

Organisation et fonctionnement des cellules souches végétales : le méristème apical d'*Arabidopsis*

Daphné Autran
Jan Traas

Le développement de l'appareil aérien des végétaux supérieurs se caractérise par la production continue d'organes à partir des méristèmes apicaux caulinaires, eux-mêmes constitués de groupes de cellules souches mises en place au cours de l'embryogenèse. Le méristème apical caulinaire maintient la présence d'une population de cellules en prolifération, tout en assurant la différenciation des organes latéraux. Ces deux fonctions sont accomplies grâce à l'action coordonnée de domaines fonctionnels distincts, mis en évidence par l'analyse histochimique détaillée du méristème apical des angiospermes. Au cours de la dernière décennie, des analyses génétiques, réalisées chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, ont permis l'identification de nombreux mutants affectés dans les différentes fonctions du méristème. Le clonage et l'étude de l'expression des gènes identifiés a démontré le haut niveau d'organisation des cellules méristématiques. L'analyse des interactions entre ces différents systèmes contrôlant le fonctionnement du méristème fournit les premières bases permettant la compréhension de la dynamique de cette structure organisée.

En raison de leur nature sessile, la croissance des plantes dépend largement des variations de leur environnement. Cette plasticité développementale, spécifique du règne végétal, est due principalement à une organogenèse continue. Une telle particularité les distingue des animaux supérieurs, chez lesquels la majeure partie des organes

sont élaborés au cours de la vie embryonnaire. Chez les plantes supérieures, des groupes de cellules souches, appelés méristèmes, sont mis en place au cours de l'embryogenèse. Celles-ci peuvent être définies comme des cellules capables de produire à la fois des cellules identiques à elles-mêmes et des cellules destinées à se différencier. Ainsi, les méristèmes sont des ensembles orga-

ADRESSE

D. Autran, J. Traas : Laboratoire de biologie cellulaire, Inra, route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.

nisés de cellules souches qui s'auto-entretiennent et produisent en parallèle des organes et des tissus, cela tout au long de la vie de la plante.

Typiquement, chez les plantes à fleurs, le méristème apical racinaire donne naissance à l'appareil racinaire, tandis que le méristème apical caulinaire (MAC), auquel est consacrée cette revue, donne naissance à toute la partie aérienne de la plante. Le MAC est caractérisé par un développement de type itératif, au cours duquel sont produites des unités séquentielles, appelées phytomères. Un phytomère comporte une feuille, portant éventuellement à son aisselle un méristème axillaire, l'ensemble constituant le nœud, soutenu par une portion de tige, appelée l'entre-nœud (*figure 1*). Des changements progressifs de l'identité du méristème interviennent au cours du développement de la plante. En effet, le MAC végétatif, formé au cours de l'embryogenèse, produit des feuilles. Lors de la transition florale, le MAC végétatif devient un méristème d'inflorescence produisant des feuilles modifiées, ou feuilles cau-

lines, et des méristèmes floraux latéraux. Contrairement à leurs prédécesseurs (méristème végétatif et d'inflorescence), ces méristèmes floraux ont une croissance définie ou déterminée, puisque leur activité cesse après la production d'un nombre défini d'organes. De plus, les organes floraux sont produits sous la forme d'anneaux concentriques, ou verticilles, et non plus en spirale comme pour les feuilles végétatives ou caulines. Les différents verticilles formant une fleur correspondent, de l'extérieur vers l'intérieur, aux sépales, pétales, étamines et carpelles.

L'activité des méristèmes aériens détermine la base de l'architecture de la plante. Ainsi, lorsque seul le méristème apical primaire est actif, l'architecture générale de la plante est linéaire. En revanche, si des méristèmes axillaires sont activés, des hampes florales secondaires sont formées, donnant naissance à une architecture branchée plus complexe (*figure 1*). D'autres types de méristèmes peuvent également être actifs, comme les méristèmes adventifs, formés *de novo* à partir de tissus

différenciés. Ils peuvent être situés sur les feuilles (adultes ou juvéniles), les tiges ou les racines. Des méristèmes secondaires plus diffus, appelés cambiums, existent dans la racine et la tige, et sont responsables de la croissance en épaisseur de ces structures. La position et l'activité des méristèmes influencent donc la croissance et la forme générale de la plante.

Dans cette revue, nous nous concentrerons sur le méristème apical caulinaire végétatif, tout en faisant référence aux connaissances et aux modèles établis à partir de l'étude des méristèmes d'inflorescence. Nous aborderons principalement les facteurs impliqués dans la maintenance des méristèmes et la mise en place proprement dite des primordiums. Nous ne pourrions développer dans cette courte synthèse la question fort intéressante de l'identité des organes produits (feuilles végétatives ou caulinaires, fleurs, ou organes floraux). Bien que la présence d'un méristème apical soit une caractéristique générale des végétaux terrestres multicellulaires, sa structure peut varier de façon significative d'une espèce à

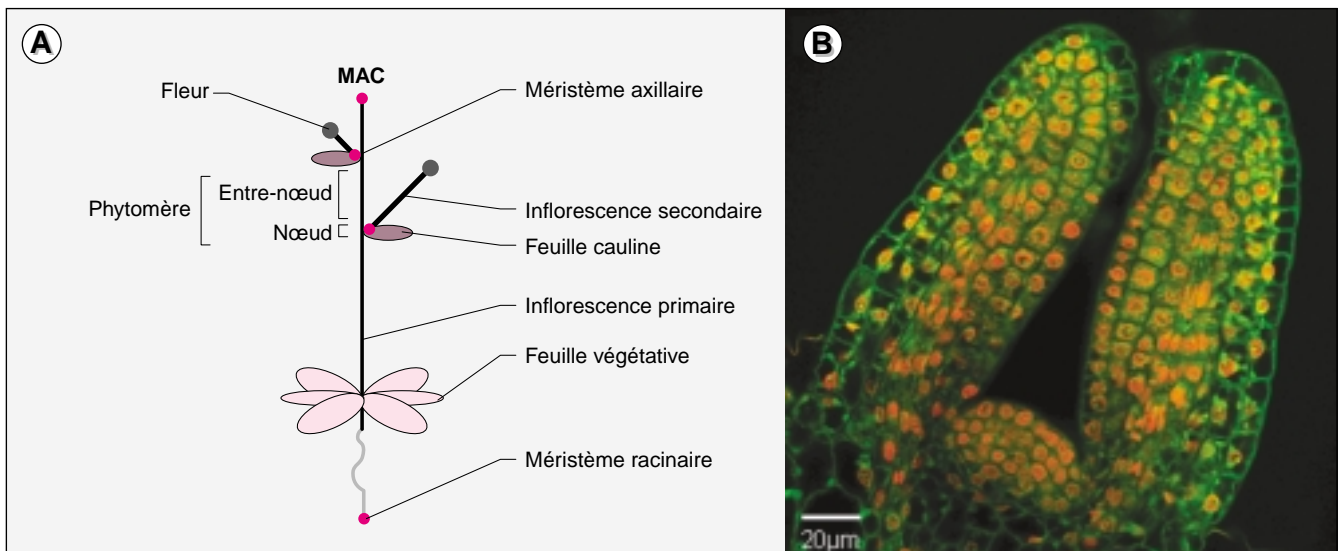


Figure 1. **A. Représentation schématique de l'architecture d'*Arabidopsis thaliana*. Le méristème apical caulinaire (MAC) produit toute la partie aérienne de la plante, tandis que le méristème apical racinaire donne naissance à l'appareil racinaire.** Le MAC végétatif, formé au cours de l'embryogenèse, produit des feuilles végétatives. Lors de la transition florale, le MAC végétatif devient un méristème d'inflorescence, produisant des feuilles modifiées, ou feuilles caulines, et des fleurs. La partie aérienne de la plante mature est constituée d'unités séquentielles appelées phytomères. Un phytomère comporte une feuille, portant éventuellement à son aisselle un méristème axillaire, l'ensemble constituant le nœud, soutenu par une portion de tige, appelée l'entre-nœud. **B. Visualisation en microscopie confocale du méristème apical végétatif d'une plantule d'*Arabidopsis* au stade 6 jours après germination.** Les deux premiers primordiums foliaires sont visibles. Un double marquage iodure de propidium/rhodamine 123 a été utilisé, colorant respectivement les noyaux en rouge et le cytoplasme des cellules en vert.

l'autre. Le méristème des angiospermes* a été plus particulièrement étudié (pour revue [1]).

Tous les méristèmes apicaux des végétaux supérieurs sont pluricellulaires. Cependant, au sein du MAC, ces cellules, qui constituent les unités de base construisant le méristème, ne fonctionnent pas de façon autonome. Elles sont organisées en des domaines multicellulaires permettant le fonctionnement du MAC comme un ensemble coordonné. Ces domaines sont distincts au niveau cytologique et représentent des unités fonctionnelles. Les connaissances issues des approches génétiques, menées au cours de la dernière décennie principalement chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, ont révélé une partie des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'organisation du MAC. Ces connaissances, associées aux approches biochimiques et cellulaires, ont établi les premières bases de la compréhens-

sion de l'intégration des processus cellulaires au sein du méristème.

Organisation des cellules méristématiques

Des analyses cytologiques classiques ont permis de mettre en évidence plusieurs modèles d'organisation cellulaire au sein du méristème.

Tout d'abord, l'observation microscopique de coupes longitudinales du MAC des Angiospermes révèle l'existence de plusieurs assises cellulaires distinctes. L'assise externe, appelée *tunica*, est formée et maintenue par l'orientation anticlinale (perpendiculaire à la surface du méristème) invariable des plans de division. La *tunica* entoure un ensemble de cellules plus interne, appelé *corpus*, qui ne présentent pas de plans de division préférentiels [2]. Chez les dicotylédones, comme *Arabidopsis*, la *tunica* se compose de deux assises cellulaires, L1 et L2, entourant le *corpus* (figure 2). L'assise L2 peut à son tour être composée de plusieurs assises, en fonction du stade de développement.

A cette stratification horizontale du MAC se superpose une organisation radiale. Trois domaines, ou zones,

ont été définis sur la base de critères cytologiques, tels que la taille cellulaire, la densité cytoplasmique et le taux de prolifération cellulaire: il s'agit de la zone centrale (ZC), de la zone périphérique (ZP) et de la zone médullaire (ZM) (figure 2). La ZC occupe le sommet du méristème et s'étend en profondeur sur une partie de la *tunica* et du *corpus*. Elle est entourée par la ZP où naissent les primordiums. Les cellules de la ZP, chez de nombreuses espèces, sont plus petites, moins vacuolisées et se divisent généralement plus rapidement que celles de la ZC. Les différences observées dans la durée du cycle cellulaire peuvent varier significativement d'une espèce à l'autre: ainsi, chez le riz, les cellules de la périphérie du méristème se divisent huit fois plus vite que celles du centre, alors que chez le pois, ce rapport varie entre 1,2 et 2,4 [3, 4]. Chez *Arabidopsis*, sur la base de ce critère cytologique, une zone centrale relativement précise a pu être définie au sein du MAC d'inflorescence [5]. Sous-jacente à la ZC et à la ZP, la ZM constitue la base du méristème et est composée de cellules plus grandes, organisées en files, qui produisent les parties internes de la tige.

D'autres études de cytologie ont analysé les régions du méristème où sont mis en place les primordiums. Le début de la formation d'une feuille s'accompagne de modifications des taux et de l'orientation des divisions et de la croissance cellulaires au sein d'un groupe de cellules de la ZP. Chez la plupart des espèces étudiées, y compris *Arabidopsis*, le taux de division augmente dans le secteur du futur primordia par rapport aux régions situées aux alentours de la ZP [5]. De plus, la formation du primordium débute avec une augmentation de la fréquence des divisions périclines (parallèles à la surface du méristème) dans les assises supérieures, comme cela a été observé chez le pois [6]. Simultanément, on observe une expansion polarisée des cellules dans l'axe de développement de la future feuille [7].

L'ensemble de ces données classiques de cytologie montre que le MAC est une structure hautement organisée, et suggère un modèle selon lequel les différentes zones définies correspondent aux deux

* *Angiospermes* (du grec angeion, vase, boîte, et sperma, graine): sous-branchement de plantes phanérogames dont les graines sont enfermées dans un fruit, comprenant près de 300 000 espèces (les angiospermes se divisent en monocotylédones et dicotylédones).

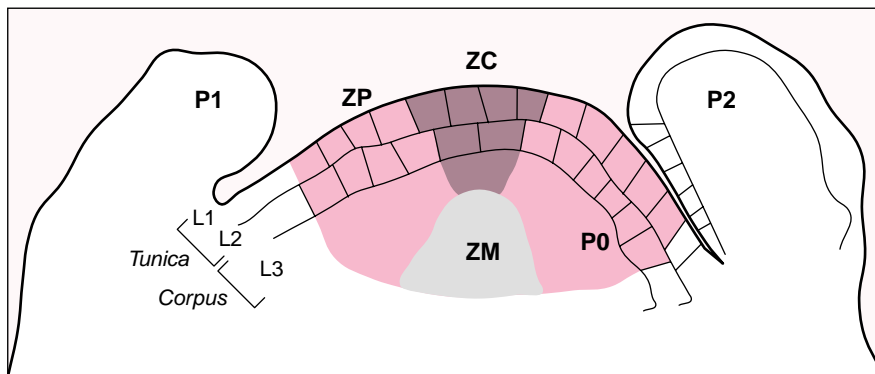


Figure 2. Description histologique de l'organisation du méristème apical. Les assises externes, L1 et L2, formant la tunica, sont caractérisées par l'orientation anticlinale (perpendiculaire à la surface du méristème) des plans de division. Les assises sous-jacentes, L3, ou corpus, ne présentent pas de plans de division préférentiels. Trois domaines, ou zones, ont été définis sur la base de critères cytologiques, tels que la taille cellulaire, la densité cytoplasmique et le taux de prolifération cellulaire: la zone centrale (ZC) contient les cellules souches assurant le maintien du méristème, la zone périphérique (ZP) est composée de cellules plus petites et se divisant plus rapidement, permettant l'initiation des primordiums d'organes. La formation du futur primordium (P0) débute avec une augmentation de la fréquence des divisions périclines (parallèles à la surface du méristème) dans l'assise L2. La zone médullaire (ZM) comporte des cellules plus grandes, allongées, et produit les tissus internes de la tige. P1, P2: primordiums.

fonctions principales du méristème : mise en place des organes latéraux dans la zone périphérique, et auto-maintenance du méristème par l'activité de la zone centrale. Au cours des dix dernières années, les fonctions distinctes suggérées par les observations cytologiques des différentes zones ont pu être confirmées et élaborées, grâce à différentes approches. En particulier, principalement chez *Arabidopsis*, grâce à l'analyse de différents mutants affectés dans la mise en place et l'organisation du MAC, couplée à l'étude des profils d'expression des gènes isolés correspondants au sein du méristème.

Maintien du méristème

Plusieurs classes de gènes à homéodomaines, codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la définition et le développement du plan de base du corps chez de nombreux organismes multicellulaires, sont impliqués dans le fonctionnement du MAC. La famille des gènes *knotted* a été initialement identifiée chez le maïs. Le premier membre isolé, le gène *knotted 1* (*kn1*), s'exprime dans tout le méristème et son expression disparaît lorsque les cellules entrent dans la formation d'un primordium (figure 3). Chez les

mutants *kn1*, le nombre de branches est réduit, alors qu'il y a plus d'organes déterminés que chez le sauvage, ce qui suggère un rôle du gène *kn1* dans le maintien du MAC [8]. Les mutants dominants *kn1*, qui expriment de façon ectopique la protéine à homéodomaine dans les feuilles, présentent des feuilles anormales formant des nœuds (*knots*) de cellules surnuméraires autour des nervures. Ceci confirme l'idée d'un rôle de la protéine *kn1* dans la persistance des cellules à l'état méristématique [9].

Les mutations dans le gène *shootmeristemless* (*stm*), membre de la famille des gènes *knotted* chez *Arabidopsis*, entraînent une incapacité à développer un méristème fonctionnel au cours de l'embryogenèse [10]. La protéine STM, comme KN1, est présente dans les méristèmes végétatifs et d'inflorescence, ainsi que dans les méristèmes floraux, mais elle est absente des primordiums d'organes. Au cours de l'embryogenèse, le gène *stm* s'exprime très précocement dans les cellules apicales de l'embryon, puis est progressivement exclu des cotylédons (feuilles embryonnaires) en formation [11]. Ce profil d'expression, ainsi que le phénotype des mutants *stm*, suggèrent un rôle de ce gène dans la mise en place du

MAC au cours de l'embryogenèse. Cependant, les plantes portant des allèles forts *stm* sont capables de mettre en place des organes (cotylédons, feuilles) bien qu'en nombre très réduit, et conserveraient donc une activité méristématique résiduelle. Une hypothèse alternative pourrait être que les mutants *stm* sont capables de mettre en place un MAC, mais n'ont pas la capacité de le maintenir. Le gène *stm*, de même que *kn1*, serait donc nécessaire pour maintenir les cellules à l'état méristématique. Il existe au moins neuf gènes de la famille des gènes *knotted* chez *Arabidopsis*: il s'agit des gènes *knat* (*knotted Arabidopsis thaliana*) 1 à 5, de *stm* et d'au moins trois autres gènes, présents dans les bases de données génomiques. Parmi ces gènes, *knat1*, *knat2* et *stm* sont exprimés dans le MAC, dans des domaines distincts mais chevauchants. *Knat1* s'exprime selon un profil proche de celui de *stm* [13], alors que *knat2* est présent dans l'assise L3 uniquement, et s'étend dans les parties plus internes de l'apex couvrant la ZM [14]. Aucun mutant de type « perte de fonction » des gènes *knat1* et *knat2* n'a été décrit. Cependant, la surexpression du gène *knat1*, sous le contrôle d'un promoteur constitutif, induit la formation de lobes et de

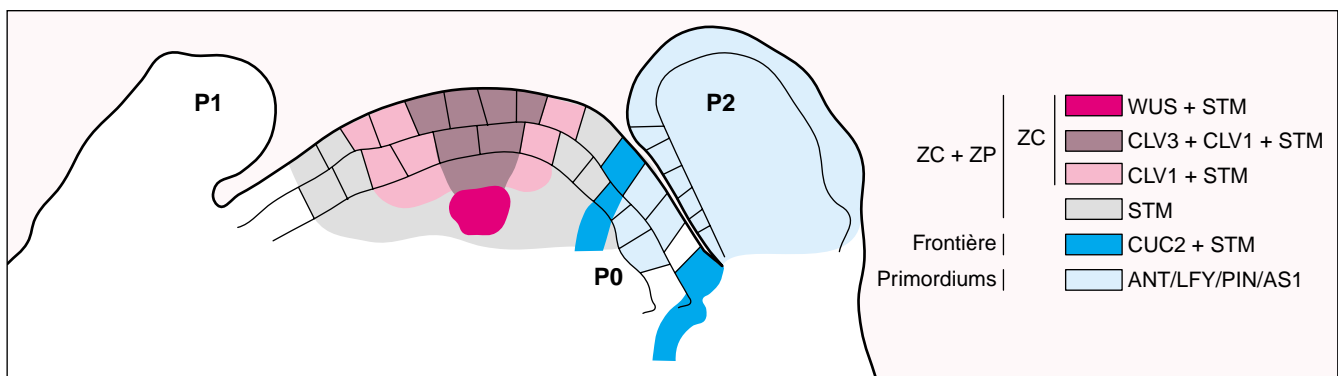


Figure 3. **Profils d'expression des principaux gènes contrôlant le fonctionnement du MAC.** Les profils d'expression transcriptionnelle représentés sont fondés sur les données d'hybridation in situ obtenues sur le MAC d'*Arabidopsis*. Le gène *shootmeristemless* (*stm*) s'exprime dans tout le domaine méristématique, à l'exception des sites de démarrage de la formation des primordiums. Les transcrits du gène *clavata 3* (*clv3*) sont détectés dans un petit groupe de cellules au sommet du méristème coïncidant probablement avec la ZC définie à partir de critères cytologiques. *clv1* s'exprime dans un large domaine central, entourant le domaine *clv3*. Le gène *wuschel* (*wus*) s'exprime dans un ensemble restreint de cellules sous-jacent au domaine *clv3*. La frontière entre le méristème et les primordiums est définie par la présence des transcrits du gène *cupshapedcotyledons 2* (*cuc2*). L'ensemble de ces domaines d'expression est inclus dans le domaine STM. Plusieurs gènes s'exprimant spécifiquement dans les primordiums ont été décrits chez *Arabidopsis*: *aintagumenta* (*ant*), *leafy* (*lfy*), *pin-formed* (*pin*) et *asymmetric leaves* (*as1*). Les gènes *phantastica* (*phan*) chez *Anthirrinum*, et son homologue *roughsheath 2* (*rs2*) chez le maïs, présentent un profil d'expression similaire. ZC: zone centrale; ZP: zone périphérique.

folioles sur les feuilles, ainsi que celle de tiges ectopiques, suggérant que le gène *knot1* est suffisant pour la mise en place de méristèmes [15].

Le gène *wuschel* définit une autre classe de gènes à homéodomains impliqués dans le fonctionnement du MAC. Chez les mutants correspondants *wus*, un MAC peut être mis en place, mais le méristème se termine précocement, après avoir formé quelques organes. De nouveaux méristèmes sont produits continuellement, mais aboutissent à des structures anormales. La fonctionnalité de la zone centrale du MAC n'est pas maintenue puisque la mise en place de primordiums a lieu fréquemment en position centrale, « consommant » les cellules méristématiques. Des fleurs sont produites, mais elles présentent un nombre réduit d'organes et se terminent précocement en une étamine centrale [16]. Au sein du MAC, les transcrits du gène *wus* sont détectés dans un petit groupe central de cellules, en dessous des trois assises cellulaires externes, constituant probablement la base de la ZC (figure 3). Ce profil se retrouve dans les méristèmes d'inflorescence et floraux. Sur la base du profil d'expression du gène et du phénotype des mutants *wus*, il a été proposé que WUS pourrait agir comme un « centre organisateur » du MAC, maintenant l'identité des cellules souches de la zone centrale surplombant son domaine d'expression [17]. Les mutants *clavata* 1, 2 et 3 (*clv1,2,3*) correspondent à l'inactivation de trois locus indépendants. Ils ont cependant un phénotype très similaire, qui suggère un rôle antagoniste de celui proposé pour les gènes *stm* et *wus*. En effet, les mutants *clv* sont caractérisés par la présence d'un méristème agrandi dès l'embryogénèse. La taille du méristème s'accroît graduellement au cours du développement, produisant plus de feuilles végétatives, puis donnant naissance à des tiges élargies. Celles-ci produisent des fleurs présentant également une augmentation du nombre d'organes [18]. Les doubles mutants *clv1 clv3* sont identiques aux simples mutants, ce qui suggère un rôle commun de ces deux gènes dans la même voie de transduction. Les mutants *clv2* ont un phénotype similaire à celui des allèles faibles *clv1* et

clv3, et l'analyse des doubles mutants a montré que le gène *clv2* agit également dans la voie *clv1/clv3* [19].

Le gène *clv1* code pour un récepteur à activité kinase, et est exprimé dans un large domaine du méristème comprenant le corpus et probablement l'assise L2 (figure 3 [20]). Le gène *clv3* code pour un petit peptide sécrété et est exprimé dans un domaine restreint au sommet du méristème, qui pourrait correspondre à la ZC définie à partir de critères cytologiques (figure 3 [21]). Le gène *clv2*, qui code également pour un récepteur membranaire, serait associé à *clv1* [22]. Ces protéines, associées à d'autres partenaires, font partie d'une même voie de signalisation contrôlant la taille du méristème. Des études biochimiques ont suggéré que la protéine *clv3* serait un ligand extracellulaire de *clv1*, sa liaison permettant l'interaction du complexe *clv1/clv2* avec les autres protéines du complexe actif, telles que la protéine phosphatase Kapp [23] et la protéine

GTPase Rho, qui relayeraient et contrôleraient la transmission du signal à des protéines cibles [24].

L'une des cibles potentielles, directe ou indirecte, de la voie définie par les gènes *clavata* pourrait être la protéine à homéodomaine *wus*. En effet, les mutations du gène *wus* sont épistatiques sur *clv*, ce qui indique que *wus* agit en amont de *clv* dans le contrôle de la taille du méristème [16]. D'autres arguments sont en faveur de cette hypothèse, et démontrent en outre l'existence d'un système de rétro-contrôle entre *clv3* et *wus*. En effet, l'expression artificielle de *wus* dans les primordiums (sous le contrôle du promoteur d'un gène spécifique des primordiums, le gène *ANT*, cf. ci-dessous) est suffisante pour induire l'expression de *clv3*, entraînant la formation d'un domaine méristématique ectopique. Par ailleurs, le domaine d'expression de *wus* est agrandi et étendu aux assises externes dans les méristèmes mutants *clv*, ce qui suggère l'existence d'un contrôle négatif de *wus* par *clv*

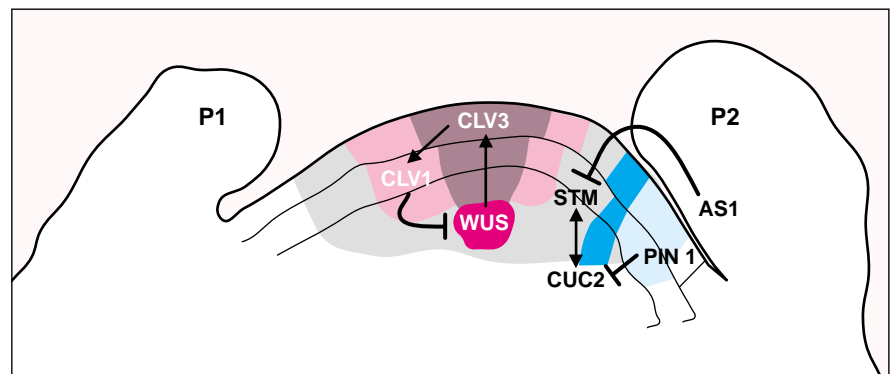


Figure 4. Un modèle de fonctionnement du méristème apical. Dans le méristème apical d'Arabidopsis, les gènes *stm*, *wus* et *clv* contrôlent la persistance et la taille du MAC. *Stm* serait nécessaire pour maintenir les cellules à l'état méristématique. Parmi ces cellules méristématiques, les cellules de la ZC produisent la protéine signal *clv3*. *Clv3* active le complexe récepteur membranaire *clv1/clv2* dans les cellules alentour, correspondant au domaine d'expression *clv1*. La transmission du signal via la voie CLV limite l'activité *wus* en restreignant son expression à un petit groupe de cellules sous-jacentes à la ZC. Simultanément, WUS représente une voie positive activant ou maintenant l'expression de *clv3*. La mise en place des primordiums nécessiterait l'inactivation du gène *stm*. Le gène de type myb *as1* est un bon candidat pour réaliser cette inactivation. Au sein de la région de démarrage de la formation des organes, les cellules peuvent appartenir à deux domaines distincts : les primordiums et les frontières entre les primordiums. Les gènes s'expriment spécifiquement dans les primordiums, tels *ant*, *lfy*, permettent leur émergence, tandis que les gènes tels *cuc2*, *ufo* s'expriment à la frontière des organes, inhibent la croissance à ce niveau. Le gène *pin1*, permettant un flux entrant local d'auxine au niveau du primordium émergent, agirait simultanément sur ces deux identités en activant la croissance de l'organe et en inhibant l'identité « frontière ».

[25]. En outre, des plantes transgéniques qui surexpriment le gène *clv3* de manière constitutive, présentent un phénotype similaire aux mutants *wus*, et n'expriment plus *wus* dans le méristème [26]. Combinées aux profils d'expression de ces différents gènes dans le méristème apical, ces données ont conduit à la proposition d'un modèle de contrôle de la taille de la population des cellules souches du méristème (figure 4). Dans le méristème apical d'*Arabidopsis*, les cellules souches de la ZC produisent la protéine signal *clv3*. Celle-ci active le complexe récepteur membranaire *clv1/clv2* dans les cellules environnantes, correspondant au domaine d'expression de *clv1*. La transmission du signal via la voie *clv* limite l'activité de *wus*, en restreignant son expression à un petit groupe de cellules sous-jacentes à la ZC. Simultanément, *wus* représente une voie positive, en activant ou en maintenant l'expression de *clv3*. Cette modulation mutuelle, qui implique des interactions positives et négatives, fournit un système de contrôle subtil de la taille du méristème. Les interactions de la voie *clv* avec le gène *stm* ont également été étudiées. Au cours du développement post-embryonnaire, les allèles faibles *clv* et *stm* agissent comme des suppresseurs mutuels. En effet, un phénotype intermédiaire est observé lors de leur inactivation [27], ce qui suggère que les deux gènes agissent indépendamment et de façon opposée, sur un processus commun, celui de la persistance du méristème. De même, les allèles sévères *stm* sont épistatiques sur les mutations *wus*, qui aggravent les phénotypes des allèles *stm* intermédiaires et faibles, conduisant ainsi à une absence de méristème embryonnaire. *stm* agit donc à un niveau de contrôle différent de celui de *wus* [28]. Parmi l'ensemble des cellules exprimant le gène *stm* (c'est-à-dire l'ensemble des cellules constituant la ZC et la ZP), la boucle de contrôle *wus/clv* coordonnerait l'activité des cellules de la ZC (figure 4).

Mise en place des organes latéraux

Au sein du méristème, les cellules se divisent perpétuellement, et les cellules filles nouvellement produites

sont intégrées dans les primordiums d'organes à la périphérie du méristème. Tandis que les gènes *stm*, *wus* et *clv* contrôlent la persistance et la taille du MAC, un autre réseau de gènes contrôle la répartition de ces cellules en organes latéraux. Une série de processus interdépendants interviennent dans la formation des organes : recrutement des cellules dans les primordiums, croissance de l'organe, séparation des organes et détermination de leur identité. Il est toutefois difficile de définir la succession exacte de ces événements au cours du développement d'un organe.

L'un des premiers processus observé est la séparation du méristème d'un groupe de cellules destinées à former un primordium. Différents gènes ont été impliqués dans cette première étape. Un évènement précoce est l'inactivation des gènes *kn1/stm* dans les cellules initiales du primordium. Les facteurs de transcription de type myb, *asymmetric leaves 1 (asl)* chez *Arabidopsis*, et leurs orthologues *rough sheath 2 (rs2)* chez le maïs, et *phantastica (phan)* chez *Antirrhinum majus*, présentent un profil d'expression complémentaire à celui de *kn1/stm*. Ces gènes sont exprimés spécifiquement dans les cellules qui donneront les futurs primordiums, et seraient nécessaires à l'inactivation de *kn1/stm* puisque ces gènes s'expriment de façon ectopique dans les primordiums chez les mutants *asl*, *rs2* et *phan* [29-31].

Un autre marqueur très précoce de la formation des primordiums est représenté par l'expression du gène *aintegumenta (ANT)* associé à la croissance et au maintien de la prolifération des cellules initiales du primordium. La protéine *ant* est un facteur de transcription potentiel, exprimée dans les primordiums des organes latéraux. Les mutants *ant* sont sévèrement affectés dans le développement floral et celui de la graine, et présentent, entre autres phénotypes, une réduction de la taille et du nombre des organes floraux. Au cours du développement végétatif, la mutation *ant* entraîne une réduction de la taille des feuilles, due à la présence d'un nombre réduit de cellules. De plus, la surexpression de *ant*, sous le contrôle d'un promoteur constitutif, entraîne une augmentation de la taille des feuilles, confirmant l'importance

du gène *ant* dans le contrôle de la croissance et donc de la taille des organes latéraux [32]. De même, le facteur de transcription leafy chez *Arabidopsis* (ou son orthologue floricaula chez *Antirrhinum*), qui joue un rôle prépondérant dans la mise en place de l'identité du méristème d'inflorescence, est exprimé précocement dans tous les primordiums d'organes [33].

Séparation des organes

La mise en place d'un primordium implique également la définition de ses frontières, conduisant à la formation d'organes distincts les uns des autres. Plusieurs gènes sont impliqués dans ce processus.

Les mutations dans les gènes *unusual flower organ (ufo)* d'*Arabidopsis* et dans son orthologue *fimbriata (fim)* chez *Antirrhinum*, affectent la séparation des organes, entraînant la formation d'organes floraux fusionnés et chimériques. Ces gènes codent pour des protéines « f-box ». Les protéines de cette famille sont impliquées dans la protéolyse de protéines-cibles via la voie de l'ubiquitine, et elles sont, dans certains cas, associées au contrôle de la prolifération cellulaire. Ces gènes s'expriment dans les méristèmes végétatifs et d'inflorescence, mais aussi à la frontière entre les organes floraux, ce qui confirme leur fonction dans la mise en place des zones de frontières entre les organes et le méristème [33].

Chez les doubles mutants *cup shaped cotyledons 1,2 (cuc1 cuc2)*, il existe une fusion des cotylédons qui forment une coupe entourant le méristème apical. Les simples mutants *1* et *2 (cuc1, 2)* n'ont en revanche pratiquement pas de phénotype apparent, probablement en raison d'une redondance entre les gènes *cuc1* et *cuc2*. Au cours du développement de ces doubles mutants *cuc1 cuc2*, des fusions d'organes sont également observées. Le gène *cuc2* a été cloné, il est homologue au gène *no apical meristem (nam)*, identifié à l'origine chez le Pétunia, chez lequel il est nécessaire pour la mise en place du MAC au cours de l'embryogenèse. Plusieurs membres de cette famille de gènes, appelés les gènes *nac*, ont été isolés chez *Arabidopsis*, et coderaient pour des facteurs de transcription. Les gènes *cuc2* et *nam* présen-

tent un profil d'expression similaire : les transcrits correspondants sont détectés dans une zone séparant les cotylédons dans l'embryon et aux frontières de tous les organes aériens (figure 3), ce qui confirme l'hypothèse de leur fonction de suppresseurs de la croissance à la frontière des organes. *stm* interagirait avec le gène *cuc2*, puisqu'il est nécessaire à l'expression spatiale correcte de *cuc2* et que la fonction de *cuc* est requise pour l'expression de *stm* [34].

Les gènes *pin-formed 1* (*pin1*) et *pinoid* (*pid*) sont impliqués à la fois dans la mise en place et la séparation des organes tout au long du développement. Au cours des phases embryonnaires et végétatives, la perte de la fonction *pin* entraîne une réduction du nombre de cotylédons et de feuilles produits. Les effets des mutations *pid* sont moins drastiques au cours du développement végétatif. Après la floraison, ces deux mutations conduisent à la formation d'une inflorescence nue, ne produisant qu'occasionnellement des fleurs, qui présentent alors des organes fusionnés. Le gène *pin* appartient à une famille multigénique, qui coderait pour des protéines transmembranaires. Le gène *pid* code pour une protéine présentant une activité sérine/thréonine kinase. Ces deux gènes ont été associés aux mécanismes d'action de l'hormone végétale auxine, suggérant ainsi un rôle prépondérant de cette hormone dans l'émergence des primordiums. Chez le mutant *pin1*, les marqueurs des primordiums d'organes, tel que *lfy*, et des frontières entre les organes, tel que *cuc2*, ne présentent plus un profil d'expression spécifique. Ils s'expriment alors tous deux dans un domaine en anneau entourant le méristème, dont les cellules possèdent donc une identité hybride, à la fois « frontière » et « primordiums ». Le gène *pin* est exprimé fortement dans les organes latéraux, confirmant son rôle supposé dans la mise en place des organes. Le rôle du gène *pin1* serait donc d'inhiber *cuc2* dans les primordiums pour permettre la croissance des organes [35].

L'identité des organes latéraux produits par les méristèmes varie au cours du développement. Au cours des phases végétatives et reproduc-

tives, différents types de feuilles sont produites. Il en est de même au niveau des fleurs, qui possèdent quatre types d'organes. Les mécanismes physiologiques et génétiques mis en jeu dans le contrôle de l'identité des organes ont été largement étudiés, principalement en ce qui concerne le développement floral (pour revue, voir [36]) et ne seront pas abordés dans cette article.

Intégration des cellules dans le méristème

Tout en conservant une organisation stricte, le MAC présente une stabilité remarquable, illustrée par l'âge que peuvent atteindre certains arbres. Cependant, cette stabilité est réalisée par un ensemble dynamique de cellules, qui se renouvellent de façon continue tout en assurant la différenciation des organes. Quels sont les mécanismes intégrant les différents comportements cellulaires, à la fois dans les domaines fonctionnels distincts composant le méristème, et entre eux ?

Selon l'une des hypothèses permettant d'expliquer la mise en place d'un contrôle spatial constant de la différenciation, le devenir d'une cellule est déterminé par son origine clonale. L'organisation en assises du méristème apical suggérerait l'intervention d'un tel mécanisme. Cependant, l'analyse de chimères périnclines (c'est-à-dire de plantes comportant des assises dont les cellules diffèrent entre elles pour un ou plusieurs marqueurs visibles : ploïdie, albinisme...), indique que l'origine clonale n'a que peu d'importance. En effet, des divisions d'orientation anormale ont parfois lieu au sein d'une assise, l'une des cellules filles se retrouvant alors dans l'assise voisine. Les cellules ainsi « déplacées » vont adopter l'identité liée à leur nouvelle position [37]. Une deuxième hypothèse, suggérée par ces observations, serait que l'identité cellulaire est acquise en fonction de la position de la cellule dans l'organe. Ceci suppose que les cellules peuvent ajuster leur comportement en fonction des cellules voisines, nécessitant donc un comportement collectif constant, malgré des variations au niveau des cellules individuelles. Des expériences d'ablation cellulaire, réalisées en microscopie

confocale dans le méristème racinaire d'*Arabidopsis*, ont permis de montrer l'importance des signaux positionnels dans l'établissement des profils de différenciation, et l'origine de ces signaux. En effet, l'identité des descendants des cellules méristématiques nécessite la présence de cellules adjacentes déjà différenciées. Les informations positionnelles proviennent donc des tissus proximaux plus matures [38].

Les cellules méristématiques, comme la plupart des cellules végétales, sont connectées par des canaux cytoplasmiques spécialisés, les plasmodesmes. La continuité symplasmique existant entre des cellules voisines permet la mise en place de domaines multicellulaires, ou « champs symplasmiques », au sein desquels le comportement cellulaire est coordonné. La microinjection de marqueurs fluorescents dans des méristèmes d'Iris a permis de mettre en évidence l'existence de différents champs symplasmiques [39]. Les cellules de la périphérie du méristème sont connectées entre elles, formant un champ séparé de la région centrale. Ceci pourrait correspondre à la zonation histologique du méristème décrite précédemment. En outre, au sein de la région centrale, les cellules de la *tunica* sont séparées du domaine symplasmique formé par le *corpus*. Les champs symplasmiques sont dynamiques et des connexions transitoires peuvent s'établir. Certains régulateurs du méristème peuvent transiter de cellule à cellule *via* les plasmodesmes, déterminant le comportement de cellules distantes ou voisines n'exprimant pas ces régulateurs. Par exemple, chez le maïs, le gène *knotted* s'exprime dans tout le dôme méristématique à l'exception de l'assise L1. La protéine kn1 est en revanche détectée dans l'ensemble des assises. Le transport de la protéine kn1 a été étudié en microinjectant la protéine marquée par des anticorps fluorescents, dans des cellules de mésophylle foliaire [40]. Dans ce cas, la protéine kn1 est capable de se déplacer vers les cellules situées aux alentours du système vasculaire et du mésophylle. De nombreux autres régulateurs du méristème présentent une activité qui ne serait pas autonome par rapport à la cellule, comme le gène d'identité florale *flo*

d'*Antirrhinum* – orthologue de LFY d'*Arabidopsis* –, qui pourrait faire intervenir un transport de ces protéines *via* les plasmodesmes [41]. De même que dans les systèmes animaux, la matrice extracellulaire chez les végétaux semble également intervenir dans la mise en place et le maintien de la différenciation cellulaire. Les différents signaux de développement transitant par l'apoplasme peuvent passer à l'intérieur des cellules, sans toutefois emprunter la voie des plasmodesmes, ce qui implique un contrôle membranaire du transport. Cela a été proposé pour le transport de l'auxine par les protéines membranaires pin, par exemple [35]. Les signaux extracellulaires peuvent également interagir avec des composants de la surface cellulaire, comme les récepteurs membranaires. Ce dernier cas est illustré par la voie de signalisation impliquant les gènes *clavata* (*clv*) décrits précédemment, qui contrôlent la taille du méristème. Ainsi, des signaux de différente nature, ARN messagers, protéines, hormones, transitent par les voies de communication symplasmiques et apoplasmiques, et permettraient l'intégration des cellules en une unité fonctionnelle dans le méristème apical.

Conclusions

Nous avons présenté les principales données génétiques, biochimiques et cellulaires qui décrivent l'organisation et le fonctionnement du méristème apical. Des facteurs spécifiques des différents domaines du méristème, ainsi que les premiers éléments de leurs interactions (*figure 4*) ont été identifiés. En outre, l'importance des communications intercellulaires, nécessaires au maintien d'une structure méristématique organisée, a été mise en évidence. Ces réseaux fonctionnels, relayés par différents signaux, doivent interagir avec les mécanismes impliqués dans la morphogenèse cellulaire, comme le montrent la modulation spatiale (et temporelle) fine de la prolifération et de l'expansion des cellules observée par l'analyse histologique classique du méristème et des primordiums. Cette question des conséquences du comportement cellulaire sur le comporte-

ment du méristème, et plus généralement sur le développement de l'organisme, est au centre des recherches actuelles, qui visent à comprendre comment le méristème apical réalise l'état d'équilibre dynamique que nous avons décrit ici ■

Remerciements

Les auteurs remercient Richard Berthomme, Olivier Hamant et Teva Vernoux pour discussions et lecture du manuscrit, et Olivier Grandjean pour son aide en microscopie confocale.

RÉFÉRENCES

1. Steeves TA, Sussex IA. *Patterns in plant development*, 2nd ed. New York: Cambridge University Press 1989.
2. Satina S, Blakeslee AF, Avery AG. Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Am J Bot* 1940; 27: 895-905.
3. Lyndon RF. The shoot apex. In: Yeoman MM, eds. *Cell division in higher plants*. London: Academic Press, 1976.
4. Francis D, Dudits D, Inzé D. *Plant cell division*. London: Portland Press, 1998.
5. Laufs P, Grandjean O, Jonak C, Kieu K, Traas J. Cellular parameters of the shoot apical meristem in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998; 10: 1375-89.
6. Cunnigham ME, Lyndon RF. The relationship between the distribution of periclinal cell divisions in the shoot apex and leaf initiation. *Ann Bot* 1986; 57: 737-46.
7. Green PB. Surface of the shoot apex: a reinforcement-field theory for phyllotaxis. *J Cell Sci* 1985; 2 (suppl): 181-201.
8. Kerstetter RA, Laudencia-Chingcuanco D, Smith LG, Hake S. Loss-of-function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. *Development* 1997; 124: 3045-54.
9. Sinha NR, Williams RE, Hake S. Overexpression of the maize homeobox gene, *knotted1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev* 1993; 7: 787-95.
10. Barton MK, Poethig RS. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: An analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* 1993; 119: 823-31.
11. Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK. A member of the *knotted* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 1996; 379: 66-9.
12. Long JA, Barton MK. The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* 1998; 125: 3027-35.
13. Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K, Hake S. A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 1994; 6: 1859-76.
14. Dockx J. On homeobox genes and plant development. Ph.D. Thesis, University of Utrecht, 1995.
15. Chuck G, Lincoln C, Hake S. *knat1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1996; 8: 1277-89.
16. Laux T, Mayer KFX, Berger J, Jürgens G. The *wuschel* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 1996; 122: 87-96.
17. Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T. Role of *wuschel* in regulating stem cell fate in *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 1998; 95: 805-15.
18. Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM. *clavata1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 1993; 119: 397-418.
19. Kayes JM, Clark SE. *clavata2*, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* 1998; 125: 3843-51.
20. Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM. The *clavata1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 1997; 89: 575-85.
21. Fletcher JC, Simon R, Running MP, Brand U, Meyerowitz EM. Signaling of cell fate decision by *clavata3* in *Arabidopsis* shoot meristem. *Science* 1999; 123: 1911-4.
22. Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE. The *arabidopsis clavata2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *clavata1* receptor-like kinase. *Plant Cell* 1999; 1: 1925-34.
23. Williams RW, Wilson JM, Meyerowitz EM. A possible role for kinase-associated protein phosphatase in *Arabidopsis clavata1* signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10467-72.
24. Trotochaud AE, Hao T, Wu G, Yang Z, Clark SE. The *clavata1* receptor-like kinase requires *clavata3* for its assembly into a signalling complex that includes *kapp* and a Rho-related protein. *Plant Cell* 1999; 11: 393-405.
25. Schoof H, Lenhard M, Haecker H, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *clavata* and *wuschel* genes. *Cell* 2000; 100: 635-44.
26. Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *clv3* activity. *Science* 2000; 289: 617-9.
27. Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM. The *clavata* and *shoot meristemless* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 1996; 122: 1567-75.

RÉFÉRENCES

28. Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ, Laux T. The *shoot meristemless* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *wuschel* and *zwille*. *Plant J* 1996; 10: 967-79.
29. Waites R, Selvadurai HR, Oliver IR, Hudson A. The *phantastica* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* 1998; 93: 779-89.
30. Timmermans MCJ, Hudson A, Becraft PW, Nelson T. *rough sheath2*: a myb protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science* 1999; 284: 151-6.
31. Byrne ME, Barley R, Curtis M, et al. *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* 2000; 408: 967-71.
32. Mizukami Y, Fischer R. Plant organ size control: *aintegumenta* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 942-7.
33. Lee I, Wolf DS, Nilsson O, Weigel D. A *leafy* co-regulator encoded by unusual flower organs. *Curr Biol* 1997; 7: 95-104.
34. Aida M, Ishida T, Tasaka M. Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interactions among the *cup-shaped cotyledon* and *shoot meristemless* genes. *Development* 1999; 126: 1563-70.
35. Vernoux T, Kronenberger J, Grandjean O, Laufs P, Traas J. *pin-formed 1* regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development* 2000; 127: 5157-65.
36. Weigel D, Meyerowitz EM. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 1994; 78: 203-9.
37. Stewart RN, Dermen H. Flexibility in ontogeny as shown by the contribution of the shoot apical layers to leaves of periclinal chimeras. *Am J Bot* 1975; 62: 935-47.
38. Van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek P, Scheres B. Cell fate in *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 1995; 378: 62-5.
39. Rinne PLH, Van der Schoot C. Symplastic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 1998; 125: 1477-85.
40. Lucas WJ, Bouché-Pillon S, Jackson DP, et al. Selective trafficking of *knotted1* homeo-domain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* 1995; 270: 1980-4.
41. Hantke SS, Carpenter R, Coen ES. Expression of *floricaula* in single cell layers of periclinal chimeras activates downstream homeotic genes in all layers of floral meristems. *Development* 1995; 121: 27-35.

TIRÉS À PART

J. Traas.

Summary

Plant stem cells organisation and function: the shoot apical meristem in *Arabidopsis*

Shoot development in higher plants is characterised by continuous organ formation from groups of stem cells established during embryogenesis: the shoot apical meristem. The shoot meristem must maintain a central population of dividing cells and allow cell differentiation in lateral organs. The existence of distinct functional domains corresponding to these two roles has been postulated from extensive histological studies of the shoot meristem. During the last decade, genetic analysis performed in *Arabidopsis* lead to the identification of several mutants affected in the different meristem functions. Cloning and expression pattern studies of the corresponding genes have confirmed and elaborated the classical models of meristem cells organisation. Based on the meristem regulators interactions and on cell-cell communication mechanisms instrumental in meristem function, the first basis in the understanding of the dynamic of these highly ordered structures can be drawn.