

Physcomitrella patens : un système expérimental modèle en génomique végétale

Didier G. Schaefer, Mikhail Chakhparonian et Jean-Pierre Zryd

Institut d'écologie, Laboratoire de Phytogénétique Cellulaire, Université de Lausanne,
Suisse

Correspondance : didier.schaefer@ie-pc.unil.ch

Introduction

Ces 10 dernières années, les progrès des programmes de séquençage, de la transgénèse, des techniques de biologie moléculaire et de la bioinformatique ont radicalement modifié la méthodologie des approches génétiques en biologie. Le décryptage du génome complet de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* annoncé en décembre 2000, celui en cours d'autres plantes modèles comme le riz, la luzerne ou le maïs, et les millions de séquences d'autres plantes disponibles dans les banques de données fournissent l'information nécessaire au développement d'une génomique fonctionnelle performante des plantes. La méthodologie de cette génomique est basée sur la génétique inverse par transgénèse et sur des études globales de profil d'expression de nombreux gènes en réponse à différentes conditions expérimentales (transcriptome, protéome, profil métabolique). L'introduction de séquences connues dans un génome par transgénèse permet de réaliser des programmes de mutagenèse insertionnelle systématique (knock-out, étiquetage et capture de gènes), d'étudier le phénotype résultant de l'addition de caractères génétiques nouveaux ou de la modulation de l'expression de gènes endogènes par surexpression ou silençage, ainsi que des études cytologiques in vivo de la fonction des protéines (fusion GFP, apoaequorine). Cette transgénèse est extrêmement performante mais a cependant une limite: le fait que l'ADN transformant s'intègre en des locus aléatoires du génome par recombinaison illégitime ne permet pas de mutagenèse ponctuelle prédéfinie et génèrent parfois des effets de position qui interfèrent avec l'analyse du phénotype muté.

La génération d'une mutation ponctuelle déterminée dans un gène fournit l'outil ultime à l'étude fine de sa fonction, et la transgénèse ciblée permet de produire de telles mutations par conversion génique. Dans ce cas, l'ADN transformant porte une séquence génomique mutagenisée in vitro qui va adresser l'ADN vers le locus ciblé et interrompre ou remplacer la séquence native en s'intégrant par recombinaison homologue (revu dans (Schaefer 2001)). Cette méthodologie constitue la base de la génétique inverse en microbiologie, mais n'est que rarement applicable chez les eucaryotes pluricellulaires car l'intégration ciblée par recombinaison homologue est 1000 à 10000 fois moins fréquente que l'intégration stochastique dans le génome par recombinaison illégitime. Il y a 12 ans, la découverte que les fréquences d'intégration ciblée dans une lignée cellulaire embryonnaire de souris (cellules ES) atteignent 1–10 % des événements de transformation a permis de résoudre cette limitation méthodologique en biologie animale et explique le développement extraordinaire de ce système expérimental modèle. A ce jour, les fréquences d'intégration ciblée dans le génome des angiospermes sont trop basses pour permettre ce type d'approche en biologie végétale (Mengiste and Paszkowski, 1999, Vergunst and Hooykaas, 1999). Nous avons récemment

montré que la transformation ciblée par recombinaison homologue est aussi efficace dans la mousse *Physcomitrella patens* que chez *Saccharomyces cerevisiae* (Schaefer, 2001, Schaefer and Zrýd, 1997) et discutons des implications de cette découverte en vue du développement futur de *Physcomitrella patens* comme « levure verte » en génomique végétale.

Les mousses comme plantes modèles

Le potentiel des Bryophytes comme système expérimental modèle de biologie des plantes était déjà reconnu au début du siècle et est associé aux caractéristiques suivantes. (Cove *et al.*, 1997, Knight, 2000, Reski, 1998, Wood *et al.*, 2000).

(1) On retrouve dans une mousse la structure fondamentale de l'architecture d'une plante avec une rhizosphère responsable de la fixation de la plante au substrat et de l'assimilation de nutriments, et une partie aérienne photosynthétique composé d'une tige dressée se différenciant à partir d'un méristème apical et portant les feuilles et les organes reproducteurs.

(2) Malgré cette complexité architecturale, la relative simplicité anatomique d'une mousse rend l'étude de processus physiologiques et morphogénétiques directement accessibles à l'expérimentation au niveau unicellulaire.

(3) Le métabolisme et le développement de la plante sont contrôlés par les mêmes facteurs biochimiques (auxines, acide abscissique, cytokinines, gibbérellines) [Cove, 1984 #30 ; (Schumaker and Dietrich, 1997) et environnementaux (Cove and Knight, 1987, Kadota *et al.*, 2000, Russell *et al.*, 1996, Wada and Kadota, 1989) que les autres plantes terrestres.

(4) D'un point de vue génétique, le gamétophyte haploïde domine le cycle de vie d'une mousse et la phase sporophytique diploïde est réduite à la différenciation à partir d'un zygote d'une capsule au sommet du gamétophyte. Cette caractéristique facilite les approches génétiques et a été utilisée pour isoler certains des premiers mutants végétaux obtenus par mutagenèse (Cove, 1983, Engel, 1968).

(5) Les mousses sont parmi les premières plantes que l'on a réussi à cultiver *in vitro* en conditions axéniques et les techniques de culture pour des espèces comme *Physcomitrella patens*, *Ceratodon purpureus* ou *Funaria hygrometrica* sont parfaitement au point. Les mousses démontrent des facultés de régénération remarquables *in vitro* et chez certaines espèces, il est possible de régénérer une plante à partir de n'importe quel fragment de tissu. Cette régénération est souvent accomplie sans étapes de dédifférenciation (cals) ce qui limite les risques de variations somaclonales.

(6) Certaines espèces de mousses comme *Tortula ruralis* présentent des capacités étonnantes de résistance aux stress comme le froid ou la dessiccation. La compréhension des mécanismes de résistance aux stress chez ces plantes peut contribuer à l'amélioration de ces caractères dans des variétés d'intérêts agronomiques (Oliver, 1996).

(7) Le développement d'un protocole de transformation efficace de la mousse *Physcomitrella patens* permet d'appliquer les techniques de génétique inverse à l'étude de la biologie des mousses (Schaefer, 1994, Schaefer *et al.*, 1991). De manière totalement inattendue, ces travaux nous ont permis de démontrer que l'intégration ciblée d'un ADN transformant par recombinaison homologue est la voie préférentielle d'intégration d'ADN exogène dans le génome de *Physcomitrella* (Schaefer and Zrýd, 1997). Cette propriété unique offre la possibilité d'appliquer dès maintenant de manière systématique dans cette mousse la mutagenèse ciblée à l'étude de la fonction des gènes végétaux (Schaefer, 2001, Tabata and Caboche, 2001).

Biologie de *Physcomitrella patens*

Le cycle de développement de *Physcomitrella* a été revu dans plusieurs articles et ne sera que brièvement résumé ici (Cove, 1992, Cove and Knight, 1993, Reski, 1999). La lignée

sauvage de *Physcomitrella patens* utilisée dans tous les laboratoires est monogénique et dérive d'une spore isolée en Angleterre (Gransden Wild-Type). En présence de lumière, la spore germe pour former un protonema, réseau ramifié de filaments unicellulaires se développant par croissance et division des cellules apicales et subapicales. Il est composé de deux types de cellules, les chloronemata et les caulonemata dont les caractéristiques biologiques sont résumées dans la Table 1. Le protonema fournit un matériel de choix pour l'étude de processus photomorphogénétiques (Ermolayeva *et al.*, 1997, Russell *et al.*, 1998), des mécanismes contrôlant la croissance apicale, les tropismes (Cove and Knight, 1987, Kadota *et al.*, 2000) et la polarité cellulaire (Cove *et al.*, 1996), ou du mode d'action des phytohormones (Neuenschwander *et al.*, 1994, Schumaker and Dietrich, 1998). Il est facile d'isoler des protoplastes à partir de protonema et 80% d'entre eux vont régénérer selon le même schéma. Les premières divisions des protoplastes sont strictement photo-dépendantes et synchronisées, et l'orientation de la division cellulaire peut être imposé en lumière polarisée. Ces protoplastes constituent un des rares exemples de système unicellulaire permettant d'étudier la relation entre le phytochrome, le cycle cellulaire et la polarité. Ils constituent également un matériel de choix pour la transformation génétique.

Table 1 : Comparaison non exhaustive des propriétés biologiques des 2 types cellulaires formant le protonema

	Chloronema	Caulonema
Division cellulaire	Photo-dépendante	Photo indépendante
Cycle cellulaire	24 heures	8 heures
Chloroplastes par cellules	Environ 50	Moins de 20
Paroi cellulaire	Perpendiculaire à l'axe	Oblique à l'axe du filament
Fonction	Photosynthèse (source)	Adventive (puits)
Tropismes	Photo/polarotropisme	- Photo/polarotropisme - Gravitropisme
Différentiation	- Stimulée par l'ammonium - En chloronema ou caulonema	- Stimulée par les auxines - En chloronema, caulonema ou bourgeon
Régénération de protoplastes	Facile	Impossible

La différenciation de la tige feuillée, le gamétophore, a lieu à partir d'une cellule subapicale latérale d'un caulonema et aboutit à la formation d'un méristème extrêmement simple initialement composé de 4 cellules. En conditions standards, cette transition développementale se produit après dix jours de culture et concerne environ 4% des cellules initiales. En présence d'un supplément en cytokinines exogènes, jusqu'à 100% des cellules initiales vont former un méristème. Ce processus morphogénétique offre une situation expérimentale unique à l'étude du mode d'action des cytokinines au niveau unicellulaire (Reski *et al.*, 1991, Reutter *et al.*, 1998). La partie basale du méristème va former un nouveau réseau filamenteux formés de cellules non-photosynthétiques pigmentées, les rhizoïdes, qui constitue la rhizosphère de la plante. Le développement caulinaire du méristème aboutit à la mise en place de la tige feuillée. La tige est non vascularisée et porte des feuilles disposées selon une phyllotaxie par rapport à l'axe de la tige. Les feuilles lancéolées et dentelées sont formées d'une seule couche de cellules et présentent un sillon médian rappelant une nervure centrale. La différenciation des organes reproducteurs mâles (anthéridies) et femelles (archégonies) a lieu à l'apex du gamétophore et est induite par un traitement au froid (15°C). *Physcomitrella patens* est une plante monoïque et les organes reproducteurs des 2 sexes sont portés par le même gamétophore. Les anthérozoïdes se différencient au sein des anthéridies et vont fusionner avec l'oogone pour former la première cellule diploïde du sporophyte. Ce dernier va se différencier au sein de l'archégonie et former une capsule contenant environ 5000 spores haploïdes produites par mitose après une première division méiotique.

Physcomitrella est facile à cultiver in vitro. En conditions standards, elle pousse sur un simple milieu minéral à 25°C en lumière discontinue (80 µE/m²/s, 16 heures/jour). Il faut 1 semaine pour produire 1 gramme de protonema ou 10⁶ protoplastes par boîtes de Petri, 4–6 semaines pour sélectionner une colonie transformée et commencer les analyses phénotypiques et moléculaires, 8-10 semaines pour un développement complet du gamétophore et 3-4 mois pour obtenir des spores. Les analyses de ségrégation s'effectue après croisement de la lignée sauvage avec une souche auxotrophe mâle stérile, les capsules produites sur la colonie auxotrophe résultant d'une fécondation croisée. Les techniques de culture de *P.patens* en fermenteur ont également été développée (Reutter and Reski, 1996). Les techniques standards de biochimie et de biologie moléculaire utilisée en biologie végétale sont généralement applicable à *Physcomitrella* (quelques méthodes sont décrites dans (Schaefer, 1998)).

Le taille du génome de *Physcomitrella patens* est estimée à 450 Mbases réparti dans 27 chromosomes (Reski, 1999). L'analyse des premières séquence de gènes et d'EST (Machuka *et al.*, 1999, Reski *et al.*, 1998) indique qu'elle est philogénétiquement très proches des angiospermes, tant au niveau structurel (structure intron - exon) que fonctionnelle (usage des codons) (Reski, 1999). A ce jour, 12000 ESTs sont accessibles dans les banques de données (Quatrano *et al.*, 1999) et peuvent servir de matériel de base à la génération du mutant correspondant. Fonctionnellement, le travail de Knight *et al.* sur la régulation de l'expression du gène Em de blé chez *P.patens* montre que les réponses moléculaires au stress hydrique et à l'acide abscissique sont conservées entre les mousses et les céréales (Knight *et al.*, 1995). Enfin, les récents progrès de la transformation génétique montrent que la plupart des élément fonctionnels (promoteurs, terminateurs, marqueurs de sélection neo et hygro, marqueurs GUS, GFP ou apoaquorine (Russell *et al.*, 1996)) utilisé pour transformer les angiospermes fonctionnent chez *Physcomitrella*.

Transformation génétique

La transformation génétique de *Physcomitrella patens* s'effectue par la méthode du transfert direct d'ADN dans des protoplastes par précipitation au polyéthylène glycol (Schaefer *et al.*, 1994, Schaefer *et al.*, 1991). La transformation biolistique est possible mais moins efficace (Sawahel *et al.*, 1992), et les essais de transformation de *Physcomitrella* par *Agrobacterium* sont sans succès à ce jour. Après transformation avec un marqueur de résistance aux antibiotiques (neo ou hygro), on observe toujours deux classes de colonies résistantes, correspondant à des clones dans lesquelles le transgène soit s'est intégré dans le génome (transformant intégratif), soit est maintenu dans la cellule comme élément épisomal (transformant répliatif) (Ashton *et al.*, 2000, Schaefer, 1994). Les caractéristiques de ces deux classes sont résumées en Table 2

Table 2 : caractéristiques des transformants répliatifs et intégratifs de *Physcomitrella patens*

	Répliatif (%) ^(a)	Intégratif (%) ^(a) Illégitime / Homologue ^(b)
Fréquence - sur enroulé	10	0.001 / 0.01
- linéaire	1	0.005 / 0.1
Tissu résistant	Protonema chimérique	Toute la plante
Croissance sur antibiotique	Réduite	Normale
Résistance sans antibiotique	Perdue	Maintenue
Stabilité mitotique	< 10 %	100 %
Ségrégation		Mendélienne, 1 locus
Nombre de copies / cellule	0.1 - 10	1 - 50
Structure du transgène	Répétition directe	Répétition directe

(a) en pour cent des colonies régénérant sans sélection après transformation

(b) DNA sans séquence génomique d'adressage / DNA avec séquence génomique

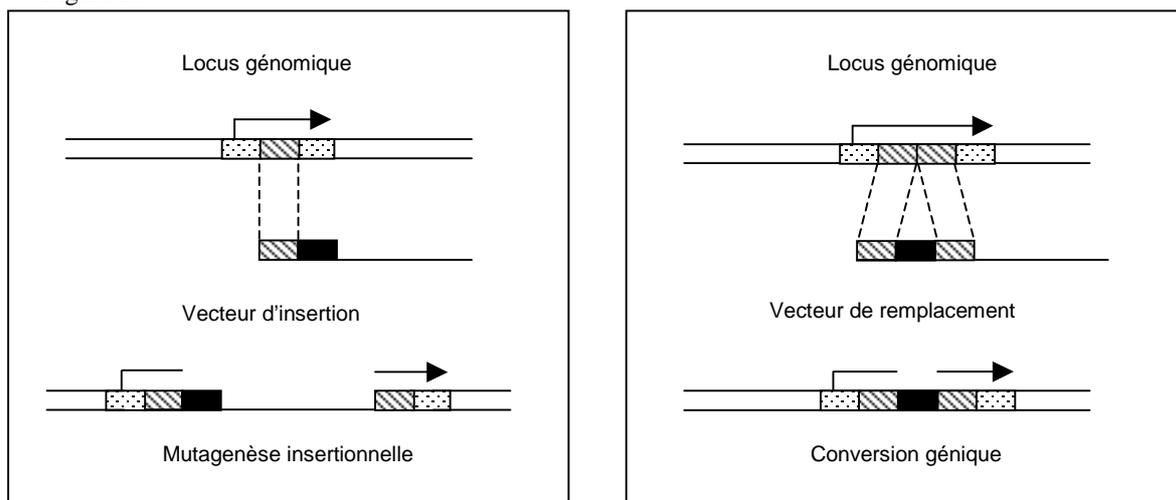
Les clones réplcatifs représentent la majorité des colonies résistantes et fournissent une première étape pour le développement futur de chromosome artificiel de mousse ou de vecteur navette entre la mousse et *E.coli*. Nous avons d'ailleurs observé que la stabilité mitotique de ces clones est plus élevée après transformation avec un ADN linéaire portant des séquences télomériques aux extrémités (YAC linéaire) (Schaefer, 1994). Il faut cependant contre sélectionner ces transformants pour identifier les plantes transgéniques qui porteront la mutation que l'on veut créer. Une croissance normale sur milieu sélectif et la perte rapide de résistance en absence de sélection dans le milieu servent de cribles à cette contre sélection. Pratiquement, après une semaine de régénération des protoplastes transformés sur un milieu isoosmotique sans sélection, on alterne les périodes de croissance sur milieu sélectif (S) et non sélectif (NS) (typiquement S-8 jours, NS-8 jours, S-8 jours). Après ce crible, plus de 90% des transformants réplcatifs sont perdus, alors que les colonies présentant une croissance normale et une résistance à l'antibiotique dans toutes les cellules sont des transformants intégratifs (Schaefer, 1994).

Transformation ciblée

En 1997, nous avons démontré que la voie principale d'intégration d'ADN exogène dans le génome de *Physcomitrella* est l'intégration ciblée par recombinaison homologue (Schaefer and Zryd, 1997) ouvrant la voie à la génération directe de mutants knock-out par insertion. Par la suite nous avons mis en évidence la spécificité de la recombinaison homologue en inactivant un des 15 membres de la famille multigénique des gènes codant pour les protéines liant les chlorophylles a/b (CAB) (Hofmann *et al.*, 1999). D'autres groupes ont profité de cette facilité pour inactiver des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (Girke *et al.*, 1998), la division du chloroplaste (Strepp *et al.*, 1998) ou la dégradation des protéines par le protéasome (Girod *et al.*, 1999), sans qu'aucun de ces travaux n'ait caractérisé dans le détail les mécanismes de recombinaison homologue chez *Physcomitrella*.

Les principales stratégies de ciblage de gènes ont été revue récemment (Schaefer, 2001) et sont brièvement illustrées dans la figure 1.

Figure 1.



Légende de la figure 1

Un vecteur d'insertion porte un fragment génomique de ciblage (hachuré) cloné à côté du marqueur de sélection (noire). L'intégration ciblée a lieu par insertion d'une ou de plusieurs copies du vecteur par un événement de recombinaison homologue (ligne hachurée) produisant une mutation par insertion qui inactive le gène (flèche). Un vecteur de remplacement porte un marqueur de sélection cloné entre deux séquences génomiques. L'intégration a lieu par deux événements de recombinaison homologue et produit une perte de fonction du gène par conversion. C'est en utilisant ce type de stratégie que l'on peut obtenir des mutations ponctuelles du génome (revu en détail dans (Schaefer, 2001)).

Les deux principaux facteurs à définir pour évaluer l'efficacité de la transformation ciblée sont les fréquences relatives d'intégration ciblée et illégitime dans une transformation et la taille de la séquence homologue optimale pour cibler un gène. Ces deux paramètres varient beaucoup entre *S.cerevisiae* (quelques centaines de bp) et les cellules embryonnaires de souris (7 – 15 kb). Une étude des fréquences de ciblage du gène codant pour l'adénine phosphoribosyl transferase (Ppapt) avec différents vecteurs de remplacement a permis de définir ces paramètres pour *P.patens* (Table 3) (Schaefer, Laloue et al, soumis à publication). Les valeurs déterminées sur ce locus confirment les valeurs observées sur tous les autres locus testés à ce jour et démontrent que la transformation ciblée est aussi facile chez *Physcomitrella* que dans la levure du boulanger, une situation unique chez les eucaryotes (Schaefer, 2001). Il est donc directement possible d'obtenir un mutant perte de fonction d'un gène de mousse dont l'EST est disponible dans la base de données : pour ce faire il suffit de synthétiser des amorces PCR à partir de la séquence de l'EST, d'amplifier la séquence génomique correspondante par PCR, de la cloner dans un vecteur portant un marqueur de sélection positif et de transformer *Physcomitrella* avec ce vecteur. Avec un séquence génomique de 500 - 1000 bp, 10 – 90% des clones résistants à l'antibiotique auront intégrés l'ADN dans le gène ciblé, entraînant la perte de sa fonction.

Table 3 : comparaison de l'efficacité de la transformation ciblée chez 2 levures, les cellules ES de souris, le tabac, *Arabidopsis* et *P. patens*.

Espèce	Vecteur	Fréquence (%)	Homologie (bp)	
			Minimale	Optimale
<i>S.cerevisiae</i>	Inser. / remplac.	95	80	300
<i>S.pombe</i>	Inser. / remplac	5 - 95	nd	1000
Souris ES	Inser. / remplac.	0.1 - 10	3000	10 000
<i>A.thaliana</i>	Inser. / remplac	0.01 – 0.001	nd	nd
<i>N.tabacum</i>	Inser. / remplac	0.01 – 0.001	nd	nd
<i>Physcomitrella</i>	Insertion	10 - 90	nd	1000
	Remplacement	5 - 95	50 - 100	500

L'étude conduite sur le locus *apt* nous a également permis de montrer qu'environ un quart des intégrations ciblées obtenues avec ces vecteurs de remplacement correspondent à des événements de conversion génique. Cette observation permet de dire qu'il est possible non seulement d'inactiver n'importe quel gène de *Physcomitrella* par insertion, mais également de modifier spécifiquement n'importe quelle séquence du génome afin d'y générer des mutations ponctuelles préalablement déterminées. On peut dès lors analyser finement la fonction d'un gène après modification des sites actifs ou régulateurs de la protéine par mutagenèse ponctuelle (génération d'une collection de mutants alléliques prédéfinis) ou après modification de la régulation de son expression par remplacement de promoteur. De telles approches de génomique fonctionnelle sont courantes en microbiologie et chez les lignées ES de souris, mais ne sont actuellement pas réalisables chez les angiospermes.

Toutefois la génération de telles mutations fines nécessite l'élimination du marqueur de sélection positive utilisé pour identifier les transformants, car sa présence au sein de séquences introniques peut sérieusement interférer avec l'effet de la mutation ponctuelle. Les stratégies développées chez les levures et les cellules ES de souris utilisent souvent le système de recombinaison à site spécifique Cre/lox pour éliminer le marqueur de sélection après intégration ciblée (Sauer, 1994). Dans ce cas, le vecteur de remplacement contient une cassette de sélection flanquée de deux sites de reconnaissance de la recombinaison (site lox) insérée dans un intron de la séquence de ciblage. Les transformants sont sélectionnés pour la résistance au marqueur puis la cassette de sélection est éliminée soit par une expression

transitoire de la recombinaise Cre, soit après croisement de la lignée transgénique avec une souche exprimant la recombinaise. Dans ce dernier cas, on peut utiliser des lignées exprimant Cre sous le contrôle d'un promoteur non constitutif (tissu spécifique ou inductible) afin de moduler encore la finesse de la mutagenèse. Ce type de stratégies est couramment utilisée chez les souris afin d'obtenir des mutations spécifiques à certains tissus ou en réponse à certaines conditions physiologiques (Sauer, 1998). Nous avons pu montrer qu'il est facile d'éliminer une cassette de sélection flanquée de sites lox intégrées dans le génome de *Physcomitrella patens* après expression transitoire de la recombinaise Cre. En conditions optimales, 5-10% des protoplastes d'une souche portant une cassette lox-neo-lox perdent la résistance à la kanamycine après expression transitoire d'une cassette CaMV35S-Cre et les analyses moléculaires ont confirmé au nucléotide près l'excision de la cassette par la recombinaise (Chakhparonian, 2001). Cette efficacité est tout à fait comparable à celle observée chez les levures et la souris et permet dès maintenant la réalisation de stratégies fines de mutagenèse ponctuelle dirigée chez *Physcomitrella*.

Complémentation avec les gènes homologues de plantes supérieures

Le gène codant pour l'adénine phosphoribosyl transferase est souvent utilisé dans des études de transformation ciblée car sa perte de fonction génère des organismes résistants aux analogues de l'adénine comme le 2,6-diaminopurine. Ce crible a été utilisé pour identifier des mutants du gène *Atapt1* d'*Arabidopsis* (Moffat *et al.*, 1991) qui, bien qu'ayant une morphologie normale, poussent plus lentement et sont mâle stériles. La perte de fonction du gène *apt* chez *Physcomitrella patens* a un effet beaucoup plus dramatique caractérisé par un développement complètement altéré du gamétophyte, un phénotype probablement lié au non recyclage de l'adénine. Nous avons restauré un phénotype wild-type à ces mutants en les transformant avec les gènes *Atapt1* ou *Atapt2* d'*Arabidopsis*, démontrant par là que l'on peut compléter des mutations générées chez la mousse par les gènes homologues de plantes supérieures (Schaefer, Laloue *et al.*, soumis à publication).

Perspectives

Les progrès récents de la transformation ciblée chez *Physcomitrella* démontrent qu'il est possible de modifier ponctuellement n'importe quelle région du génome de cette plante de la même façon et avec la même efficacité que le génome de *S.cerevisiae*. Il ne s'agit pas là d'une application nouvelle de la transgénèse à la génomique fonctionnelle, mais bien de l'avènement d'une nouvelle génomique des plantes. Les possibilités de mutagenèse de *Physcomitrella* sont sans limite et sans comparaison possible avec ce que l'on peut faire aujourd'hui chez les autres plantes. Ce progrès méthodologique fournit un outil essentiel et jusque là absent en biologie végétale et va entraîner une modification du mode de pensée et de planification des approches expérimentales de génomique fonctionnelle.

Les applications de la transformation ciblée chez *Physcomitrella* vont avoir un impact aussi bien en science fondamentale qu'appliquée. En effet, il est aujourd'hui possible de changer un acide-aminé spécifique au sein d'une protéine et d'étudier l'effet de cette mutation dans son contexte chromosomique naturel. De telles approches permettent non seulement d'étudier la fonction d'une protéine avec une finesse jusque là inaccessible chez les plantes, mais également d'essayer d'améliorer ou de modifier la fonction d'une protéine (protein design). Par exemple, le développement de transporteur de nutriments plus performants pourrait être optimisé chez *Physcomitrella* avant d'être testés dans des plantes cultivées pour voir si l'on peut réduire les apports nutritifs aux champs. Il est également possible de modifier la régulation spatio-temporelle de l'expression d'un gène après remplacement de son

promoteur ou déplacement du gène dans une autre région du génome que l'on suspecte être soumise à d'autres régulations. On peut également envisager l'étude de la fonction de séquence non codantes du génome, une question qui est pour l'instant difficile à adresser chez les autres plantes. Les exemples ci-dessus n'ont qu'une valeur illustratrice et il est certain que l'imagination des chercheurs va découvrir bien d'autres applications à la transformation ciblée chez *Physcomitrella*, mais l'outil méthodologique est immédiatement accessible.

Enfin, l'efficacité unique de la transformation ciblée chez *Physcomitrella* soulève la question de la régulation de la voie d'intégration d'ADN exogène dans un génome. Les études conduites chez la levure établissent une corrélation entre le mécanisme de réparation des ruptures double brins de l'ADN et la voie d'intégration d'ADN exogène. Chez la plupart des eucaryotes la réparation de ruptures double brin peut avoir lieu par recombinaison homologue ou par ligation indépendante de l'homologie mais l'une des deux voies généralement prédomine sur l'autre, et c'est cette prédominance qui définit la voie préférentielle d'intégration d'ADN exogène dans le génome. Les gènes impliqués dans ces voies de réparation sont identifiés mais les facteurs qui déterminent le choix entre l'une ou l'autre des voies sont à ce jour inconnus (Paques and Haber, 1999). Le rôle de ces gènes dans la transformation ciblée de *Physcomitrella* doit être étudié pour éventuellement permettre le développement de la transformation ciblée chez les plantes supérieures et il est certain que de nombreuses études vont se faire sur cette question dans un proche avenir.

Conclusion

La question posée aujourd'hui en génomique fonctionnelle est: « maintenant qu'on a la structure, comment en déterminer la fonction ? ». Du côté des angiospermes, les millions de séquences disponibles dans les banques de données et les collections saturées de mutants étiquetés par insertion chez les plantes modèles comme *Arabidopsis* fournissent un matériel de choix pour l'étude globale de la fonction des gènes d'une plante. Mais cette démarche restera toujours limitée par le caractère stochastique de la mutagenèse insertionnelle. Du côté de *Physcomitrella*, si l'on a l'outil ultime de génomique fonctionnelle, l'information structurelle sur son génome est encore très limitée, même si l'on peut prévoir que le nombre de séquences disponibles dans les banques de données augmente de façon exponentielle ces prochaines années. La mise en route à court terme de programme systématique de séquençage chez *Physcomitrella* semble cependant être indispensable. Le groupe de Mitsuyasu Hasebe a effectué la première tentative de mutagenèse insertionnelle globale en transformant *Physcomitrella* avec une banque d'ADN génomique mutagénisée avec un transposon bactérien (shuttle mutagenesis) (Nishiyama *et al.*, 2000). Une analyse préliminaire des transformants ainsi obtenus indiquent que les fréquences auxquelles on obtient des phénotypes détectables sont supérieures à celles que l'on observe chez *Arabidopsis* et il est certain que ce type d'approche va se développer très rapidement chez la mousse.

Notre connaissance des génomes vivants nous montre que l'information génétique peut fréquemment être transférées d'un organisme à un autre, voire d'un règne à un autre, sans perte de fonctionnalité. L'étude fine de la fonction d'un génome nécessite de pouvoir le modifier à volonté, ce qui n'est à ce jour pas possible chez les angiospermes. Dans cette optique, *Physcomitrella patens* offre un outil indispensable à la génomique fonctionnelle des plantes qui complète avantageusement les outils disponibles chez les autres plantes modèles.

Références

- Ashton N. W., Champagne C. E. M., Weiler T. and Verkoczy L. K. (2000) *New Phytologist* 146, 391-402
- Chakhparonian M. (2001) PhD Thesis, University of Lausanne
- Cove D. J. and Knight C. D. (1993) *Plant Cell* 5, 1483 - 1488
- Cove D. J., Knight C. D. and Lamparter T. (1997) *Trends in Plant Science* 2, 99-105
- Cove D. J., Quantrano R. S. and Hartmann E. (1996) *Development* 122, 371-379
- Engel P. P. (1968) *American Journal of Botany* 55, 438-446
- Ermolayeva E., Sanders D. and Johannes E. (1997) *Planta* 201, 109-118
- Girke T., Schmidt H., Zähringer U., Reski R. and Heinz E. (1998) *The Plant Journal* 15, 39-48
- Girod P. A., Fu H. Y., Zrýd J. P. and Vierstra R. D. (1999) *Plant Cell* 11, 1457-1471
- Hofmann A. H., Codon A. T., Ivascu C., Russo V. E. A., Knight C., Cove D. J., Schaefer D. G., Chakhparonian M. and Zrýd J.-P. (1999) *Molecular and General Genetics* 261, 92-99
- Kadota A., Sato Y. and Wada M. (2000) *Planta* 210, 932-937
- Knight C. D., Sehgal A., Atwal K., Wallace J. C., Cove D. J., Coates D., Quatrano R. S., Bahadur S., Stockley P. G. and Cuming A. C. (1995) *Plant Cell* 7, 499 - 506
- Machuka J., Bashiardes S., Ruben E., Spooner K., Cuming A., Knight C. and Cove D. (1999) *Plant & Cell Physiology* 40, 378-387
- Mengiste T. and Paszkowski J. (1999) *Biological Chemistry* 380, 749-758
- Moffat B., Pethe C. and Laloue M. (1991) *Plant Physiology* 95, 900 - 908
- Neuenschwander U., Fleming A. and Kuhlemeier C. (1994) *The Plant Journal* 5, 21 - 31
- Nishiyama T., Hiwatashi Y., Sakakibara K., Kato M. and Hasebe M. (2000) *DNA Research* 7, 9-17
- Oliver M. J. (1996) *Physiologia Plantarum* 97, 779-787
- Paques F. and Haber J. E. (1999) *Microbiology & Molecular Biology Reviews* 63, 349-404
- Reski R. (1998) *Botanica Acta* 111, 1-15
- Reski R. (1999) *Planta* 208, 301-309
- Reski R., Reynolds S., Wehe M., Kleberjanke T. and Kruse S. (1998) *Botanica Acta* 111, 143-149
- Reski R., Wehe M., Hadel B., Marienfeld J. R. and Abel W. O. (1991) *Journal of Plant Physiology* 138, 236 - 243
- Reutter K., Atzorn R., Hadel B., Schmülling T. and Reski R. (1998) *Planta* 206, 196-203
- Reutter K. and Reski R. (1996) *Plant Tissue Culture Biotechnology* 2, 142-147
- Russell A. J., Cove D. J., Trewavas A. J. and Wang T. L. (1998) *Planta* 206, 278-283
- Russell A. J., Knight M. R., Cove D. J., Knight C. D., Trewavas A. J. and Wang T. L. (1996) *Transgenic Research* 5, 167-170
- Sauer B. (1994) *Biotechniques* 16, 1086-1088
- Sauer B. (1998) *Methods (Duluth)* 14, 381-392
- Sawahel W., Onde S., Knight C. and Cove D. (1992) *Plant Molecular Biology Reporter* 10, 314 - 315
- Schaefer D. G. (1994) PhD thesis, University of Lausanne "www.unil.ch/lpc/docs/DSThesis.htm"
- Schaefer D. G. (1998) "<http://www.unil.ch/lpc/docs/pp.htm>"
- Schaefer D. G. (2001) *Current Opinion in Plant Biology* 4, 143-150
- Schaefer D. G. and Zrýd J.-P. (1997) *The Plant Journal* 11, 1195-1206
- Schaefer D. G., Zrýd J.-P., Knight C. D. and Cove D. J. (1991) *Molecular and General Genetics* 226, 418-424
- Schumaker K. S. and Dietrich M. A. (1997) *Plant Cell* 9, 1099-1107
- Schumaker K. S. and Dietrich M. A. (1998) *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 49, 501-523
- Strepp R., Scholz S., Kruse S., Speth V. and Reski R. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 4368-4373
- Tabata S. and Caboche M. (2001) *Current Opinion in Plant Biology* 4, 103-104
- Vergunst A. C. and Hooykaas P. J. J. (1999) *Critical Reviews in Plant Sciences* 18, 1-31
- Wood A. J., Oliver M. J. and Cove D. J. (2000) *Bryologist* 103, 128-133