

Évolution et développement de la fleur

Aurélie Vialette-Guiraud et Michiel Vandenbussche

Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, École Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon, France

Auteur correspondant : Michiel Vandenbussche, michiel.vandenbussche@ens-lyon.fr

Reçu le 22 novembre 2011

Résumé – L'apparition de la fleur des angiospermes constitue une innovation morphologique importante dans l'évolution des plantes. À travers l'étude des bases moléculaires du développement de la fleur dans différentes espèces modèles, nous proposons un aperçu des réseaux génétiques qui sous-tendent la grande diversité de morphologie florale chez les angiospermes. L'évolution de la famille des facteurs de transcription à boîte MADS semble avoir joué un rôle central dans l'apparition de cette diversité.

Mots clés : Évolution / angiospermes / fleur / *Pétunia* / gènes à boîte MADS

Abstract – Evolution and development of the flower.

The appearance of the angiosperm flower has been an important morphological innovation in plant evolution and is thought to be, at least in part, responsible for the evolutionary success of flowering plants. Through studying and comparing the molecular basis of flower development in different model species, we can gain insights into the diversification of developmental networks that underlie the vast array of angiosperm floral morphologies. Floral development is controlled by several genes among which MADS-box genes play a crucial role as homeotic genes. Indeed, the evolution of the MADS-box transcription factor family appears to have played a pivotal role in the development of flower diversity.

Key words: Evolution / angiosperms / flower / *Petunia* / MADS-box genes

Introduction

Au cours de l'évolution des plantes, de nombreuses innovations morphologiques se sont produites, en particulier le développement d'un tissu vasculaire, l'émergence de la graine et l'apparition de la fleur. Les plantes à fleurs, ou angiospermes, sont aujourd'hui le groupe de plantes le plus répandu et ce succès évolutif est, en grande partie, dû à leur structure reproductrice unique : la fleur. Les fleurs ont rendu possible le développement de l'entomogamie (pollinisation faisant intervenir les insectes) qui serait une des forces évolutives ayant conduit à leur radiation rapide. Le développement de la fleur et son évolution sont donc des sujets de recherche majeurs en biologie évolutive et développementale (« évo-dévo », voir par exemple Scutt *et al.*, 2007). En utilisant la

comparaison des processus développementaux entre différentes espèces, l'évo-dévo cherche à déterminer les liens évolutifs entre les organismes et l'évolution des processus développementaux.

Les bases moléculaires du développement de la fleur ont tout d'abord été majoritairement étudiées chez les espèces modèles *Arabidopsis thaliana* et *Antirrhinum majus* (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Coen & Meyerowitz, 1991; Ma, 1994; Davies *et al.*, 2006; Zahn *et al.*, 2006). Les recherches sur ces espèces ont rapidement montré qu'un grand nombre d'acteurs des voies du développement floral appartiennent à la famille des gènes à boîte MADS (acronyme pour les 4 gènes fondateurs de la famille : *MCM*, *AG*, *DEF*, *SRF*). Tous les facteurs de transcription à boîte MADS contiennent, au niveau ou à proximité de l'extrémité N-terminale, un domaine MADS de liaison à l'ADN

très conservé (Ma *et al.*, 1991; Riechmann *et al.*, 1996a).

Les plantes possèdent en général plus de cent gènes à boîte MADS, appartenant à des sous-familles fonctionnellement divergentes. De nombreux gènes à boîte MADS du type MIKC (*MADS-Intervening region-Keratin domain-C-region*) jouent un rôle essentiel dans la détermination du méristème floral et dans l'identité des organes floraux. Les gènes à boîte MADS étant des gènes homéotiques – des gènes qui déterminent l'identité des organes – ils sont particulièrement importants pour l'apparition d'innovations morphologiques. L'évolution de cette famille de gènes a donc certainement joué un rôle central dans la génération de l'immense diversité des morphologies florales (Rijpkema *et al.*, 2007).

L'analyse approfondie du développement floral dans différentes espèces peut nous apprendre dans quelle mesure les voies développementales contrôlant la formation des différentes structures florales se sont diversifiées ou sont conservées. Les monocotylédones *Oryza sativa* et *Zea mays*, les gymnospermes *Gnetum gnemon* et *Picea abies*, la dicotylédone *Gerbera hybrida*, membre de la famille des Astéracées, mais également, *Petunia hybrida* constituent d'autres espèces modèles pour la recherche en biologie moléculaire sur le développement de la fleur (voir par exemple Tandré *et al.*, 1995; Winter *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2003; Gerats & Vandebussche, 2005; Furutani *et al.*, 2006; Kater *et al.*, 2006; Malcomber *et al.*, 2006; Teeri *et al.*, 2006a, Whipple & Schmidt, 2006; Vasquez-Lobo *et al.*, 2007).

1 La fleur de Pétunia

Le Pétunia forme une inflorescence de type cyme et, après la transition florale, présente une croissance sympodiale (Souer *et al.*, 1998; Angenent *et al.*, 2005). À la base de chaque fleur se trouvent deux bractées, possédant chacune à leur base un méristème végétatif dormant. Une fleur sauvage de Pétunia comporte cinq sépales, cinq pétales, cinq étamines et deux carpelles arrangés en quatre verticilles concentriques zygomorphes (Knapp, 2002). Les cinq pétales sont soudés. Les filets des étamines sont partiellement fusionnés au tube formé par la corolle. Les ovules ne possèdent qu'un seul tégument (Angenent *et al.*, 1995a). Le fruit est une capsule conique contenant un nombre variable de graines selon les espèces de Pétunia (Gunn & Gaffney, 1974; Sink & Power, 1978). Les fruits matures sont entourés par un calice renflé, sécréteur, couvert de poils et composé de cinq lobes (les sépales) qui sont aussi longs ou plus longs que la capsule selon les espèces (Gunn & Gaffney, 1974). Le genre *Petunia* présente une très grande diversité

florale : la couleur des fleurs, la longueur du tube formé par les pétales et le parfum peuvent varier. Ces différences sont à mettre en relation avec des modes de pollinisation différents au sein du clade des Pétunias.

2 Études moléculaires du développement floral

Au début des années 1990, le modèle ABC du développement floral a été élaboré à partir d'études de mutants d'*Arabidopsis* et d'*Antirrhinum* (Coen & Meyerowitz, 1991), bien que, dans la première version de ce modèle chez *Antirrhinum*, la fonction A n'ait pas été décrite (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990). D'après le modèle ABC, les gènes de la fonction A seuls spécifient l'identité des sépales; les gènes des fonctions A et B contrôlent ensemble l'identité des pétales; les gènes des fonctions B et C contrôlent ensemble l'identité des étamines et le gène de la fonction C spécifie seul l'identité des carpelles. De plus, les gènes de la fonction A répriment le gène de la fonction C et inversement (Coen & Meyerowitz, 1991; Weigel & Meyerowitz, 1994). Bien que la formulation du modèle ABC ait énormément stimulé la recherche sur le développement de la fleur, le modèle classique semble aujourd'hui dépassé puisque seules les fonctions B et C apparaissent réellement conservées. Il semble donc qu'il faille considérer un modèle sans fonction A (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Davies *et al.*, 2006; Litt, 2007). De plus, au cours des quelques années qui ont suivi la formulation du modèle ABC, la recherche sur le Pétunia a conduit à étendre ce modèle en établissant une fonction D responsable de la spécification de l'identité des ovules (Angenent *et al.*, 1995b; Colombo *et al.*, 1995).

Une autre modification importante du modèle ABC a été la mise en évidence d'une sous-famille des gènes à boîtes MADS nécessaire à la formation de tous les organes floraux, les gènes de la fonction E. Les premières indications de l'existence d'une telle fonction sont venues de la recherche sur le Pétunia et la tomate (Angenent *et al.*, 1994; Pnueli *et al.*, 1994).

Au cours des années qui ont suivi, la majorité des gènes à boîte MADS de type MIKC ont été isolés et analysés fonctionnellement.

Nous avons choisi ici, non pas de donner un résumé complet de tous les travaux réalisés sur la transition florale et sur la mise en place des organes floraux chez Pétunia, mais de nous concentrer sur quelques exemples précis montrant comment l'étude du développement de la fleur de Pétunia a permis d'améliorer la compréhension de l'évolution et du développement de la fleur des eudicotylédones.

3 Deux manières de supprimer l'expression des gènes de la fonction C dans les deux verticilles du périanthé

La fonction A, chez *Arabidopsis*, est représentée par deux gènes *APETALA1* (*AP1*, un gène à boîte MADS) et *AP2* (Kunst *et al.*, 1989; Irish & Sussex, 1990; Bowman *et al.*, 1993; Jofuku *et al.*, 1994). Le mutant *ap1* présente un remplacement des sépales par des structures de type bractées à la base desquelles se développent des fleurs secondaires, ce qui montre qu'*AP1* est impliqué dans la détermination de l'identité du méristème floral (Irish & Sussex, 1990; Bowman *et al.*, 1993). À température normale, les sépales des mutants *ap2* sont remplacés par des structures de type feuille (Kunst *et al.*, 1989; Bowman *et al.*, 1993; Jofuku *et al.*, 1994), ce qui montre qu'*AP2* est également impliqué dans la détermination de l'identité du méristème floral.

Mais le gène *AP2* possède également une autre fonction très importante : il est directement impliqué dans la restriction de l'expression du gène de la fonction C *AGAMOUS* (*AG*). En effet, à des températures élevées, le mutant *ap2* présente des organes carpelloïdes au niveau du premier verticille et des organes de type étamine au niveau du deuxième verticille, ce qui indique une expression ectopique du gène de la fonction C (Bowman *et al.*, 1989; Mizukami & Ma, 1992). La répression de l'expression du gène de la fonction C par *AP2* permet donc la formation du périanthé (ensemble des sépales et pétales).

Même si on a tout d'abord considéré que l'action d'*AP2* sur les gènes de la fonction C était universelle, plusieurs données récentes sont venues contredire cette idée. Chez Pétunia, trois gènes *AP2* ont été isolés, et l'un d'eux, *PhAP2A*, est capable de compléter le phénotype du mutant *ap2-1* d'*Arabidopsis*. Cependant, les mutants *phap2a* de Pétunia ne présentent pas de phénotype mutant au niveau du développement floral (Maes *et al.*, 2001). Il a également été montré que les deux orthologues d'*AP2* d'*Antirrhinum* ne sont pas impliqués dans la régulation des gènes de la fonction C (Keck *et al.*, 2003).

Cependant des mutants présentant des caractéristiques typiques d'une expression ectopique des gènes de la fonction C étaient connus depuis longtemps, aussi bien chez Pétunia que chez *Antirrhinum* (Vallade *et al.*, 1987; Tsuchimoto *et al.*, 1993; McSteen *et al.*, 1998; Motte *et al.*, 1998). Plusieurs approches « gène candidat » infructueuses ont été tentées pour identifier la mutation qui cause la conversion des pétales en étamines chez le mutant *blind* (*bl*) de Pétunia (Kater *et al.*, 1998; Tsuchimoto *et al.*, 2000; Maes *et al.*, 2001; Mayama *et al.*, 2003). Les fleurs du mutant *bl* présentent une conversion homéotique des pointes des pétales en structures anthéroïdes

(figure 1B). Ce phénotype est très variable et, sous certaines conditions, on peut même observer une conversion de la pointe des sépales en tissu carpelloïde (Vallade *et al.*, 1987).

Le phénotype du mutant *bl* est dû à l'expression ectopique des gènes de la fonction C *PETUNIA MADS BOX GENE3* (*PMADS3*) et *FLORAL BINDING PROTEIN6* (*FBP6*) dans les deux premiers verticilles de la fleur (Tsuchimoto *et al.*, 1993; Kater *et al.*, 1998). Ceci explique également pourquoi l'expression ectopique de *PMADS3* dans des lignées transgéniques de Pétunia conduit au même phénotype que celui du mutant *bl*. En effet, elle entraîne la formation de structures anthéroïdes au niveau de l'extrémité des pétales et de tissu carpelloïde au niveau des sépales (Tsuchimoto *et al.*, 1993; Kater *et al.*, 1998).

La découverte de l'insertion d'un transposon chez le mutant *bl* a enfin permis d'aborder les causes moléculaires de son phénotype. Les mutants *bl* et les mutants *fistulata* (*fis*) d'*Antirrhinum*, qui ont des phénotypes similaires, possèdent des allèles mutés récessifs de deux gènes homologues codant pour un microARN (Cartolano *et al.*, 2007). *BL* et *FIS* codent pour un micro-ARN de la famille miR169. *miRBL* est nécessaire à la restriction de l'expression des gènes de la fonction C aux deux verticilles internes de la fleur. Cependant, la répression des gènes de la fonction C n'est pas directe puisque les transcrits de ces gènes ne possèdent pas de site de reconnaissance par miR169 où ce petit ARN pourrait se lier, conduisant ainsi au clivage du transcrit ou à l'inhibition de sa traduction. En revanche, on trouve des sites de liaison à miR169 dans les gènes de la famille NF-YA. Cartolano *et al.* (2007) proposent un modèle dans lequel *BL* entraîne une répression partielle de ces facteurs de transcription NF-YA, qui seraient potentiellement nécessaires à l'augmentation ou au maintien de l'expression des gènes de la fonction C. Ils postulent également que les gènes de la fonction C régulent en retour *miRBL*, permettant ainsi le maintien d'un niveau correct de l'expression des gènes de la fonction C dans les deux verticilles internes de la fleur. Une régulation fine de l'expression de ces gènes peut également être réalisée grâce à une boucle de régulation entre le microARN et ses cibles directes (les facteurs de transcription NF-YA, Cartolano *et al.*, 2007).

Dans les mutants *bl* et *fis*, la régulation fine de l'expression des gènes de la fonction C par le microARN est perturbée et l'expression précoce de ces gènes augmente tout d'abord dans le domaine où ils sont normalement exprimés. L'extension latérale du domaine des gènes de la fonction C résulterait de la transmission d'un excès de transcrits des gènes de la fonction C aux cellules-filles au cours des divisions cellulaires. Ceci serait renforcé par une autorégulation dépendante du seuil d'expression des gènes de la

fonction C (Cartolano *et al.*, 2007). La poursuite des recherches est nécessaire pour consolider ce modèle de la régulation des gènes de la fonction C par *miRBL* chez *Pétunia* et par *miRFIS* chez *Antirrhinum*, via les gènes NF-YA.

En tout cas, il apparaît que, chez *Arabidopsis* d'une part, et chez *Pétunia* et *Antirrhinum* d'autre part, des mécanismes indépendants qui assurent la même fonction ont évolué. Il faut noter que les éléments du module miR169-NF-YA sont aussi présents chez *Arabidopsis*, et que les éléments du module AP2-miR172 existent chez *Antirrhinum* et *Pétunia*. Il serait intéressant de déterminer si ces mécanismes complémentaires ont perdu tout ou partie de leur fonction, et/ou en ont acquis d'autres.

4 Évolution moléculaire des gènes du programme de l'identité des pétales

Une des innovations majeures de l'évolution des plantes est l'apparition des pétales qui est en lien étroit avec le développement de nouveaux mécanismes de pollinisation faisant intervenir les insectes (Crepet, 2000). Les gènes de la fonction B, qui contrôlent les programmes de l'identité des pétales et des étamines, sont représentés par *APETALA3* (*AP3*) et *PIS-TILLATA* (*PI*) chez *Arabidopsis* et par *DEFICIENS* (*DEF*) et *GLOBOSA* (*GLO*) chez *Antirrhinum*.

Les lignages *DEF/AP3* et *GLO/PI* résultent d'une duplication qui aurait eu lieu avant la diversification des angiospermes actuelles (Kim *et al.*, 2004; Hernandez-Hernandez *et al.*, 2006). Au sein des angiospermes, le lignage *DEF/AP3* a subi une autre duplication qui coïncide avec la radiation des eudicotylédones et qui a conduit à deux clades dont on peut distinguer les membres par leur domaine C-terminal (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2006). Alors que le domaine du type *paleoAP3* est rencontré dans tous les groupes d'angiospermes, le domaine *euAP3* n'a été identifié que chez les eudicotylédones. Ce dernier domaine résulterait d'une mutation *frameshift* (délétion d'un nucléotide dans le domaine ancestral de type *paleoAP3*; Vandenbussche *et al.*, 2003).

Arabidopsis et *Antirrhinum* possèdent un gène du lignage *euAP3* (*AP3* et *DEF* respectivement) et un gène de type *GLO/PI* (*PI* et *GLO* respectivement). Les simples mutants *ap3* et *pi* présentent une conversion homéotique des pétales en sépales et des étamines en carpelles. Ceci est en accord avec le fait que *PI* et *AP3* agissent uniquement sous forme d'hétérodimère (Trobner *et al.*, 1992; Goto & Meyerowitz, 1994; Jack *et al.*, 1994; Krizek & Meyerowitz, 1996a; McGonicle *et al.*, 1996; Riechmann *et al.*, 1996b; Yang *et al.*, 2003a, 2003b).

Alors que certaines eudicotylédones comme *Arabidopsis* ont perdu le gène portant le domaine du type *paleoAP3*, d'autres comme les Solanacées semblent avoir conservé à la fois le gène *paleoAP3/TM6* et le gène *euAP3* (Rijkema *et al.*, 2006). Jusqu'à présent, le *Pétunia* et la tomate sont les seules espèces chez qui les fonctions des gènes *euAP3* et *paleoAP3* (*TM6*) ont été étudiées. Des analyses fonctionnelles de ces deux gènes chez *Pétunia* (*PhDEF* et *PhTM6*) et chez la tomate (*TAP3* et *TM6*) montrent qu'ils ont des fonctions différentes (de Martino *et al.*, 2006; Rijkema *et al.*, 2006). Le *Pétunia* et la tomate possèdent également deux homologues de *GLO/PI* qui résultent d'une duplication plus récente, peut-être au sein du lignage qui a mené aux Solanacées (Hileman *et al.*, 2006; Rijkema *et al.*, 2006). Les fonctions des quatre gènes de la fonction B de *Pétunia* ont été déterminées grâce à l'utilisation de mutants d'insertion (insertion d'un transposon pour *PhGLO1*, *PhGLO2* et *PhTM6*) et d'un mutant EMS (pour *PhDEF*) ainsi qu'à l'étude de leur phénotype et des phénotypes des différentes combinaisons de doubles mutants. La figure 1 montre quelques-uns de ces phénotypes.

Les deux gènes *GLO/PI* de *Pétunia* fonctionnent de la même façon que le gène *PI* d'*Arabidopsis* et le gène *GLO* d'*Antirrhinum* (Vandenbussche *et al.*, 2004). Les deux gènes agissent de façon très largement redondante lors de la formation des pétales et des étamines, ce qui est cohérent avec leur origine probablement récente. En effet, seul le double mutant *phglo1 phglo2* présente une complète conversion des pétales en sépales et des étamines en carpelles. Cependant, l'étude détaillée des simples mutants *phglo1* fait apparaître des fonctions spécifiques de *PhGLO1*. Comme on peut le voir sur la figure 1C, les nervures centrales des pétales des mutants *phglo1* sont vertes (c'est-à-dire sépaloïdes) et les filets des étamines ne sont pas fusionnés au tube des pétales comme c'est le cas dans les fleurs sauvages de *Pétunia*. Ceci indique que *PhGLO1* seul contrôle la formation des nervures centrales des pétales et la fusion des étamines au tube formé par les pétales (Vandenbussche *et al.*, 2004). De manière cohérente avec leur fonction de gène de la classe B, les deux gènes *PhGLO* sont exprimés dans les deuxième et troisième verticilles floraux tout au long du développement floral.

L'expression de *PhDEF* est aussi majoritairement confinée aux deuxième et troisième verticilles floraux, mais de faibles niveaux d'ARN *PhDEF* sont aussi détectés dans les premier et quatrième verticilles (Angenent *et al.*, 1992; van der Krol *et al.*, 1993; Tsuchimoto *et al.*, 2000; Vandenbussche *et al.*, 2004; Rijkema *et al.*, 2006). Le mutant *phdef*, qui présente une conversion des pétales en sépales alors que les étamines ne sont pas affectées, a d'abord mené à l'hypothèse selon laquelle la fonction du gène *euAP3* du

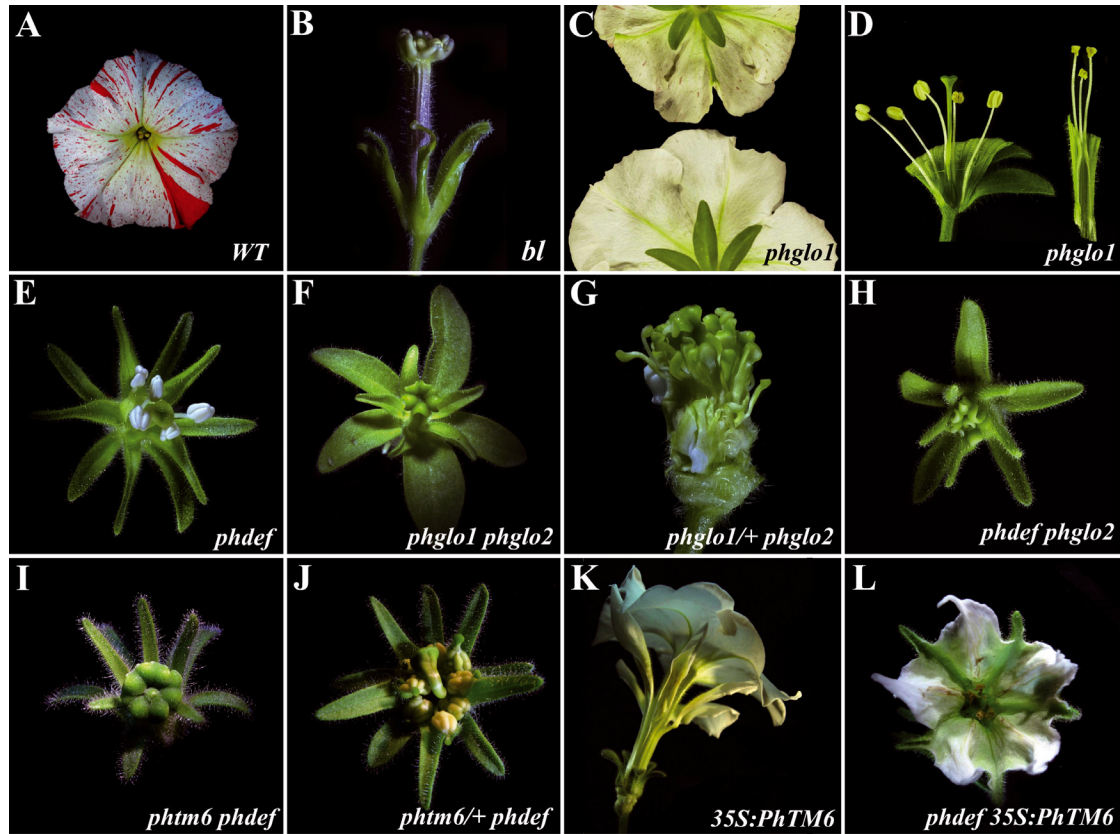


Fig. 1. Phénotypes du mutant *blind* et de différents mutants de la fonction B de *P. hybrida*.

Pétunia serait différente de celle de ses orthologues chez les autres espèces (van der Krol *et al.*, 1993; Weigel & Meyerowitz, 1994). Cependant, le double mutant *phdef phtm6* présente une totale conversion des pétales en sépales et des étamines en carpelles, ce qui montre que c'est plutôt la redondance des rôles entre *PhDEF* et *PhTM6* dans le développement des étamines qui conduit à la conversion homéotique d'un seul verticille observée dans le simple mutant *phdef* (Rijpkema *et al.*, 2006). *PhDEF* montre toutes les caractéristiques généralement associées à un gène *euAP3*, telles qu'elles ont été décrites pour *DEF* et *AP3*.

PhTM6 est surtout exprimé dans les verticilles trois et quatre tout au long du développement floral. Il est également initialement exprimé dans les *primordia* de pétales mais cette expression n'augmente pas au cours des stades plus tardifs du développement (Vandenbussche *et al.*, 2004). Le simple mutant *phtm6* produit des fleurs de type sauvage. Cependant, le phénotype du double mutant *phdef phtm6* montre que *PhTM6* remplit un rôle dans le développement des étamines, qui est redondant avec celui de *PhDEF* (Rijpkema *et al.*, 2006). De plus, il est clair, d'après

les phénotypes des simples mutants *phdef* et *phtm6* et du double mutant *phdef phtm6*, que *PhDEF* et *PhTM6* ont aussi des fonctions divergentes : le gène *euAP3 PhDEF* est impliqué dans le développement des pétales et des étamines alors que le gène *pa-leoAP3 PhTM6* est seulement impliqué dans la formation des étamines. La forte expression de *PhTM6* au cours de tout le développement des ovules suggère des fonctions supplémentaires (redondantes) dans le quatrième verticille, même si cela doit encore être étudié. Des expériences de double-hybride en levure et l'analyse du double mutant *phdef phglo2* ont mis en évidence une diversification des fonctions encore plus importante au sein des protéines de la fonction B du Pétunia (Vandenbussche *et al.*, 2004). Chez le double mutant *phdef phglo2* (figure 1H), les étamines sont remplacées par des carpelles, montrant que les deux protéines restantes de la fonction B, *PhGLO1* et *PhTM6*, sont insuffisantes pour établir d'identité d'étamine. Les expériences de double-hybride en levure montrent clairement que, même si *PhDEF* peut interagir avec *PhGLO1* et *PhGLO2*, *PhTM6*, lui, interagit spécifiquement avec *PhGLO2* et très peu (si ce n'est pas du tout) avec *PhGLO1*. L'absence

d'hétérodimères PhTM6-PhGLO1 explique l'absence d'étamines chez les doubles mutants *phdef phglo2* (Vandenbussche *et al.*, 2004).

La suppression, soit des deux *DEF/AP3*, soit des deux *GLO/PI*, conduit à une conversion complète des pétales en sépales et des étamines en carpelles. Il est cependant intéressant de noter que des combinaisons mutants-hétérozygotes comme *phtm6/+*, *phdef*; *phglo1/+*, *phglo2* ou *phglo1*, *phglo2/+* présentent des effets de dose évidents (figures 1F, 1G, 1I, 1J). De plus, les mutants *phtm6/+*, *phdef* et *phglo1/+*, *phglo2* apportent de nouvelles informations fonctionnelles, puisque chacun de ces mutants présente une perte partielle de détermination dans le troisième verticille. Dans les fleurs *phtm6/+*, *phdef*, les anthères possèdent des replis (formant ainsi une structure qui ressemble à un cerveau), dus à la prolifération de tissu anthéroïde et se terminent par une courte structure de type style ou stigmat (figure 1J). Dans les fleurs *phglo1/+*, *phglo2*, les anthères sont converties en tissu carpelloïde qui prolifère (figure 1G). La perte partielle de détermination dans le troisième verticille de ces mutants est une indication soutenant l'implication des gènes de la fonction B dans la régulation de la prolifération cellulaire et la détermination (Bowman *et al.*, 1992; Trobner *et al.*, 1992; Jack *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1995; Krizek & Meyerowitz, 1996).

La diversification fonctionnelle qui suit une duplication peut résulter d'un changement de fonction d'une protéine codée par une des copies du gène ou d'une modification de l'expression du gène correspondant. *PhDEF* et *PhTM6* présentent des patrons d'expression très différents, ce qui suggère que des changements dans les séquences régulatrices de l'expression de ces gènes ont eu lieu après la duplication qui a conduit aux lignages *TM6* et *euAP3*, au moins au cours de l'évolution du Pétunia et de la tomate. La comparaison des séquences promotrices des gènes *TM6* et *euAP3* de la tomate et du Pétunia a indiqué qu'elles contiennent des domaines conservés mais différents (Rijpkema *et al.*, 2006). Il sera intéressant d'étudier comment et quand, au cours de l'évolution, les gènes *euAP3* ont acquis leur séquence « 5' régulatrices » ou comment les gènes *TM6* l'ont perdu.

On peut également se demander si ces différences dans les promoteurs sont suffisantes pour expliquer les divergences fonctionnelles entre les gènes *PhDEF* et *PhTM6* ou si les différences entre les domaines paleoAP3 et euAP3 en particulier sont également importantes. L'approche choisie a été de surexprimer *PhTM6* dans un mutant *phdef* pour voir si la présence d'une protéine de type paleoAP3 pouvait compléter un mutant *euAP3*, *phdef* (Rijpkema *et al.*, 2006). Comme le montre la figure 1L, *PhTM6*, lorsqu'il est surexprimé, est capable de produire

des pétales et de compléter presque parfaitement le mutant *phdef*. La différence fonctionnelle entre *PhDEF* et *PhTM6* semble donc principalement due à des différences de patrons d'expression. Des expériences d'échange de promoteurs et des domaines C-terminaux permettront d'analyser plus finement l'importance de l'évolution des protéines et des promoteurs sur les différences fonctionnelles entre *PhDEF* et *PhTM6*.

5 Conclusion

Une analyse comparative du développement floral dans des espèces modèles bien positionnées phylogénétiquement peut nous apprendre comment certaines fonctions des gènes se sont développées et nous donner des informations sur le degré et le mode de diversification de la régulation du développement des fleurs chez les plantes. Le développement floral du Pétunia a été étudié dès le début des années 1990 et ces recherches ont mis en évidence des divergences surprenantes dans les mécanismes impliqués. De plus, le Pétunia est une espèce modèle idéale pour étudier l'évolution moléculaire des gènes impliqués dans les programmes d'identité des pétales. La réalisation d'une analyse fonctionnelle extensive des sous-familles de gènes à boîte MADS intéressantes chez le Pétunia et d'autres espèces modèles nous fournira certainement des données très fructueuses sur l'évolution des réseaux impliqués dans le développement des fleurs.

Références

- Angenent G.C., Busscher M., Franken J., Mol J., van Tunen A.J., Differential expression of two MADS box genes in wild-type and mutant Petunia flowers. *Plant Cell*, 1992, 4, 983–993.
- Angenent G.C., Franken J., Busscher M., Weiss D., van Tunen A.J., Co-suppression of the petunia homeotic gene *fbp2* affects the identity of the generative meristem. *Plant J*, 1994, 5, 33–44.
- Angenent G.C., Busscher M., Franken J., Dons H., van Tunen A.J., Functional interaction between the homeotic genes *FBP1* and *pMADS1* during Petunia floral organogenesis. *Plant Cell*, 1995a, 7, 507–516.
- Angenent G.C., Franken J., Busscher M., van Dijken A., van Went J.L., Dons H., van Tunen A.J., A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in Petunia. *Plant Cell*, 1995b, 7, 1569–1582.
- Angenent G.C., Stuurman J., Snowden K.C., Koes R., Use of Petunia to unravel plant meristem functioning. *Trends Plant Sci*, 2005, 10, 243–250.

- Becker A., Saedler H., Theissen G., Distinct MADS-box gene expression patterns in the reproductive cones of the gymnosperm *Gnetum gnemon*. *Dev Genes Evol*, 2003, 213, 567–572.
- Bowman J.L., Smyth D.R., Meyerowitz E.M., Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1989, 1, 37–52.
- Bowman J., Sakai H., Jack T., Weigel D., Mayer U., Meyerowitz E., SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Development*, 1992, 114, 599–615.
- Bowman J.L., Alvarez J., Weigel D., Meyerowitz E.M., Smyth D.R., Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development*, 1993, 119, 721–743.
- Cartolano M., Castillo R., Efremova N., Kuckenberg M., Zethof J., Gerats T., Schwarz-Sommer Z., Vandenbussche M., A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nat Genet*, 2007, 39, 901–905.
- Coen E.S., Meyerowitz E.M., The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353, 31–37.
- Colombo L., Franken J., Koetje E., van Went J., Dons H., Angenent G.C., van Tunen A.J., The *Petunia* MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. *Plant Cell*, 1995, 7, 1859–1868.
- Crepet W.L., Progress in understanding angiosperm history, success, and relationships: Darwin's abominably "perplexing phenomenon". *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97, 12939–12941.
- Davies B., Cartolano M., Schwarz-Sommer Z., Flower development: The *Antirrhinum* perspective. *Adv Bot Res Incorp Adv Plant Path*, 2006, 44, 278–319.
- de Martino G., Pan I., Emmanuel E., Levy A., Irish V.F., Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell*, 2006, 18, 1833–1845.
- Furutani I., Sukegawa S., Kyoizuka J., Genome-wide analysis of spatial and temporal gene expression in rice panicle development. *Plant J*, 2006, 46, 503–511.
- Gerats T., Vandenbussche M., A model system for comparative research. *Petunia*. *Trends in Plant Sci*, 2005, 10, 251–256.
- Goto K., Meyerowitz E.M., Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev*, 1994, 8, 1548–1560.
- Gunn C.R., Gaffney F.B., Seed characteristics of 42 economically important species of Solanaceae in the United States. *USDA, Technical Bulletin*, 1974, 1417, 1–33.
- Hernandez-Hernandez T., Martinez-Castilla L.P., Alvarez-Buylla E.R., Functional diversification of B MADS-box homeotic regulators of flower development: Adaptive evolution in protein-protein interaction domains after major gene duplication events. *Mol Biol Evol*, 2006, 24, 465–481.
- Hileman L.C., Sundstrom J.F., Litt A., Chen M., Shumba T., Irish V.F., Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. *Mol Biol Evol*, 2006, 23, 2245–2258.
- Irish V.F., Sussex I.M., Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell*, 1990, 2, 741–753.
- Jack T., Fox G.L., Meyerowitz E.M., *Arabidopsis* homeotic gene *APETALA3* ectopic expression: Transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell*, 1994, 76, 703–716.
- Jofuku K.D., Boer B.G.W.d., Montagu M.V., Okamoto J.K., Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 1994, 6, 1211–1225.
- Kater M.M., Colombo L., Franken J., Busscher M., Masiero S., Van Lookeren Campagne M.M., Angenent G.C., Multiple *AGAMOUS* homologs from cucumber and *Petunia* differ in their ability to induce reproductive organ fate. *Plant Cell*, 1998, 10, 171–182.
- Kater M.M., Dreni L., Colombo L., Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2006, 57, 3433–3444.
- Keck E., McSteen P., Carpenter R., Coen E., Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. *EMBO J*, 2003, 22, 1058–1066.
- Kim S., Yoo M.-J., Albert V.A., Farris J.S., Soltis P.S., Soltis D.E., Phylogeny and diversification of B-function MADS-box genes in angiosperms: Evolutionary and functional implications of a 260-million-year-old duplication. *Amer J Bot*, 2004, 91, 2102–2118.
- Knapp S., Floral diversity and evolution in the Solanaceae. In: Q.C.B. Cronk, R.M. Bateman, J.A. Hawkins (Eds.), *Developmental Genetics and Plant Evolution*, 2002, Taylor and Francis, London, UK, pp. 267–297.
- Krizek B., Meyerowitz E., The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development*, 1996, 122, 11–22.
- Kunst L., Klenz J.E., Martinez-Zapater J., Haughn G.W., *AP2* gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 1989, 1, 1195–1208.
- Litt A., An evaluation of A-Function: Evidence from the *APETALA1* and *APETALA2* gene lineages. *Inter J Plant Sci*, 2007, 168, 73–91.

- Ma H., Yanofsky M., Meyerowitz E., AGL1-AGL6, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev*, 1991, 5, 484–495.
- Ma H., The unfolding drama of flower development: Recent results from genetic and molecular analyses. *Genes Dev*, 1994, 8, 745–756.
- Maes T., Van de Steene N., Zethof J., Karimi M., D Hauw M., Mares G., Van Montagu M., Gerats T., *Petunia* *Ap2*-like genes and their role in flower and seed development. *Plant Cell*, 2001, 13, 229–244.
- Malcomber S.T., Preston J.C., Reinheimer R., Kossuth J., Kellogg E.A., Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity. *Adv Bot Res Incorpor Adv Plant Path*, 2006, 44, 425–481.
- Mayama T., Ohtstubo E., Tsuchimoto S., Isolation and expression analysis of *Petunia* *CURLY LEAF*-like genes. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44, 811–819.
- McGonigle B., Bouhidel K., Irish V.F., Nuclear localization of the *Arabidopsis* *APETALA3* and *PISTILLATA* homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes Dev*, 1996, 10, 1812–1821.
- McSteen P.C., Vincent C.A., Doyle S., Carpenter R., Coen E.S., Control of floral homeotic gene expression and organ morphogenesis in *Antirrhinum*. *Development*, 1998, 125, 2359–2369.
- Mizukami Y., Ma H., Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell*, 1992, 71, 119–131.
- Motte P., Saedler H., Schwarz-Sommer Z., *STYLOSA* and *FISTULATA*: Regulatory components of the homeotic control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *Development*, 1998, 125, 71–84.
- Pnueli L., Hareven D., Broday L., Hurwitz C., Lifschitz E., The *TM5* MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell*, 1994, 6, 175–186.
- Riechmann J., Wang M., Meyerowitz E., DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA* and *AGAMOUS*. *Nucleic Acids Res*, 1996a, 24, 3134–3141.
- Riechmann J.L., Krizek B.A., Meyerowitz E.M., Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, and *AGAMOUS*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996b, 93, 4793–4798.
- Rijkema A.S., Royaert S., Zethof J., van der Weerden G., Gerats T., Vandenbussche M., Analysis of the *Petunia* *TM6* MADS box gene reveals functional divergence within the *DEF/AP3* lineage. *Plant Cell*, 2006, 18, 1819–1832.
- Rijkema A.S., Gerats T., Vandenbussche M., Evolutionary complexity of MADS complexes. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10, 32–38.
- Sakai H., Medrano L.J., Meyerowitz E.M., Role of SUPERMAN in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature*, 1995, 378, 199–203.
- Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H., Sommer H., Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 1990, 250, 931–936.
- Scutt C.P., Theissen G., Ferrandiz C., The evolution of plant development: Past, present and future: Preface. *Ann Bot*, 2007, 100, 599–601.
- Sink K.C., Power J.B., Incongruity of interspecific and intergeneric crosses involving *Nicotiana* and *Petunia* species that exhibit potential for somatic hybridization. *Euphyt*, 1978, 27, 725–730.
- Souer E., van der Krol A., Kloos D., Spelt C., Blik M., Mol J., Koes R., Genetic control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. *Development*, 1998, 125, 733–742.
- Tandre K., Albert V., Sundås A., Engström P., Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Plant Molec Biol*, 1995, 27, 69–78.
- Teeri T.H., Elomaa P., Kotilainen M., Albert V.A., Mining plant diversity: *Gerbera* as a model system for plant developmental and biosynthetic research. *BioEssays*, 2006a, 28, 756–767.
- Trobner W., Ramirez L., Motte P., Hue I., Huijser P., Lonnig W., Saedler H., Sommer H., Schwarz-Sommer Z., *GLOBOSA*: A homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *EMBO J*, 1992, 11, 4693–4704.
- Tsuchimoto S., van der Krol A.R., Chua N.H., Ectopic expression of *pMADS3* in transgenic *Petunia* phenocopies the *Petunia* *blind* mutant. *Plant Cell*, 1993, 5, 843–853.
- Tsuchimoto S., Mayama T., van der Krol A., Ohtsubo E., The whorl-specific action of a *petunia* class B floral homeotic gene. *Genes Cells*, 2000, 5, 89–99.
- Vallade J., Maizonnier D., Cornu A., La morphogénèse florale chez le pétunia. Analyse d'un mutant à corolle staminée. *Can J Bot*, 1987, 65, 761–764.
- van der Krol A., Brunelle A., Tsuchimoto S., Chua N.-H., Functional analysis of *Petunia* floral homeotic MADS box gene *pMADS1*. *Genes Dev*, 1993, 7, 1214–1228.
- Vandenbussche M., Theissen G., Van de Peer Y., Gerats T., Structural diversification and neo-functionalization during floral MADS-box gene evolution by C-terminal frameshift mutations. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 4401–4409.
- Vandenbussche M., Zethof J., Royaert S., Weterings K., Gerats T., The duplicated B-class heterodimer model: Whorl-specific effects and complex genetic interactions

- in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell*, 2004, 16, 741–754.
- Vazquez-Lobo A., Carlsbecker A., Vergara-Silva F., Alvarez-Buylla E.R., Pinero D., Engstrom P., Characterization of the expression patterns of *LEAFY/FLORICAULA* and *NEEDLY* orthologs in female and male cones of the conifer genera *Picea*, *Podocarpus*, and *Taxus*: Implications for current evo-devo hypotheses for gymnosperms. *Evol Dev*, 2007, 9, 446–459.
- Weigel D., Meyerowitz E., The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, 1994, 78, 203–209.
- Whipple C.J., Schmidt R.J., Genetics of grass flower development. *Adv Bot Res Incomp Adv Plant Path*, 2006, 44, 385–424.
- Winter K.-U., Becker A., Munster T., Kim J.T., Saedler H., Theissen G., MADS-box genes reveal that gnephytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 7342–7347.
- Yang Y., Xiang H., Jack T., *pistillata-5*, an *Arabidopsis* B class mutant with strong defects in petal but not in stamen development. *Plant J*, 2003a, 33, 177–188.
- Yang Y., Fanning L., Jack T., The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, *APETALA3* and *PISTILLATA*. *Plant J*, 2003b, 33, 47–59.
- Zahn L.M., Feng B., Ma H., Beyond the ABC-model: Regulation of floral homeotic genes. *Adv Bot Res Incomp Adv Plant Path*, 2006, 44, 163–207.