

Réponse au manque d'oxygène dans les tissus végétaux

Philippe Raymond, Pierre Saglio, Bérénice Ricard

A lors que les végétaux, par la photosynthèse, sont à l'origine de l'oxygène moléculaire présent dans la biosphère, ils ont aussi besoin d'oxygène moléculaire pour leur fonctionnement. Les cellules des végétaux supérieurs utilisent l'oxygène au niveau des oxygénases ou oxydases pour divers processus de biosynthèse ou de dégradation. La plus grande partie de la consommation d'oxygène est due à la respiration mitochondriale où l'oxygène est consommé soit au niveau de la cytochrome oxydase, soit au niveau de l'oxydase alterne [1]. Il est vraisemblable que l'alimentation en oxygène est généralement suffisante pour répondre aux besoins des organes aériens des plantes. Au niveau des feuilles, une diminution de la teneur en oxygène a un effet favorable en ralentissant le processus de photorespiration [2]. Elle peut devenir limitative (*photo 1*) dans le cas des racines et des semences qui se développent dans le sol. Le travail du sol tend à éviter les effets catastrophiques qui n'apparaissent guère qu'en cas d'ennoyage. Comme il est difficile d'observer les racines ou les semences en germination dans un sol, la perte de productivité due au phénomène d'anoxie, au champ, est difficile à évaluer. Elle est plus évidente pour les

organes végétaux récoltés, comme les fruits, où le déclenchement de la fermentation a des effets défavorables tant sur les qualités organoleptiques que sur la durée de conservation des produits [3].

Conditions d'apparition d'un métabolisme hypoxique

L'oxygène représente 21 %, en volume, des gaz de l'air, soit 210 millilitres par litre (*tableau 1*). L'eau, en équilibre avec l'air, est relativement plus pauvre en oxygène que l'air, sa teneur en oxygène dissous équivalant à seulement 6 millilitres d'oxygène gazeux par litre. L'alimentation d'un tissu en oxygène dépend de la vitesse de diffusion de ce gaz dans le milieu gazeux ou liquide et dans l'espace intracellulaire, liquide, où se situe l'oxydase utilisatrice. Comme la vitesse de diffusion de l'oxygène est environ cent fois plus rapide dans l'air que dans l'eau, l'existence dans les tissus d'espaces intercellulaires remplis d'air est très favorable à une bonne alimentation des cellules en oxygène. Au contraire, la présence d'une couche d'eau autour des tissus, comme pour les semences et racines placées dans des sols très humides [4] et pour les cellules cultivées en milieu liquide [5], ou l'absence d'espaces gazeux dans des tissus compacts comme des cals, des fruits mûrs

ou des téguments [6], conduisent à un ralentissement de la diffusion d'oxygène. Dans ces cas, l'apport d'oxygène peut être insuffisant pour répondre à la demande : sa concentration à l'approche du site de consommation diminue et, en dépit de la forte affinité de la cytochrome oxydase pour l'oxygène ($K_m < 3 \mu M$; [6]), la vitesse de respiration diminue, amenant une situation métabolique appelée hypoxie. Des températures élevées, qui diminuent la quantité d'oxygène dissous dans l'eau tandis qu'elles augmentent la vitesse de respiration, induisent également un métabolisme hypoxique. L'hypoxie est donc définie non seulement en fonction de la concentration en oxygène du milieu, mais aussi en fonction de la réponse du végétal, qui dépend de sa structure et de son environnement.

Caractéristiques de l'hypoxie et de l'anoxie

Dans la littérature les deux termes hypoxique et anoxique sont parfois utilisés indistinctement. Si l'on entend par anoxique une situation où l'oxygène moléculaire est absent, on sera amené à n'utiliser que le terme hypoxique pour décrire les situations naturelles ou expérimentales où l'oxygène est raréfié, car il est toujours présent fût-ce à l'état de traces. Cependant, le terme anoxique peut être utile, dans une étude de physio-

P. Raymond, P. Saglio, B. Ricard : Institut national de la recherche agronomique, Centre de recherches de Bordeaux, Station de physiologie végétale, BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon cedex, France.

Tirés à part : P. Raymond

Tableau 1

Expression de la teneur en oxygène de l'air ou de l'eau en équilibre avec l'air

Pourcentage en volume	21 %
Pression partielle à 1 atm.	0,21 atmosphère
	21 000 Pascal
Concentration dans l'eau à 25 °C	240 µM

Oxygen content of air and air-equilibrated water

logie, pour désigner les situations où la teneur en oxygène est tellement faible que son effet sur le métabolisme est négligeable. Comme un des effets importants d'un ralentissement de la respiration est de diminuer la vitesse de production d'ATP, on a proposé d'appeler anoxiques les situations où la production d'ATP d'origine respiratoire est négligeable à côté de celle d'origine fermentaire [7].

Le métabolisme hypoxique est caractérisé par le fait que le métabolisme aérobie (c'est-à-dire la respiration) et le métabolisme anaérobie (la fermentation) fonctionnent simultanément. Dans des conditions d'alimentation en oxygène limitative, le métabolisme d'un organe végétal, en la matière, peut être hétérogène puisque les couches externes reçoivent plus d'oxygène et sont donc moins hypoxiques que les couches internes. Par exemple, dans les racines de maïs soumises à de faibles teneurs en oxygène, le cylindre central présente des signes d'hypoxie tandis que le cortex, qui entoure le cylindre central, reste aérobie [4]. Dans des racines soumises à l'hypoxie, la formation d'aérenchymes (*photo 2*), c'est-à-dire d'espaces remplis d'air formés par destruction de certaines cellules du cortex, facilite le mouvement d'oxygène vers l'apex racinaire. Grâce aux aérenchymes, une racine placée dans un sol dépourvu d'oxygène est donc partiellement hypoxique plutôt qu'anoxique [8].

Dans le présent article, nous insistons sur trois points où des progrès significatifs ont été accomplis au cours des quinze dernières années. Au début des années 80, on appelait encore anoxiques des conditions qui étaient sans aucun doute hypoxiques, c'est-à-dire que la teneur en oxygène était telle, de l'ordre de 0,1 à 1 %, que la respiration jouait encore un rôle important dans le métabolisme. De nombreux laboratoires se sont attachés à créer des conditions aussi proches que possible de l'anoxie, ce qui a permis de

mieux définir le métabolisme des cellules végétales en anaérobiose. Par ailleurs, le fait qu'un phénomène particulier, l'acclimatation à l'anoxie, se déroule en hypoxie, a été mis en évidence. Enfin, l'étude de la réponse à l'anoxie au niveau de l'expression des gènes a été considérablement développée.

Le métabolisme anaérobie

Il est maintenant établi que l'éthanol est le principal produit du métabolisme fermentaire chez les végétaux supérieurs. L'acide lactique et l'alanine sont deux autres produits quantitativement importants (*figure 1*).

Acide lactique

L'acide lactique est le produit de la réduction de l'acide pyruvique par le NADH. Cette réaction est catalysée par la lactate déshydrogénase. Dans les plantes supérieures, l'acide L-lactique est souvent produit avant l'éthanol. Son accumulation commence dans les minutes qui suivent le passage en anoxie et se ralentit ensuite [9, 10]. Davies [11] a suggéré que l'accumulation d'acide lactique conduisait à une acidification du cytosol qui était nécessaire à la mise en route de la fermentation éthanolique. Cependant, la concentration d'acide lactique reste faible dans certains tissus comme l'embryon de riz [12], ou encore les racines de maïs acclimatées à l'hypoxie [13], où la fermentation éthanolique se met en route dès le transfert en anoxie. En fait, l'acidification du cytosol, qui se produit dans les minutes suivant le transfert en anoxie, est due à des mécanismes tels que l'hydrolyse d'ATP et un ralentissement des pompes

à protons qui excrètent les protons du cytosol [14].

Éthanol

L'éthanol est produit par deux réactions successives : la décarboxylation de l'acide pyruvique en acétaldéhyde, catalysée par la pyruvate décarboxylase, suivie de la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol catalysée par l'alcool déshydrogénase (*figure 1*). C'est en étudiant la distribution de marqueurs radioactifs dans divers métabolites [15] ou en établissant des bilans entre les quantités de glucides consommées et de produits fermentaires [9] que l'on a montré que l'éthanol est le principal produit fermentaire chez les végétaux supérieurs. Généralement, la vitesse de production d'éthanol diminue après quelques heures d'anoxie [9, 10, 15], sauf dans quelques végétaux bien adaptés à l'anoxie comme la semence et l'embryon de riz [16]. L'acétaldéhyde est parfois détectable et pourrait causer des dommages aux tissus [5].

Alanine

L'alanine est, quantitativement, le troisième produit fermentaire [15]. Elle se forme à partir du pyruvate par transamination par l'alanine aminotransférase. En suivant l'évolution des concentrations en aminoacides, on a abouti à la conclusion que les donneurs de la fonction amine sont d'autres aminoacides comme l'asparagine, la glutamine ou l'aspartate [17] ; l'alanine est donc formée à partir d'azote assimilé avant l'anoxie. L'assimilation d'azote ne semble pas continuer en anoxie chez les végétaux supérieurs.

Des informations complémentaires sur le métabolisme anaérobie sont présentées et discutées par Ricard *et al.* [18]. En résumé, on sait aujourd'hui que le métabolisme anaérobie des végétaux supérieurs, quoique plus complexe que celui d'autres organismes, est plus simple qu'on ne le pensait en 1980 puisqu'il est essentiellement limité à la formation de trois dérivés de l'acide pyruvique produit par la glycolyse. L'accumulation, en anoxie, des acides succinique et γ -aminobutyrique a été confirmée, mais il s'agit de quantités relativement faibles, de l'ordre de 1 % de la quantité d'éthanol. Au contraire, on a montré que si l'acide malique peut effectivement s'accumuler en hypoxie, il ne se forme pas en anoxie où, au contraire, son niveau diminue lentement. L'hypothèse selon laquelle la production d'acide



Photo 1. Effet de la pression partielle d'oxygène sur le développement racinaire et végétatif de plantules de maïs (Dea, Pioneer) cultivées en solution nutritive.

Après apparition de la première feuille, les systèmes racinaires ont été maintenus à différentes pressions partielles d'oxygène par barbotage de mélanges d'oxygène et d'azote, à la température constante de 25 °C. La photographie illustre l'état des plantes après 8 jours de traitement (d'après Saglio [48]).

Photo 1. Effect of oxygen partial pressure on root and shoot development of maize seedlings (Dea, Pioneer) grown in mineral solution. After appearance of the first leaf, roots were maintained under different oxygen partial pressures by bubbling with oxygen/nitrogen mixtures, at 25° C. The photograph shows plants after 8 days of treatment.

malique plutôt que d'éthanol caractérisait les végétaux adaptés à l'anoxie [19], qui avait connu un grand succès, est donc maintenant rejetée. Il n'y a pas d'indication que le cycle de Krebs fonctionne en anoxie et pas de preuve qu'une respiration puisse fonctionner en utilisant le nitrate au lieu d'oxygène, quoique cette idée soit reprise périodiquement, par exemple récemment, pour expliquer la germination en anoxie de certaines semences [20]. On peut en conclure que la production d'ATP en anoxie repose sur la fermentation. Si les végétaux sont assez homogènes quant à la nature des produits du métabolisme anaérobie, ils varient par l'activité de la fermentation (rapportée, par exemple, à l'activité de la respiration) qui s'étend sur un ordre de

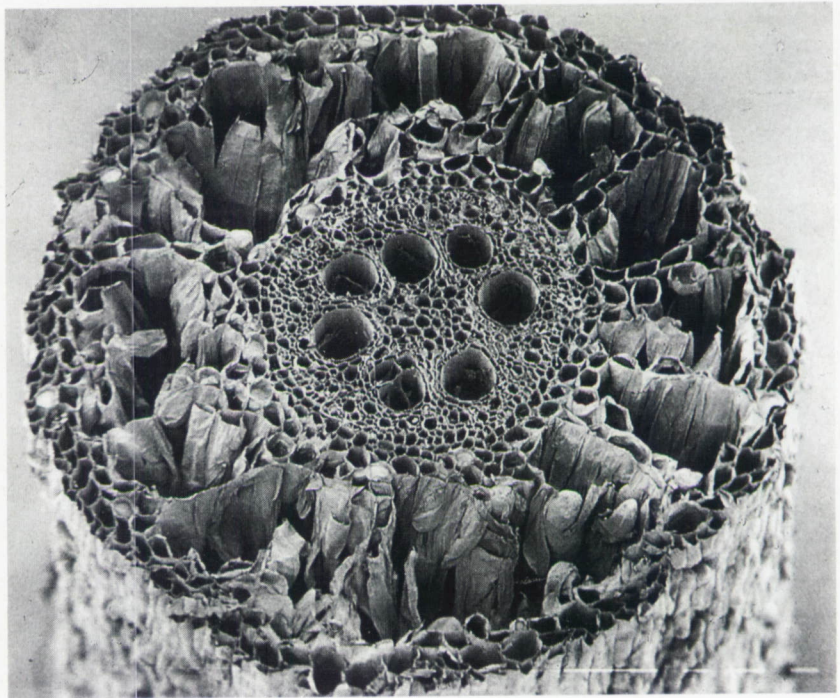


Photo 2. Effet d'un traitement hypoxique sur la formation d'aérenchymes dans des racines adventives de maïs (Dea, Pioneer) poussant en solution nutritive. Douze jours après le début de la germination, alors que la première couronne de racines adventives commençait à émerger, les plantes ont été soumises à 11 jours d'hypoxie par barbotage d'un mélange d'azote et d'oxygène à 5 % d'oxygène en volume. La section transversale correspond à la zone médiane d'une racine adventive de 4 jours (Barre : 250 µm).

Photo 2. Effect of hypoxic treatment on the formation of aerenchyma in adventitious roots of maize (Dea, Pioneer), growing in mineral solution. Twelve days after germination, as the first set of adventitious roots appeared, plants were submitted to 11 days of hypoxia by bubbling with an oxygen/nitrogen mixture containing 5% oxygen by volume. The cross section of the mid zone of a 4 days adventitious root is shown (Bar : 250 µm).

grandeur, se traduisant par des charges énergétiques passant de 0,9 en aérobiose, à 0,8 (tissus les plus actifs) ou 0,3 (tissus de fermentation lente) en anaérobiose [16].

Mécanismes de la sensibilité et de l'acclimatation à l'anoxie

Les plantes peuvent réagir à un défaut d'oxygène en développant des systèmes racinaires superficiels ou, dans les racines

existantes, des aerenchymes qui améliorent la diffusion des gaz de l'atmosphère [8]. Il s'agit là d'adaptations morphologiques et histologiques qui favorisent le maintien d'une certaine aérobiose. De telles réactions sont impossibles pour les semences et inefficaces pour les méristèmes racinaires. La résistance à l'anoxie de ces tissus est donc déterminée au niveau métabolique.

Les tissus végétaux peuvent survivre en anoxie pendant des durées très variables, allant de quelques heures à plusieurs jours. Par exemple, alors que les racines de maïs exposées brutalement à l'anoxie ne survivent pas plus de huit heures [21], les semences en germination survivent pendant plusieurs jours ou même plusieurs semaines en anoxie [16]. Génér-

ralement, la croissance est arrêtée mais, chez quelques espèces, on observe la croissance de certains organes tels que le coléoptile chez le riz, *Oryza sativa*, et une adventice des rizières, *Echinochloa phyllopogon*, et même une germination (percée de la radicule) chez *Erythrina caffra* [20].

La présence d'un substrat glucidique, fermentescible, est nécessaire à la survie en anoxie [13] et les tissus meurent après épuisement des réserves. Dans de nombreux cas cependant, la mort survient avant que les réserves glucidiques ne soient épuisées. Alors qu'au cours des années 70 l'hypothèse dominante liait la sensibilité à l'anoxie à une forte production d'éthanol, on sait maintenant que la vitesse de production d'éthanol n'est pas un facteur déterminant : les semences en germination de certaines espèces, comme le pois ou le riz, ont une fermentation alcoolique très active et survivent longtemps, et même, dans le cas du riz, croissent en anoxie. De même, il a été établi [22] que la toxicité de l'éthanol pour les tissus végétaux n'est pas aussi élevée qu'on l'avait dit. Cependant, des travaux récents indiquent que l'acétaldéhyde pourrait avoir des effets toxiques [5, 23]. Ceci n'est pas étonnant d'un aldéhyde qui peut réagir avec les fonctions amines présentes sur la plupart des protéines. Toutefois, la manifestation de ces effets ne semble pas être générale car l'acétaldéhyde s'accumule rarement dans les tissus.

En présence d'un substrat fermentescible, c'est la régulation du pH intracellulaire qui est actuellement considérée comme le facteur essentiel de la survie en anoxie [10, 24]. Les principaux éléments en faveur de cette hypothèse sont les suivants :

- un mutant de maïs déficient en ADH, dans lequel l'accumulation d'acide lactique persiste plus longtemps, est aussi plus sensible à l'anoxie que le maïs normal où la fermentation alcoolique prend le relais [24] ;
 - l'embryon de riz, où l'accumulation d'acide lactique dans les tissus est faible, survit très bien en anoxie ;
 - les matériels végétaux qui produisent activement l'acide lactique, mais sont capables de le sécréter dans le milieu, ont une bonne capacité de survie en anoxie, qu'il s'agisse de couches d'aleurones d'orge [26] ou de racines de plantes halophytes du genre *Limonium* [27].
- L'étude du métabolisme des racines de maïs acclimatées à l'anoxie a abouti à la

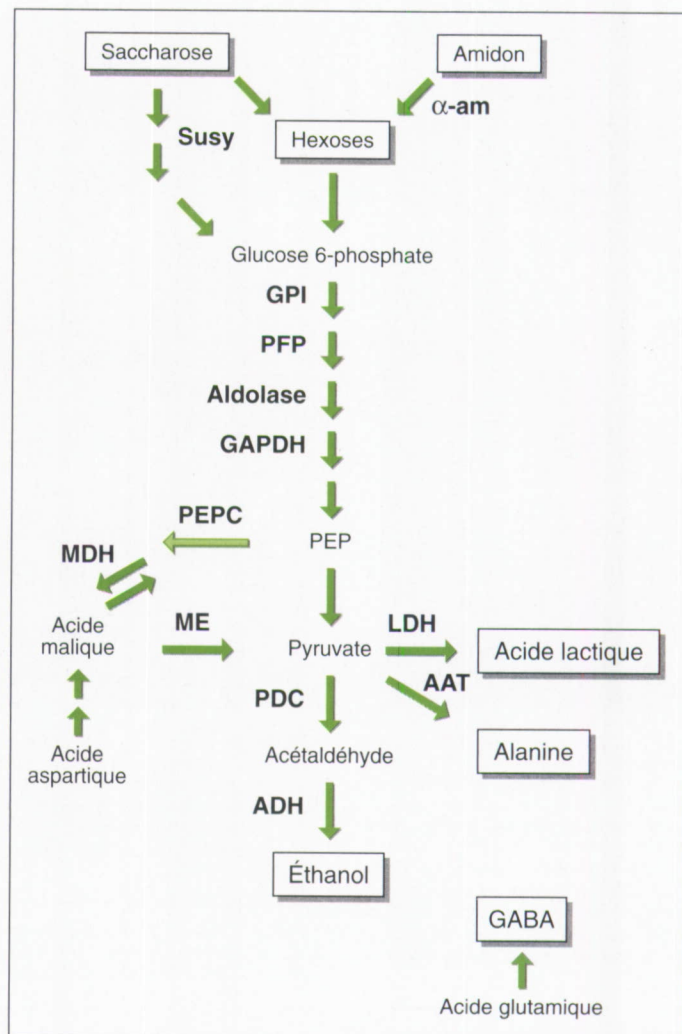


Figure 1. Schéma métabolique des principales voies fonctionnant en anaérobiose. Les enzymes sont désignées par les abréviations suivantes : α -am : α -amylase ; Susy : saccharose synthase ; GPI : glucose phosphate isomérase ; PFP : fructose 6-phosphate 1-phosphotransférase ; aldolase : fructose 1,6-bisphosphate aldolase ; GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; PDC : pyruvate décarboxylase ; ADH : alcool déshydrogénase ; LDH : lactate déshydrogénase ; AAT : alanine aminotransférase ; GDC : glutamate décarboxylase ; PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase ; MDH : malate déshydrogénase ; EM : enzyme malique.

Figure 1. Metabolic diagram showing the major pathways operating under anoxia. Enzymes are designated as follows. α -am : α -amylase ; Susy : sucrose synthase ; GPI : glucose phosphate isomerase ; PFP : fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase ; aldolase : fructose 1,6-bisphosphate aldolase ; GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; PDC : pyruvate decarboxylase ; ADH : alcohol dehydrogenase ; LDH : lactate dehydrogenase ; AAT : alanine aminotransferase ; GDC : glutamate decarboxylase ; PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase ; MDH : malate dehydrogenase ; EM Malic enzyme.

même conclusion. L'acclimatation est obtenue par un traitement hypoxique : les racines, excisées ou de plantules entières, sont placées dans une solution équilibrée avec un courant gazeux (bullage d'un mélange d'oxygène et d'azote) contenant 3 % d'oxygène. Ce traitement hypoxique améliore la capacité de survie

des racines de moins de dix heures à deux jours au moins, pourvu que du glucose leur soit fourni [21]. On a montré sur des racines excisées, puis confirmé sur des racines entières [28] qu'après acclimatation, les racines sont capables de sécréter l'acide lactique dans le milieu. La meilleure régulation du pH

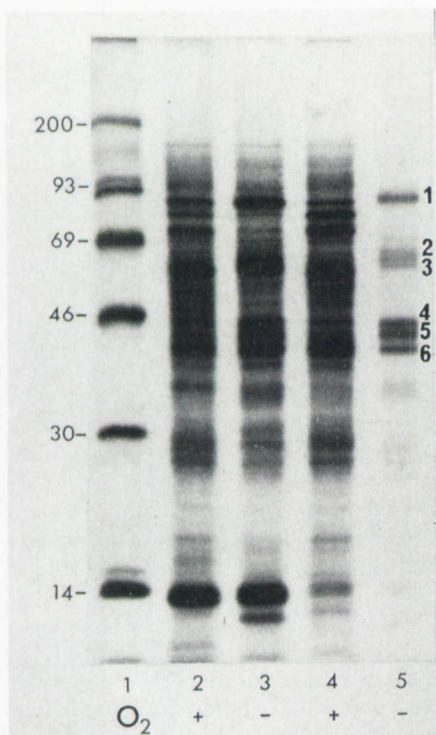


Photo 3. Protéines synthétisées dans le coléoptile et la racine de plantules de riz, dans l'air ou en anoxie. Des plantules de riz obtenues après 48 h de germination en conditions aérées ont été incubées en présence d'acides aminés marqués, pendant 6 h, en conditions aérées ou anoxiques. Elles ont été congelées et les coléoptiles et les racines ont été séparés. Les protéines extraites ont été analysées par électrophorèse. Piste 1 : marqueurs de poids moléculaires. Pistes 2 et 3 : coléoptiles dans l'air (2) ou en anoxie (3) ; pistes 4 et 5 : racines dans l'air (4) ou en anoxie (5). On observe que la synthèse de protéines reste très active en anoxie dans les coléoptiles tandis qu'elle est fortement réduite dans les racines. Les protéines exprimées en conditions aérobies et anaérobies ne sont pas les mêmes. Certaines des protéines surexprimées en anoxie ont été identifiées à l'aide d'anticorps spécifiques. 1 : saccharose synthase (87 kd) ; 2 : pyruvate décarboxylase, sous-unités α et β (65 et 62 kd) ; 3 : alcool déshydrogénase 2 ; 4 : alcool déshydrogénase 1 ; 5 : glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

Photo 3. Proteins synthesised in the coleoptile and root of rice seedlings, under air or anoxia. Rice seedlings after 48 h of germination under aerated conditions were incubated under either aerated or anoxic conditions in the presence of labelled aminoacids, for 6 h. They were frozen and the coleoptile and root were separated. Proteins were extracted and analyzed by electrophoresis. Lane 1 : molecular weight markers ; lanes 2 and 3 : coleoptiles under air (2) or anoxia (3) ; lanes 4 and 5 : roots in air (4) or anoxia (5). It can be seen that protein synthesis under anoxia remained active in coleoptiles but was dramatically reduced in roots. The proteins expressed under anoxia were not the same as in air. Some of the proteins overexpressed under anoxia have been identified by using specific antibodies : 1 : sucrose synthase (87 kDa) ; 2 : pyruvate decarboxylase, subunits α and β (65 and 62 kDa) ; 3 : alcohol dehydrogenase 2 ; 4 : alcohol dehydrogenase 1 ; 5 : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Summary

Plant tissue responses to low oxygen concentrations

P. Raymond, P. Saglio, B. Ricard

To accomplish their life cycle, plant cells require molecular oxygen. In the absence of oxygen, however, they can survive for periods ranging from a few hours to several days. In all plant tissues studied, the fermentative metabolism produced mainly ethanol and, to a lesser extent, lactic acid and alanine. Be this as it may, fermentative activity varies considerably according to tissue or plant species, and no relationship has been found between this activity and the plant's capacity for survival under anoxia. Reducing the rate of oxygen diffusion leads to hypoxic conditions where respiration and fermentation both operate. A short incubation under hypoxia results in a better resistance to a subsequent anoxic environment. The mechanisms involved in this acclimation process include an improved capacity to excrete lactic acid into the medium. This allows a better control of cytosolic pH which, in turn, may explain the sustained glycolytic activity. It is now widely accepted that survival under anoxia requires both the availability of a fermentable substrate, and the avoidance of excessive acidification. Gene expression in anaerobiosis is different to that observed in aerobiosis. The products of those identified so far are linked with the mobilisation of fermentable substrates through glycolysis and fermentation. Their expression regulation mechanisms are being analysed in terms both of promoter control and anoxic signal transduction pathway.

Cahiers Agricultures 1995 ; 4 : 343-50

pourrait expliquer que l'activité fermentaire dans ces racines persiste plus longtemps, et donc que la survie soit plus longue que pour les racines non traitées. La production et l'accumulation d'acide lactique pourraient ainsi jouer un rôle déterminant sur la sensibilité à l'anoxie des tissus végétaux par la suracidification qui résulterait de l'accumulation d'acide lactique au cours de l'anoxie. Les mécanismes qui conduisent à l'acclimatation, dont ceux qui aboutissent à la modification du métabolisme de l'acide lactique, ne sont pas identifiés. La synthèse de protéines, comme on pouvait s'y attendre, et la présence d'acide abscissique semblent être impliquées dans l'acquisition de la tolérance à l'anoxie [29].

Modifications de l'expression du génome en anoxie

Les travaux sur le métabolisme fermentaire des végétaux ont permis de distinguer deux stratégies métaboliques, conduisant toutes deux à une survie en anoxie. D'une part, une répression de l'activité métabolique correspondant à une faible activité fermentaire, avec un faible niveau d'ATP et une faible charge énergétique, qui se traduit par l'arrêt de la biosynthèse et de la dégradation des protéines, comme dans les semences de laitue [30] ; d'autre part, une activité fermentaire

assez élevée pour permettre le maintien des activités cellulaires, y compris la synthèse de protéines, d'ARN et d'ADN, comme dans l'embryon de riz [31]. L'activité métabolique est particulièrement élevée dans le coléoptile et nettement plus faible dans la radicule, dont la croissance est arrêtée (*photo 3*). Ce type de réponse active a été également mise en évidence chez *Echinochloa* [32] et se rencontre aussi, de façon plus limitée, chez le maïs. C'est sur les plantes conservant un métabolisme actif qu'ont été réalisées la plupart des études sur l'expression du génome en anoxie. Ceci constitue une limitation à notre compréhension du métabolisme anaérobie des plantes.

Les premières approches ont consisté à identifier les protéines synthétisées sous anoxie. La plupart des protéines induites en anaérobiose peuvent être classées, d'après leur fonction, en trois groupes :

- les enzymes de mobilisation de l'amidon et du saccharose comme l' α -amylase et la saccharose synthase ;

- diverses enzymes de la glycolyse comme la glucose phosphate isomérase, la fructose 6-phosphate 1-phosphotransférase, la fructose 1,6-bisphosphate aldolase et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ;

- les enzymes de la fermentation éthanologique, pyruvate décarboxylase et alcool déshydrogénase : une induction par l'anaérobiose de cette dernière enzyme a été détectée dans tous les végétaux étudiés à ce jour.

Les protéines anaérobies ont été identifiées essentiellement dans les racines de maïs [33] et dans les embryons de riz [34-36]. On peut penser que l'induction de toutes ces enzymes est favorable à la production d'éthanol, principal produit du métabolisme fermentaire.

On a également mis en évidence l'induction d'autres enzymes : l'alanine aminotransférase [37], ce qui est en accord avec le fait que l'alanine est un produit fermentaire ; la lactate déshydrogénase [38] qui, outre son rôle dans la fermentation lactique, pourrait avoir d'autres rôles dans le fonctionnement cellulaire (l'exemple de cellules animales [39] indique qu'elle pourrait avoir un rôle de coordination de nombreux systèmes cellulaires puisqu'elle se lie à certains nucléotides régulateurs [alarmones] ainsi qu'à des séquences particulières d'acides nucléiques) ; la superoxyde dismutase, qui pourrait être impliquée dans la protection contre les radicaux libres d'oxy-gène qui se formeraient lors du retour à l'air [23].

Certains travaux ont porté sur l'expression d'enzymes du cycle de Krebs et les propriétés des mitochondries qui se modifient d'une façon qui semble permettre un meilleur fonctionnement en anoxie [40]. Plus récemment, les recherches se sont orientées vers la recherche de protéines qui pourraient être impliquées directement dans la tolérance à l'anoxie [41], et dont l'identification pourrait révéler des mécanismes insoupçonnés d'acclimatation à l'anoxie.

Surexpression et activité d'enzymes fermentaires

Dans la plupart des plantes ayant un métabolisme anaérobie actif, l'activité d'enzymes liées au métabolisme fermentaire augmente. Cette augmentation dépasse ce qui est strictement nécessaire pour catalyser le flux glycolytique. En effet, la surexpression ne concerne pas que des enzymes dont l'activité pourrait être limitative pour le flux glycolytique, mais aussi des enzymes qui semblent déjà se trouver en excès. Par exemple, on peut calculer, pour les racines d'orge [42], que l'activité de la lactate déshydrogénase est déjà en excès de 30 fois par rapport au flux d'acide lactique qui se produira dès le transfert en anoxie, l'excès étant de 600 fois après induction. En ce qui concerne l'alcool déshydrogénase, l'étude de mutants a montré qu'on peut diminuer son activité de 17 fois sans provoquer de diminution du flux d'éthanol en anoxie [24]. Pourtant, l'activité alcool déshydrogénase augmente fortement dans la plupart des végétaux étudiés. On peut envisager plusieurs explications à ce phénomène. D'une part, les gènes codant pour une enzyme donnée, comme par exemple l'alcool déshydrogénase, qui sont normalement exprimés en aérobiose, ne sont pas les mêmes que ceux qui sont induits en anoxie. Il est donc possible que l'isoenzyme exprimée en anoxie soit mieux adaptée aux conditions du métabolisme anaérobie. D'autre part, on peut noter que l'excès d'activité par rapport au flux qui traverse la voie métabolique est une caractéristique générale des voies métaboliques ; on doit dès lors supposer que la surexpression aurait une fonction

régulatrice, qui n'est pas encore clairement identifiée.

Contrôle de l'expression des gènes

La régulation de l'expression d'un gène, c'est-à-dire de la quantité de protéine produite à partir de ce gène, peut se faire soit au niveau de la quantité d'ARN messager (ARNm), qui dépend des vitesses de synthèse (transcription) et de dégradation de cet ARNm, soit au niveau de la vitesse à laquelle cet ARNm est traduit en protéine au niveau des ribosomes.

Dans presque tous les cas examinés, on a trouvé que la surexpression d'une protéine en anaérobiose est liée à une activation de la transcription du gène correspondant. C'est l'alcool déshydrogénase du maïs qui a été le plus étudiée : l'augmentation d'activité qui se produit à la suite du transfert en anoxie s'accompagne d'une augmentation de 50 fois de la quantité des ARNm correspondants. La recherche du mécanisme par lequel cette induction peut se faire a permis d'identifier, dans le promoteur du gène *Adh 1* de maïs, une séquence particulière nécessaire à l'expression de ce gène en anaérobiose [42]. Des séquences homologues ont été trouvées dans d'autres gènes induits en anaérobiose chez le maïs ou même dans les gènes *Adh* d'autres espèces [38]. Des facteurs protéiques se liant à ces éléments de la séquence de l'ADN favoriseraient la transcription de ces gènes [43].

Outre la stimulation de la transcription, la stabilité des ARNm joue un rôle important. L'augmentation de la quantité des ARNm codant pour l'ADH 1 est aussi due à une augmentation de sa stabilité en hypoxie [44]. Au contraire, certains ARNm présents en conditions aérées disparaissent en une heure après transfert en anoxie [41].

Il existe aussi des mécanismes qui limitent l'expression des ARNm existants : en effet, pour la plupart, les ARNm présents en aérobiose persistent dans les cellules pendant plusieurs heures après le transfert en anoxie, mais leur traduction en protéine ne se fait plus, ou que lentement [34]. Comme les polysomes présents en aérobiose se dissocient après le transfert

en anoxie [45], le contrôle de la traduction peut se faire au moment de l'initiation, ou de la ré-initiation, par la sélection des ARN qui seront traduits. Il peut aussi s'exercer par la régulation de la vitesse d'élongation comme le suggèrent les résultats obtenus dans un système de traduction *in vitro* de maïs. Le contrôle de la sélection des ARNm, comme celui de la vitesse d'élongation, reposerait sur une modification, par phosphorylation, de l'activité de protéines ribosomales ou de facteurs d'initiation [46].

Par quel mécanisme les cellules détectent-elles une diminution de leur oxygénation ? Quel est le signal transmis vers le génome pour que la réponse à l'anoxie ou le processus d'acclimatation soit exprimé ? Comme l'oxygène diffuse rapidement à travers les membranes, on privilégie en général l'hypothèse selon laquelle les signaux primaires seraient des modifications du métabolisme qui résultent directement du ralentissement de la respiration. Parmi les changements métaboliques qui se produisent très rapidement en réponse à une diminution de l'apport d'oxygène, on connaît depuis longtemps la modification des rapports entre nucléotides adényliques (charge énergétique) ou pyridiniques (état rédox), ou des teneurs en divers métabolites tels que les intermédiaires de la glycolyse. Cependant, aucune fonction de signal de ces changements n'a été décrite à ce jour. Le pH cytosolique varie très rapidement, lui aussi, après la mise en anoxie, et la baisse du pH cytosolique a été impliquée récemment dans le contrôle de l'élongation des polypeptides *via* la phosphorylation d'une protéine [47]. La concentration cytosolique de calcium joue un rôle dans la réponse à de nombreux stimuli environnementaux chez les végétaux. Récemment, on a montré qu'une augmentation de la concentration cytosolique d'ion calcium est nécessaire au déclenchement de la réponse à l'anoxie, et qu'elle est suffisante puisque elle permet la surexpression de l'ADH 1 en aérobiose [48]. Comme le calcium est libéré vers le cytosol à partir de sites de stockage intracellulaires, les auteurs de ce travail ont émis l'idée que la variation de la teneur en oxygène pourrait être détectée au niveau d'une membrane autre que la membrane mitochondriale.

Les recherches réalisées au cours des quinze dernières années sur l'anoxie chez les plantes ont établi, d'une part, que l'anoxie peut effectivement se produire dans les organes végétaux placés dans le sol tels

que les semences en germination, les plantules et les racines, ainsi que dans les fruits placés sous atmosphère contrôlée, d'autre part, qu'elle déclenche dans les tissus concernés une réponse coordonnée et, enfin, qu'elle cause des dommages dans des délais variables selon les tissus. Le traitement technique du problème consiste à éviter l'apparition des conditions d'hypoxie, tandis que l'objectif des recherches sur la physiologie des plantes est d'acquiescer une meilleure connaissance du phénomène afin d'améliorer la capacité de résister à des anoxies ou hypoxies transitoires. Les résultats ont montré que le maintien de l'activité métabolique est une condition nécessaire de la survie : il s'agit donc d'un phénomène complexe puisqu'il inclut la disponibilité de réserves fermentescibles (saccharose ou amidon) et la capacité de les mobiliser par l'ensemble d'enzymes adéquat, mais aussi la capacité de contrôler le pH cytosolique. Cependant, de nombreuses questions restent posées. Par exemple, la fonction de l'accumulation d'acide lactique n'est pas établie et on peut se demander quelle peut être l'utilité, pour la plante, de ce métabolisme dont les effets néfastes en anoxie sont évidents. L'existence d'au moins deux types de stratégies métaboliques en anoxie, métabolisme actif ou métabolisme lent, amène à s'interroger sur l'intérêt, pour la survie, de chacune de ces deux options. Chez les plantes de rizière, l'activité du métabolisme permet la croissance du coléoptile qui va ainsi atteindre la surface de l'eau et permettre la poursuite du développement en aérobiose. Pour la plupart des plantes cultivées, l'intérêt du maintien d'un métabolisme actif n'est pas clair et il semble bien qu'une stratégie d'attente, c'est-à-dire l'établissement d'un métabolisme lent, serait une bonne solution. Cependant, rien n'explique encore comment se déterminent les deux stratégies, métabolisme actif ou métabolisme lent, identifiées chez les semences en germination. La différence peut se trouver à divers niveaux des processus du métabolisme énergétique, mais il est possible qu'elle concerne la nature du signal d'anoxie ou de la chaîne de transduction de ce signal. L'étude de plantes modifiées sur l'un ou l'autre de leurs caractères, par les méthodes de la génétique moléculaire ou de la physiologie moléculaire, permettra de progresser dans l'identification des propriétés qui déterminent la survie. Un long chemin reste à parcourir pour que soient obtenues des plantes mieux adaptées à ces situations ■

Références

1. Van der Werf A, Raaimakers D, Poot P, Lambers H. Evidence for a significant contribution by peroxidase-mediated O₂ uptake to root respiration of *Brachypodium pinnatum*. *Planta* 1991 ; 183 : 347-52.
2. Lorimer GH, Andrews TJ. The C₂ chemo- and photorespiratory carbon oxidation cycle. In : Stumpf PK, Conn EE, eds. *The biochemistry of plants*, Vol 8. New York : Academic Press 1981 : 329-74.
3. Renault P, Houal L, Jacquemin G, Chambroy Y. Gas exchange in modified atmosphere packaging. 2. Experimental results with strawberries. *Internat J Food Sci Technol* 1994 ; 29 : 79-394.
4. Thomson CJ, Greenway H. Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O₂ concentrations. *Plant Physiol* 1991 ; 96 : 1294-301.
5. Perata P, Alpi A. Ethanol-induced injuries to carrot cells. *Plant Physiol* 1991 ; 95 : 748-52.
6. Tucker ML, Laties GG. The dual role of oxygen in avocado fruit respiration: kinetic analysis and computer modelling of diffusion-affected respiratory oxygen isotherms. *Plant Cell Environ* 1985 ; 8 : 117-27.
7. Pradet A, Bomsel JL. Energy metabolism in plants under hypoxia and anoxia. In : Hook DD, Crawford RMM, eds. *Plant life in anaerobic environments*. Ann Arbor : Ann Arbor Science Publishers Inc 1978 : 89-118.
8. Drew MC, Saglio PH, Pradet A. Larger adenylate energy charge and ATP/ADP ratios in aerenchymatous roots of *Zea mays* in anaerobic media as a consequence of improved internal oxygen transport. *Planta* 1985 ; 165 : 51-8.
9. Raymond P, Al Ani A, Pradet A. Low contribution of nonrespiratory pathways in ATP regeneration during early germination of lettuce seeds. *Physiol Veg* 1983 ; 21 : 677-87.
10. Roberts JKM, Callis J, Jardetzky O, Walbot V, Freeling M. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 6029-33.
11. Davies DD. Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In : Stumpf PK, Conn EE, eds. *The biochemistry of plants*, Vol 2. New York : Academic Press, 1980 : 581-611.
12. Rivoal J, Ricard B, Pradet A. Glycolytic and fermentative enzyme induction during anaerobiosis in rice seedlings. *Plant Physiol Biochem* 1989 ; 27 : 43-52.
13. Xia JH, Saglio PH. Lactic acid efflux as a mechanism of hypoxic acclimation of maize root tips to anoxia. *Plant Physiol* 1992 ; 93 : 453-9.
14. Saint-Ges V, Roby C, Bligny R, Pradet A, Douce R. Kinetic studies of the variation of cytoplasmic pH, nucleotide triphosphates (³¹P-NMR) and lactate during normoxic and anoxic transitions in maize root tips. *Eur J Biochem* 1991 ; 200 : 477-82.
15. Smith AM, ap Rees T. Pathways of carbohydrate fermentation in the roots of marsh plants. *Planta* 1979 ; 146 : 327-34.
16. Raymond P, Al Ani A, Pradet A. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. *Plant Physiol* 1985 ; 79 : 879-84.
17. Roberts JKM, Hooks MA, Miaullis AP, Edwards S, Webster C. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH

regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol* 1992 ; 98 : 480-7.

18. Ricard B, Couée I, Raymond P, Saint-Ges V, Pradet A. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiol Biochem* 1994 ; 32 : 1-10.

19. Crawford, RMM. Metabolic acclimation to anoxia. In : Hooks DD, Crawford RMM, eds. *Plant life in anaerobic environments*. Ann Arbor : Ann Arbor Science Publishers Inc., 1978 : 119-36.

20. Kemp K, Small JGC. Nitrate and nitrite reductase in *Erythrina caffra* enhancement of induction by anoxia and possible role in germination. *Planta* 1993 ; 189 : 298-300.

21. Saglio PH, Drew MC, Pradet A. Metabolic acclimation to anoxia induced by low (2-4 kPa) partial pressure oxygen pretreatment (hypoxia) in root tips of *Zea mays*. *Plant Physiol* 1988 ; 86 : 61-6.

22. Jackson MB, Herman B, Goodenough A. An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. *Plant Cell Environ* 1982 ; 5 : 163-72.

23. Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM. Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide. *Plant Physiol* 1987 ; 85 : 1016-20.

24. Roberts JKM, Chang K, Webster C, Callis J, Wemmer D, Walbot V. Dependence of ethanolic fermentation, cytoplasmic pH regulation and viability on the activity of alcohol dehydrogenase in hypoxic maize root tips. *Plant Physiol* 1989 ; 89 : 1275-8.

25. Rivoal J, Ricard B, Pradet A. Lactate dehydrogenase in *Oryza sativa* L. seedlings and roots. *Plant Physiol* 1991 ; 95 : 682-6.

26. Hoffman NE, Bent AF, Hanson AD. Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. *Plant Physiol* 1986 ; 82 : 658-63.

27. Rivoal J, Hanson AD. Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *Limonium*. *Plant Physiol* 1993 ; 101 : 553-60.

28. Xia JH, Roberts JKM. Improved cytoplasmic pH regulation, increased lactate efflux, and reduced cytoplasmic lactate levels are biochemical traits expressed in root tips of whole maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment. *Plant Physiol* 1994 ; 105 : 651-7.

29. Hwang SY, Van Toai TT. Abscisic acid induces anaerobiosis tolerance in corn. *Plant Physiol* 1991 ; 97 : 593-7.

30. Pradet A, Mocquot B, Raymond P, Morisset C, Aspart L, Delseny M. Energy metabolism and synthesis of nucleic acids and proteins under anoxic stress. In : Key JL, Kosuge T, eds. *UCLA symposia on molecular and cellular biology, new series, cellular and molecular biology of plant stress*. New York : Alan R. Liss Inc, 1985 ; 22 : 227-45.

31. Aspart L, Got A, Delseny M, Mocquot B, Pradet A. Adaptation of ribonucleic acid metabolism to anoxia in rice embryos. *Plant Physiol* 1983 ; 72 : 115-21.

32. Kennedy RA, Rumpho ME, Fox TC. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol* 1992 ; 100 : 1-6.

33. Sachs MM, Freeling M, Okimoto R. The anaerobic proteins of maize. *Cell* 1980 ; 20 : 761-7.

34. Ricard B, Pradet A. Anaerobic protein synthesis in different organs of germinating rice seeds. *Plant Physiol Biochem* 1989 ; 27 : 761-8.

35. Ricard B, Rivoal J, Spiteri A, Pradet A. Anaerobic stress induces the transcription and translation of sucrose synthase in rice. *Plant Physiol* 1991 ; 95 : 669-74.

36. Perata P, Geshi N, Yamaguchi J, Akazawa T. Effect of anoxia on the induction of α -amylase in cereal seeds. *Planta* 1993 ; 191 : 402-8.

37. Good AG, Crosby WL. Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. *Plant Physiol* 1989 ; 90 : 1305-9.

38. Good AG, Paetkau DH. Identification and characterization of a hypoxically induced maize lactate dehydrogenase gene. *Plant Mol Biol* 1992 ; 19 : 693-7.

39. Anderson GR, Farkas BK. The major anoxic stress response protein p34 is a distinct lactate dehydrogenase. *Biochemistry* 1988 ; 27 : 2187-93.

40. Couée I, Defontaine S, Carde JP, Pradet A. Effects of anoxia on mitochondrial biogenesis in rice shoots. *Plant Physiol* 1992 ; 98 : 411-21.

41. Brevario, D, Giani, S, Morello, L, Coraggio, I. Anaerobiosis-mediated early transcriptional and translational responses in rice *Oryza sativa* L. ; coleoptiles and roots. *Plant Cell Environ* 1994 ; 17 : 925-34.

42. Dennis ES, Walker JC, Llewellyn DJ, et al. The response to anaerobic stress: transcriptional regulation of genes for anaerobically induced proteins. In : Cherry JH, ed. *Environmental stress in plants*. New York : Springer, 1989 : 231-45.

43. Ferl RJ. ARF-B₂ : a protein complex that specifically binds to part of the anaerobic response element of maize *Adh1*. *Plant Physiol* 1990 ; 93 : 1094-101.

44. Rowland LJ, Strommer JN. Anaerobic treatment of maize roots affects transcription of *Adh1* and transcript stability. *Plant Physiol* 1986 ; 6 : 3368-72.

45. Bailey-Serres J, Freeling M. Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiol* 1990 ; 94 : 1237-43.

46. Webster C, Gaut RL, Browning KS, Ravel JM, Roberts JKM. Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tips. *J Biol Chem* 1992 ; 266 : 23341-6.

47. Subbaiah CC, Bush DS, Sachs MM. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension-cultured cells. *Plant Cell* 1994 ; 6 : 1747-62.

48. Saglio P. La vie du maïs, application à la production. *Colloque INRA, AGPM, Université Paris-Sud*. Pau, 13-15 novembre 1990 : 55-60.

Résumé

Les cellules des végétaux supérieurs, bien qu'ayant besoin d'oxygène pour fonctionner normalement, sont capables de survivre en situation d'anoxie (absence d'oxygène) pendant des durées variant de quelques heures à plusieurs jours. Chez tous les végétaux, le métabolisme fermentaire produit essentiellement de l'éthanol et, en moindre quantité, de l'acide lactique et de l'alanine. Cependant, l'activité fermentaire est très variable selon les tissus ou les espèces. Un ralentissement de la diffusion de l'oxygène se traduit par une situation d'hypoxie où la respiration et la fermentation fonctionnent simultanément. Un séjour en hypoxie induit une meilleure capacité de résistance à l'anoxie. Les gènes exprimés en anoxie sont différents de ceux exprimés en conditions aérobies ; certains de ces gènes ont été identifiés et des mécanismes intervenant dans le contrôle de leur expression ont été élucidés.