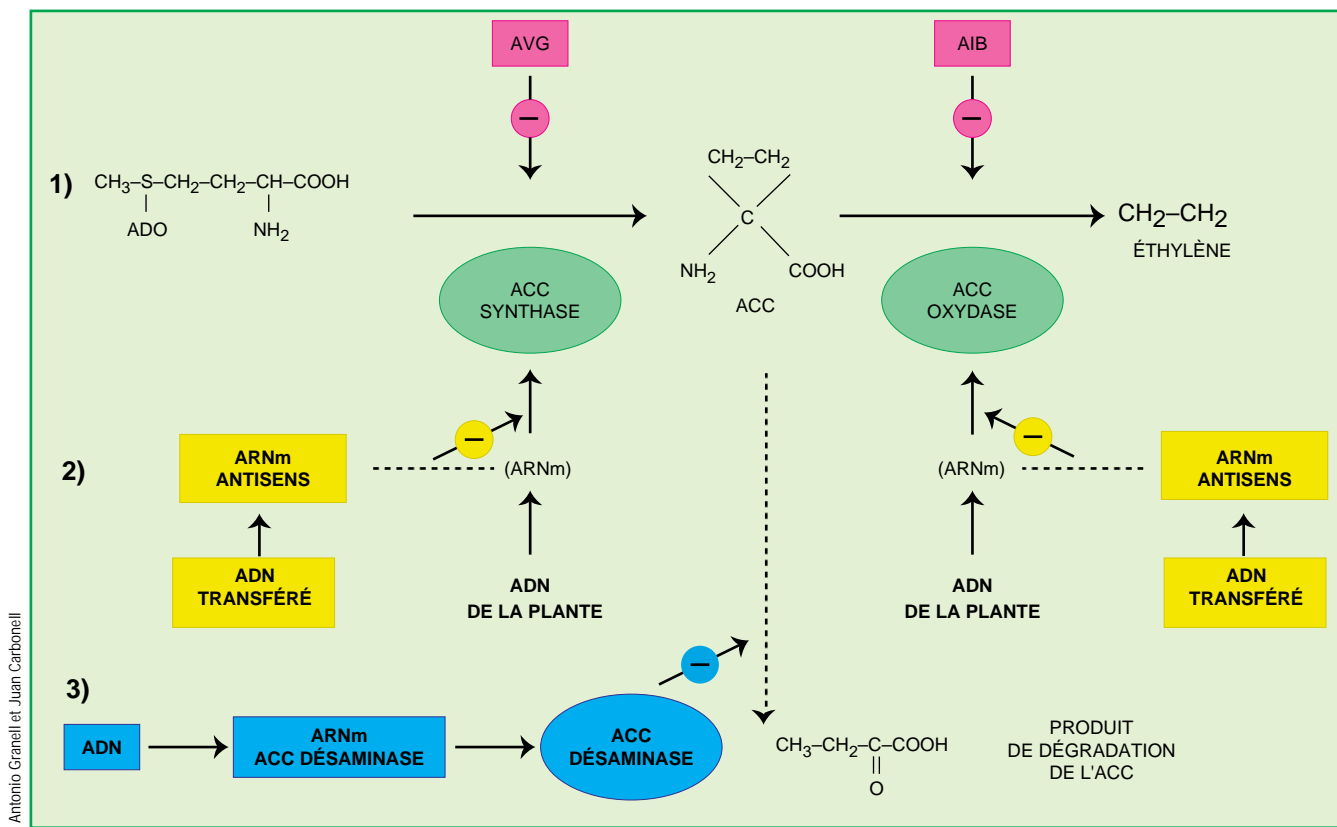
Les hormones animales interagissent avec un des récepteurs qui déclenchent la transduction du signal. Le signal reconnu, l'hormone active la chaîne des réactions aboutissant à la réponse physiologique. Différentes cellules peuvent transformer un même

signal en différentes informations, selon la batterie de récepteurs disponibles, leur localisation et la fonction qu'ils remplissent à un moment donné.

Hormones et récepteurs

L'action hormonale dépend de la concentration de l'hormone, de la présence et des caractéristiques de ses récepteurs, et des éléments de la chaîne de transduction du signal. Le complexe hormone-récepteur, c'est-à-dire le récepteur activé, est le premier maillon de la chaîne de transduction du signal qui déclenche la première réaction, laquelle active une série de changements qui constituent la réponse physiologique.

On utilise deux stratégies pour étudier l'action hormonale chez les plantes. Premièrement, la recherche de récepteurs et d'éléments de transduction du signal hormonal ; pour cela, on identifie les protéines qui s'unissent à des hormones, ainsi que les gènes qui, lorsqu'ils sont mutés, perturbent l'action des hormones. Deuxièmement, l'analyse des gènes dont l'expression



4. L'INHIBITION DE LA BIOSYNTHESE de l'éthylène peut être obtenue de diverses façons : 1) par traitement avec des substances chimiques, telles que l'acide α-amino-éthoxyvinylglycine (AVG) et l'acide α-amino-isobutyrique (AIB) ; 2) en bloquant l'expression des gènes de la biosynthèse de l'éthylène par des gènes antisens de

l'ACC synthase ou de l'ACC oxydase qui inhibent la production de ces enzymes indispensables à la synthèse de l'éthylène ; 3) on peut aussi introduire dans la plante le gène codant l'ACC désaminase, l'enzyme qui dégrade le précurseur de l'éthylène, l'acide amino-cyclopropane carboxylique (ACC).

est modifiée par des hormones ; pour ce faire, on caractérise les séquences régulatrices d'ADN, on identifie les protéines qui s'y lient et l'on examine l'expression des gènes dans les plantes transgéniques.

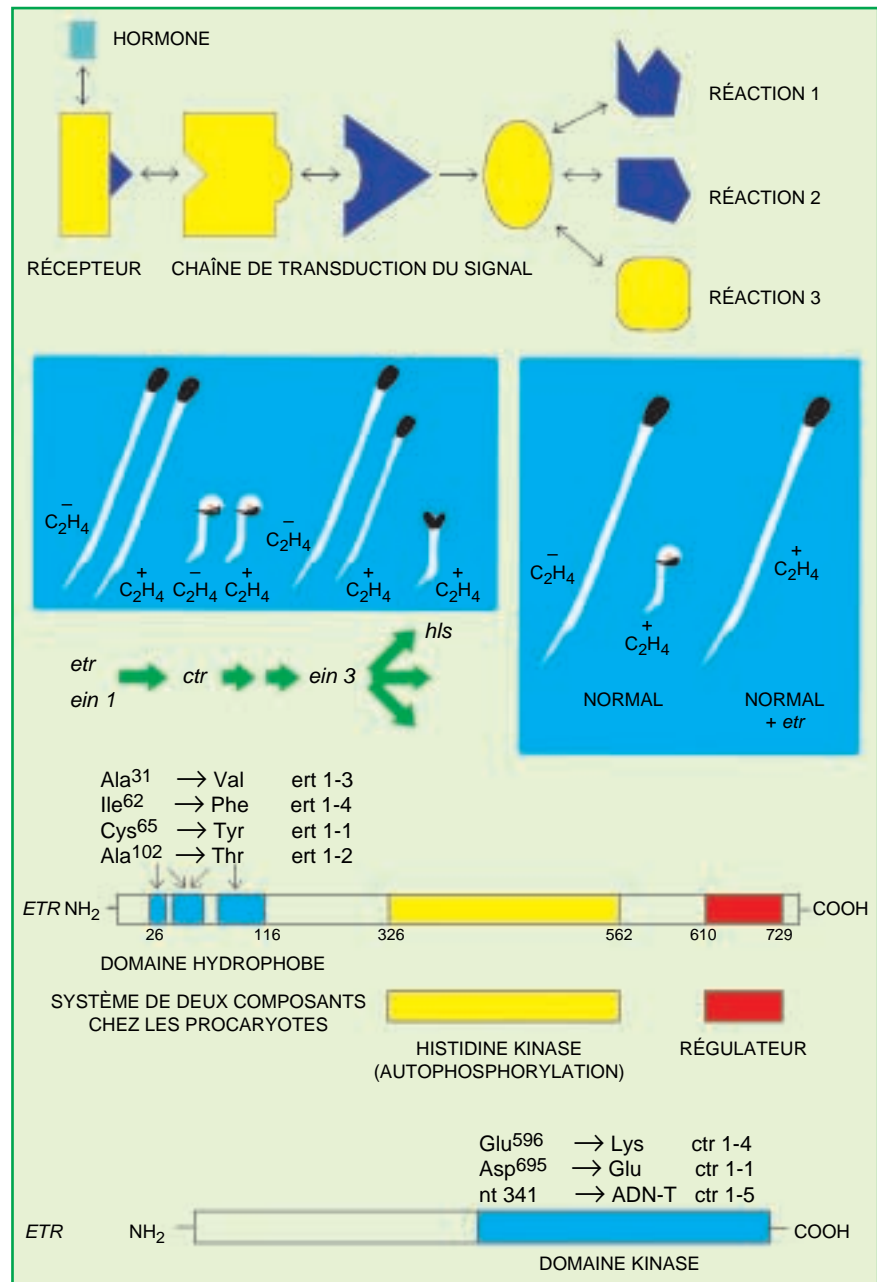
On a identifié les récepteurs hormonaux en isolant des protéines qui se lient à des hormones marquées. Pour localiser les récepteurs, on a également recours à d'autres molécules : des dérivés hormonaux modifiés par voie chimique, des dérivés photosensibles qui s'ancrent au récepteur lorsque leur structure est modifiée par la lumière et des anticorps anti-idiotypes (des molécules dont la structure est analogue à celle du complexe hormonal ; on les prépare en utilisant des anticorps dirigés contre le complexe hormonal et qui jouent alors le rôle d'antigènes).

Les hormones ne se lient pas seulement à leurs récepteurs : elles se fixent à d'autres protéines, par exemple à des enzymes et à des transporteurs. Dans le coléoptile du maïs, on a identifié et caractérisé la protéine qui se lie à l'auxine, ou ABP (*Auxin-Binding Protein*) ; elle se situe dans le réticulum endoplasmique et dans la zone externe de la membrane plasmique. La séquence du gène codant l'ABP et celle de la protéine ont été identifiées.

Les anticorps préparés contre l'ABP bloquent l'hyperpolarisation membranaire des protoplastes du tabac déclenchée par des auxines. En outre, un peptide (la région carboxylique de l'ABP) modifie les canaux qui régulent l'entrée et la sortie des ions potassium à travers la membrane cellulaire. Ces modifications identiques à celles que produisent des concentrations élevées d'auxine, surviennent en quelques minutes et rendent le cytoplasme basique. On en déduit que l'ABP serait responsable de la réponse primaire à l'auxine, et que l'ABP est peut-être le récepteur des auxines.

Les progrès les plus importants en matière d'identification des éléments qui participent à la chaîne de transduction du signal hormonal ont été obtenus par l'analyse des gènes dont une mutation perturbe les réactions aux hormones. Ils résultent de l'étude d'*Arabidopsis thaliana*, une plante dont le génome est limité.

Chez les plantes *Arabidopsis* poussant dans l'obscurité, l'éthylène déclenche une triple réaction : une inhibition de la croissance de l'hypocotyle (la partie de l'axe embryonnaire qui se trouve sous les cotylédons, et qui



5. UNE HORMONE VÉGÉTALE agit par l'intermédiaire d'un récepteur. L'interaction hormone-récepteur se transmet à une série d'éléments, les maillons de la chaîne de transduction du signal. Les réactions physiologiques des cellules ou des tissus effecteurs sont modulées par des facteurs qui leur sont spécifiques. L'utilisation de mutants dans la réaction à l'éthylène (C_2H_4) de la plante *Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier certains éléments de la chaîne de transduction du signal hormonal. Les plantes normales d'*Arabidopsis* réagissent à l'éthylène en manifestant : 1) une inhibition de la croissance de l'hypocotyle et de la racine ; 2) un épaississement de l'hypocotyle ; 3) une accentuation de la courbure apicale. On utilise divers types de mutants : ceux qui sont insensibles à l'éthylène (*etr*, *ein1* et *ein3*) donnent toujours un phénotype qui croît en absence d'éthylène ; les mutants *ctr* présentent les trois réactions, même en absence d'éthylène exogène. Certains, comme le *hls*, ne développent que quelques-unes des caractéristiques des trois réactions. Lors d'expériences menées avec des mutants doubles, on peut établir la séquence d'activation des gènes. Les gènes identifiés qui participent à la chaîne des réactions à l'éthylène semblent avoir des fonctions similaires à d'autres gènes qui interviennent dans la chaîne de transduction du signal, dans d'autres organismes. L'analyse de la séquence du gène *ETR* indique qu'il code une protéine qui regroupe deux éléments semblables à un capteur et à un régulateur, deux protéines qui, chez les procaryotes, interviennent dans les systèmes de réactions aux signaux extracellulaires. La séquence de la protéine *CTR*, quant à elle, pourrait être comparée à celle des kinases Ser-Thr du type Raf présentes chez des animaux. Elle fait peut-être partie de la cascade des phosphorylations chargées de la transmission du signal hormonal.

Antonio Granell et Juan Carbonell

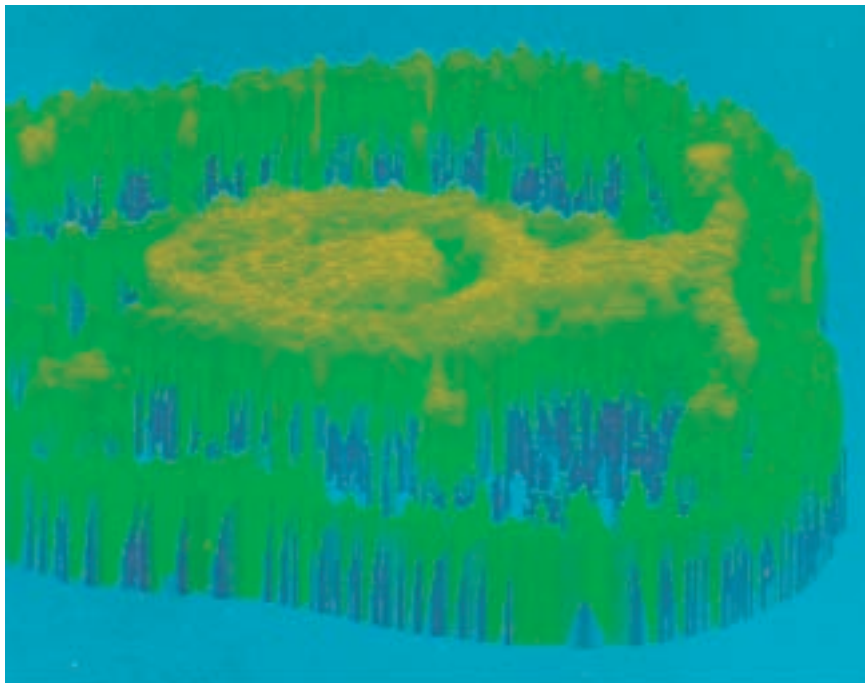
donne les racines) et de la racine ; un épaississement de l'hypocotyle ; une accentuation de la courbure apicale. Les chercheurs du laboratoire de J. Ecker, de l'Université de Pennsylvanie, ont isolé des mutants d'*Arabidopsis* dont la sensibilité à l'éthylène est modifiée.

Parmi ces mutants, les types *ein* (*ethylene insensitive*, c'est-à-dire insensibles à l'éthylène) et les *ctr*, présentent toujours les trois réactions, même en l'absence d'éthylène. Dans un autre mutant, le *hls* (sans courbure apicale), une seule des réactions à l'éthylène est perturbée.

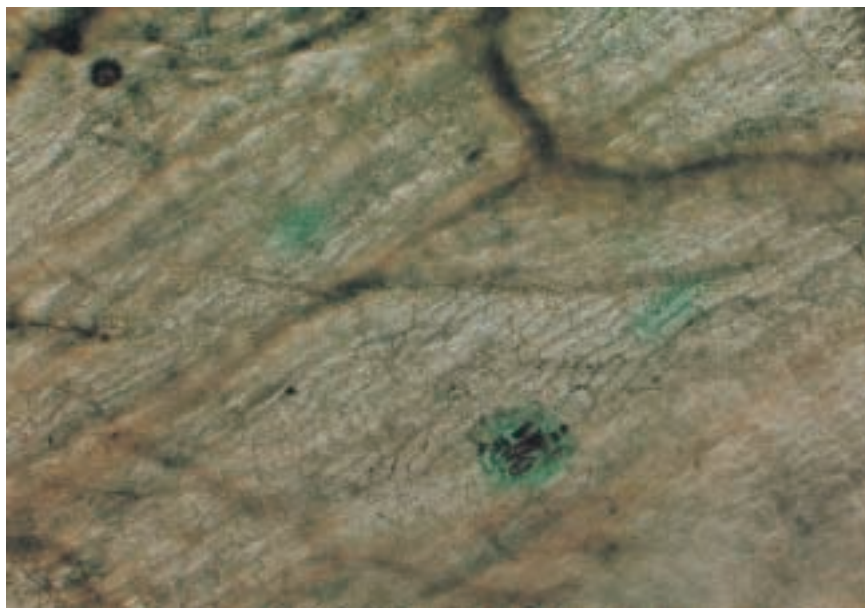
Les gènes semblent être activés dans l'ordre *Etr/Ein1 - Ctr - Ein3 - Hls*. On a identifié certaines de ces mutations en comparant les séquences correspondantes de l'allèle normal et des allèles mutés. La comparaison du gène *ctr* et d'autres gènes mutés a montré que la protéine qu'il code est une sérine-thréonine kinase, semblable aux protéines Raf. Ces protéines font partie de la cascade des kinases de la voie de la protéine Ras, une voie décisive dans la régulation de la croissance d'organismes aussi variés que les levures, les nématodes, les mouches ou les êtres humains. En outre, la protéine codée par le gène *EIN3* a une séquence semblable à celle de certains facteurs de transcription : elle participerait à l'activation d'une série de gènes qui, à leur tour, agirait sur d'autres gènes, déterminant ainsi les réactions physiologiques.

L'analyse physiologique de mutants d'*Arabidopsis* qui ne présentent pas la triple réponse a permis l'identification du gène *ETR*, l'un de ceux qui la commandent. La protéine codée par ce gène est formée de 738 acides aminés ; elle contient une région amino-terminale hydrophobe et deux régions qui ressemblent à deux protéines bactériennes. La première région, qui va de l'acide aminé 326 à l'acide aminé 562, présente une homologie avec une histidine kinase qui s'autophosphoryle (c'est-à-dire qui est capable, sans intervention extérieure d'ajouter un groupe phosphate à sa propre molécule). La seconde région, qui va de l'acide aminé 610 au 729, présente les caractères d'un régulateur des systèmes procaryotes. Ainsi, la protéine végétale est constituée de deux éléments qui, chez les procaryotes, assurent la détection et la transmission de signaux, de l'extérieur vers l'intérieur des cellules.

Quatre mutants *etr* d'*Arabidopsis* ont une région amino-terminale hydrophobe anormale, et la mutation est dominante. Les plantes, qui devraient manifester la triple réponse dans une atmosphère d'éthylène, sont insensibles au gaz après introduction du gène mutant *etr-1*. La protéine Etr est-elle un récepteur, ou fait-elle partie d'un complexe, récepteur de l'éthylène? On l'ignore encore, mais on sait désormais qu'Etr et Ctr interviennent dans un mécanisme intracellulaire commun à toute une série d'organismes.



N. Harris



D. Ordóñez

6. L'EXPRESSION d'une thiolprotéase est contrôlée par des hormones dans des tissus floraux sénescents de pois. L'ARN messager de la thiolprotéase est localisé dans l'ovule et dans l'endocarpe de l'ovaire (*en jaune, en haut*). On l'a détectée par une sonde ARN antisens qui s'hybride avec l'ARN messager de la protéase présente dans les cellules de ces organes. Le traitement de l'ovaire par l'acide gibbérellique inhibe l'expression de la protéase et provoque le développement du fruit. Pour étudier les gènes dont l'expression est commandée par les hormones, on construit un gène, qui contient un fragment du gène de la thiolprotéase associé à un gène marqueur (le gène de la β -glucuronidase de *Escherichia coli*). Cette combinaison est introduite dans les cellules de pétales de pois avec un canon à particules. Les cellules qui ont acquis le gène et expriment la thiolprotéase, expriment également la β -glucuronidase, que l'on détecte grâce à sa couleur bleue (*en bas*).

Analyse des gènes et activité hormonale

En analysant les gènes régulés par des hormones, on a précisé les mécanismes de l'action hormonale. On isole d'abord des polypeptides et des messagers dont la synthèse est déclenchée ou inhibée par une hormone ; puis, on identifie et on isole des séquences régulatrices des gènes et des protéines qui s'y lient ; enfin, on introduit dans des plantes des gènes spécifiquement commandés par des hormones, afin d'en découvrir la fonction.

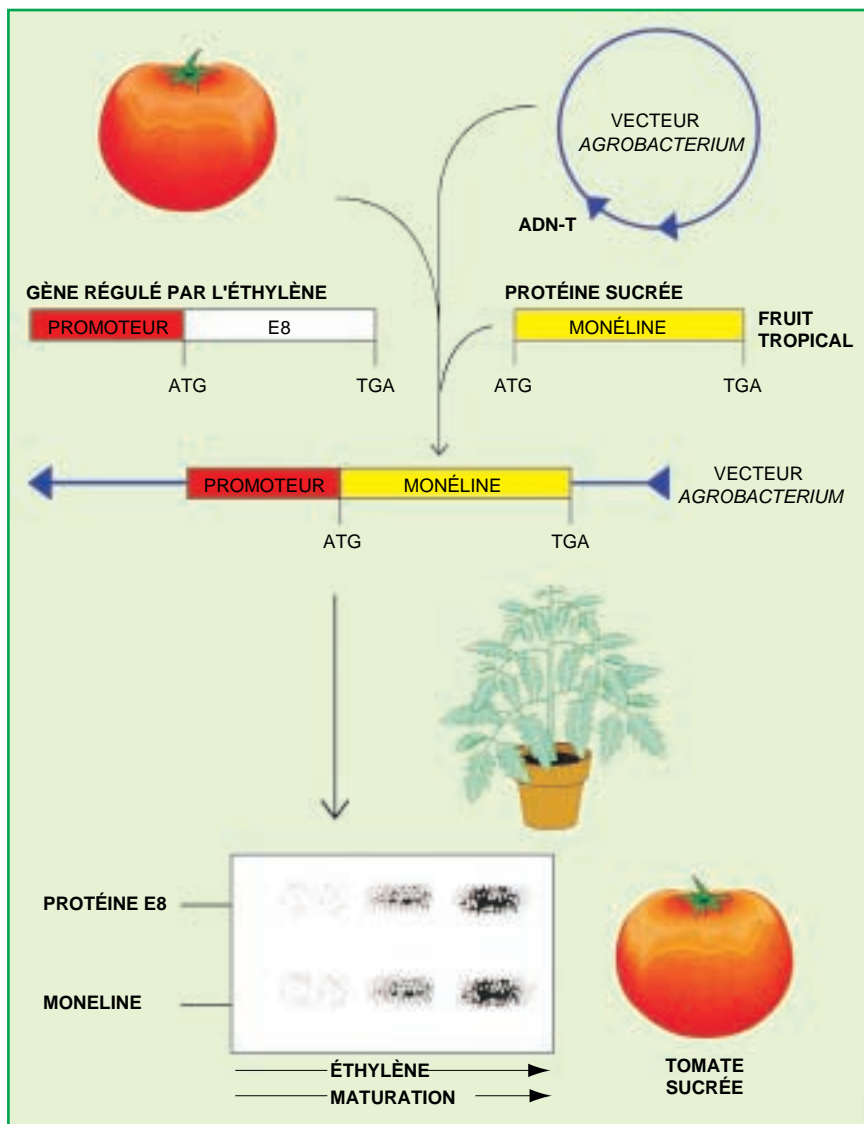
Certains de ces gènes contiennent des séquences *HRE* qui réagissent aux hormones (*HRE* pour *Hormone Responsive Elements*) ; ces séquences sont localisées dans la région du promoteur. Au cours de l'étude des promoteurs, on a délimité des séquences, spécifiquement reconnues par certaines protéines, dont la présence est nécessaire à la régulation du gène par l'hormone. La perte d'une séquence *HRE*, ou une mutation dans cette région, entraîne la perte partielle ou totale de la sensibilité à l'hormone : ces éléments agiraient comme des rhéostats modulateurs de l'expression du gène.

Dans notre laboratoire de l'Institut de biologie moléculaire et cellulaire des plantes, nous avons étudié l'expression du gène d'une thiolprotéase durant la sénescence d'ovaires de pois non pollinisés. L'application de gibbérellines sur l'ovaire évite sa sénescence et empêche l'expression du gène de la thiolprotéase. En revanche, elle favorise le développement de fruits sans graines. Pour observer l'expression du gène de la thiolprotéase, on construit un gène, par l'union d'une séquence du gène de la thiolprotéase et du gène marqueur *gus* (qui code l'enzyme β -glucuronidase). Quand ce gène est présent dans les fleurs où s'exprime temporairement le gène de la thiolprotéase, on le détecte par la couleur bleue due à l'enzyme β -glucuronidase. On délimite ainsi les séquences responsables du contrôle hormonal de l'expression génique.

L'étude de gènes contrôlés par les gibbérellines et par l'acide abscissique a permis l'identification de séquences régulatrices *GARE* (pour *Gibberellic Acid Regulatory Elements*) et *ABRE* (pour *Abscissic Acid Regulatory Elements*). L'identification d'ARN messagers et de protéines dont la production, très rapide, est commandée par des hormones a per-

mis l'identification de certains maillons de la chaîne de transduction du signal transmis par les auxines. Ainsi, l'expression de deux gènes (*IAA1* et *IAA2*) est-elle activée quatre ou huit minutes après l'action des auxines. Les produits de ces gènes, *IAA1* et *IAA2*, sont des protéines qui agissent dans le noyau dont la durée de vie moyenne est très courte (de six à huit minutes en moyenne) ; elles ressemblent à des facteurs de transcription présents chez les procaryotes. Ces protéines sont-elles l'autre extrémité de la chaîne de transduction du signal dû aux auxines?

Dès lors que les séquences cibles des hormones agissant sur l'ADN sont connues, nous pouvons chercher dans quelles cellules et dans quels tissus l'hormone s'accumule. On introduit, dans des cellules végétales, le promoteur d'un gène, contrôlé par des hormones et couplé à un gène marqueur. Par exemple, on construit un gène contenant le promoteur du gène *SAUR* du soja (un gène dont on ignore la fonction, mais qui est activé par des auxines), lié à la séquence codante du gène *gus* (on introduit ce gène dans des plants de tabac grâce à *Agrobacte-*



7. LES RÉGIONS RÉGULATRICES des gènes contrôlés par des hormones commandent l'expression d'autres gènes chez des plantes transgéniques. Cette figure illustre l'expression d'un gène de tomate constitué par les séquences régulatrices du promoteur du gène E_8 et par la région codant la monéline, la protéine sucrée de la plante tropicale *Taumatococcus danielli*. Durant la maturation du fruit, la régulation est assurée par l'éthylène. Le fragment d'ADN constitué du promoteur et du gène codant la monéline est introduit dans des plants de tomate par l'intermédiaire d'*Agrobacterium*. Dans ces plantes transgéniques, la monéline est produite durant la maturation du fruit déclenchée par l'éthylène. La présence de monéline confère un goût sucré aux tomates, sans augmenter la concentration en sucres.

rium tumefaciens). Les cellules qui contiennent des auxines activent le promoteur *SAUR* et le gène marqueur qui produit une couleur bleue.

Hormones et rendements agricoles

La sélection d'espèces végétales d'intérêt agricole a été pratiquée selon des critères qui, sans qu'on le sache, correspondaient à la présence ou à l'absence d'hormones végétales. Ainsi, en recherchant des variétés qui exigent moins d'engrais et dont les tiges restent bien droites, pour faciliter la récolte et pour éviter les attaques des prédateurs et des agents pathogènes, on sélectionne des plantes de blé naines, résistantes et dont les distances internodales sont courtes. Or, de telles plantes ont des concentrations en gibbérellines basses. Au contraire, une concentration élevée en certaines hormones endogènes (les auxines, certaines gibbérellines et les cytokinines) donne des fruits sans graines. Enfin, on a longtemps fait mûrir des fruits en atmosphère confinée et surchauffée, sans savoir que l'éthylène était le principe actif de la maturation.

Quand le rôle de certaines hormones et de divers régulateurs a été établi, on a tenté de reproduire les résultats en appliquant sur les plantes des phytohormones et des régulateurs. L'application d'une substance qui inhibe la synthèse de gibbérellines a raccourci la distance internodale et renforcé la résistance des tiges de diverses variétés de blé, plus petites. De même, l'emploi d'auxines, de gibbérellines et de cytokinines a amélioré le développement et les caractéristiques de certains fruits. En outre, on utilise de l'éthylène pour faire mûrir les fruits. L'application d'acide abscissique, un phytorégulateur, provoque la chute des fleurs de coton, ce qui en facilite la cueillette. Enfin, les hormones végétales sont indispensables pour les cultures *in vitro*, pour l'obtention de clones de plantes, de plantes exemptes de virus ou de plantes qui produisent des sous-produits précieux.

Aujourd'hui, on dispose d'hormones qui commandent le développement des plantes. Les méthodes utilisées respectent mieux l'environnement, puisqu'elles évitent l'épandage de produits chimiques. Nous avons expliqué que la

synthèse de l'éthylène est inhibée par des gènes qui bloquent la production des enzymes de sa biosynthèse ou qui réduisent la production de ses précurseurs. Aussi peut-on cueillir les fruits avant qu'ils ne soient trop mûrs : ils résistent mieux au transport, à un stockage prolongé et à de nombreux agents pathogènes qui s'attaquent aux fruits trop mûrs. On contrôle la maturation de ces fruits par application exogène de la phytohormone.

On peut aussi utiliser des promoteurs de gènes commandés par des hormones. La séquence nucléotide du promoteur est liée à des gènes qui peuvent conférer de nouvelles propriétés, et l'on en déclenche l'expression par application de l'hormone. On a ainsi introduit un «goût sucré» dans des tomates sans en augmenter la concentration en sucre. Pour ce faire, on a construit un gène avec le promoteur du gène *E8* (on ignore la fonction du gène, mais son promoteur est activé dans les tomates au début de la maturation et par traitement à l'éthylène) et la séquence d'ADN qui code une protéine à la saveur très sucrée, la monéline (isolée d'un fruit tropical, *Taumatococcus danielli*).

Les pièces du puzzle constitué par les hormones végétales commencent à s'assembler. Cette facette de la physiologie végétale ouvre de nouvelles perspectives, dont certaines ont déjà été appliquées : la première tomate transgénique résistante à la surmaturation est aujourd'hui sur le marché. C'est le «fruit» des recherches menées sur les mécanismes moléculaires de l'action des hormones végétales.

Antonio GRANELL et Juan CARBONELL sont chercheurs à l'Institut de biologie moléculaire et cellulaire des plantes, à l'Université polytechnique de Valence.

Fisiología y Bioquímica Vegetal, sous la direction de J. Azcón-Bieto et M. Talón, chapitres 12 à 17, Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1993.

M.H.M. GOLDSMITH, *Cellular Signaling : New Insights into the Action of the Plant Growth Hormone Auxin*, in *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, vol. 90, pp. 11 442-11 445, 1993.

H.J. KLEE et C.P. ROMANO, *The Roles of Phytohormones in Development as Studied in Transgenic Plant*, in *Critical Reviews in Plant Science*, vol. 13, pp. 311-324, 1994.
