



Vers des plantes plus performantes : Efficacité de la photosynthèse

Yves Chupeau

Directeur de Recherches honoraire de l'INRA

Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA Versailles

Membre correspondant de l'Académie d'agriculture de France

Manuscrit révisé le 24 avril 2015 - Publié le 29 avril 2015

Résumé : *Les progrès récents de la biologie végétale révèlent que les processus de la photosynthèse ont diversement évolué selon les adaptations des organismes aux conditions écologiques. Ces connaissances, constamment renouvelées par les progrès des analyses métaboliques et génomiques, associées au progrès des techniques de transfert de gènes, révèlent une assez grande souplesse adaptative de ce processus, pourtant très complexe.*

Ces révélations motivent des tentatives d'amélioration, en rupture avec l'idée longtemps admise que l'on ne pourrait pas améliorer un métabolisme aussi complexe.

De fait, la connaissance de ces différentes voies d'utilisation de l'énergie lumineuse, conduit aujourd'hui de nombreuses équipes à tenter de transférer les dispositifs les plus efficaces aux plantes cultivées.

Le perfectionnement des analyses de génomique et l'amélioration des techniques de génie génétique renouvellent nos approches de biologie, et, partant, d'amélioration des plantes (Chupeau, 2013).

De nombreux travaux concernent la compréhension du fonctionnement de la photosynthèse en raison de son rôle central dans la fixation du carbone, donc de la production végétale, et de la régulation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère. En outre, les contraintes d'adaptation des plantes cultivées aux changements climatiques constituent une puissante motivation pour une meilleure connaissance des régulations de la photosynthèse. Les approches fondamentales en cours fournissent un ensemble de connaissances renouvelées qui constituent autant de pistes d'amélioration potentielles. La bibliographie dans ce domaine est imposante, mais ce rapide tour d'horizon ne prétend pas à l'exhaustivité, il cherche plutôt à éclairer différentes voies d'approche.

Améliorer la photosynthèse

La photosynthèse utilise l'énergie lumineuse (longueurs d'onde rouges et bleues) et le gaz carbonique pour synthétiser des sucres, et émettre de l'oxygène. Ce processus résulte d'un ensemble complexe, mais coordonné de réactions biochimiques qui s'effectuent dans des organites cellulaires spécialisés des plantes, les chloroplastes. L'efficacité (biomasse produite) de la photosynthèse (en moyenne 2%) repose sur la quantité d'énergie lumineuse captée ainsi que sur le fonctionnement coordonné des enzymes impliqués. Elle fait également intervenir la morphologie des feuilles et le fonctionnement des stomates pour la rapidité des échanges gazeux. Enfin la disponibilité en azote influe sur le fonctionnement de la photosynthèse.

Ces différents niveaux fournissent autant d'approches pour l'analyse de l'efficacité de la photosynthèse, de la parcelle jusqu'aux caractéristiques cinétiques des processus biochimiques.

1 - Abrégé de la biochimie de la photosynthèse

L'utilisation du traçage radioactif, dès le début des années 1940, avait permis de préciser que l'oxygène émis par la photosynthèse provenait de l'eau (et non pas du gaz carbonique qui est lié par l'enzyme Rubisco au Ribulosebiphosphate). Le devenir des protons, résultants de l'oxydation de l'eau par le photosystème II, vient d'être récemment révélé : ce sont les ions HCO_3^- qui transportent les protons vers le lumen des thylakoïdes (Koroidov et al., 2014).

Les techniques de traçage avaient progressivement révélé l'ensemble des étapes de la synthèse des glucides (Calvin, 1956) qui génère un Fructose en recyclant six Ribulosephosphates dans le cas de la photosynthèse des plantes en C3 (Figure 1) (pour l'analyse détaillée de la photosynthèse voir Farineau et Morot-Gaudry, 2011 et Morot-Gaudry 2014).

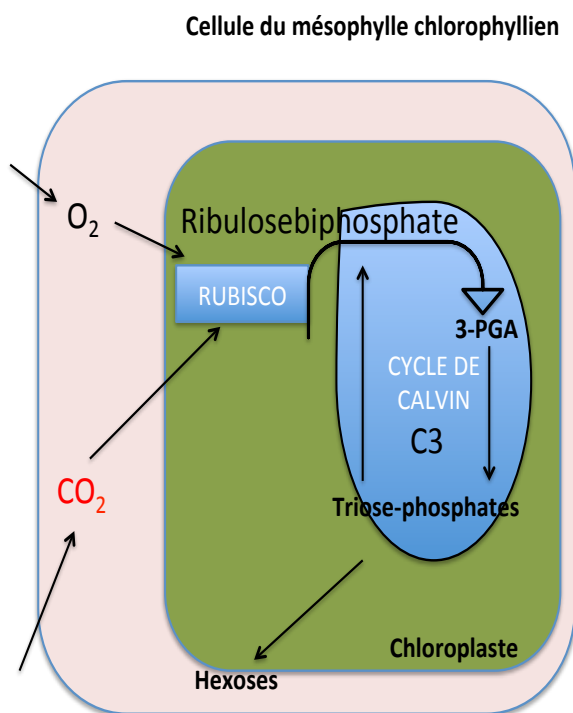


Figure 1 : Schémas des métabolismes de la photosynthèse : le cycle de Calvin

La Rubisco préactivée par la fixation du CO_2 sur la lysine 201 forme un carbamate, qui peut fixer un ribulosebiphosphate, lui ajouter CO_2 et H_2O et former 2 molécules de 3- PGA (3-phosphoglycerate) à la suite de 5 réactions.

La réduction du 3-PGA conduit aux trioses phosphates (glyceraldehyde 3-P) dont 1/6 sont utilisés pour la synthèse de fructose dans le cytosol puis d'hexoses.

Le reste est recyclé en ribulosebiphosphate par phosphorylation.

Fixation du CO_2 en C3

L'équation globale du processus s'écrit sous la forme :



La fourniture de NADH et d'ATP résulte de la captation d'énergie lumineuse qui fait intervenir des associations de protéines membranaires localisées à l'intérieur des chloroplastes : les photosystèmes, qui constituent des complexes biochimiques supramoléculaires comportant les pigments (les chlorophylles, xanthophylles et caroténoïdes...) capteurs d'énergie lumineuse (les quanta) et leurs protéines associées aux transporteurs d'électron.

Le fonctionnement complexe de la photosynthèse chez les plantes est un sujet d'émerveillement constamment renouvelé, surtout depuis la vérification de l'origine

bactérienne des chloroplastes. La symbiose d'origine avec des bactéries photosynthétiques a conduit au transfert de nombreux gènes bactériens vers le génome nucléaire des plantes, il ne reste aujourd'hui qu'une centaine de gènes dans le génome des chloroplastes. Cependant, la majorité des produits de ces gènes (de l'ordre de 2 500) sont réexpédiés dans les chloroplastes pour y former des complexes protéiques fonctionnels associant des sous-unités codées par le génome des chloroplastes avec des sous-unités codées par le génome nucléaire (exemple des photosystèmes, voir Choquet et Vallon, 2000) qui sont transportées dans ces organites par des systèmes complexes. Cette organisation fonctionnelle suppose de nombreuses régulations très finement coordonnées, de biosynthèse, de transport, et d'association des sous-unités, dont le détail n'est pas encore totalement élucidé.

L'enzyme responsable de la réduction/fixation du CO₂ est la Rubisco (abréviation de Ribulosebiphosphate carboxylase/oxygénase), la protéine la plus abondante de la biosphère, exemple remarquable de l'organisation fonctionnelle mixte qui résulte de l'évolution de la symbiose initiale. Elle est constituée chez les plantes de 16 sous-unités, dont huit petites protéines (S pour *small*) sont d'origine nucléaire et huit grosses (L pour *large*) d'origine chloroplastique. Cette organisation chez les plantes (L2)₄S8 est héritée des cyanobactéries, cependant d'autres organisations ont évolué chez différents organismes (Whitney et al., 2011). Les spécialistes s'accordent à faire dériver ces différentes formes d'une protéine ancestrale probablement apparue par modification d'une enzyme du métabolisme du soufre (Ashida et al., 2005), qui aurait également conduit à une forme sans activité carboxylase, dénommée forme IV (Tabita et al., 2008). L'émergence de la Rubisco s'est produite dans une atmosphère très riche en CO₂ et pratiquement dépourvue d'oxygène. Par la suite, le développement des organismes photosynthétiques a progressivement modifié la composition de l'atmosphère (Whitney et al., 2011) en l'enrichissant abondamment en oxygène.

Comme son nom l'indique la Rubisco (Ribulosebiphosphate carboxylase/oxygénase) possède également une affinité pour l'oxygène ce qui conduit à l'oxydation du Ribulosebiphosphate et forme deux trioses : du PGA (3-phosphoglycerate) qui rentre dans le cycle de Calvin, mais aussi du PG (2-phosphoglycerate) qui inhibe certaines étapes de la photosynthèse. Le PG est un produit dont le recyclage complexe fait intervenir des activités des mitochondries et des peroxysomes, pour aboutir à la formation de glycérate, réintroduit dans les chloroplastes. Ce métabolisme, coûteux en énergie, constitue la photorespiration (Figure 2) qui produit également

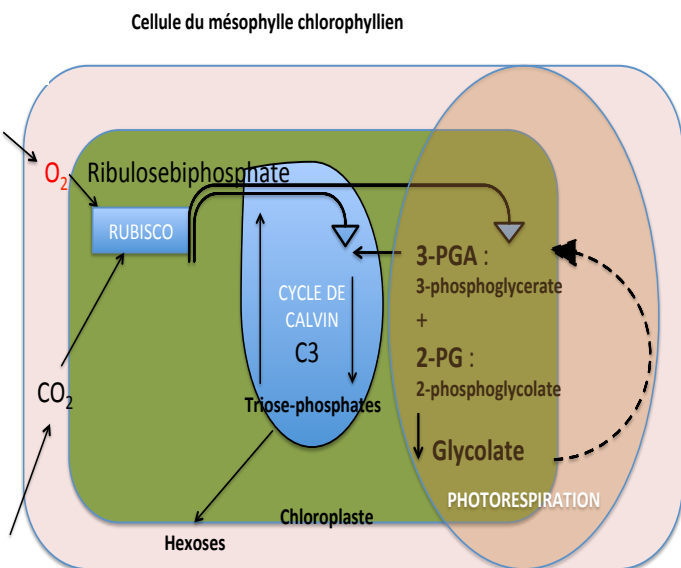


Figure 2 : Schémas des métabolismes de la photosynthèse : La photorespiration.

La fixation de O₂ sur la Rubisco entraîne l'oxydation du ribulose biphosphate dont l'hydrolyse produit le 3-PGA mais aussi le 2-PG (2-phosphoglycolate), puis le glycolate qui est un produit toxique. Il est éliminé par une série de réactions dans les peroxysomes, puis les mitochondries, qui aboutissent à la formation de 3-PGA recyclé, de CO₂ et de NH₄. Ce qui aboutit à une perte d'efficacité du fonctionnement photosynthétique de la Rubisco, coûteuse en énergie.

Fixation du CO₂ en C3 et Photorespiration

du CO₂ et de l'ammonium. Le fonctionnement d'oxydation, qui limite la photosynthèse, concerne en moyenne de 30 à 50% de l'activité de la Rubisco, mais ce ratio augmente selon la disponibilité en CO₂ et selon les conditions climatiques (Long et Spence, 2013).

À la différence de la photosynthèse des plantes en C₃, fortement ralentie par la température, la sécheresse et les fortes luminosités, la photosynthèse dite en C₄ de certaines plantes tropicales ou subtropicales (maïs, sorgho, canne à sucre...) s'est révélée moins sujette à ces conditions. La photosynthèse en C₄ fut révélée en 1966; elle consiste en une spécialisation cellulaire (Hatch, 2002). Les cellules du parenchyme foliaire fixent le CO₂ grâce à l'activité cytosolique de la PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase) qui produit de l'oxaloacetate, réduit en malate. Le malate est transporté vers les chloroplastes des cellules péri-vasculaires dans lesquelles il est hydrolysé par l'enzyme malique, en acide pyruvique et CO₂. L'acide pyruvique est recyclé dans les cellules du parenchyme (Figure 3). Cette spécialisation cellulaire s'accompagne d'adaptations spécifiques des chloroplastes des deux types de cellules. Cette répartition métabolique permet de concentrer de l'ordre de dix fois le CO₂ dans les cellules des gaines péri-vasculaires à proximité de la Rubisco, ce qui limite la fonction oxygénase de la Rubisco, donc la photorespiration (Figure 3), et permet une efficacité moyenne de la photosynthèse de l'ordre de 30% supérieure à la photosynthèse en C₃.

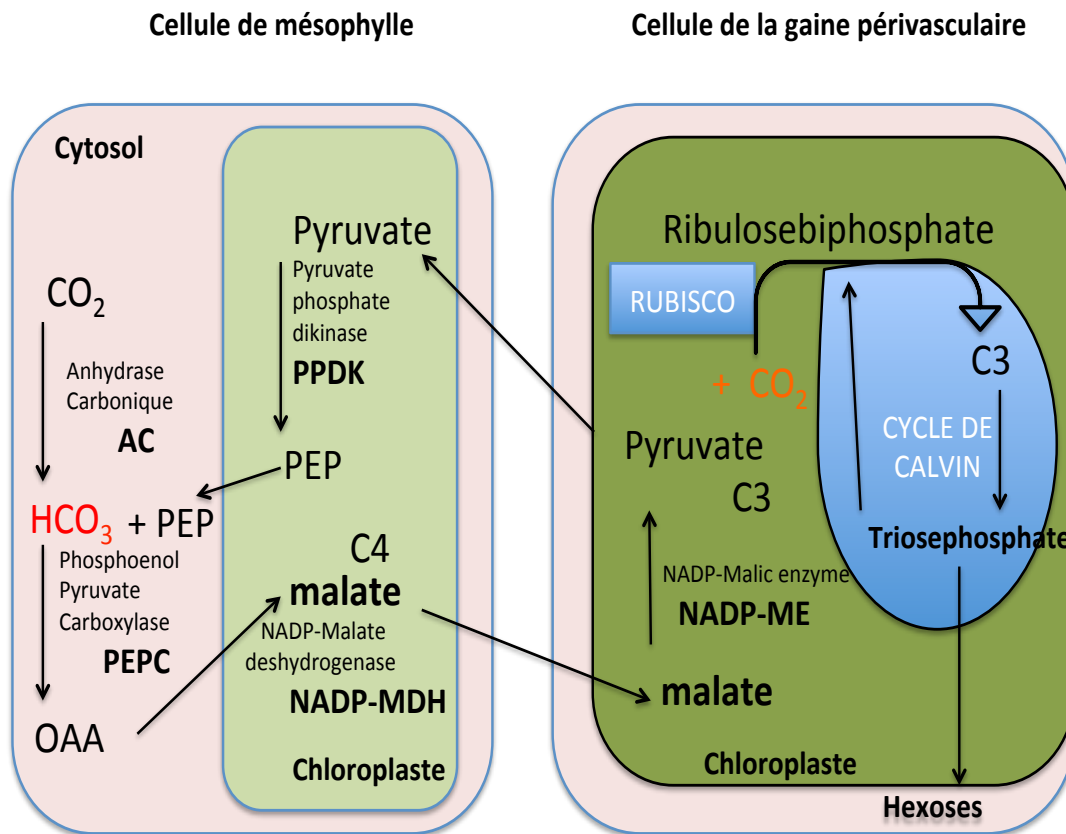


Figure 3 : Schémas des métabolismes de la photosynthèse : La photosynthèse en C₄.

Dans le cas des graminées, la fixation du carbone intervient en deux étapes, réparties dans deux types de cellules des feuilles. Dans les cellules du mésophylle, la PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase) produit de l'oxaloacetate, réduit dans les chloroplastes en malate qui circule vers les chloroplastes des cellules des gaines périvasculaires pour être decarboxylé en pyruvate recyclé, et en CO₂ utilisé par la Rubisco. Ce dispositif se traduit par une concentration du CO₂ ce qui limite la photorespiration.

Il existe des variations dans ce type de métabolisme en C4, mais ce schéma reste central pour de nombreuses plantes terrestres. Cette évolution adaptative s'est produite plus de 60 fois chez les plantes terrestres, spécialement chez les graminées (*Poaceae*), mais aussi chez d'autres familles (*Chenopodiaceae*, *Cleomoideae*, *Crassulaceae* ...) (Langdale, 2011).

Les plantes et organismes photosynthétiques aquatiques ont également développé des systèmes de concentration en réponse à la plus faible concentration du CO₂ dans l'eau. De fait, de nombreuses adaptations du dispositif de « la pompe à CO₂ » sont révélées pour des organismes variés (Kupriyanova et al., 2013).

Les progrès récents de la biologie végétale révèlent ainsi que la photosynthèse a diversement évolué selon les adaptations des organismes aux conditions écologiques. Ces connaissances, constamment renouvelées par les progrès des analyses métaboliques et génomiques, associées au progrès des techniques de transfert de gènes, révèlent une assez grande souplesse adaptative de ce processus, pourtant très complexe. Cette souplesse adaptative est bien illustrée par la capacité de certaines cyanophycées (*Leptolyngbya*) d'utiliser les longueurs d'onde du « rouge lointain » par modification des complexes photosynthétiques. Cette adaptation s'accompagne de la modulation de l'expression d'environ 3 000 gènes, soit d'environ 40% du génome (Gan et al., 2014).

2- Augmentation de la captation lumineuse et du transport d'électron

À l'échelle de la parcelle, l'organisation du couvert végétal constitue l'un des paramètres importants qui conditionne la quantité d'énergie lumineuse effectivement utilisée aux différents étages foliaires. Les modélisations prédisent des gains de l'ordre de 7% de productivité lorsque l'organisation du couvert végétal est optimisé (Dewry et al., 2014). Il est d'ores et déjà possible d'utiliser ces données dans les programmes d'amélioration : la génétique des caractères d'architecture du blé est connue (De Carvalho et Qualset, 1978). Dans ce domaine, la précision du rôle des brassinostéroïdes fournit également des pistes d'amélioration, ainsi les feuilles érigées de certains mutants de riz permettent d'augmenter les rendements (Sakamoto et al., 2006).

Tout récemment, une équipe du MIT a montré que des nanotubes de carbone insérés dans les chloroplastes de plantes d'*Arabidopsis*, se comportaient comme des antennes artificielles capables de capter l'énergie lumineuse de nombreuses longueurs d'onde, ce qui permet d'augmenter de l'ordre de 30% le transfert d'électron (Giraldo et al., 2014). Même s'il reste à démontrer que cela augmente effectivement le rendement photosynthétique, ces expériences démontrent qu'il est possible d'augmenter l'efficacité de la captation lumineuse, sans perturber le fonctionnement global d'une plante.

Le transport d'électrons est fortement lié au contenu en cytochrome *f* par unité de surface de feuille (Yamori et al., 2011 ; Evans, 2013). Afin d'augmenter le contenu en cytochrome *f*, il reste à déterminer la façon d'accroître le complexe fonctionnel qui contient ce cytochrome, complexe formé de trois sous-unités codées par le noyau et de quatre codées par le génome chloroplastique (Evans, 2013).

Une étude récente montre, assez paradoxalement, qu'une diminution de la teneur en chlorophylle peut se révéler bénéfique pour les rendements chez le blé (Hamblin et al., 2014). Cet effet bénéfique conjugue probablement les éléments favorables éventuels résultant de la diminution de chlorophylle (économie d'azote et de nutriments), ainsi qu'une meilleure

répartition de la lumière pour les étages foliaires. Enfin, l'échauffement réduit des feuilles, qui limite la fermeture des stomates, autorise une meilleure ventilation, donc une disponibilité accrue de CO₂.

3 - L'amélioration du fonctionnement de la Rubisco

Des considérations essentielles motivent ces travaux. En premier lieu, le fait que la Rubisco soit apparue il y a environ 2,5 milliards d'années dans une atmosphère bien plus riche en CO₂ et pratiquement dénuée d'oxygène peut rendre compte de l'apparente faible efficacité de l'enzyme dans la composition actuelle de l'air, dans laquelle l'oxygène est actuellement 525 fois plus abondant que le gaz carbonique.

De façon assez surprenante, les études de cinétique, associées aux fractionnements isotopiques, révèlent une Rubisco peu efficace et assez lente, qui nécessite de grandes quantités de l'enzyme, donc une importante mobilisation d'azote par les plantes. Les caractéristiques cinétiques des Rubisco auraient évolué afin d'être très précisément adaptées aux variations des conditions d'environnement des plantes (Tcherkez et al., 2006). Cependant, différentes formes de Rubisco, dont les efficacités sont variables, ont été progressivement révélées chez des organismes divers, et tout spécialement chez les algues rouges dont les formes (L₂)₄S₈ présentent une affinité supérieure pour le CO₂ (Pary et al., 2012). L'idée de manipuler l'assemblage, précisément régulé, des sous-unités de la Rubisco, inimaginable il y a une vingtaine d'années, s'est progressivement imposée avec les possibilités expérimentales du génie génétique tant au niveau nucléaire que chloroplastique. De nombreux essais concernent les plantes supérieures; ils révèlent une certaine souplesse des capacités d'assemblage de différentes sous-unités provenant d'espèces différentes (Pary et al., 2012). Cependant, les sous-unités des algues rouges ne sont ni repliées, ni assemblées par la machinerie des chloroplastes des plantes supérieures, il reste à découvrir les mutations susceptibles de favoriser l'assemblage (Andrews et Whitey, 2003 ; Whitey et al., 2011). Ces expérimentations ont déjà fourni de nombreuses surprises, et se perfectionnent progressivement par l'élaboration de nouveaux outils. C'est le cas des tabacs spécialement façonnés pour faciliter l'application du génie génétique aux chloroplastes (Whitney et Sharwood, 2008). De plus, il est désormais possible d'obtenir une Rubisco active *in vitro*, donc d'assembler *in vitro* la Rubisco de cyanobactéries (type (L₂)₄S₈) en faisant intervenir des chaperones spécifiques (Liu et al., 2010), protéines qui favorisent l'assemblage et le repliement fonctionnel des sous-unités de la Rubisco. Cela permet d'éprouver directement les effets de mutations des sous-unités sur les repliements, l'assemblage et l'activité des holoenzymes ainsi assemblés. Globalement, les expériences de transformation des chloroplastes ont révélé que des modifications des grandes sous-unités entraînent des variations de l'efficacité de la Rubisco qui sont corrélées avec la photosynthèse et la croissance des plantes transplastomiques (plantes transgéniques dont le gène d'intérêt a été inséré dans le génome du chloroplaste). Le rôle des petites sous-unités est en cours d'analyse dans différents systèmes expérimentaux, qui se heurtent encore aux difficultés d'assemblage de sous-unités d'origine différente (Pary et al., 2012).

Le résultat le plus prometteur dans ce domaine vient d'être publié (Lin et al., 2014a), ces auteurs ont remplacé les gènes des grandes sous-unités de la Rubisco des chloroplastes de tabac par les gènes des sous-unités de la Rubisco d'une cyanobactérie (*Synetochococcus elongatus*), associés aux gènes de quelques sous-unités de carboxysomes bactériens. Alors que ces plantes transgéniques ne survivent pas en atmosphère normale, elles se développent tout à fait

normalement en atmosphère enrichie en CO₂ (9000 ppm). Le fait que ces plantes fonctionnent uniquement avec la Rubisco bactérienne renouvelle fondamentalement ces approches expérimentales, et constitue le préalable au transfert complet de l'efficacité de la photosynthèse due aux capacités de concentration du CO₂ des carboxysomes des bactéries (Lin et al., 2014b).

Le génie génétique permet également de préciser le rôle d'autres protéines associées à la Rubisco, telles les chaperones qui favorisent les repliements et les associations correctes des sous-unités ainsi que la stabilité de l'holoenzyme (Feiz et al., 2012). La Rubisco activase, est une ATPase soluble des chloroplastes qui restaure l'activité de la Rubisco inhibée par la fixation des pentoses-phosphates. Deux isoformes existent chez la majorité des plantes. Les analyses montrent que cette activité présente un optimum de température variable selon les espèces, ce qui procure la possibilité d'augmenter la photosynthèse de plantes tempérées par transfert de Rubisco activase thermo-tolérante de plantes tropicales (Sage et al., 2008). En outre, certains mutants de Rubisco activase procurent une réactivation plus rapide de la photosynthèse dans les transitions de régimes lumineux, et donc une nette amélioration de l'efficacité de la fixation du CO₂ dans des conditions de lumière variables (Carmo-Silva et Savucci, 2013). La poursuite de ces études devraient se révéler fructueuse, car l'expression des Rubisco activases est élevée au cours du remplissage des grains, ce qui leur confère un rôle important pour la productivité (Yin et al., 2014).

Les analyses de la Rubisco et des protéines associées, chez des organismes de plus en plus nombreux, permettent d'envisager la caractérisation plus précise des relations séquence-performance pour les différents niveaux de régulation. Ainsi du rôle de deux mutations de la grande sous-unité de la Rubisco chez les Amaranthaceae, spécifiques de l'évolution vers la photosynthèse en C₄. Ces deux mêmes remplacements spécifiques d'acides aminés se vérifient pour les monocotylédones en C₄, ce qui révèle un parallélisme frappant d'évolution moléculaire (Kapralov et al., 2012). Le recours au génie génétique en vérifiera l'efficacité, cependant, une pleine utilisation de ces connaissances aux plantes cultivées reposera sur l'extension des procédés de transformation des chloroplastes, encore restreints à un trop petit nombre d'espèces (Hanson et al., 2012).

4- Les métabolismes de concentration du CO₂

Au cours de l'évolution, de nombreuses adaptations à la raréfaction du CO₂ ont été mise en place par les organismes photosynthétiques (Zabaleta et al., 2012). Cependant, la majorité des études concerne deux mécanismes de concentration du CO₂ : la répartition métabolique de la photosynthèse en C₄ entre les cellules des feuilles, et le dispositif de concentration intrachloroplastique du CO₂ des bactéries et des algues.

La révélation de l'efficacité de la photosynthèse en C₄ a motivé de nombreuses tentatives de transfert des gènes spécifiques. Jusqu'à aujourd'hui, les transferts des gènes codant les principales activités du métabolisme en C₄ (Figure 3 : PEPC, PPDK, NADP-ME, MDH...) aux plantes en C₃ (riz, tabac, pomme de terre...) n'ont provoqué que de modestes améliorations de l'efficacité de la photosynthèse des plantes réceptrices, (pour revue voir Ruan et al., 2012).

Ces tentatives exploratoires se heurtent à la spécialisation cellulaire qui accompagne les évolutions biochimiques des plantes en C₄, dont les cellules des gaines péri-vasculaires sont plus nombreuses et plus grandes que leurs homologues des plantes en C₃. Il semble d'ailleurs que

cette anatomie ait précédé et favorisé l'évolution biochimique (Christin et al., 2013). Il convient cependant de relativiser l'importance de ces différences morphologiques et biochimiques, sans doute trop exagérées depuis la découverte de la photosynthèse en C4. L'analyse de nombreuses mutations affectant la biochimie des chloroplastes, a récemment prouvé que les cellules des gaines péri-vasculaires des plantes en C3 présentent, elles aussi, des spécificités biochimiques qui leur confèrent des rôles cruciaux dans les flux métaboliques (Lundquist et al., 2013).

Bien que les déterminants génétiques de ces différenciations cellulaires se précisent (Slewinski et al., 2012), l'analyse comparée (*Setaria viridis*, *Zea mais*, *Sorghum bicolor*) des gènes différemment exprimés entre les cellules du mésophylle et les cellules de la gaine péri-vasculaire révèle que ce sont de l'ordre de cent à deux cents gènes qui rendent compte des spécialisations cellulaires, avec une remarquable convergence entre les trois espèces (John et al., 2014). Fait notable, ces résultats impliquent une évolution parallèle de l'expression des gènes responsables de la mise en place du métabolisme en C4 chez les Poacées.

L'évolution vers la photosynthèse en C4 apparaît donc complexe, mais il existe des situations biologiques qui permettent une approche assez directe. Par exemple, dans le genre *Cleome*, de l'ordre des *Brassicales*, phylogénétiquement proches d'*Arabidopsis*, les différentes espèces présentent différentes étapes de la progression de C3 en C4. La progression chez ces espèces de *Cleome* met en jeu des nervurations plus denses, des cellules péri-vasculaires plus grandes et plus riches en organites, puis l'expression des enzymes spécifiques chez *Cleome gynandra* (Marshall et al., 2007 ; Koteyea et al., 2011), cependant avec des différences de niveau d'expression importantes (Bräutigam et al., 2011). Cette progression semble vérifiée pour un grand nombre de plantes d'après les méta-analyses de différents genres qui comprennent des espèces en C3 et C4 (Williams et al., 2013). Une revue très complète fait le point sur l'évolution morphologique et la spécialisation cellulaire (Sage et al., 2014).

Enfin, l'hypothèse d'une extension de la différenciation de l'endoderme racinaire dans les feuilles, pour former les gaines péri-vasculaires des plantes en C4, alors que cette extension de différenciation serait normalement réprimée dans les feuilles en C3, fournit de nouvelles orientations de recherches (Slewinski, 2013).

Cette hypothèse vient d'ailleurs d'être pleinement confirmée par la comparaison des transcriptomes des feuilles de deux *Cleomaceae* : *Tarenaya hassleriana* en C3 et *Gynandropsis gynandra* en C4 (Kulahoglu et al., 2014). Cette analyse révèle l'expression, dans les feuilles C4, de différents gènes exprimés dans les racines, ainsi qu'une différenciation plus lente des feuilles en C4 qui autorise une nervation plus importante.

Les études de la régulation de l'expression des gènes de la photosynthèse en C4 montrent que ce sont des altérations de l'expression spatiale des gènes orthologues des plantes en C3 qui ont progressivement conduit à l'expression cellulaire ciblée. Les enzymes spécifiques de la photosynthèse en C4 ont été recrutés parmi les gènes des familles des enzymes du métabolisme en C3. La plupart des plantes exprime plusieurs gènes de PEPC, c'est le cas d'*Arabidopsis* (Sanchez et al, 2006), et le cas dans le genre *Flaveria*, un genre d'*Asteraceae* qui comporte des plantes en C3 et en C4, mais aussi des espèces intermédiaires C3-C4 ce qui facilite l'analyse de l'évolution des séquences des gènes associées aux différents métabolismes. Pour la PEPC par exemple, un seul des trois gènes C3 (*ppcA*), est spécialement et fortement exprimé dans les cellules du mésophylle de *Flaverai trinervia* en C4, ce qui permet la comparaison des séquences

du promoteur et des séquences activatrices, puis d'avoir accès aux facteurs de transcription spécifiques (Westhoff et Govic, 2004).

Selon les gènes C4 et les plantes, l'analyse des modalités de régulation des enzymes C4 font intervenir des régulations par les séquences codantes (Paulus et al., 2013) ou les séquences promotrices (Abdolreza et al., 2014), ainsi que des régulations post-transcriptionnelles (Aldous et al., 2014), mais aussi par les histones associées, donc des modifications épigénétiques (Heimann et al., 2013). Cette dernière découverte, fait écho aux effets d'hétérosis sur l'efficacité de la photosynthèse chez des hybrides d'*Arabidopsis* (Fugimoto et al., 2012). Ce qui ouvre la voie aux tentatives de modifications épigénétiques ciblées, qui présentent l'avantage de modifier l'expression d'un grand nombre de gènes de façon coordonnée pour une fonction donnée (Offermann et Peterhansel, 2014).

De fait, la nécessaire maîtrise de la complexité de ces régulations cellule-spécifiques en C4 pour leurs transferts aux plantes C3 est sans doute plus rapidement accessible qu'il semble, pour deux raisons essentielles. D'une part, on sait depuis longtemps que les gènes C4 sont correctement régulés et exprimés spécifiquement dans les plantes C3 (Matsuoka et al., 1993). D'autre part, certains gènes C3 révèlent des expressions cellules spécifiques lorsqu'ils sont transférés dans une plante C4 (Brown et al., 2011 ; Kajala et al., 2012), ce qui indique que les gènes C3 peuvent être directement recrutés pour les métabolismes en C4. Les plantes en C4 présentent des métabolismes de type C3 dans certaines feuilles au cours du développement, ou en réponse à l'environnement (Yakir et al., 1991; Xu et al., 2012), et les cellules compagnes de la veine centrale des plantes en C3 montrent des activités de type C4 (Brown et al., 2010). Également, les plantes C3 placées en atmosphère appauvrie en CO₂ montrent des surexpressions des enzymes du métabolisme en C4 (Li et al., 2014).

Enfin, l'exploitation des analyses comparées des transcriptomes de feuilles de riz et de maïs (très précisément sur des segments de développement comparable) permet une approche ciblée de la mise en place des spécificités anatomiques, ainsi que la caractérisation de régulateurs de transcription nécessaires aux régulations des métabolismes en C4 (Wang et al., 2014a).

Il est clair que les connaissances sur la mise en place des métabolismes en C4 s'accumulent. Ce qui peut entraîner une image de complexité. Cependant, il faut garder à l'esprit la régulation par des éléments conservés des séquences géniques, qui laisse deviner la simplicité (relative) du mécanisme qui a permis les mêmes adaptations en C4 dans de nombreuses familles botaniques.

L'ensemble de ces connaissances motive de plus en plus fortement les tentatives d'adaptation de l'efficacité des plantes en C4 aux plantes en C3. Cet objectif mobilise désormais d'importants programmes coopératifs tout spécialement sur le riz qui est une plante en C3, avec des financements importants (<http://c4rice.irri.org/> - <http://www.igb.illinois.edu/news/illinois-improve-crop-yield-through-photosynthesis-new-global-effort> - von Caemmerer et al, 2012). Les progrès fondamentaux résultant de ces programmes seront également riches de possibilités d'application à d'autres plantes C3 de grande culture ...

Une autre forme de métabolisme en C4, encore plus étonnante, ne repose pas sur une spécialisation cellulaire, mais sur la répartition dans la même cellule de deux type de chloroplastes (Chuong et al., 2006), mais les mécanismes de cette spécialisation des chloroplastes sont loin d'être totalement élucidés (Rosnow et al., 2014).

En milieu aquatique, chez les cyanobactéries, les diatomées et certaines algues, la nécessité de concentrer le CO₂ a été résolue par un processus cellulaire intra-chloroplastique. Les bactéries photosynthétiques ont développé des systèmes de perméation efficaces du CO₂ et du HCO₃⁻ qui font intervenir quelques protéines dont l'activité concentre de l'ordre de 1000 fois le HCO₃⁻ dans les cellules. La Rubisco est localisée dans des structures particulières des thylakoïdes, les carboxysomes (5 à 15 par cellule), dans lesquels une anhydrase carbonique spécifique libère du CO₂ à proximité de la Rubisco. Le carboxysome doué de perméabilité sélective, se compose de protéines (6 à 8 gènes), dont l'assemblage forme une coque (semblable à une coque de virus) fait intervenir d'autres protéines (Espinoza et Kimber, 2011). Ces adaptations fonctionnelles des cyanobactéries se sont développées après l'endosymbiose à l'origine des plantes terrestres, qui en sont donc dépourvues. L'idée de transférer tout ou partie des gènes en cause aux plantes terrestres s'est progressivement imposée (Price et al., 2012 ; Zarzycki et al., 2013), d'autant que les modélisations laissent augurer d'une augmentation de 60% de l'utilisation du CO₂ (McGrath et Long, 2014).

Les premières tentatives concernaient le transfert aux chloroplastes du gène (*ictB*) de perméation du HCO₃⁻ afin de vérifier la possibilité de concentrer le CO₂ dans les chloroplastes (Liemann-Hurwitz et al., 2003). Cependant, l'augmentation de la photosynthèse détectée en serre pour quelques rares plantes, ne s'est pas vérifiée aux champs.

Plus récemment, la possibilité provoquer la formation de carboxysomes dans les chloroplastes par le transfert coordonné des gènes de *Synechococcus elongatus* codant les protéines du carboxysome vient d'être vérifiée. L'expression transitoire systémique par agro-infiltration des gènes en cause a permis de détecter des formations organisées semblables aux carboxysomes dans les chloroplastes de *Nicotiana benthamiana* (Lin et al., 2014b). La prochaine étape, l'obtention des plantes transgéniques, nécessite probablement de nombreuses précisions concernant la régulation de l'expression des différentes protéines, ainsi que l'adressage de l'anhydrase carbonique et de la Rubisco, car chez les bactéries la Rubisco joue un rôle important pour la nucléation complète du carboxysome (Cameron et al., 2013). Comme nous l'avons déjà signalé, il est possible de faire exprimer la Rubisco de cyanobactérie (Lin et al., 2014a) par des chloroplastes de plante.

Le cadre expérimental semble donc pratiquement au point pour transférer l'ensemble du dispositif de concentration du CO₂ bactérien aux plantes supérieures...

5- La diminution de la photorespiration

Bien que l'on puisse considérer que la photorespiration représente un gâchis d'énergie pour la plante, il semble que ce métabolisme soit essentiel car les mutants de photorespiration ne survivent pas dans l'atmosphère actuelle, vraisemblablement en raison de l'accumulation du 2-phosphoglycerate, inhibiteur du cycle de Calvin, ce qui empêche la régénération du Ribulosebiphosphate. Le transfert de gènes permet désormais de provoquer la métabolisation plus rapide du 2-Phosphoglycerate (Peterhansel et Maurino, 2011).

Le bien-fondé de cette approche vient d'être confirmé avec des pommes de terre transgéniques qui expriment une polyprotéine comportant les trois sous-unités de la glyoxylate deshydrogénase d'*E. coli* (Nölke et al., 2014). La polyprotéine, adressée aux chloroplastes, est fonctionnelle et permet effectivement d'augmenter la photosynthèse, de sorte que la production de tubercules des certaines plantes transgéniques est 2,3 fois supérieure à celle des plantes témoins.

Cependant, toutes ces expériences ont été réalisées en serre ou en salle climatisée, il faut donc attendre la confirmation d'un tel comportement en différentes conditions agronomiques.

6- amélioration du fonctionnement des stomates

Les échanges gazeux qui permettent le fonctionnement des plantes sont dus essentiellement au fonctionnement des stomates, les pores des feuilles. La mise en place de ces perforations repose sur la différenciation de deux cellules de l'épiderme, les cellules de garde disposées en demi-arc de cercle autour du pore. Le métabolisme des cellules de garde modifie la turgescence, ce qui contrôle l'ouverture et la fermeture du pore. Bien que ces stomates ne représentent que de l'ordre de 3% de la surface des feuilles, ils contrôlent effectivement plus de 98% du CO₂ absorbé ainsi que de l'eau évaporée.

Le fonctionnement des stomates, qui conditionne à la fois la photosynthèse et l'évaporation donc l'efficacité de l'eau, constitue donc l'un des aspects clé de la biologie des plantes sessiles soumises à des conditions d'environnement variables. De nombreux travaux destinés à mieux comprendre leur fonctionnement (Kollist et al., 2014) débouchent également sur des possibilités de manipulations (densité de stomate, rapidité des processus d'ouverture-fermeture ...) visant à en améliorer le fonctionnement (Lawson et Blatt, 2014).

Il semble *a priori* illusoire de modifier l'activité des stomates sans entraîner des conséquences néfastes pour la plante, tant la régulation complexe de leur fonctionnement (Kollist et al., 2014) est également étroitement imbriquée avec l'ensemble des régulations d'une plante, et tout spécifiquement avec la régulation de l'activité photosynthétique.

Un travail récent sur une des activités clé de l'ouverture des stomates apporte un éclairage nouveau dans ce domaine. Il concerne la régulation de l'H⁺-ATPase de la membrane des cellules de garde. Activée par la lumière bleue l'ATPase induit la polarisation de la membrane induisant un flux de potassium, ce qui provoque la plasmolyse des cellules de garde et donc l'ouverture des stomates. Chez *Arabidopsis thaliana*, le transfert du gène de l'ATPase sous le contrôle du promoteur fort et spécifique des cellules de garde (*pGC1*) permet effectivement d'augmenter la quantité d'ATPase dans les cellules de garde, ce qui accroît l'ouverture de stomates en réponse à la lumière. Cette stimulation apparaît assez spécifique, car elle ne perturbe pas les réponses des stomates à l'obscurité ni à l'acide abscissique. Enfin et surtout, elle provoque une photosynthèse plus efficace et une meilleure croissance des plantes (Wang et al, 2014b).

Cependant, il s'agit également d'expériences réalisées dans les conditions contrôlées de salles climatisées, il faut donc attendre les vérifications sur des plantes cultivées et en conditions agronomiques pour décider de l'intérêt des plantes qui sur-expriment l'ATPase membranaire des cellules de garde.

7- Modulation des régulations de la photosynthèse

En raison de la complexité moléculaire et métabolique de la photosynthèse, et de ses multiples interactions avec la physiologie des plantes, il semblait de plus en plus impensable d'intervenir sur la régulation même du processus global de la fixation du carbone par les plantes...

Une publication récente vient tout juste de démontrer l'existence de facteurs de transcription qui contrôlent l'activité d'un grand nombre de gènes de la photosynthèse (Ambaravam et al.,

2014). Ce travail constitue d'ailleurs une remarquable illustration de la puissance des analyses de génomique. Ces auteurs ont utilisé les nombreuses données publiées d'expression des gènes de riz selon différentes conditions de l'environnement. L'analyse des corrélations d'expression de chacun des facteurs de transcription du riz avec l'ensemble des gènes de 328 voies métaboliques (photosynthèse et métabolisme du carbone), a permis de caractériser un gène (Os03g02650) nommé HYR (Higher Yield Rice). Ce facteur de transcription inducible par la sécheresse, était le seul présentant des associations positives avec les métabolismes du carbone. L'étude de l'expression *in planta* de ce gène a vérifié que la sécheresse en provoquait la surexpression tout particulièrement au niveau des panicules au stade pré-anthèse et post-anthèse, qui sont effectivement des stades critiques pour la production des céréales.

Ces auteurs ont ensuite surexprimé ce facteur de transcription par génie génétique : les riz transgéniques présentent effectivement une photosynthèse plus efficace, qui permet jusqu'à 30 % de rendement supplémentaire, de plus elles sont effectivement plus résistantes à la sécheresse ainsi qu'aux températures de nuit élevées. L'ensemble des vérifications démontre bien que HYR constitue un régulateur maître qui régule l'activité de nombreux facteurs de transcription des processus de la photosynthèse. Toutes ces expériences ont été conduites en conditions contrôlées, il faut donc espérer que les essais au champ se révéleront aussi productifs.

8- Photosynthèse et disponibilité en azote

De nombreuses expériences, en conditions contrôlées, ont permis de montrer que l'augmentation de la pression partielle de CO₂ provoque, initialement, une photosynthèse accrue, et une croissance plus importante, cependant cette stimulation est suivie d'une baisse de la photosynthèse. Chez la majorité des plantes, ce déclin se traduit par une teneur accrue en amidon et une baisse en protéines (Bloom et al., 2010 ; Bunce, 2014). Il semble clair que des interactions très complexes des régulations métaboliques sont responsables de ces modifications de teneurs en éléments nutritifs. L'un des éléments essentiels concerne la demande accrue en nutriments que suscite l'augmentation de la photosynthèse. Ainsi une augmentation de la disponibilité en nutriments, et spécialement en azote, permet aux plantes de conserver la vitesse de croissance et la teneur en protéines. Malgré le grand nombre de travaux sur ces sujets, ces régulations métaboliques ne sont pas encore bien connues. Une revue très complète sur ce sujet (Stitt et Krapp, 1999) conclut qu'il reste à conduire des analyses plus poussées du métabolisme de l'azote chez les plantes élevées en atmosphère enrichie en CO₂. Dans cet objectif de nouveaux outils seront bientôt disponibles, notamment avec les plantes transgéniques qui expriment des Rubiscos bactériennes plus efficaces. Également, les plantes qui présentent une efficacité accrue de l'utilisation de l'azote (Martin et al., 2006 ; Shrawat et al., 2008), ou un doublement du stockage de sucre (Wu et Birch, 2007), fournissent des outils expérimentaux supplémentaires pour les analyses du métabolisme en atmosphère enrichie en CO₂.

9- Conclusions et perspectives

La complexité fonctionnelle de la photosynthèse des plantes, résultant d'une longue évolution adaptative, avait puissamment motivé l'idée que l'on ne peut sérieusement envisager de faire mieux que l'aboutissement de l'évolution naturelle. Les études précises de cinétique et de flux métaboliques révèlent la délicate adaptation de la Rubisco aux conditions actuelles des plantes

de régions tempérées. Cependant, les évolutions morphologiques et métaboliques des nombreuses adaptations naturelles en cours d'analyse révèlent une grande variété de mécanismes de la photosynthèse. L'analyse de ces adaptations se précise de jour en jour grâce aux connaissances accrues du métabolisme et de la génomique. Mais ce sont surtout les progrès des techniques de transfert de gènes qui fournissent dans ce domaine de nouveaux et puissants outils d'analyse fonctionnelle.

Les travaux les plus conséquents, conduits en coopérations internationales, portent sur l'adaptation des métabolismes en C4 aux plantes en C3.

En parallèle, des avancées audacieuses permettent de créer des métabolismes nouveaux. Ainsi du transfert de la glyoxylate oxydase bactérienne, qui permet de supprimer la photorespiration. Surtout le transfert aux plantes des complexes photosynthétiques très efficaces de bactéries ouvre de vastes possibilités expérimentales. Ces avancées, bien que majoritairement obtenues sur des plantes modèles cultivées en conditions contrôlées, ouvrent des perspectives pour les plantes cultivées, dont il faudra éprouver le bien fondé en conditions agronomiques.

Dans ce domaine cependant, il reste un défi majeur, qui concerne la compréhension des inter-régulations du métabolisme photosynthétique avec le stockage des sucres et l'assimilation de l'azote.

Références

- Abdolreza EN, Fatemeh E, Elyas MS, Ahmad SN, Maryam G, et al. (2014) Structures of Phospho enol pyruvate carboxylase (PEPC) Gene Promoter from C 4 and C 3 Flaveria species Using Sequence Analysis by Bioinformatics Tools. *Ann Res Rev Biol* 4: 2779-2794.
- Aldous SH, Weise SE, Sharkey TD, Waldera-Lupa DM, Stühler K, et al. (2014) Evolution of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase Protein Kinase Family in C3 and C4 Flaveria spp. *Plant Physiol* 165: 1076-1091.
- Ambavaram MMR, Basu S, Krishnan A, Ramegowda V, Batlang U, Rahman L, Baisakh N, Pereira A (2014) Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. *Nat Commun* 5 : 5302.
- Andrews TJ, Whitney SM (2003) Manipulating ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Arch Biochem Biophys* 414: 159-169.
- Ashida H, Danchin A, Yokota A (2005) Was photosynthetic RuBisCO recruited by acquisitive evolution from RuBisCO-like proteins involved in sulfur metabolism? *Res Microbiol* 156: 611-618.
- Bloom AJ, Burger M, Rubio Asensio JS, Cousins AB (2010) Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. *Science* 328: 899-903.
- Bräutigam A, Kajala K, Wullenweber J, Sommer M, Gagneul D, et al. (2011) An mRNA blueprint for C4 photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C3 and C4 species. *Plant Physiol* 155: 142-156.
- Brown NJ, Palmer BG, Stanley S, Hajaji H, Janacek SH, et al. (2010) C4 acid decarboxylases required for C4 photosynthesis are active in the mid-vein of the C3 species Arabidopsis thaliana, and are important in sugar and amino acid metabolism. *Plant J* 61: 122-133.
- Brown NJ, Newell C a, Stanley S, Chen JE, Perrin AJ, et al. (2011) Independent and parallel recruitment of preexisting mechanisms underlying C4 photosynthesis. *Science* 331: 1436-1439.
- Bunce JA (2014) Corn response to elevated CO2 varies with the amount of nitrogen applied. *Am J Plant Sci* 5 : 306-312.
- Calvin M. (1956) The photosynthetic cycle. *Bull Soc Chim Biol* 38(11):1233-44.
- Cameron JC, Wilson SC, Bernstein SL, Kerfeld CA (2013) Biogenesis of a bacterial organelle: the carboxysome assembly pathway. *Cell* 155: 1131-1140.
- Carmo-Silva AE, Salvucci ME (2013) The regulatory properties of Rubisco activase differ among species and affect photosynthetic induction during light transitions. *Plant Physiol* 161: 1645-1655.
- Choquet Y, Vallon O (2000) Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82: 615-634.
- Christin P-A, Osborne CP, Chatelet DS, Columbus JT, Besnard G, et al. (2013) Anatomical enablers and the evolution of C4 photosynthesis in grasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1381-1386.

- Chuong SDX, Franceschi VR, Edwards GE (2006) The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C4 photosynthesis in Chenopodiaceae species. *Plant Cell* 18: 2207-2223.
- Chupeau Y (2013) La génomique et l'amélioration des plantes. AAF : <http://www.academie-agriculture.fr/groupe-de-reflexion/potentiels-de-la-science-pour-lavenir-de-lagriculture-de-lalimentation-et-de>
- De Carvalho FIF, Qualset CO (1978) Genetic Variation for Canopy Architecture and its Use in Wheat Breeding. *Crop Sci* 18: 561-567.
- Drewry DT, Kumar P, Long SP (2014) Simultaneous improvement in productivity, water use, and albedo through crop structural modification. *Glob Chang Biol* 20: 1955-1967.
- Espie GS, Kimber MS (2011) Carboxysomes: cyanobacterial RubisCO comes in small packages. *Photosynth Res* 109: 7-20.
- Evans JR (2013) Improving photosynthesis. *Plant Physiol* 162: 1780-1793.
- Farineau J, et Morot-Gaudry JF (2011) La photosynthèse. Editions Quae
- Feiz L, Williams-Carrier R, Wostrikoff K, Belcher S, Barkan A, et al. (2012) Ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase/oxygenase accumulation factor1 is required for holoenzyme assembly in maize. *Plant Cell* 24: 3435-3446.
- Fujimoto R, Taylor JM, Shirasawa S, Peacock WJ, Dennis ES (2012) Heterosis of Arabidopsis hybrids between C24 and Col is associated with increased photosynthesis capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7109-7114.
- Gan F, Zhang S, Rockwell NC, Martin SS, Lagarias JC, Bryant DA (2014) Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far red light. *Science* 345, 1312-1317.
- Giraldo JP, Landry MP, Faltermeier SM, McNicholas TP, Iverson NM, et al. (2014) Plant nanobionics to augment photosynthesis and biochemical sensing. *Nature Materials*, 13 : 400-408.
- Hamblin J, Stefanova K, Angessa TT (2014) Variation in chlorophyll content per unit leaf area in spring wheat and implications for selection in segregating material. *PLoS One* 9: e92529.
- Hanson MR, Gray BN, Ahner BA (2013) Chloroplast transformation for engineering of photosynthesis. *J Exp Bot* 64, 731-742.
- Hatch M.D. (2002). C4 photosynthesis: Discovery and resolution. *Photosynth. Res.* 73: 251-256.
- Heimann L, Horst I, Perduns R, Dreesen B, Offermann S, et al. (2013) A Common histone modification code on C4 genes in maize and its conservation in Sorghum and Setaria italica. *Plant Physiol* 162: 456-469.
- John CR, Smith-Unna RD, Woodfield H, Covshoff S, Hibberd JM (2014) Evolutionary convergence of cell-specific gene expression in independent lineages of C4 grasses. *Plant Physiol* 165: 62-75.
- Kajala K, Brown NJ, Williams BP, Borrill P, Taylor LE, et al. (2012) Multiple Arabidopsis genes primed for recruitment into C4 photosynthesis. *Plant J* 69: 47-56.
- Kapralov MV, Smith JAC, Filatov DA (2012) Rubisco evolution in C₄ eudicots: an analysis of Amaranthaceae sensu lato. *PLoS One* 7: e52974.
- Kollist H, Nuhkat M (2014) Tansley review. Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytol* 203, 44-62.
- Koroidov S, Shevela D, Shutova T, Samuelsson G, Messinger J (2014) Mobile hydrogen carbonate acts as proton acceptor in photosynthetic water oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6299-6304.
- Koteyeva NK, Voznesenskaya E V, Roalson EH, Edwards GE (2011) Diversity in forms of C4 in the genus Cleome (Cleomaceae). *Ann Bot* 107: 269-283.
- Kulahoglu C, Denton AK, Sommers M, Maß J, Chiesky S et al (2014) Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two cleomaceae C3 and C4 plant species. *Plant Cell* 26, 3243-3260.
- Kupriyanova EV, Sinetova MA, Cho SM Park YI, Los DA, Pronina NA (2013) CO₂-concentrating mechanism in cyanobacterial photosynthesis: organization, physiological role, and evolutionary origin. *Photosynth Res* 117:133-146
- Langdale JA (2011) C4 cycles : past, present, and future research on C4 photosynthesis. *Plant Cell* 23 : 3879-3892.
- Lawson T, Blatt MR (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol* 164: 1556-1570.
- Li Y, Xu J, Haq NU, Zhang H, Zhu X-G (2014) Was low CO₂ a driving force of C4 evolution: Arabidopsis responses to long-term low CO₂ stress. *J Exp Bot* 65: 3657-3667.
- Lieman-Hurwitz J, Rachmilevitch S, Mittler R, Marcus Y, Kaplan A (2003) Enhanced photosynthesis and growth of transgenic plants that express ictB, a gene involved in HCO₃⁻ accumulation in cyanobacteria. *Plant Biotechnol J* 1: 43-50.
- Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Parry MAJ, Hanson MR (2014a) A faster rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. *Nature* 513 : 547-550.

- Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Devonshire J, Hines KM, et al. (2014b) B-Carboxysomal proteins assemble into highly organized structures in *Nicotiana* chloroplasts. *Plant J* 79: 1-12.
- Liu C, Young AL, Starling-Windhof A, Bracher A, Saschenbrecker S, et al. (2010) Coupled chaperone action in folding and assembly of hexadecameric Rubisco. *Nature* 463: 197-202.
- Long SP et Spence AK (2013) Toward cool C4 crops. *Annu Rev plant Biol* 64 : 701-722.
- Lundquist PK, Rosar C, Bräutigam A, Weber APM (2014) Plastid signals and the bundle sheath: mesophyll development in reticulate mutants. *Mol Plant* 7: 14-29.
- Marshall DM, Muhaidat R, Brown NJ, Liu Z, Stanley S, et al. (2007) *Cleome*, a genus closely related to *Arabidopsis*, contains species spanning a developmental progression from C(3) to C(4) photosynthesis. *Plant J* 51: 886-896.
- Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, et al. (2006) Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell* 18: 3252-3274.
- Matsuoka M, Tada Y, Fujimura T, Kano-Murakami Y (1993) Tissue-specific light-regulated expression directed by the promoter of a C4 gene, maize pyruvate, orthophosphate dikinase, in a C3 plant, rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9586-9590.
- McGrath JM, Long SP (2014) Can the cyanobacterial carbon-concentrating mechanism increase photosynthesis in crop species? A theoretical analysis. *Plant Physiol* 164: 2247-2261.
- Morot-Gaudry (2014) Les métabolismes photosynthétiques : Intérêts pour l'agronomie. AAF : <http://www.academie-agriculture.fr/groupe-de-reflexion/potentiels-de-la-science-pour-lavenir-de-lagriculture-de-lalimentation-et-de>
- Nölke G, Houdelet M, Kreuzaler F, Peterhänsel C, Schillberg S (2014) The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. *Plant Biotechnol J* 12: 734-742.
- Offermann S, Peterhansel C (2014) Can we learn from heterosis and epigenetics to improve photosynthesis? *Curr Opin Plant Biol* 19C: 105-110.
- Pary MAJ, Andralojc PJ, Scales JC, Salvucci ME, Carmo-Silva E, Alonso H, Whitney SM (2013) Rubisco activity and regulation as target for crop improvement. *J Exp Bot* 64 : 717-730.
- Paulus, J. K. Schlieper D, Groth G (2013) Greater efficiency of photosynthetic carbon fixation due to single amino-acid substitution. *Nat. Commun.* 4:1518 doi: 10.1038/ncomms2504
- Peterhansel C, Maurino VG (2011) Photorespiration redesigned. *Plant Physiol* 155: 49-55.
- Price GD, Forster B, Du J, Caemmerer S Von, Beatrice M (2013) The cyanobacterial CCM as a source of genes for in improving CO₂ fixation in crop species. *J Exp Bot* 64: 753-768.
- Rosnow J, Yerramsetty P, Berry JO, Okita TW, Edwards GE (2014) Exploring mechanisms linked to differentiation and function of dimorphic chloroplasts in the single cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. *BMC Plant Biol* 14: 34.
- Ruan CJ, Shao HB, Teixeira da Silva JA (2012) A critical review on the improvement of photosynthetic carbon assimilation in C3 plants using genetic engineering. *Crit Rev Biotechnol* 32: 1-21.
- Sage RF, Khoshravesh R, Sage TL (2014) From proto-Kranz to C4 Kranz: building the bridge to C4 photosynthesis. *J Exp Bot* 65: 3341-3356.
- Sage RF, DWay DA, Kubien DS (2008) Rubisco, Rubisco activase, and global climate change. *J Exp Bot* : 59, 1581-1595.
- Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, Sunohara H, Fujioka S, Ueguchi-Tanaka M, Mizutani M, Sakata S, Takatsuto S, Yoshida S, Tanaka H, Kitano H, Matsuoka M. (2006) Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nature Biotechnol* 24 : 105-109.
- Sánchez R, Flores A, Cejudo FJ (2006) *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta* 223: 901-909.
- Shrawat AK, Carroll RT, DePauw M, Taylor GJ, Good AG (2008) Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of alanine aminotransferase. *Plant Biotechnol J* 6: 722-732.
- Slewinski TL (2013) Using evolution as a guide to engineer kranz-type C4 photosynthesis. *Front Plant Sci* 4: 212.
- Slewinski TL, Anderson A, Zhang C, Turgeon R (2012) Scarecrow plays a role in establishing Kranz anatomy in maize leaves. *Plant Cell Physiol* 53: 2030-2037.
- Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ* 22: 583-621.
- Tabita FR, Satagopan S, Hanson TE, Kreel NE, Scott SS (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *J Exp Bot* 59: 1515-1524.

- Tcherkez GGB, Farquhar GD, Andrews TJ (2006) Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7246-7251.
- von Caemmerer S, Quick WP, Furbank RT (2012) The development of C₄ rice: current progress and future challenges. *Science* 336: 1671-1672.
- Wang L, Czedik-Eisenberg A, Mertz RA, Si Y, Toghe T et al (2014a) Comparative analyses of C₄ and C₃ photosynthesis in developing leaves of maize and rice. *Nature Biotech* doi:10.1038/nbt.3019
- Wang Y, Noguchi K, Ono N, Inoue S, Terashima I, et al. (2014b) Overexpression of plasma membrane H⁺-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 533-538.
- Westhoff P, Gowik U (2004) Evolution of c₄ phosphoenolpyruvate carboxylase. *Genes and proteins: a case study with the genus Flaveria*. *Ann Bot* 93: 13-23
- Whitney SM, Houtz RL, Alonso H (2011) Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiol* 155: 27-35
- Whitney SM, Sharwood RE (2008) Construction of a tobacco master line to improve Rubisco engineering in chloroplasts. *J Exp Bot* 59: 1909-1921.
- Williams BP, Johnston IG, Covshoff S, Hibberd JM (2013) Phenotypic landscape inference reveals multiple evolutionary paths to C₄ photosynthesis. *elife* 2: e00961
- Wu, L. et Birch, R.G. (2007) Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnol. J.* 5, 109-117.
- Xu J, Fan X, Zhang X, Xu D, Mou S, et al. (2012) Evidence of coexistence of C₃ and C₄ photosynthetic pathways in a green-tide-forming alga, *Ulva prolifera*. *PLoS One* 7: e37438.
- Yakir D, Osmond B, Giles L (1991) Autotrophy in maize husk leaves: evaluation using natural abundance of stable isotopes. *Plant Physiol* 97: 1196-1198.
- Yamori W, Takahashi S, Makino A, Price GD, Badger MR, von Caemmerer S (2011) The roles of ATP synthase and the cytochrome b₆/f complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity. *Plant Physiol* 155: 956-962.
- Yin Z, Zhang Z, Deng D, Chao M, Gao Q, et al. (2014) Characterization of Rubisco activase genes in maize: an α -isoform gene functions alongside a β -isoform gene. *Plant Physiol* 164: 2096-2106.
- Zabaleta E, Martin MV, Braun H-P (2012) A basal carbon concentrating mechanism in plants? *Plant Sci* 187: 97-104.
- Zarzicki J, Axen SD, Kinney JN, Kerfeld CA (2013) Cyanobacterial-based approaches to improving photosynthesis in plants. *J Exp Bot* 63 : 695-709.