



**HAL**  
open science

# Rôle des transporteurs SWEET dans le développement du système vasculaire d'*Arabidopsis thaliana*, la croissance et l'adaptation de la plante à son environnement

Emilia Aubry

## ► To cite this version:

Emilia Aubry. Rôle des transporteurs SWEET dans le développement du système vasculaire d'*Arabidopsis thaliana*, la croissance et l'adaptation de la plante à son environnement. Biologie végétale. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS583 . tel-03082000

**HAL Id: tel-03082000**

**<https://theses.hal.science/tel-03082000>**

Submitted on 18 Dec 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Rôle des transporteurs SWEET dans le développement du système vasculaire d'*Arabidopsis thaliana*, la croissance et l'adaptation de la plante à son environnement

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud  
Institut Jean-Pierre Bourgin – INRA Versailles-Grignon

École doctorale n°567 : sciences du végétal :  
du gène à l'écosystème (SDV)  
Spécialité de doctorat: Biologie

Thèse présentée et soutenue à Versailles, le 13 Décembre 2019, par

**Emilia Aubry**

Composition du Jury :

Marianne Delarue  
Professeur, Établissement – IPS2

Présidente

Annabelle Dejardin  
DR, INRA Val de Loire

Rapporteure

Jacqueline Grima-Pettenati  
DR, CNRS – LRSV

Rapporteur

Martine Dieuaide-Noubhani  
Maître de conférences, INRA Bordeaux-Aquitaine–UMR BFP

Examinatrice

Rémi Lemoine  
DR, CNRS – UMR EBI

Examineur

Rozenn Le Hir  
CR, INRA – IJPB

Directrice de thèse



A mes grands-parents ...





## Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le LaBex SPS (Sciences des plantes de Saclay) d'avoir financé ces trois années de thèse. Un grand merci à ce LaBex qui offre l'opportunité à de nombreux étudiants de réaliser leur thèse et de partir en congrès international comme ce fut mon cas.

Mes plus sincères remerciements aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je voudrais exprimer toute ma gratitude auprès des rapporteurs Annabelle Dejardin et Jacqueline Grima-Pettenati et les examinateurs Martine Dieuaide-Noubhani et Rémi Lemoine et Marianne Delarue. Je tiens également à remercier l'école doctorale Sciences du Végétal et la directrice Jacqui Shykoff.

Je tiens également à remercier les personnes ayant participé à l'aboutissement de ce travail de thèse. Je remercie les membres de mes comités de thèse, Martine Gonneau, Sandrine Pelleshi-Travier et Sébastien Thomine pour leurs précieux conseils et leur suivi ces trois années. Je remercie également Anne-Sophie Leprince et Matthieu Reymond d'avoir accepté d'être rapporteur de mes exposés de mi-parcours à l'IJPB. Un grand merci pour votre pédagogie et vos conseils.

Je remercie également l'Observatoire du végétal et les membres des plateformes de l'IJPB, les serristes, particulièrement Philippe Maréchal d'avoir contribué à ces travaux de recherches dans les meilleures conditions.

Je souhaiterais remercier des collègues de l'IJPB ou d'autres instituts avec qui j'ai eu la chance de collaborer, Evelyne Téoulé, Carine Géry, Olivier Loudet, Elodie Gilbault, Rémi Lemoine, Benoit Porcheron, Gilles Clément, Grégory Mouille, Fabien Chardon, Anne Marmagne, Françoise Gilard et Fabien Miart. Un grand merci pour ces échanges et vos précieux conseils.

Je tiens à remercier particulièrement les membres de l'équipe CATS « Carbon Allocation Transport and Signaling », la chef d'équipe Sylvie Dinant pour son sourire et son accueil au sein de l'équipe.

J'aimerais adresser mes remerciements les plus chaleureux à ma directrice de thèse, Rozenn Le Hir. Merci de m'avoir fait profiter de tes qualités pédagogiques et scientifiques, et de m'avoir donné de ton temps et de ton énergie. Je te remercie énormément pour ces trois années, tu as su faire preuve de patience face à quelqu'un de si peu organisée et je t'en remercie. Un grand merci pour ces trois années passées ensemble.

Je remercie également les membres de l'équipe, Françoise Vilaine pour sa douceur et sa gentillesse, Catherine Bellini pour sa sympathie, Beate Hoffmann pour sa bonne humeur et sa bienveillance, Laurence Bill, Sahar Sellami et les anciens membres de l'équipe, Fédérica, Nelly, Loubna, Fanny et Anfina qui ont contribué à ce travail et cette bonne entente au sein de l'équipe.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du bâtiment 3 pour cette bonne humeur, les barbecues, les repas de Noël, les apéros fromages, ou simplement les échanges. J'ai pris plaisir à travailler dans ce bâtiment et j'en garde d'excellents souvenirs.

Je remercie également les personnes avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger au bâtiment 14, Frédéric Chauffour, Cyril Gaertner, Boris Collet, Omae Pozza, Nero Borrega, Fabien Miart, Gladys Cloarec. Un grand merci pour votre bonne humeur, votre humour et votre bienveillance.

Je voudrais également remercier les thésards et post-docs de l'IJPB, Camille, Ying, Jing, Win, Yasser, Fabien, et je tiens à particulièrement remercier les thésards du bureau, Sahar, Roua et Mathilde pour ce soutien et cette bonne entente, un grand merci.

Je remercie très chaleureusement Mathilde Grégoire, un grand merci pour les deux années que j'ai passé avec toi ! Un excellent binôme dans la vie professionnelle ou personnelle.

Un très grand merci à Fred, Mathilde, Valentin, Nina, Abdou, Kévin, Jérémy et Lauralie pour votre soutien affectif durant ces 3 ans. Merci pour votre aide et votre bonne humeur. Merci d'avoir discuté de ce sujet avec moi, de m'avoir écouté (même quand je parle beaucoup) et d'avoir donné votre avis quand le chemin paraissait sinueux. Alicia, Cléo, Alice, Faustine, Justin, Joseph, Jo, Guillaume, Anto, Lise, Paola et Clémence, merci pour vos sourires et tous ces moments de fêtes.

Mes plus grands remerciements vont directement à ma mère, Pascal, mon frère et ma grand-mère. Merci de m'avoir encouragée, d'avoir été si présents, et si positifs. Du fond du cœur, merci.

Un dernier merci à toutes celles et ceux que je n'ai pas cité mais que je n'oublie bien évidemment pas.

## Table des matières

<b>I. <u>INTRODUCTION GENERALE</u></b> .....	<b>1</b>
Préambule.....	1
1. <u>Production et transport des sucres chez les Angiospermes</u> .....	3
2. <u>Le système vasculaire chez les Angiospermes</u> .....	18
3. <u>La réponse des plantes aux changements environnementaux : conséquences sur le transport des sucres et le développement du système vasculaire</u> .....	38
4. <u>Objectifs des travaux de thèse</u> .....	41
<b>II. <u>MATERIEL ET METHODES</u></b> .....	<b>43</b>
1. <u>Matériel végétal</u> .....	43
2. <u>Conditions de culture</u> .....	45
3. <u>Mesures des paramètres de croissance de la plante</u> .....	51
4. <u>Analyses morphologiques de la hampe florale</u> .....	54
5. <u>Analyse de la composition pariétale par Spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR)</u> .....	56
6. <u>Test de complémentation fonctionnelle chez la souche de levure <i>EBY.WV.4000</i></u> .....	57
7. <u>Quantification de l'expression de gènes par qPCR</u> .....	61
8. <u>Quantification des sucres solubles et de l'amidon par dosage enzymatique</u> .....	63
9. <u>Quantification des acides aminés totaux</u> .....	66
10. <u>Analyse métabolomique par Spectrométrie de Masse en Chromatographie Gazeuse (GC-MS)</u> .....	66
11. <u>Localisation tissulaire des lignées <i>pSWEET :GUS</i></u> .....	68
12. <u>Analyses statistiques</u> .....	69

### **III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....71**

#### **CHAPITRE 1 : Rôle des échanges de sucres à l'échelle cellulaire sur le développement, la croissance et la physiologie de la plante.....71**

##### **I. Introduction.....71**

##### **II. Résultats.....72**

1. Localisation tissulaire des promoteurs des gènes SWEETs sous le contrôle du gène rapporteur GUS.....72

2. Production des triples mutants et du quadruple mutant.....80

3. Impact d'une perturbation des échanges de sucres sur la croissance et le développement de la plante.....80

4. Impact d'une perturbation des échanges de sucres sur le métabolisme de la plante.....88

##### **III. Discussion.....99**

1. Perturber l'expression des gènes SWEETs impacte la croissance de la rosette.....99

2. Les gènes SWEET11, SWEET12, SWEET16 et/ou SWEET17 sont nécessaires pour l'allocation des sucres et le développement de la hampe florale.....102

3. La perturbation des gradients de sucres médiés par les transporteurs SWEETs semble favoriser la remobilisation de l'azote vers les graines.....105

##### **IV. Conclusion et perspectives.....107**

#### **CHAPITRE 2: Rôle du transport facilité des sucres dans le développement du système vasculaire de la hampe florale.....108**

##### **I. Introduction.....108**

##### **II. Résultats.....110**

1. Localisation cellulaire des promoteurs des gènes SWEETs sous le contrôle du gène rapporteur GUS dans les différents types de pôles vasculaires de la hampe.....110

2. Impact d'une perturbation des échanges de sucres sur la croissance et le développement des tissus vasculaires de la hampe.....122

3.	<u>Impacts d'une perturbation des échanges de sucres sur la composition pariétale</u> .....	128
<b>III.</b>	<b><u>Discussion</u></b> .....	148
1.	<u>Importance du transport facilité des sucres entre les cellules de parenchymes, les fibres et les vaisseaux au cours du développement des cellules de xylème</u> .....	148
2.	<u>Importance de l'homéostasie des sucres dans le développement des vaisseaux et des fibres de xylème</u> .....	151
<b>IV.</b>	<b><u>Conclusion et perspectives</u></b> .....	154
<b>V.</b>	<b><u>Publication associée</u></b> .....	154
<b><u>CHAPITRE 3 : Rôle du transport facilité des sucres dans la réponse des plantes à des modifications de l'environnement</u></b> .....		155
<b>I.</b>	<b><u>Introduction</u></b> .....	155
<b>II.</b>	<b><u>Résultats</u></b> .....	157
1.	<u>Réponse des mutants <i>sweets</i> face à des contraintes de températures</u> .....	157
2.	<u>Réponse d'<i>Arabidopsis thaliana</i> à une forte salinité du sol</u> .....	166
3.	<u>Réponse des mutants <i>sweets</i> face à la sécheresse</u> .....	167
<b>III.</b>	<b><u>Discussion</u></b> .....	182
1.	<u>Réponse des plantes face à une réduction prolongée en eau dans le sol</u> .....	182
2.	<u>Impact d'une perturbation du gradient des sucres sur la réponse des plantes aux stress abiotiques</u> .....	183
3.	<u>Impact d'une température fraîche sur le développement de la hampe florale en cas de perturbation ou non des échanges de sucres</u> .....	184
<b>IV.</b>	<b><u>Conclusion et perspectives</u></b> .....	186
<b>V.</b>	<b><u>Publication associée</u></b> .....	186

<b>IV.</b>	<b><u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u></b> .....	<b>187</b>
1.	<u>Rôles des <i>SWEETs</i> dans le développement, la croissance et la physiologie de la hampe florale</u> .....	187
2.	<u>Rôle des gradients de sucres dans le développement des vaisseaux</u> .....	188
3.	<u>Sucre : nutriment ou signal ?</u> .....	190
<b>V.</b>	<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b> .....	<b>193</b>
<b>VI.</b>	<b><u>ANNEXES</u></b>	

## Abréviations et acronymes

$^{14}\text{C}$  : Carbone 14

$^{15}\text{N}$  : Azote 15

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

APL : ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT

ARN : Acide ribonucléique

ARNm Acide ribonucléique messenger

*At* : *Arabidopsis thaliana*

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

CC : Cellule compagne

CesA : cellulose synthase

cINV : invertase neutre cytosolique

CLE/TDIF : CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION (CLE)

CM : Cellule de mésophylle

$\text{CO}_2$  : dioxyde de Carbone

*Col-0* : *Arabidopsis thaliana* écotype *columbia*

CP : Cellule de parenchyme

cwINV : invertase acide pariétale

DO : Densité optique

ERD6-like : Early Response to Dehydration6-like

F : fibre de xylème

F6P : fructose-6-phosphate

fi : Fibre interfasciculaire

FRK : fructokinase

fru :fructose

FT-IR : Spectroscopie Infra-rouge à Transformée de Fourier

G1P : glucose-1-phosphate

G6P : glucose-6-phosphate

G6PDH : Glucose-6-Phosphate DesHydrogénase

GC-MS : Spectrométrie de Masse en Chromatographie Gazeuse

glc : glucose

GUS :  $\beta$ -glucuronidase

$\text{H}^+$  : Proton

$\text{H}_2\text{O}$  : eau

HXK : hexokinase

INT : Inositol Transporter

KAN : KANADI

LOG4 : LONELY GUY4

MAC : Méristème apical caulinaire

MFS : Major Facilitator Superfamily

MP : MONOPTEROS

MST : Monosaccharides Transporter

$\text{NAD}^+$  : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite).

NADPH :

NST1-2 : NAC DOMAIN THICKENING PROMOTING FACTOR 1-2

OPS : OCTOPUS

*Os* : *oryzae sativa*

PAT : Transport polarisé de l'auxine

pb : Procambium

PCR : Polymérase Chain Reaction

pd : Plasmodesme

PGI : phosphoglucose isomérase

pGlcT : Plastidic Guucose Translocator

PGM : phosphoglucose mutase

ph : Phloème

PMT : Polyols/Monosaccharide Transporter



Pôle de type-B : B : Branching stem

Pôle de type-L : L : Cauline Leave

Pôle de type-M : M : Main inflorescence stem

PXY/TDR : PHLOEM INTERCALATED  
WITH XYLEM / TRACHEARY ELEMENT  
DIFFERENCIATION INHIBITORY  
FACTOR TDIF receptor

qPCR : quantitative Polymérase Chain  
Reaction

sac : saccharose

*Sb* : *sorghum bicolor*

SND1 : SECONDARY WALL-  
ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 1

SPPase : saccharose-6-phosphatase

SPS : saccharose-phosphate-synthase

STP : Sugar Transporter Family

SUC/SUT : Sucrose Carrier/Sucrose  
Transporter

*Sus* : lignée mutée dans l'expression des gènes  
codant la sucrose synthase

SuSy : sucrose synthase

SWC : Soil Water Content

*SWEET* : gène *SWEET*

*sweet* : mutant

*SWEET* : Sugar Will Eventually Be Exported  
Transporters

*swt* : *sweet*

TC : Tube criblé ou ES : élément de sève

TMO/LHW : TARGET OF  
MONOPTEROS5/LONESOME HIGHWAY

TP : triose phosphate

TST : Tonoplastic Sugar Transporter

UDP : uridine di-phosphate

UDP-ara : UDP-arabinose

UDP-galA : UDP-acide galacturonique

UDP-rha : UDP-rhamnose

UDP-xyl : UDP-xylose

UXT : Transporteur de UDP-xylose

V : Vaisseau de xylème

VGT : Vacuolar Glucose Transporter

vINV : invertase acide vacuolaire

VND : VASCULAR RELATED NAC  
DOMAIN

WOX4 : WUSCHEL RELATED  
HOMEBOX

WT : Wild-type

xy : Xylème

## Liste des tableaux et des figures

Tableau IA et IB : Synthèse bibliographique des *SWEETs* retrouvés dans différentes espèces végétales avec présentation brève de leur localisation et leurs rôles

Tableau II : Synthèse bibliographique du nombre de gènes *SWEETs* retrouvés chez les plantes

Tableau III : Représentation des stades de développement des plantes en conditions de jours longs décrit par Boyes et al., 2001 en serre et dans nos conditions de culture en jours longs

Tableau IV : Représentation des notes moyennes obtenues pour chaque génotype après deux jours passés à -5°C

Tableau V : Représentation des notes moyennes obtenues pour chaque génotype après deux jours passés à -7°C

Figure 1 : Représentation du métabolisme des sucres dans une cellule végétale

Figure 2 : Transport de sucres entre les organes sources et les organes puits

Figure 3 : Représentation des familles de transporteurs de sucres localisées dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 4 : Localisation tissulaire des transporteurs de sucres dans le système vasculaire de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 5 : Organisation du système vasculaire dans les différents organes chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (d'après Campbell and Turner, 2017)

Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation du système vasculaire dans les différents organes chez *Arabidopsis thaliana*

Figure 7 : Organisation cellulaire des tissus vasculaires chez *Arabidopsis thaliana*

Figure 8 : Représentation schématique de la régulation du transport polarisé d'auxine (PAT) dans le développement du système vasculaire de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 9 : Représentation schématique de la différenciation des tubes criblés du phloème

Figure 10 : Représentation schématique des étapes de développement d'une fibre et d'un vaisseau de xylème au cours de la xylogénèse

Figure 11 : Développement des cellules du système vasculaire à partir du procambium vasculaire (D'après Turner et al., 2007 et Schuetz et al., 2012)

Figure 12 : La régulation transcriptionnelle de la différenciation des fibres et des vaisseaux de xylème

Figure 13 : Représentation graphique des lignées mutées dans l'expression des *SWEETs*

Figure 14 : Représentation schématique des conditions de croissance pour le stress gel

Figure 15 : Représentation des trois conditions de culture de température fraîche 7°C

Figure 16 : Représentation schématique du contenu en eau appliqué en condition de stress sécheresse

Figure 17 : Photographie de l'apparition du bouton floral : critère retenu pour déterminer l'émergence du bouton floral chez les différentes lignées

Figure 18 : Représentation du traitement d'image pour mesurer la surface verte projetée de la rosette

Figure 19 : Représentation schématique des mesures effectuées sur la hampe florale principale, les organes latéraux et la comptabilisation du nombre de feuilles sénescents

Figure 20 : Représentation schématique des analyses réalisées sur les sections basales de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 21 : Représentation schématique de l'analyse quantitative réalisée sur les pôles de xylème dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 22 : Représentation schématique de l'acquisition spectrale réalisée en spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier

Figure 23 : Principe du test de complémentation fonctionnelle chez la levure *EBY.VW.4000*

Figure 24 : Mesures de la densité optique des cultures de levures

Figure 25 : Calculs effectués afin de déterminer le volume d'eau à ajouter pour les dilutions

Figure 26 : Représentation schématique des différentes étapes du test de complémentation

Figure 27 : Représentation schématique des réactions enzymatiques impliquées dans le dosage des sucres solubles

Figure 28 : Représentation schématique du protocole d'observations des lignées *pSWEET :GUS*

Figure 29 : Représentation schématique des organes d'*Arabidopsis thaliana*

Figure 30 : Localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* dans les feuilles

Figure 31 : Localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* dans la hampe florale

Figure 32 : Localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* dans les fleurs

Figure 33 : Localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* dans les siliques

Figure 34 : Génotypage du quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17* par PCR

Figure 35 : Croissance de la rosette en fonction du temps des mutants *sweets*

Figure 36 : Vitesse de croissance de la rosette au moment de l'apparition du bouton floral

Figure 37 : Mesures des paramètres de croissance de la hampe florale

Figure 38 : Développement des organes latéraux sur la hampe florale principale

Figure 39 : Statut physiologique de la rosette des différentes lignées *sweet*

Figure 40 : Variations des contenus en sucres solubles et en amidon de la hampe florale des différents mutants *sweets*

Figure 41 : Concentration d'acides aminés totaux de la hampe florale principale des différents mutants *sweets*

Figure 42 : Analyse en composante principale des données de métabolomiques acquises sur la hampe florale des différents mutants *sweet*

Figure 43 : Représentation schématique des principales voies de biosynthèse du métabolisme dans une cellule végétale

Figure 44 : Analyses du statut carboné et azoté dans les graines des différents mutants *sweet*

Figure 45 : Représentation schématique des différents types de pôles retrouvés dans un entrenœud de la hampe florale principale

Figure 46 : Représentation schématique des niveaux de la hampe florale pour lesquels la localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* a été approfondie

Figure 47 : Domaine d'expression du promoteur *SWEET11* dans la hampe

Figure 48 : Domaine d'expression du promoteur *SWEET12* dans la hampe

Figure 49 : Domaine d'expression du promoteur *SWEET16* dans la hampe

Figure 50 : Domaine d'expression du promoteur *SWEET17* dans la hampe

Figure 51 : Synthèse des domaines d'expression des promoteurs des *SWEETs*

Figure 52 : Variations de la surface de la section basale de la hampe florale

Figure 53 : Nombre de cellules conductrices dans un pôle de xylème

Figure 54 : Surface occupée par les fibres et les vaisseaux dans un pôle de xylème

Figure 55 : Surface moyenne d'une fibre et d'un vaisseau de xylème

Figure 56 : Ratio surface occupée par les cellules conductrices / Surface de la hampe

Figure 57 : Test de complémentation fonctionnelle avec la souche de levure *EBY.WV 4000* mutée dans le transport des hexoses exprimant les transporteurs *SWEET11* ou *SWEET12*

Figure 58 : Analyse de la composition pariétale des lignées WT, *swt16*, *swt17*, *swt16wt17*

Figure 59 : Analyse statistique de la composition de la paroi de *swt11swt12* et *swt11sw12swt16*

Figure 60 : Analyse de la composition pariétale des lignées WT, *swt17*, *swt11swt12wt17* et *swt11swt12swt16swt17*

Figure 61 : Analyse de la composition pariétale des cellules du xylème en fonction du type de pôles vasculaires chez les plantes sauvages

Figure 62 : Analyse de la composition pariétale des cellules de xylème du quadruple mutant en fonction du type de pôles cribro-vasculaires

Figure 63 : Variations de l'expression des gènes impliqués dans la maintenance du procambium et le développement des vaisseaux et des fibres du xylème

Figure 64 : Représentation schématique des différents types de contraintes environnementales explorées dans ce chapitre

Figure 65 : Echelle de notation des lésions causées par l'application d'une période de gel à -5°C ou -7°C durant deux jours au stade végétatif

Figure 66 : Développement de la rosette des différents génotypes dans les trois conditions de croissance

Figure 67 : Effet d'une période de croissance à 7°C sur le développement de la hampe florale chez les différents génotypes

Figure 68 : Impact d'une période de croissance à 7°C sur le développement de la hampe florale chez les différents génotypes

Figure 69 : Impact d'une période de croissance à 7°C sur le développement du phloème, du procambium et du xylème de la hampe florale chez les différents génotypes

Figure 70 : Impact d'un stress hydrique sur la surface verte projetée chez les différents génotypes

Figure 71 : Modifications métabolomiques de la rosette des plantes de type sauvage soumises à un stress hydrique

Figure 72 : Modifications du métabolome de la rosette du quadruple mutant soumise à un stress hydrique

Figure 73 : Variations des contenus en métabolites en réponse un stress hydrique chez le type sauvage et le quadruple mutant

Figure 74 : Comparaison des modifications du métabolome de la rosette entre le type sauvage et le quadruple mutant dans chaque condition de culture

Figure 75 : Répartition des métabolites accumulés de façon significativement différente entre le type sauvage et le quadruple mutant pour chaque condition de culture

Figure 76 : Variations du contenu en métabolites en réponse un stress hydrique entre le type sauvage et le quadruple mutant

Figure 77 : Modèle proposé pour le rôle des transporteurs SWEETs au cours de la différenciation du xylème chez *Arabidopsis thaliana*

---

# I. INTRODUCTION GENERALE

---



### Préambule

Contrairement aux animaux, les végétaux sont capables de fabriquer leur matière organique à partir de lumière, d'eau (H<sub>2</sub>O) et de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) grâce à la photosynthèse selon la formule :  $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + \text{énergie lumineuse} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$ . Cette réaction se déroule théoriquement dans tous les tissus chlorophylliens mais principalement dans les chloroplastes des cellules du mésophylle des feuilles adultes chez les végétaux supérieurs. Après la fixation du CO<sub>2</sub>, les trioses phosphate produits sont soit exportés vers le cytosol pour être convertis en sucres soluble (ex : saccharose, glucose, fructose) soit stockés dans le stroma sous forme d'amidon. Les sucres solubles produits sont ensuite transportés à longue distance, sous forme majoritaire de saccharose, grâce au phloème ou bien à courte distance (i.e. transport intercellulaire et intracellulaire) sous forme de saccharose ou après clivage en glucose et fructose (Stitt et al., 2010). A l'échelle de la cellule, les sucres solubles vont être utilisés pour la maintenance du métabolisme général de la cellule, comme intermédiaire métabolique pour la production de sucres complexes (ex : amidon, polysaccharides pariétaux) ou comme molécule signal dans le cadre de certains processus morphogénétiques (pour revue Li et al., 2016). Maintenir une concentration optimale des sucres à l'échelle de la cellule, du tissu ou de la plante, au cours de sa croissance et en fonction des conditions environnementales requière donc une régulation fine de l'expression et de l'activité de l'ensemble des acteurs impliqués dans leur biosynthèse, leur dégradation et leur transport. Ainsi, le maintien de l'homéostasie des sucres à l'échelle cellulaire et la gestion de l'allocation des sucres à l'échelle de la plante entière constitue un enjeu majeur afin d'assurer une croissance et un rendement optimal de la plante (i.e. production de biomasse et de graines).

Chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, la hampe florale joue un rôle central dans la croissance de la plante puisqu'elle porte les inflorescences latérales, les feuilles caulines, les fleurs et les fruits (siliques) (Boyes et al., 2001). De plus, sa contribution au gain total de carbone au cours de la vie de la plante est plus importante que celle des feuilles de rosette (Earley et al., 2009), et elle contribue à hauteur d'environ 38% à la biomasse totale produite par la plante notamment du fait de la présence du xylème dont les vaisseaux et les fibres présentent des parois secondaires très épaissies (communication personnelle Chardon et Marmagne, IJPB). Cependant cet organe a reçu relativement peu d'attention de la part des chercheurs en comparaison des feuilles, des racines ou des graines. La hampe florale constitue pourtant un bon modèle d'étude afin de mieux appréhender l'allocation des sucres à l'échelle de la plante



## I. INTRODUCTION GENERALE

entière mais également pour étudier le développement du système vasculaire (Chaffey et al., 2002, Ragni and Grebs, 2018). En effet, le développement du système vasculaire de la hampe florale chez *Arabidopsis thaliana* présente des similarités avec celui des espèces ligneuses sans en avoir les inconvénients (i.e. taille et vitesse de croissance). Les données expérimentales exposées dans cette partie introductive concerneront donc principalement celles publiées chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* et plus particulièrement sur la hampe florale qui a servi de modèle d'étude dans le cadre de cette thèse.

Dans cette introduction, je reviendrai dans un premier temps sur les voies métaboliques conduisant à la production des sucres simples (saccharose, glucose et fructose) et complexes (amidon, polysaccharides de parois) et sur les différents modes de transport de ces sucres entre les cellules ou au sein de la cellule. J'aborderai ensuite l'organisation du système vasculaire et les étapes du développement des différents tissus composant ce système vasculaire. Enfin, je présenterai brièvement les données bibliographiques relatives aux conséquences d'un stress abiotique sur le transport des sucres et le développement du système vasculaire avant d'exposer les objectifs de ce travail de thèse.

### 1. Production et transport des sucres chez les Angiospermes

#### 1.1. Biosynthèse des sucres

##### 1.1.1. Cycle de Calvin-Benson : production de trioses-phosphate

Les végétaux ont la particularité de produire des sucres à partir du dioxyde de carbone, d'eau et d'énergie lumineuse. Au cours de la phase lumineuse de la photosynthèse, l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique sous forme d'ATP et de NADPH qui va permettre d'alimenter les réactions chimiques du cycle de Calvin dans les chloroplastes (Figure 1). Ensuite lors de la phase sombre de la photosynthèse, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est incorporé dans des molécules organiques via le cycle de Calvin afin de produire des trioses phosphate. Ces trioses phosphate permettent (1) de régénérer le ribulose-1,5-biphosphate dans le chloroplaste ou (2) de produire après des réactions en chaîne du glucose-6-phosphate qui sera utilisé lors de la synthèse de l'amidon, une forme de stockage des sucres, ou sera exporté dans le cytosol pour la biosynthèse des autres sucres.

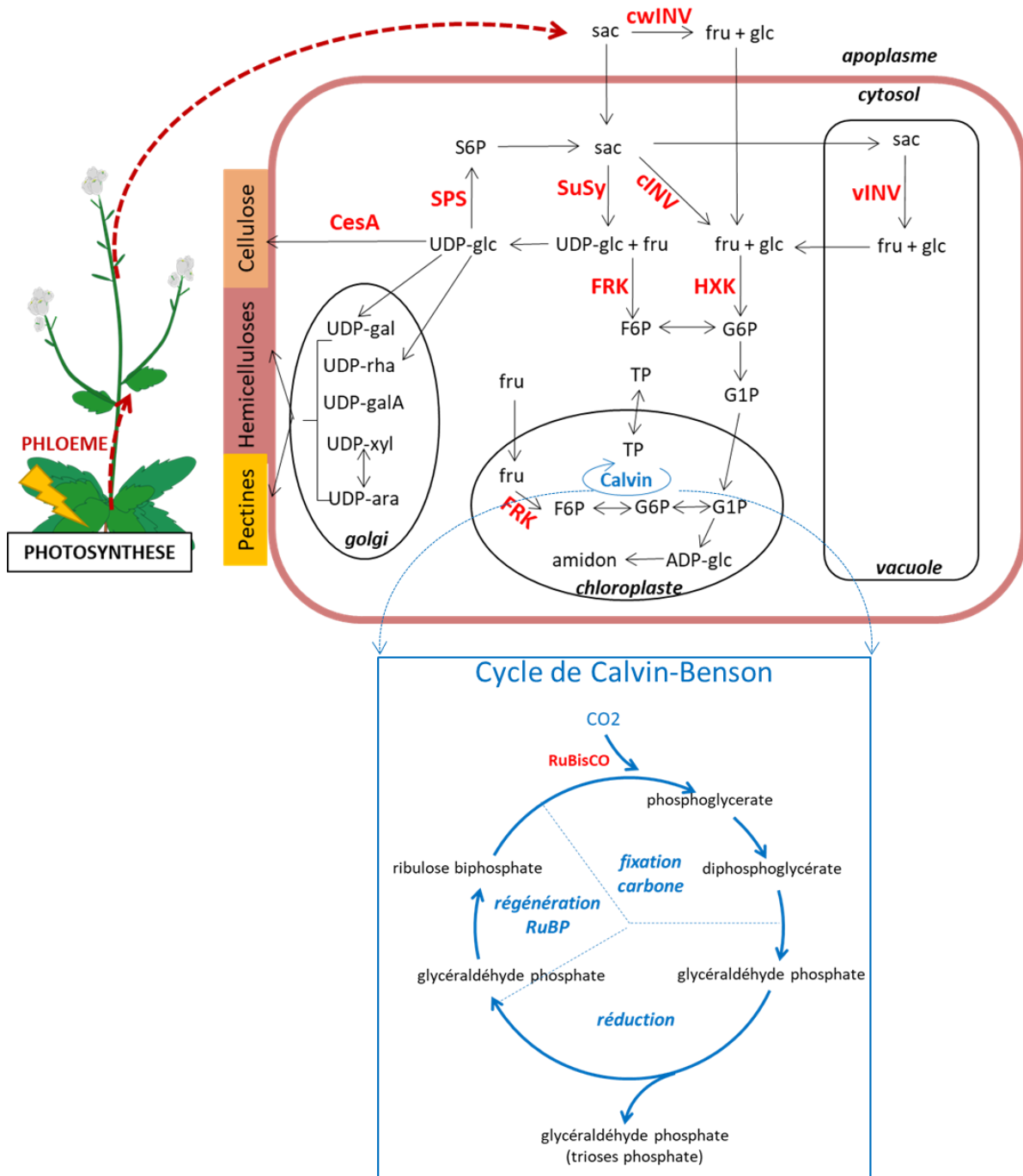
##### 1.1.2. Synthèse de saccharose et des hexoses

Dans les organes photosynthétiques, la synthèse du saccharose a lieu majoritairement sous l'action de la saccharose-phosphate-synthase (SPS) selon la réaction suivante :



Cette réaction est en théorie réversible mais *in vivo* elle permet préférentiellement la synthèse de saccharose-6-phosphate. Enfin, le saccharose est produit grâce à la déphosphorylation sous l'action de la saccharose-6-phosphatase (SPPase). Une fois synthétisé, le saccharose peut être exporté vers les cellules adjacentes ou à plus longue distance à travers le phloème ou être hydrolysé sous la forme d'hexoses. L'hydrolyse du saccharose peut se faire à différents niveaux subcellulaires (Figure 1). Ainsi, dans l'apoplasme, le saccharose peut être hydrolysé en glucose et en fructose par l'action de l'invertase acide pariétale (cwINV). Dans le cytosol, l'hydrolyse du saccharose est réalisée par 2 enzymes : l'invertase neutre cytoplasmique (cINV) et la sucrose synthase (SuSy). Ainsi, en présence d'UDP, la SuSy permet la conversion du saccharose en UDP-glucose et en fructose. L'UDP-glucose est utilisé comme intermédiaire de la voie de biosynthèse des polysaccharides pariétaux (Verbančič et al., 2018). Enfin, le saccharose importé dans la vacuole peut également y être hydrolysé en hexoses sous l'action de l'invertase acide vacuolaire (vINV) (Koch, 2004, Figure 1).

# I. INTRODUCTION GENERALE



**Figure 1** : Représentation du métabolisme des sucres dans une cellule végétale

Cycle de Calvin-Benson (en bleu) (A) et enzymes (en rouge) impliqués dans le métabolisme des sucres (B) avec : cwINV : invertase pariétale ; cINV : invertase cytosolique ; vINV : invertase vacuolaire ; FRK : fructokinase ; HXK : hexokinase ; SuSy : sucrose synthase ; SPS : saccharose phosphate synthase ; CesA : cellulose synthase ; TP : trioses phosphate ; sac : saccharose ; glc : glucose ; fru : fructose ; G6P : glucose-6-phosphate ; G1P : glucose-1-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; UDP : uridine-diphosphate ; gal : galactose ; rha : rhamnose ; galA : acide galacturonique ; xyl : xylose ; ara : arabinose. (Adaptée d'après Verbančič et al., 2018)

## I. INTRODUCTION GENERALE

Afin d'être métabolisés, les hexoses (glucose et fructose) doivent subir une étape de phosphorylation par l'intermédiaire des hexokinases (HK) ou des fructokinases (FRK) (Granot et al., 2013). Ces enzymes ont un rôle central dans la transformation des sucres dans les organes sources où elles auraient un rôle prépondérant dans la voie de signalisation des sucres et dans les organes puits où elles permettraient la synthèse des intermédiaires nécessaires à la croissance de la cellule (Granot et al., 2013). Il est également intéressant de noter dès à présent que des études chez *Arabidopsis thaliana* et chez la tomate ont mis en évidence que des mutants affectés dans l'expression des gènes codant des fructokinases ont des parois de cellules de xylème plus fines et des vaisseaux collapsés (Stein et al., 2014 et 2016). Ces études mettent ainsi en évidence qu'une perturbation du métabolisme des sucres impacte les parois cellulaires des cellules de xylème. Ainsi, bien que la biosynthèse des polysaccharides de parois a largement été étudiée (Cosgrove, 2005), peu d'études se sont concentrées sur la provenance et le transport des sucres nécessaires à la formation des parois cellulaires, particulièrement dans les cellules de xylème.

### 1.1.3. Synthèse des polysaccharides pariétaux

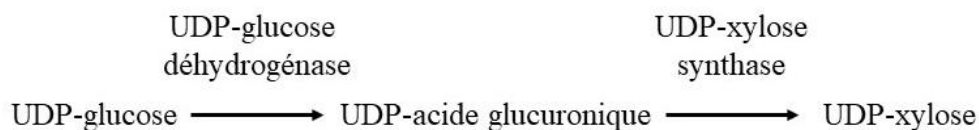
Chez les dicotylédones, la paroi végétale d'une cellule en croissance est qualifiée de primaire et elle se compose de 90 % de polysaccharides pariétaux (cellulose, hémicelluloses et pectines) et de 10 % de protéines. Lorsque la cellule a cessé de croître, une paroi secondaire composée d'environ 50 % de cellulose, 30 % d'hémicelluloses et 20% de lignines se dépose (Marriott et al., 2015). La production des polysaccharides pariétaux (i.e. cellulose, hémicelluloses et pectines) débute par la production d'un précurseur commun l'UDP-glucose, sous l'action de la SuSy (Verbančič et al., 2018, Figure 1). Dans certains types cellulaires comme les vaisseaux de xylème, la cellule va déposer un épaissement supplémentaire de la paroi secondaire afin de permettre à la cellule de résister aux fortes pressions négatives prenant place dans la sève xylémienne. Cette synthèse supplémentaire de paroi secondaire va donc consommer une grande quantité de sucres afin d'assurer la synthèse des polysaccharides pariétaux.

La cellulose est un polymère de glucose liés par des liaisons  $\beta$ -1,4 (Somerville, 2006). Les microfibrilles de cellulose sont insolubles et constituent un cadre rigide entourant la cellule et lui permettant de résister à des pressions osmotiques importantes. La synthèse de cellulose est assurée par des complexes enzymatiques, les celluloses synthases (CESAs). Dans les parois

## I. INTRODUCTION GENERALE

primaires, le complexe CESA1, 3 et 6 permet la formation de la cellulose alors que dans les parois secondaires ce sont les CESA4, 7 et 8 qui assurent ce rôle (Carroll et al., 2012). Les CESAs assurent ainsi la synthèse de cellulose à partir d'UDP-glucose. Il a longtemps été suggéré que la production d'UDP-glucose avait lieu directement au niveau de la membrane plasmique sous l'action d'une forme plasmalémnique de la SuSy (Amor et al., 1995). Depuis ces travaux, cette hypothèse est fortement débattue dans la littérature (Kumar et al., 2015). Ainsi chez *Arabidopsis thaliana*, le quadruple mutant *sus1-4* ne présente pas de défaut de contenu en cellulose (Barratt et al., 2009). De même chez le peuplier, l'analyse des plantes mutées dans l'expression des gènes *SuSy* montre que ces gènes ne sont pas essentiels pour la synthèse de cellulose mais auraient plutôt un rôle plus large permettant de réguler la quantité de carbone nécessaire à la formation des composés pariétaux (Gerber et al., 2014). Chez le peuplier, la source principale d'UDP-glucose résulterait de l'activité de l'invertase neutre cytosolique (Rende et al., 2017). Chez *Arabidopsis*, malgré la production d'un double mutant *cinv1cinv2*, aucune preuve d'un mécanisme similaire n'a à ce jour été apportée (Barratt et al., 2009).

Après la cellulose, les hémicelluloses, principalement sous la forme de xylanes dans la paroi secondaire, représentent le deuxième type de polysaccharide le plus abondant chez les plantes. Les xylanes sont des polymères de xyloses associés par des liaisons  $\beta$ -1,4 qui présentent une variabilité de structure importante due notamment à la présence de nombreuses substitutions (i.e groupement acétyle, résidus d'acide glucuronique, d'acide 4-*O*-méthylglucuronique ou d'arabinose) (Rennie et al., 2014). L'UDP-xylose qui est utilisé pour la synthèse des xylanes est synthétisé dans le cytosol selon les réactions suivantes :



L'UDP-xylose est ensuite transporté dans l'appareil de Golgi par des transporteurs d'UDP-xylose (UXT) pour la synthèse des xylanes (Zhao et al., 2018). Dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* les hémicelluloses présentes sont principalement sous forme de xylanes et de mannanes (Kim and Daniel, 2012a et b).

## I. INTRODUCTION GENERALE

### 1.1.4. Synthèse de l'amidon

L'amidon est un polymère de glucoses assemblés entre eux par des liaisons  $\alpha$ -1,4. La synthèse d'amidon, qu'elle se déroule de façon transitoire (dans les feuilles) ou dans des organes de réserve (graines) est basée sur le même schéma et fait intervenir plus d'une quarantaine d'enzymes (pour revue voir Stitt and Zeeman, 2012). Au cours de la journée, les substrats nécessaires à la synthèse d'amidon sont produits majoritairement dans le chloroplaste, directement à partir du cycle de Calvin-Benson. Ainsi, le fructose-6-phosphate (F6P) permet la production de glucose-6-phosphate (G6P) sous l'action de la phosphoglucose isomerase (PGI) qui est à son tour transformé en glucose-1-phosphate (G1P) sous l'action de la phosphoglucose mutase (PGM). Ce dernier servira de substrat pour l'ADP-glucose phosphorylase permettant sa conversion en ADP-glucose, le substrat utilisé pour la synthèse d'amidon (Stitt and Zeeman, 2012). L'amidon est la forme de stockage majoritaire dans les organes sources et sert de réserve d'énergie et de carbone pour la plante. Durant la nuit, le stock d'amidon est dégradé en maltose, glucose et glucose-1-phosphate dans le chloroplaste puis le glucose et le maltose sont exportés dans le cytosol (Zeeman et al., 2007 cité par Granot et al., 2013). L'hydrolyse d'amidon la nuit permet ainsi de maintenir la production de sucres solubles en l'absence d'énergie lumineuse et assure ainsi une continuité dans l'export de saccharose jusqu'aux organes puits (Geiger and Servaites, 1994).

## 1.2 Le transport des sucres

### 1.2.1 Organe source versus organe puit

Un organe est qualifié de source lorsque sa production de sucre est excédentaire par rapport à ses besoins. Dans ce cas, l'excédent de sucres produits est exporté vers les autres organes, c'est le cas par exemple des feuilles adultes (Figure 2). A contrario lorsqu'un organe ne produit pas suffisamment de sucres pour assurer sa croissance alors il est qualifié de puits, c'est-à-dire qu'il importe des sucres provenant des organes sources, c'est le cas par exemple des fruits ou des racines (Figure 2).

Dans une feuille mature (organe source), le saccharose synthétisé est chargé dans le phloème des veines mineures. Cette étape de chargement dépend de plusieurs mécanismes : le transport symplasmique (avec ou sans piégeage moléculaire) et le transport apoplasmique (via l'action de transporteurs) (Figure 2). Le symplasme désigne le continuum intracellulaire formé par les cytoplasmes des cellules reliés entre eux par des plasmodesmes et permet le transport

## I. INTRODUCTION GENERALE

d'éléments nutritifs, de petits ARNs et de particules virales entre les cellules (Sager and Lee, 2014). Le transport symplasmique des sucres dépend donc du gradient de concentration de sucres existant entre les cellules. Dans le cas d'un chargement symplastique, le saccharose va diffuser de manière passive des cellules du parenchyme phloémien vers les cellules compagnes *via* les plasmodesmes. Ceci implique donc l'existence d'une forte concentration en saccharose dans les cellules du mésophylle par rapport aux cellules compagnes phloémiennes. Ce type de transport peut être associé à un mécanisme de « piégeage moléculaire » où les molécules de saccharose sont condensées pour former du raffinose ou du stachyose, qui du fait de leur taille se trouvent piéger à l'intérieur de la cellule compagne. Ce procédé permet de maintenir un gradient de « saccharose » sans pour autant nécessiter de fortes concentrations en saccharose dans les cellules du mésophylle. Ce sont alors ces triholosides et tétraholosides qui sont transportés dans le phloème vers les organes puits (Rennie and Turgeon, 2009). L'apoplasme désigne quant à lui l'espace intercellulaire entre les parois pecto-cellulosiques des cellules voisines. Le transport apoplasmique est assuré par diffusion passive non sélective ou par l'action de transporteurs actifs ou passifs. Dans le cadre du chargement du phloème, le saccharose, produit dans le cytosol des cellules du mésophylle des organes photosynthétiques est exporté dans l'apoplasme avant d'être chargé dans les cellules compagnes puis dans les tubes criblés du phloème par diffusion ou par l'action de transporteurs tels que les membres de la famille des transporteurs SUC/SUT ou SWEET (Durand et al., 2018). Le saccharose est ensuite déchargé dans les cellules hétérotrophes que l'on qualifie de puits soit par l'action des plasmodesmes spécialisés comme dans le cas de la racine (Ross-Elliott et al., 2017) soit par l'action de transport actif lorsque la concentration dans la cellule puit est supérieure à la concentration dans les cellules de phloème (Durand et al., 2018).

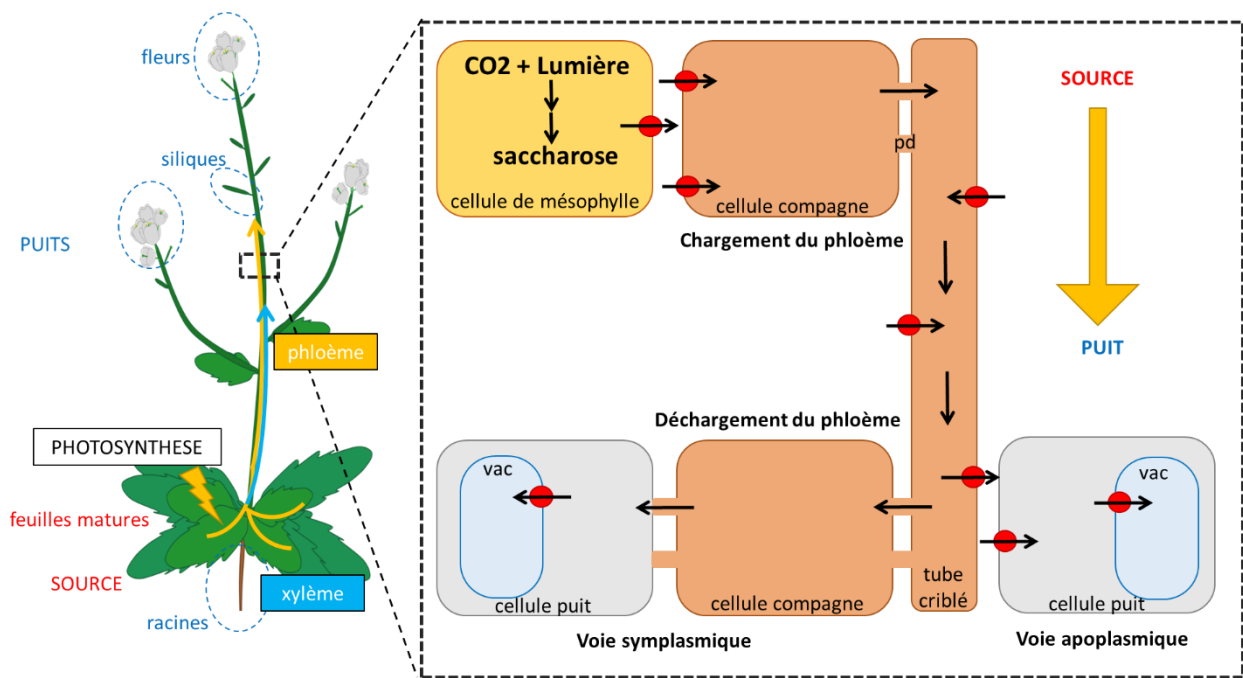
Le transport du saccharose des organes sources vers les organes puits se déroule ensuite dans le phloème de transport qui se caractérise par la présence de cellules compagnes moins volumineuses et la présence de tubes criblés de tailles plus importantes (Van Bel et al., 2003, Figure 2). Lors de ce transport à longue distance, une fraction du saccharose s'échappe du phloème. Une partie sert à alimenter en squelettes carbonés les tissus puits environnants, comme le cambium et le xylème et ainsi assurer leur prolifération et leur croissance (De Schepper et al., 2013, Figure 2), et une autre partie est réabsorbée au sein du phloème (Hafke et al., 2005 ; Minchin et al., 1984 ; Minchin et Thorpe, 1987). Même si les acteurs moléculaires impliqués dans la fuite de saccharose le long du phloème ne sont pas identifiés, les facilitateurs de transport de saccharose de type SWEETs sont des candidats plausibles (Ludewig and Flüge,



## I. INTRODUCTION GENERALE

2013). Le processus de récupération du saccharose dans le phloème pourrait être réalisé par l'intermédiaire de co-transporteurs de saccharose/H<sup>+</sup> (SUC) selon un mécanisme semblable à celui se déroulant dans le phloème de chargement (Ayre, 2011 ; Gould et al., 2012).

Enfin, le saccharose est déchargé dans les organes puits. Cette étape implique souvent des étapes de transport symplastique (Patrick, 1997). Ainsi dans la racine, le déchargement du saccharose se déroulerait par l'intermédiaire de plasmodesmes spécialisés, qualifiés de plasmodesmes « entonnoirs » (funnel plasmodesmata) qui sont spécifiquement localisés entre les tubes criblés du protophloème et les cellules du péricycle (Ross-Elliott et al., 2017). La question de savoir si ces plasmodesmes spécialisés existent aussi dans d'autres organes puits ou est spécifique de la racine reste ouverte. Au-delà de la zone de déchargement du phloème, le mode de transport utilisé par les sucres varie selon le type de puits et son stade de développement. Ainsi dans la graine, le transport des sucres après le déchargement du phloème, au niveau de la chalaze, est assuré par l'action successive de plusieurs transporteurs de type SWEETs, dont SWEET11, SWEET12 et SWEET15 (Chen et al., 2015).



**Figure 2 : Transport de sucres entre les organes sources et les organes puits**

Représentation du transport d'eau et d'éléments minéraux médié par le xylème (en bleu) et le transport d'éléments nutritifs médié par le phloème (en jaune) avec une représentation du chargement et du déchargement du phloème avec le transport du saccharose entre les cellules (flèches noires), les transporteurs de sucres (ronds rouges) et les plasmodesmes (pd) (Adaptée d'après Dinant et al., 2008).

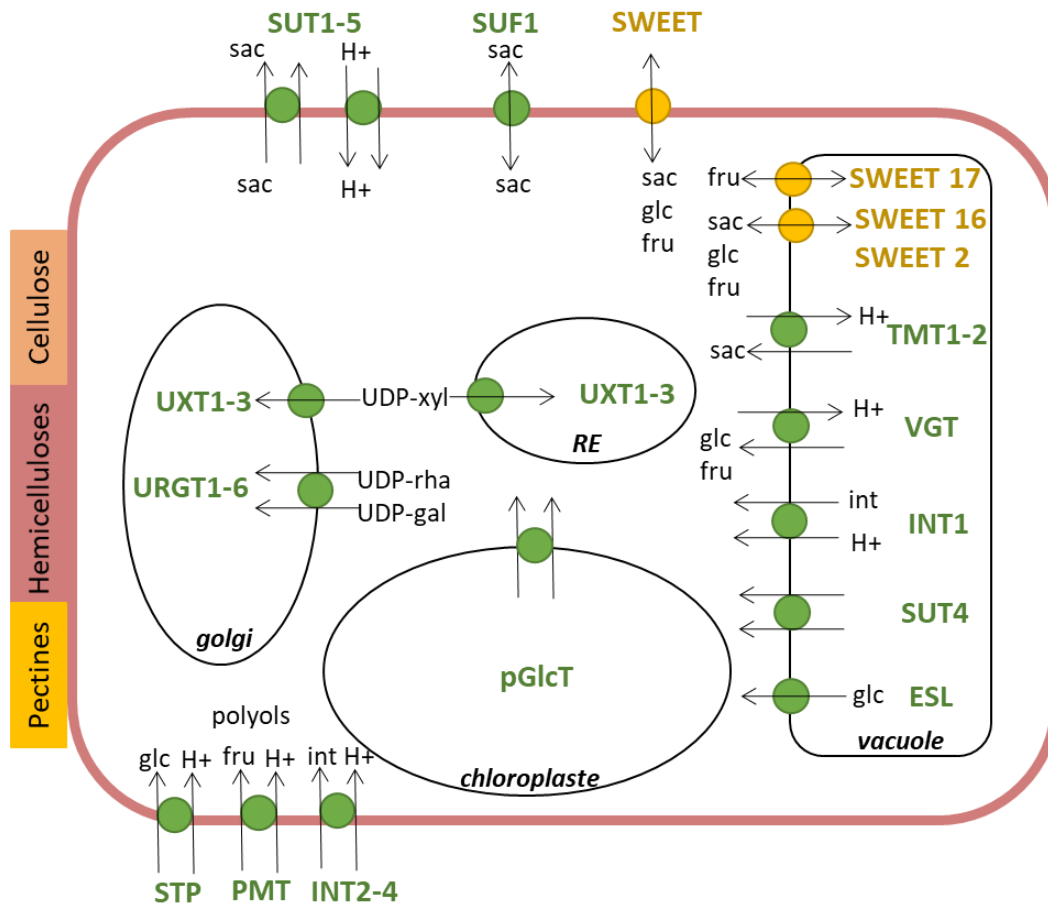


## I. INTRODUCTION GENERALE

### 1.2.2 Le cas particulier de la hampe florale

On peut ainsi voir les végétaux comme un système complexe d'organes sources et puits. Certains organes comme les feuilles débutent leur développement en étant des puits pour le saccharose et deviennent ensuite des sources. A l'inverse, les graines peuvent être considérées uniquement comme des organes puits tout au long de leur développement. Mais qu'en est-il du statut de la hampe florale ? Chez la moutarde blanche, une augmentation de saccharose dans la sève phloémienne a été observée au moment de la transition florale, suggérant que la hampe florale est un puit fort dont les besoins en sucres sont très importants afin d'assurer la production des nouveaux organes (Lejeune et al., 1993). Des études plus récentes utilisant du dioxyde de carbone marqué au  $^{14}\text{C}$  et une technique d'imagerie radio-isotopique en temps réel ont permis de montrer que jusqu'à la production des premières fleurs, les principales sources de photosynthétats de la hampe florale sont les feuilles de la rosette. Une fois les premières fleurs développées, la hampe florale devient la principale source de photosynthétats, devenant ainsi un organe source (Ohmae et al., 2013 ; Sugita et al., 2016). Ces résultats ont été récemment confirmés par Durand et al. (2018) qui a réalisé, chez *Arabidopsis thaliana*, une étude de l'allocation du carbone et de la régulation des relations sources-puits dans les différents organes (feuilles de rosette, hampe florale et racines) du stage végétatif au stade reproducteur. De plus, il a été suggéré que les feuilles caulines, présentes sur la hampe florale, qui sont photosynthétiquement actives, pourraient contribuer à une large proportion de carbone utilisé par les fleurs et les siliques (Earley et al., 2009). La hampe florale, tout comme les feuilles de la rosette, a donc un double statut étant puits au début de son développement puis source. Enfin, bien que la notion de source-puits soit majoritairement utilisée à l'échelle de l'organe, il est important de préciser également que certains tissus sont considérés comme des puits, c'est le cas par exemple des tissus méristématiques comme le procambium/cambium présent dans les tiges (De Schepper et al., 2013). Qu'en est-il du statut du xylème au cours de son développement et notamment pendant la synthèse de la paroi secondaire qui nécessite un apport important de squelettes carbonés ? Et quels sont les acteurs moléculaires impliqués dans le transport de sucres dans ce tissu ? Répondre à ces questions, qui restent largement inexplorées, pourrait permettre de mieux intégrer l'allocation du carbone aux différentes échelles d'organisation (i.e. plante entière, organe, tissus).

1.2.3 Les familles de transporteurs de sucres



**Figure 3 : Représentation des familles de transporteurs de sucres localisées dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*** (Adaptée d'après Doidy et al., 2012)

Le transport des sucres est assuré par des transporteurs organisés en deux grandes familles :

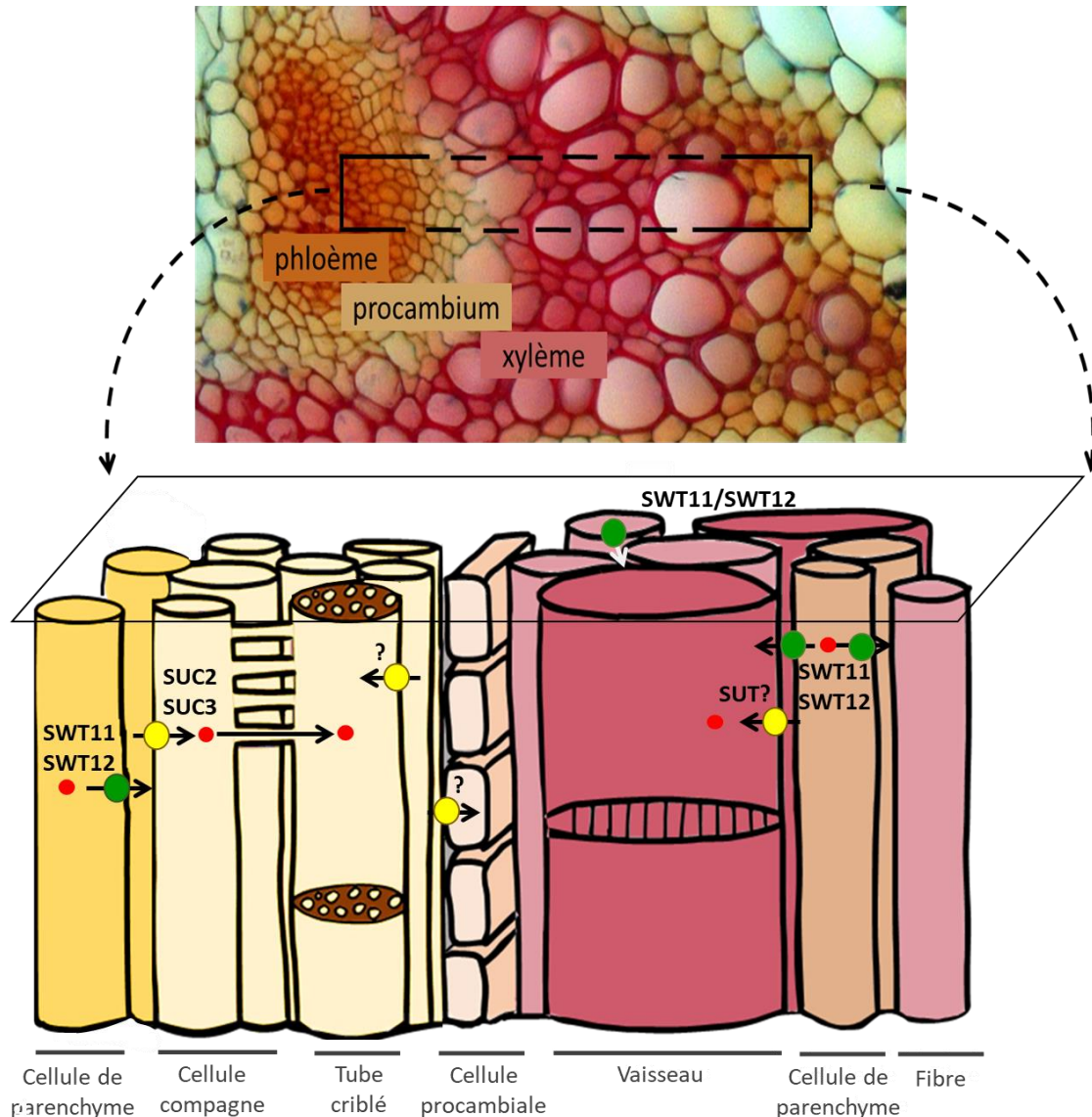
(1) Les MFS (Major Facilitator Superfamily) (pour revue Nino-Gonzalez et al., 2019) comprenant notamment :

- La famille des SUC/SUT (Sucrose Carrier/Sucrose Transporter)
- La famille des MSTs (Monosaccharides Transporters) comprenant :
  - i. les STP (Sugar Transporter Family),
  - ii. les ERD6-like (Early Response to Dehydration6-like),
  - iii. les TST (Tonoplasmic Sugar Transporter),
  - iv. les PMT (Polyol/Monosaccharide Transporter),
  - v. les PGlcT (Plastidic Glucose Translocator),
  - vi. les VGT (Vacuolar Glucose Transporter) et
  - vii. les INT (Inositol Transporter).

(2) La famille des transporteurs de type SWEET (Sugar Will Eventually Be Exported Transporter) (Chen et al., 2013).

## I. INTRODUCTION GENERALE

Dans le cadre d'une revue plus large sur le transport latéral des solutés qui a été publiée dans l'équipe cette année (Aubry et al., 2019), j'ai fait une synthèse des différents transporteurs pouvant être impliqués dans les échanges de sucres au niveau de la hampe florale, en se basant sur leurs patrons d'expression chez *Arabidopsis thaliana* ou chez des espèces ligneuses. (Figure 5). Ce sont uniquement ces familles de transporteurs que je vais détailler ci-après.



**Figure 4 : Localisation tissulaire des transporteurs de sucres dans le système vasculaire de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana***

Représentation schématique des cellules retrouvées dans le phloème avec CM : cellule de mésophylle ; CP : cellule de parenchyme ; CC : cellule compagne ; TC : Tube criblé ; et des cellules retrouvées dans le xylème avec V : vaisseau ; F : fibre. Représentation schématique des sucres (en rouge), des transporteurs de type-SWEET (en vert) et des transporteurs actifs de type-SUC (en jaune) (Adaptée d'après Aubry et al., 2019).

## I. INTRODUCTION GENERALE

### 1.2.3.1 Les transporteurs de saccharose (SUC/SUT)

Les membres de la famille SUC/SUT, qui sont au nombre de 9 chez *Arabidopsis thaliana*, assurent le transport du saccharose contre le gradient de concentration grâce à la force promotrice (Sauer, 2007). Ils sont exprimés dans différents tissus et type cellulaires et ont été décrit comme étant impliqués dans le chargement et le déchargement du phloème (Milne et al., 2017).

Chez *Arabidopsis thaliana* le symporteur ; saccharose :H<sup>+</sup>, AtSUC2, est localisé dans les cellules compagnes du phloème des feuilles et de la hampe florale (Truernit and Sauer, 1995, Figure 4) et contribue au chargement du saccharose dans le phloème, permettant ainsi son export vers les organes puits (Sauer and Stolz, 1994 ; Stadler and Sauer, 1996 ; Gottwald et al., 2000). Il a également été suggéré que ce transporteur était impliqué dans le rechargement du saccharose s'échappant lors du transport à longue distance des sucres dans le phloème des organes de transport, comme la hampe florale chez *Arabidopsis thaliana* (Srivastava et al., 2008) ou l'entre-nœud de maïs (Julius et al., 2017). De plus, un rôle de AtSUC2 dans le déchargement du saccharose dans les organes puits comme la racine a également été suggéré (Durand et al., 2018). Chez le peuplier, le transporteur de saccharose PttSUT3, un orthologue de AtSUC2, est quant à lui impliqué dans le transport du saccharose au moment de la formation de la paroi secondaire des cellules du bois (Mahboubi et al., 2013). Chez le sorgho (*Sorghum bicolor*), *SbSUT1* et *SbSUT5* sont tous deux localisés à la membrane plasmique des tubes criblés de protophloème ainsi que dans les parenchymes de réserve (Milne et al., 2017). A un stade de développement précoce d'un entre-nœud, les protéines SUTs présentes dans les tubes criblés du protophloème permettraient ainsi l'export de saccharose hors des cellules de phloème médiée par la force promotrice des cellules compagnes voisines (Milne et al., 2017). A un stade de développement plus tardif, les SUTs, excepté SUT4 : un transporteur vacuolaire ; permettraient de décharger le saccharose dans les cellules de parenchymes de réserves (Milne et al., 2017).

### 1.2.3.2 Les transporteurs SWEET

Les gènes de la famille des *SUGAR WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTERS* (*SWEET*) codent pour des protéines transmembranaires permettant le transport facilité des sucres selon le gradient de concentration (Chen et al., 2010). Un gène *SWEET* est présent chez les bactéries et les mammifères, deux *SWEET* sont présents chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Le génome du ver *Caenorhabditis elegans* compte sept gènes. Au contraire, le nombre de gènes *SWEET* dans le génome des végétaux est beaucoup

## I. INTRODUCTION GENERALE

plus important et varie selon les espèces (Chen et al., 2010 ; Yuan et al., 2014). Il existe ainsi 17 gènes chez *Arabidopsis thaliana*, 21 gènes chez le riz (*Oryzae sativa*) et chez le peuplier (Chen et al., 2010, Tableau III). Ces gènes sont généralement répartis en quatre clades selon le type de substrat transporté (Baker et al., 2012; Yuan et al., 2014 ; Eom et al., 2015). Il s'agit de facilitateurs permettant le transport de sucres selon le gradient de concentration au niveau de la membrane plasmique ou du tonoplaste. Contrairement aux autres membres de la superfamille des MFS, les transporteurs SWEETs sont des protéines à 7 domaines transmembranaires qui doivent former des homo-oligomères et/ou des hétéro-oligomères pour créer un pore fonctionnel (Xuan et al., 2013). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que les protéines SWEETs transportent majoritairement du saccharose, du glucose et/ou du fructose (Chen et al. 2010 ; Klemens et al., 2013 ; Chardon et al., 2013 ; Le Hir et al., 2015). Une étude de cristallographie a mis en évidence l'existence de deux tailles de pore permettant le transport de (1) diose de type saccharose, ou (2) d'hexoses (fructose ou glucose) (Xuan et al., 2013). Une étude effectuée sur *AtSWEET1* a étendu la capacité de transport de ce facilitateur au mannose et au galactose (Chen et al., 2010). De plus, une récente étude portant sur *AtSWEET13* et *AtSWEET14* a mis en évidence leur capacité à transporter des régulateurs de croissance, à savoir des gibbérellines (Kanno et al., 2016). Chez le riz les transporteurs OsSWEET1, OsSWEET4, OsSWEET5 et OsSWEET15 sont également capables de transporter du galactose (Yuan et al., 2014). Ces études suggèrent que les SWEETs ne sont sans doute pas restreints à transporter des sucres simples de type glucose, fructose et/ou saccharose et pourraient être capables de transporter des molécules plus complexes.

Chez *Arabidopsis thaliana*, la caractérisation fonctionnelle des lignées dérégulées dans l'expression de certains gènes appartenant à la famille des transporteurs SWEETs a permis de suggérer un rôle de ces gènes dans la nutrition du pollen (*SWEET8* et *SWEET12*), la sécrétion du nectar (*SWEET9*), la nutrition de l'embryon (*SWEET11*, *SWEET12* et *SWEET15*), le chargement du phloème (*SWEET11* et *SWEET12*), la séquestration du carbone dans le cadre de l'interaction *Arabidopsis-Phytium* (*SWEET2*), la tolérance au froid (*SWEET16*) ou la modulation du contenu en fructose des vacuoles des feuilles (*SWEET17*) (Pour revue Chen et al., 2015) (Tableaux IIA, IIB et III). Au cours de ma thèse, j'ai réalisé une synthèse bibliographique des SWEET retrouvés dans les différentes espèces végétales. J'ai représenté sous forme de tableau les rôles connus des différents SWEET ((Tableaux IIA, IIB).

**Tableau IIIA : Synthèse bibliographique des SWEETs retrouvés dans différentes espèces végétales avec présentation brève de leur localisation et leur rôle dans la plante**

SWEET	Espèce végétale	Localisation	Tissu / organe	Transport	Rôle	Référence
SWEET1	At	Membrane plasmique	Feuille, hampe, fleurs, tube pollinique : phloème uniquement	Glucose	Transport dans le réticulum endoplasmique	Chen et al., 2010
	Cs		Racine, feuille, fruit, fleur male			Hu et al., 2017
	Md		Fruit		Export et import	Wei et al., 2014
	Pb		Hampe			Li et al., 2017
SWEET2	At	Vacuole	Fleurs à différents stades de développement Toute la plante	Glucose	Interaction Arabidopsis phytium Rôle dans le développement Interaction avec CK, cwINV	Chen et al., 2010
	Os					Feng et al., 2015
	Cs					Hu et al., 2017
SWEET3	At	Membrane plasmique	Xylème de la hampe florale (cellule parenchyme) Système vasculaire des nodules		Composition paroi secondaire	Le Hir et al., non publiée
	Lj					Sugiyama et al., 2016
SWEET4	Zm	Membrane plasmique	Absent des siliques et graines	Glucose et fructose	Interaction avec auxine, action dans la sénescence	Zhou et al., 2014
	Os					
SWEET5	At	Membrane plasmique	Pollen Racine et fleur mâle Pollen et fruit	Glucose	Fournit en énergie cellules générative	Chen et al., 2010
	Cs					Hu et al., 2017
	Pb					Wei et al., 2014
	Os					
SWEET6	Pb	Membrane plasmique	Feuilles			Li et al., 2017
SWEET7	Cs	Membrane plasmique	Fleur mâle Feuille			Hu et al., 2017
	Pb					Li et al., 2017
SWEET8	At	Membrane plasmique	Tubes polliniques	Glucose	Efflux de glucose pour la nutrition du pollen	Chen et al., 2010 Fen et al., 2015
SWEET9	At	Membrane plasmique	Nectaires Nectaires Pollen et fruit		Impliqué dans la sécrétion du nectar Sécrétion de sucre dans les nectaires	Chen, 2015
	Cs					Hu et al., 2017
	Pb					Li et al., 2017



**Tableau IIB : Synthèse bibliographique des SWEETs retrouvés dans différentes espèces végétales avec présentation brève de leur localisation et leur rôle dans la plante**

SWEET	Espèce végétale	Localisation	Tissu / organe	Transport	Rôle	Référence
SWEET10	At	Membrane plasmique	Feuilles, principalement tissu vasculaire, membrane plasmique Pollen et fruit	Sucrose	Augmentation de l'expression lors de l'infection par Pythium Irregularare	Dhandapani et al, 2017
	Ib					Y Li et al, 2017
	Pb					Li et al, 2017
	Gh					Cox et al, 2017
SWEET11	At	Membrane plasmique	Phloème et Xylème	Glucose Fructose Sucrose	Chargement phloème, développement système vasculaire et formation paroi cellulaire secondaire	Le Hir et al, 2015 Chen et al, 2012
	Os		Membrane plasmique cellules non infectées Graines			Chen et al, 2010 Kryvoruchko et al, 2016
	Hv					Mascher et al, 2017
SWEET12	At	Membrane plasmique	Phloème et xylème	Glucose Fructose Sucrose	Chargement phloème, développement système vasculaire et formation paroi cellulaire secondaire	Le Hir et al, 2015 Chen et al, 2012
	Os		Fleur mâle			Streubel et al, 2013
	Cs					Hu et al, 2017
SWEET13	At	Membrane plasmique	Développement floral : anthères Pentules	Glucose Gibberélines	Transporteur de glucose	Kanno et al, 2016 Unpublished Sellami Feng et a, 2015
	At Os Pb	Membrane plasmique	Feuilles			Yuan et Wang, 2013 Li et al, 2017
SWEET15	At	Membrane plasmique	Racines latérales, fleur, feuilles sénescentes Hampe florale, fruit, Pentules, fleur et racines		Régulateur tolérance salinité	Chen and al. 2010 ; Seo and al, 2011
	Os					Feng et a, 2015
	Cs					Hu et al, 2017
	Si					Asai et al, 2015
SWEET16	At	Vacuole	Cellules parenchymes vasculaire, xylème Fleur	Glucose, fructose, sucrose	Homéostasie des sucres	Klemens & al, 2013 Unpublished results M2, 2016
	Pb					Li et al, 2017
SWEET17	At	Vacuole	Feuilles Fleur mâle	Fructose	Contrôle la quantité de sucrose des feuilles	Chardon et al, 2013 Hu et al, 2017
	Cs					

## I. INTRODUCTION GENERALE

**Tableau III : Synthèse bibliographique du nombre de gènes SWEETs retrouvés chez les plantes**

NOM	Espèce végétale	SWEETs	Références bibliographiques
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	17	Chen et al., 2010 ; 2012 ; 2015 (AtSWEET11,12,15) ; Le Hir et al., 2015 (AtSWEET11, 12); Chardon et al., 2013 (AtSWEET17) ; Klemens et al., 2013 (OE SWEET16); Guo et al., 2013 (AtSWEET17) ; Seo et al, 2011 (SAG29) ; Kanno et al, 2016 (AtSWEET13,14) ; Dhandapani et al, 2017 (AtSWEET2)
Os	<i>Oryza sativa (rice)</i>	21 (12 chr)	Streubel et al, 2013 ; Yuan et Wang 2013, Anthony et al, 2010 (Os11N3)
Zm	<i>Zea mays (maize)</i>		
Mt	<i>Medicago truncatula</i>	28	Kryvoruchko et al., 2016
Lj	<i>Lotus japonicus</i>	13	Sugiyama et al., 2016 (LjSWEET3)
Cs	<i>Cucumis sativus (cucumber)</i>		Hu et al, 2017
Cl	<i>Citrullus lanatus (watermelon)</i>		Hu et al, 2017
Cm	<i>Cucumis melo (melon)</i>		Hu et al, 2017
Sl	<i>Solanaceae lycopersicum (tomato)</i>	29 / 31	Feng et al, 2015 ; Asai et al, 2015
	<i>Citrus sinensis (orange)</i>		Zheng et al., 2014
Md	<i>Maluce domestica (apple)</i>	25	Wei et al., 2014
Gm	<i>Glycine Max (Soybean)</i>	52 (15 chr)	Patil et al., 2015
Ib	<i>Ipomoea batatas Lam (Sweet Potato)</i>		Li et al., 2017
Ps	<i>Pisum sativum (pea)</i>		Dhandapani et al., 2017
Hv	<i>Hordeum vulgare (barley)</i>		Mascher et al, 2017
	<i>Triticum (weat)</i>		
	<i>Poplar (Populus)</i>	21	
Me	<i>Cassava</i>		Cohn et al, 2014 (SWEET10a)
Vv	<i>Vitis vinefera</i>	17	Chong et al., 2014
Ph	<i>Petunia hybrida</i>		Ge et al, 2000 ; 2001 (NEC1)
Pb	<i>Pyrus bretschneideri (chinese white pear)</i>	18 (15 on 17chr)	Li et al, 2017
Pp	<i>peach</i>	17	Li et al, 2017
Pm	<i>Japanese apricot</i>	11	Li et al, 2017
Fv	<i>Woodland strawberry</i>	10	Li et al, 2017
Gh	<i>Gossupium hirsutum spp. Cotton</i>		Cox et al, 2017 (GhSWEET10)
Ma	<i>Musa acuminata Banana</i>	25	Miao et al, 2016
Sb	<i>Sorghum (Sorge)</i>	23	Mizuno et al, 2016



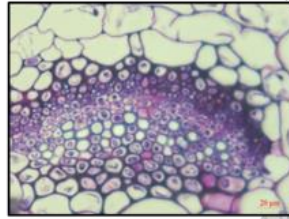
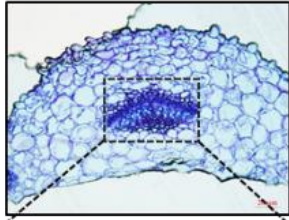
### 2. Le système vasculaire chez les Angiospermes

Le transport à longue distance des sucres produits dans les organes sources vers les organes puits a lieu dans un tissu extrêmement spécialisé, le phloème. A ce transport à longue distance des sucres vient s'ajouter le transport d'eau et d'éléments minéraux des racines vers les parties aériennes à travers le xylème. Le xylème permet également d'apporter à la plante un support structural afin d'assurer son port érigé (Heo et al., 2014). Le phloème et le xylème et leur assise génératrice, le procambium/le cambium, forment le système vasculaire chez les végétaux supérieurs (Eames and MacDaniels, 1947). Dans cette partie, nous aborderons dans un premier temps comment le système vasculaire s'organise à l'échelle de la plante entière et des organes et dans un second temps, je reviendrai sur la structure et le développement des différents types cellulaires composant le système vasculaire à l'échelle de la cellule.

#### 2.1. Organisation du système vasculaire à l'échelle de la plante entière et de l'organe

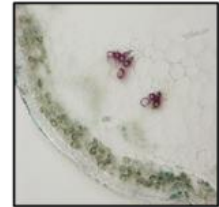
La formation du système vasculaire débute dès l'embryogenèse selon une polarité apico-basale de l'embryon. Durant les stades précoces de l'embryogenèse, l'organogenèse, c'est-à-dire la mise en place de la racine, de la tige et des cotylédons, se superposent à l'histogenèse, c'est-à-dire la formation des cellules précurseurs des différents tissus dont le procambium. Nous reviendrons plus tard sur les acteurs moléculaires impliqués dans la mise en place du procambium et des autres types cellulaires du système vasculaire. Après l'embryogenèse, le méristème apical caulinaire (MAC) produit les feuilles. Chaque feuille est connectée au système vasculaire existant par une ou plusieurs traces foliaires (Dengler, 2001). A cette organisation se superpose la phyllotaxie, c'est-à-dire l'ordre dans lequel est produit les feuilles (Dengler et al., 2006). La description des connexions du système entre les différents organes a été réalisée au cours des premiers stades de développement de la plantule d'*Arabidopsis thaliana* (Busse and Evert, 1999), et au cours de la phase reproductive grâce à l'utilisation de la lignée *pATHB8:GUS* qui est un marqueur du procambium (Kang et al., 2003). Ainsi, bien que l'organisation du système vasculaire diffère d'un organe à l'autre, une continuité entre la partie racinaire et à la partie aérienne est observée (Esau, 1965).

**PETIOLE (FEUILLE)**

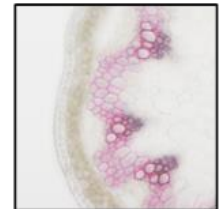


**HAMPE FLORALE**

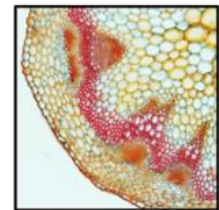
tissu jeune



tissu en cours d'élongation

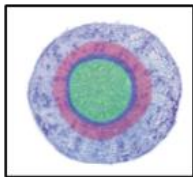


tissu mature

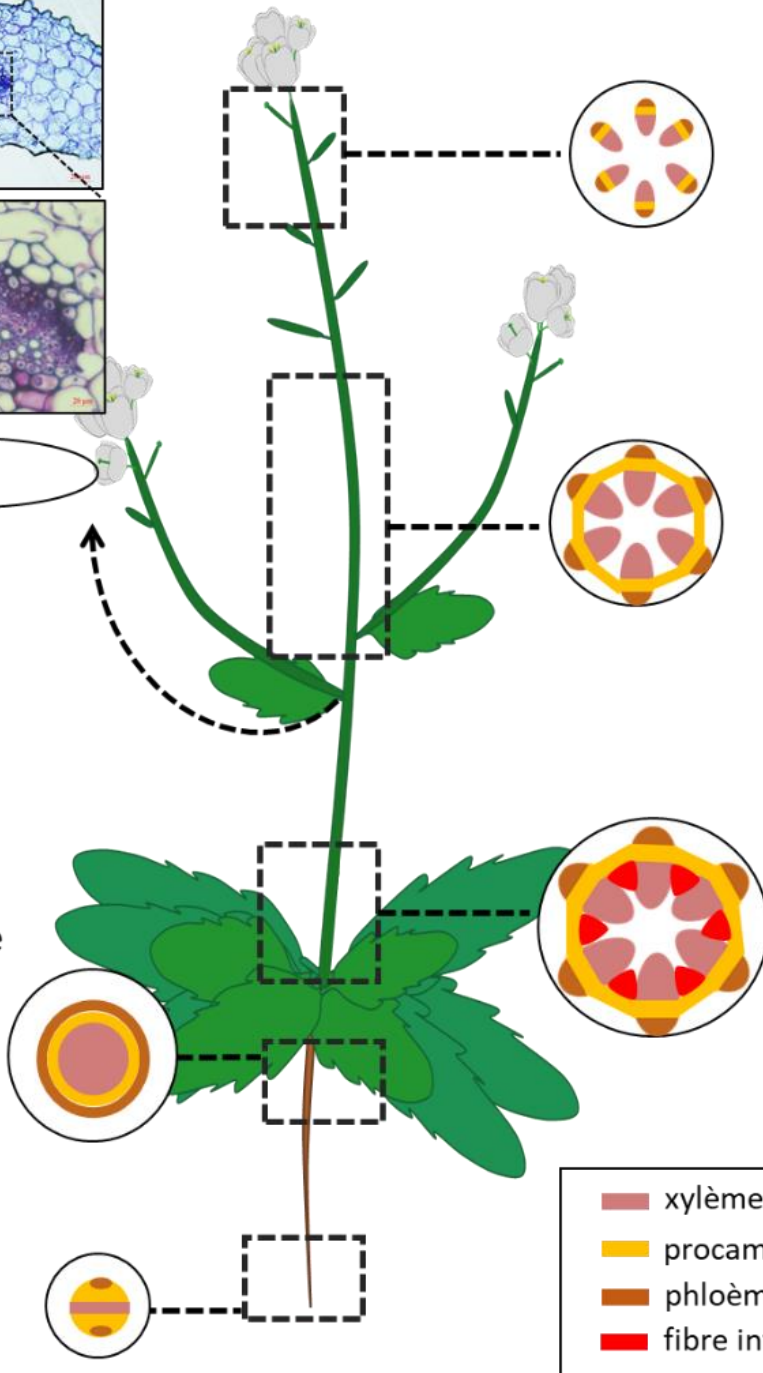
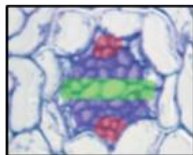


**RACINE**

tissu mature



tissu jeune



- xylème
- procambium
- phloème
- fibre interfasciculaire

**Figure 5 : Organisation du système vasculaire dans les différents organes chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Adaptée d'après Campbell and Turner, 2017)**

## I. INTRODUCTION GENERALE

La racine se compose d'une zone méristématique, d'une zone d'élongation et d'une zone de maturation (Lucas et al., 2013). Le système vasculaire est un cylindre central composé de 2 pôles de phloème et de 2 pôles de xylème selon une organisation diarche (Lucas et al., 2013, Campbell and Turner, 2017 ; Figure 5). Du fait de la relative simplicité de son organisation, la racine a été intensivement utilisée comme modèle d'étude afin de déterminer les étapes de développement du système vasculaire et les régulations moléculaires impliqués dans ces mécanismes (Cano-Delgado et al. 2010; Scarpella and Helariutta 2010, Lucas et al., 2013)

Les feuilles, quant à elles, comportent un réseau de veines interconnectées composées de cellules de phloème, de xylème, de parenchymes, de sclérenchymes et de fibres (Lucas et al., 2013). Les tissus vasculaires sont organisés en faisceaux composés d'un massif de phloème surmontant un massif de xylème et sont entourés d'une gaine périvasculaire qui les sépare des tissus parenchymateux adjacents (Campbell and Turner, 2017 ; Figure 5). Les veines sont classées en fonction de leurs tailles et de la nature des tissus adjacents (Nelson and Dengler, 1997 cité par Lucas et al., 2013). Les veines majeures (primaires et secondaires) sont entourées de parenchymes tandis que les veines mineures (tertiaires ou quaternaires) sont entourées de mésophylle (Esau, 1965a cité par Lucas et al., 2013). Les veines majeures sont les plus larges et assurent ainsi le transport d'eau et de métabolites tandis que les veines mineures plus fines assurent essentiellement le chargement du phloème (Haritatos et al., 2000, Lucas et al., 2013).

La hampe florale possède, quant à elle, une disposition des tissus vasculaires plus complexe que celle de la racine et de la feuille (Aubry et al., 2019). Chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, la hampe florale porte les inflorescences latérales, les siliques et les fleurs et assure le transport d'éléments nutritifs et d'eau à longue distance à travers le système vasculaire (Sanchez et al., 2012). Tous les tissus vasculaires des parties aériennes se développent à partir du méristème apical caulinaire, contrairement à la racine et à l'hypocotyle. Ces derniers proviennent des tissus provasculaires formés durant l'embryogénèse (Campbell et Turner, 2017). Ainsi dans la hampe florale, on trouve plusieurs faisceaux cribro-vasculaires (8-10 en moyenne) reliés entre eux par des fibres interfasciculaires. Chaque pôle cribro-vasculaires de la hampe florale résulte de la combinaison complexe de plusieurs traces foliaires (Kang et al., 2003) et est organisé de manière collatérale avec le xylème primaire localisé à proximité de la moelle, le phloème primaire localisé à l'extérieur du faisceau (Zhong et al., 1999) et le procambium séparant ces deux tissus (Figure 5). Enfin, les faisceaux cribro-vasculaires sont reliés entre eux par des fibres interfasciculaires (Altamura et al., 2001). Le ratio de cellules de xylème par rapport aux cellules de phloème est constant le long de la circonférence et permet

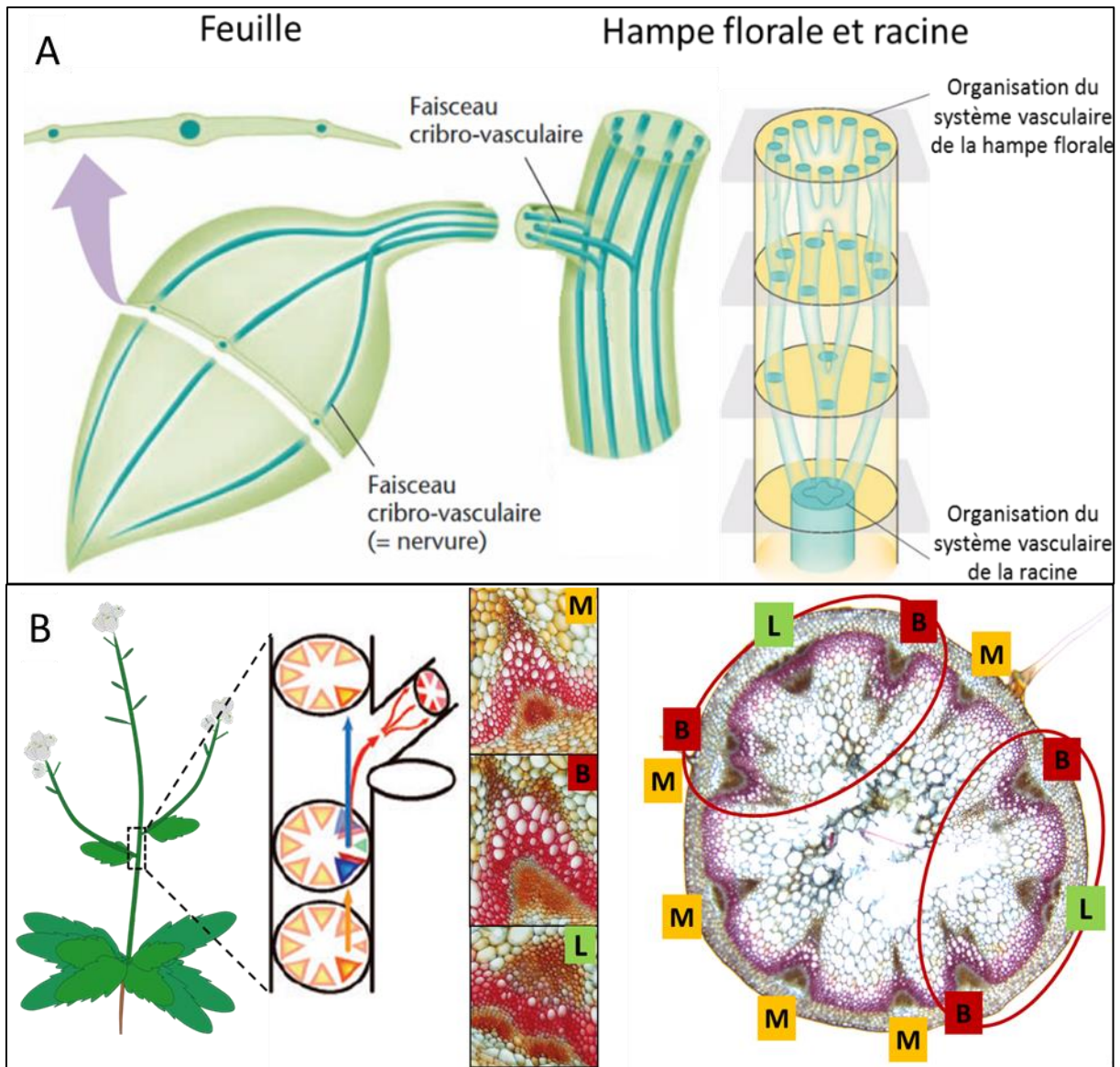
## I. INTRODUCTION GENERALE

ainsi de maintenir une forme cylindrique de la hampe florale (Spicer and Groover, 2010). Si la production de cellules de xylème est accélérée dans certaines régions cambiales, la forme de la hampe florale est alors aplatie (Basson et Bierhorst, 1967). Cette organisation vasculaire est observée par exemple chez les lianes ce qui leur confère un avantage mécanique dans un habitat en hauteur tel que le leur (Spicer et Groover, 2010).

Récemment, une classification du type de pôles cribro-vasculaires dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* a été établie (Park et al., 2015, Figure 6B). Ces travaux ont mis en évidence l'existence de trois types de pôles. Les pôles cribro-vasculaires de formes triangulaires permettraient d'alimenter la totalité de la hampe florale principale (Main Inflorescence Stem connexions). A l'approche d'un entre-nœud supportant une inflorescence latérale, on peut également observer des pôles de forme irrégulière composés de plusieurs pointes xylémiennes, ce sont les pôles de type-B (Branching Stem Connexions). Enfin, entre chaque pôle B, un faisceau cribro-vasculaire de plus petite taille et de forme plus arrondie permettant d'alimenter les feuilles caulinaires sous-jacentes et qualifié de pôle de type-L, est observé (Cauline Leave Connexions) (Park et al., 2015). Bien qu'une étude a décrit l'organisation du système vasculaire de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* en analysant les embranchements des entre-nœuds de la hampe florale (Altamura et al., 2001), les détails sur leur organisation spécifique et leurs fonctions ne sont pas connus.

Au sein d'un organe, l'organisation des tissus vasculaires est contrôlée par l'activité de certains facteurs de transcription. Ainsi, lors de mutations dans des gènes de type *MYB* (Waites et al., 1995, 1998), *PHB* (McConnell et al., 2001) et *AVBI* (Ye, 2002) un phénotype de xylème entourant le phloème a été observé chez les feuilles (Waites et al., 1995, 1998 ; McConnell et al., 2001) et dans la hampe florale (Zhong et al., 1999 ; Ye, 2002). De plus, le facteur de transcription *REVOLUTA*, appartenant à la classe III des HD-ZIP, détermineraient la polarité des faisceaux cribro-vasculaires et assureraient l'organisation collatérale (Emery et al., 20013). De nombreuses phytohormones sont également impliquées dans ces processus, notamment l'auxine qui jouerait un rôle crucial dans la mise en place des pôles vasculaires de la hampe florale (Aloni et al., 1987 ; Gälweiler et al., 1998 ; Ibanes et al., 2009 ; Fabregas et al., 2015). Ainsi, les lignées mutées dans l'expression des gènes codant pour les transporteurs d'influx d'auxines *AUX/LAX* présentent moins de pôles cribro-vasculaires dont l'espacement est plus important (Fabregas et al., 2015).





**Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation du système vasculaire dans les différents organes chez *Arabidopsis thaliana***

Connexion du système vasculaire dans la feuille, la hampe florale et la racine (A). Classification des faisceaux cribro-vasculaires de la hampe florale (B) avec des pôles de type-M pour « Main inflorescence stem connexion » (Connexion des pôles vasculaires de la hampe florale principale, de forme triangulaire en jaune) ; de type-B pour « Branching stem connexion » (Connexion aux pôles vasculaires des inflorescences latérales formés de deux pointes xylémiennes en rouge) et de type-L pour « Cauline Leave connexion » (Connexion aux pôles vasculaires des feuilles caulines de forme arrondie en vert). (C) Section basale de hampe florale (échelle : 200  $\mu\text{m}$ ) représentant les trois types de pôles vasculaires (M, B et L) avec un cercle rouge regroupant deux pôles B entourant un pôle L, représentant la position de l'embranchement d'une inflorescence latérale avec la feuille cauline sous-jacente (Adaptée d'après Park et al., 2015).

## I. INTRODUCTION GENERALE

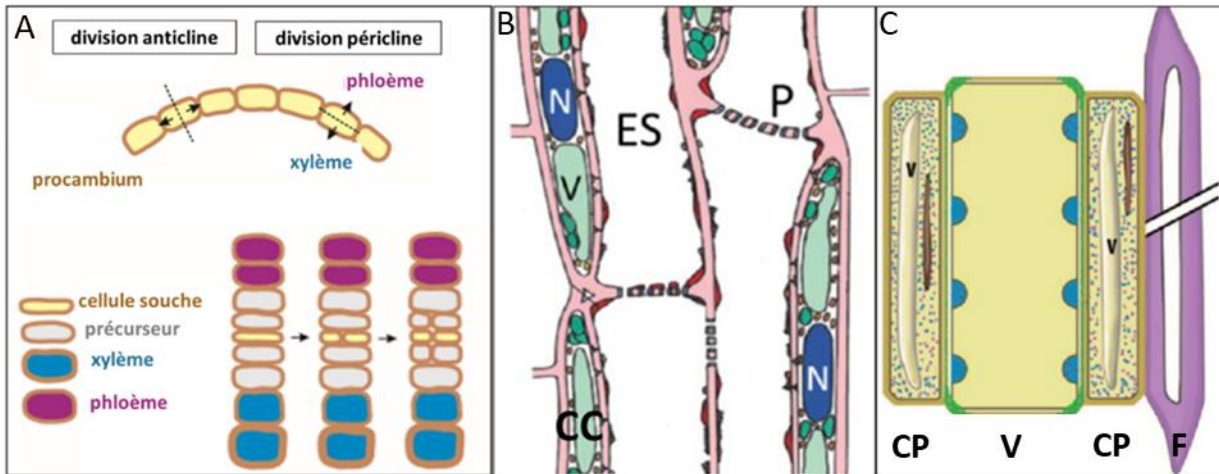
A l'inverse les lignées mutées dans l'expression des gènes codant pour les transporteurs d'efflux d'auxine PIN1 et PIN2 présentent un plus grand nombre de faisceaux cribro-vasculaires et une augmentation de la différenciation du xylème (Ibanes et al., 2009). Ainsi la mise en place des gradients d'auxine à travers l'action coordonnée des transporteurs d'influx et d'efflux d'auxines est important pour déterminer la position des pôles cribro-vasculaires mais également leur espacement au sein de la hampe florale. De plus, les brassinostéroïdes, identifiées la première fois pour leur implication dans l'élongation de la hampe florale (Grove et al., 1979, Mandva, 1988 cités par Cano-Delgado et al., 2004), sont également impliquées dans la mise en place du nombre de faisceaux cribro-vasculaires de la hampe florale et agiraient en stimulant les divisions du procambium (Ibanes et al., 2009). Enfin, le nombre de pôle cribro-vasculaires serait sous le contrôle des cytokinines. En effet, la mutation dans des gènes impliqués dans la biosynthèse des cytokinines entraîne une réduction de 50% du nombre de pôles vasculaires (Matsumoto-Kitano et al., 2008).

### **2.2. Structure et développement du système vasculaire**

#### **2.2.1. Le procambium et le cambium**

##### **2.2.1.1. Structure et fonction**

Le procambium est un tissu méristématique composé d'une assise de cellules non différenciées qui assure le développement des cellules de phloème et de xylème primaire (encore appelé protophloème et protoxylème) (Esau, 1997 ; Larson 1994 ; Schuetz et al., 2012, Figure1A) grâce à des divisions périclines (Esau, 1997 ; Larson 1994 ; Figure 7A). A cette croissance primaire s'ajoute une croissance secondaire ou croissance radiale qui est assuré par l'activité du cambium vasculaire et la production de métaphloème et de métaxylème (Spicer and Groover, 2010). La prolifération des cellules de procambium ou de cambium se fait, quant à elle, grâce à des divisions anticlines (Figure 7A). Les cellules procambiales et cambiales sont composées d'un cytoplasme dense (Esau, 1965a, Nelson and Dengler 1997, Lucas et al., 2013) et présente une forme étroite et allongée (Kang et al., 2007 ; Etchells et al., 2013). A l'œil nu, il est difficile de différencier les cellules souches de procambium, des cellules précurseurs de phloème ou de xylème (Lucas et al., 2013). Cependant l'identification de certains des acteurs moléculaires impliqués dans la production et la prolifération de ces cellules (ex : WOX4, PXY, ATHB8, ANT, PEAR1) a permis la création de lignées marqueurs fluorescents, rendant ainsi l'identification de ces cellules plus aisée (Smetana et al., 2019).



**Figure 7 : Organisation cellulaire des tissus vasculaires chez *Arabidopsis thaliana***

Procambium (A) ; Phloème (B) ; Xylème (C) avec ES : éléments de sève, CC : cellules compagnes, P : plasmodesmes, CP : cellules de parenchymes, V : vaisseau, F : fibre (d'après Spicer and Groover, 2010 et Schuetz et al., 2012)

#### 2.2.1.2. Acteurs impliqués dans la maintenance et la prolifération des cellules souches

La maintenance et la prolifération des cellules procambiales/cambiales sont sous le contrôle de nombreux acteurs moléculaires et hormonaux. Au stade embryonnaire l'initiation du procambium au niveau de la racine résulte d'une balance entre les concentrations d'auxine et de cytokinines et fait intervenir de nombreux acteurs tel les facteurs de transcription MONOPTEROS (MP) et TARGET OF MONOPTEROS5/LONESOME HIGHWAY (TMO5/LHW) et l'enzyme de la biosynthèse des cytokinines LONELY GUY4 (LOG4) (De Rybel et al., 2014). Le transport polarisé d'auxine est régulé par le gène *KANADI* (*KAN*) exprimé dans le phloème qui permet de restreindre le transport polarisé de l'auxine (PAT) au procambium et au tissu de xylème en développement (Schuetz et al., 2012, Figure 5A). Les gènes appartenant à la famille des HD-ZIP localisés dans le xylème permettent de réguler positivement le transport polarisé de l'auxine et favorisent le développement du xylème (Schuetz et al., 2012, Figure 8A). Ces gènes HD-ZIP sont maintenus par l'auxine et par des régulations post-transcriptionnelles médiée par les *microARN* 165 et 166 (Figure 8A). Le gène *MONOPTEROS* (*MP*) active l'expression du transporteur d'auxine *PIN1* et du gène *HD-ZIP* *ATHB8*. L'activation d'*ATHB8* par les gènes *MP* entraîne la différenciation des cellules souches du procambium. Une autre voie de signalisation a récemment été mise en évidence (Etchells et al., 2010). Des peptides *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION* (*CLE*) *CLE/TDIF* d'origine phloémienne diffusent dans l'apoplasme jusqu'aux cellules méristématiques ou ils

## I. INTRODUCTION GENERALE

sont pris en charge par les récepteurs *PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM / TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR TDIF* receptor *PXY/TDR* spécifiquement exprimées dans les cellules procambiales (Fisher and Turner, 2007 ; Hirakawa et al., 2008 ; Etchells and Turner., 2010 ; Schuetz et al., 2012, Figure 8B). La voie de signalisation de *PXY/TDR* entraîne la polarisation des cellules de procambium et favorise les divisions périclines (Etchells et Turner, 2010, Schuetz et al., 2012). Le modèle pour lequel le récepteur PXY localisé dans le procambium reçoit une information de la cellule phloémienne voisine concorde avec les études menées chez *C elegans* pour lequel un signal WNT provenant des cellules adjacentes contrôle l'orientation des divisions cellulaires (Goldstein, 1995, Schlesinger et al., 1999). La voie de signalisation de *PXY/TDR* active également le gène *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN PROTEIN 4* (Hirakawa et al., 2010) impliqué dans la prolifération des cellules procambiales et permet le maintien des cellules souches en inhibant la différenciation du xylème (Schuetz et al. 2012, Etchells et al., 2013, Figure 9B).

### 2.2.2. Le phloème

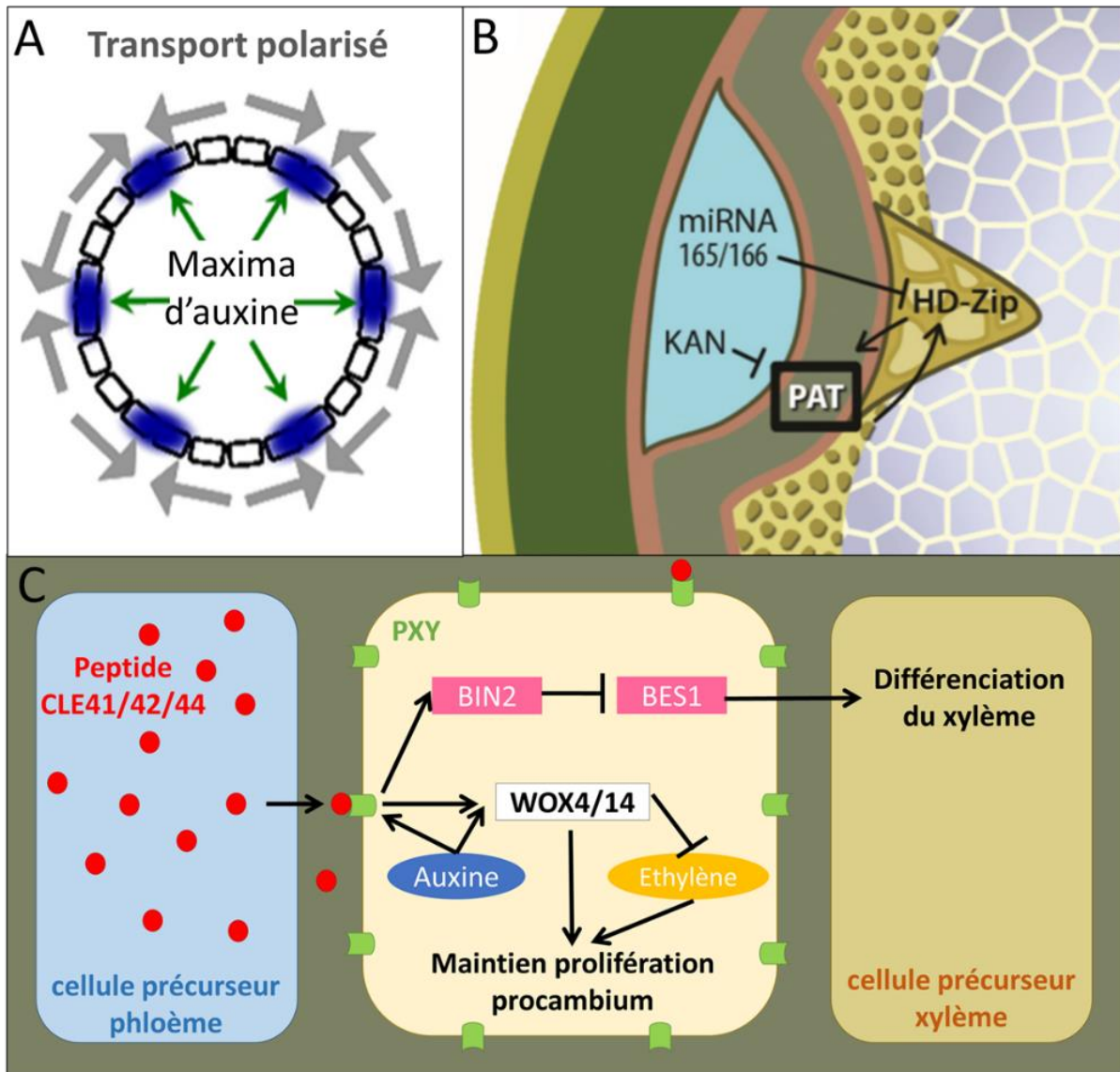
Le phloème est un tissu complexe composé de cellules de petites tailles et qui se situe profondément dans les tissus. Il se compose de trois types cellulaires : les cellules compagnes (CC), les tubes criblés (TC) et les cellules de parenchyme phloémien (PP).

#### 2.2.2.1. Structure et fonction

##### ➤ **Les cellules compagnes**

Les cellules compagnes sont des cellules de parenchymes spécialisées accolées aux éléments criblés. Ces cellules ont la particularité d'avoir un cytoplasme dense avec de nombreux plastes, mitochondries et ribosomes (Cronshaw, 1981). L'utilisation récente de marqueurs subcellulaires fluorescents a permis de décrire plus précisément l'organisation subcellulaire de ces différents types cellulaires (Cayla et al., 2015). Cette étude a notamment permis de montrer que les cellules compagnes sont très riches en organites, ce qui leur permet de subvenir aux besoins des cellules dépourvues de noyaux qui composent les tubes criblés (Raven, 1991, Lough et Lucas, 2006). Elles sont perforées de nombreux plasmodesmes de taille comprise entre 10 et 40 kDa (Kempers and Van Bel 1997) permettant ainsi la communication avec les cellules criblées adjacentes.





**Figure 8 : Représentation schématique de la régulation du transport polarisé d'auxine (PAT) dans le développement du système vasculaire de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana***

Représentation schématique d'une section transversale de la hampe florale avec les maxima d'auxine permettant de contrôler le transport polarisé d'auxine (PAT) et ainsi le positionnement des faisceaux cribro-vasculaires dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* (A) ; Représentation schématique d'une coupe transversale d'un faisceau cribro-vasculaire dans la hampe florale avec l'épiderme et le cortex (vert), le phloème (bleu), le procambium (gris), le xylème (brun) et la moelle (violet) (B) et Modèle moléculaire du transport polarisé d'auxine (PAT) dans le tissu du procambium avec l'action des peptides CLE/TDIF (sphères rouges) qui se fixent aux récepteurs PXY/TDR (formes vertes) activant le gène WOX4/14 qui favorise la prolifération des cellules souches de procambium et réprime la différenciation du xylème (C) (Adaptée d'après Schuetz et al., 2012, Etchells et al., 2013, Campbell et Turner, 2017).

### ➤ **Les tubes criblés**

Les cellules des tubes criblés sont les cellules conductrices du phloème découvertes en 1837 par Théodor Hartig (Heo et al., 2014). C'est dans les tubes criblés que la sève élaborée circule. Au cours de leur développement, le noyau, les vacuoles, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi se dégradent mais les mécanismes moléculaires impliqués restent à ce jour peu décrits (Lucas et al., 2013). Cependant, ces cellules sont vivantes puisqu'elles sont entourées d'une membrane plasmique et comportent un faible nombre d'organelles avec des mitochondries, des plastides et un réticulum endoplasmique. Ce réticulum endoplasmique est localisé à proximité des plasmodesmes qui permettent la communication entre ces cellules de tubes criblés et les cellules compagnes voisines.

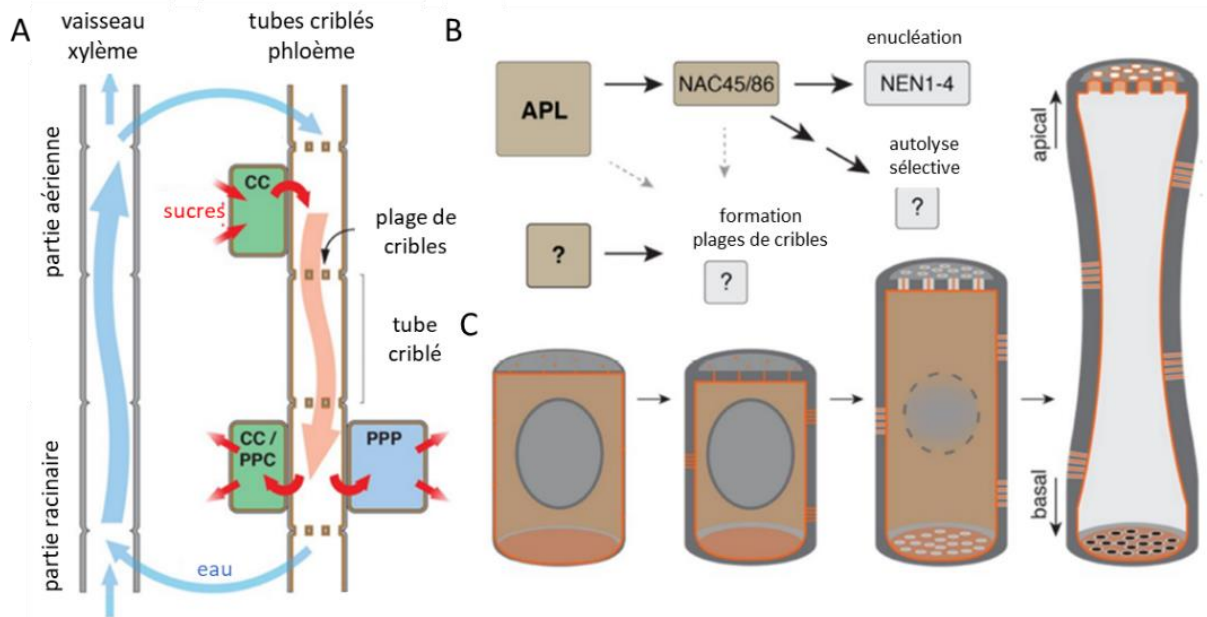
La paroi cellulaire de ces éléments criblés est modifiée avec un dépôt important de callose sous forme de plaque entourant les plasmodesmes, remplaçant la cellulose des parois cellulaires existantes. Au cours de leur maturation, de larges pores se forment en remplaçant ces dépôts de callose et la lamelle moyenne voisine (Lucas et al., 1993). Ces perforations latérales ainsi formées laissent librement circuler la sève élaborée. Les parois latérales des cellules des tubes criblés développent également des pores permettant la communication avec les cellules compagnes voisines.

### ➤ **Les cellules de parenchyme phloémien**

Les cellules de parenchyme phloémien sont des cellules de plus grande taille que les cellules compagnes et les tubes criblés. Elles servent d'interface entre les cellules de mésophylle et le complexe CC/TC. Un rôle des cellules de parenchyme phloémien a été suggéré dans le chargement en sucres des cellules compagnes ou directement des tubes criblés (Hafke et al., 2005). Les travaux récents montrant une localisation des protéines fusions SWEET11-GFP et SWEET12-GFP dans les cellules de parenchyme phloémien des feuilles viennent supporter ce rôle (Chen et al., 2012 ; Cayla et al., 2019).

#### 2.2.2.2. *Acteurs impliqués dans la différenciation du phloème*

Au cours de la vie de la plante, le phloème primaire se forme à partir de la division du procambium puis plus tardivement le phloème secondaire se différencie à partir du cambium. Plus précisément, après la division péricline du procambium une cellule précurseur de phloème se forme (Schuetz et al., 2012 ; Lucas et al., 2013), s'ensuit une division tangentielle qui permet la production d'une cellule compagne et d'un tube criblé (Lucas et al., 2013).



**Figure 9 : Représentation schématique de la différenciation des tubes criblés du phloème**

Représentation schématique du transport d'eau et de nutriments dans le xylème et le phloème (A), Acteurs moléculaires régulant ces processus développementaux avec APL qui initie la différenciation des tubes criblés. Les plages de cribles sont contrôlées par APL et NAC45/86 mais peuvent également se former en l'absence de ces facteurs de transcription (B), Modèle de différenciation des éléments criblés avec les patrons des futures plages de cribles déterminées par la position des plasmodesmes (C) APL : ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT, NAC45/86 : NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 45/86 (D'après Kalmbach et Helariutta, 2019)

Chez *Arabidopsis thaliana*, la racine a constitué le modèle de choix pour disséquer les différents acteurs impliqués dans la différenciation du phloème. Les travaux sur cet organe ont ainsi permis d'identifier le premier gène impliqué dans le développement du phloème, *ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT* (APL). APL est un facteur de transcription de type MYB exprimé dans les cellules compagnes et dans les éléments criblés (Figure 9). Il a une action promotrice sur la formation du phloème et une action inhibitrice sur la formation du xylème (Bonke et al., 2003). Ainsi, le mutant nul *apl1* ne présente aucune cellules criblés ou cellules compagnes (Bonke et al., 2003). Il a également été montré que APL ciblait l'expression de deux facteurs de transcription de type NAC, NAC45/86, qui contrôlent eux-mêmes l'expression des protéines NEN1-NEN4 impliqués dans l'énucléation des tubes criblés (Furuta et al., 2014).

## I. INTRODUCTION GENERALE

Le gène *OCTOPUS* (*OPS*) est également impliqué dans la différenciation du phloème (Nagawa et al., 2006, Truernit et al., 2012). Il est localisé dans les cellules de procambium et dans les cellules de phloème. Ce gène code une protéine membranaire (Benschop et al., 2007) spécifique des plantes vasculaires (Nagawa et al., 2006) localisé à la fin apicale des tubes criblés (Truernit et al., 2012). Au cours du développement, le gène *OCTOPUS* est exprimé dans les cellules provasculaires dans l'embryon puis est restreint aux cellules de phloème après la spécification des cellules de phloème (Baudy et al., 2007, Truernit et al., 2012). La racine et l'hypocotyle des mutant nul *ops* présente des tubes criblés séparés par des cellules d'éléments criblés indifférenciés avec des parois cellulaires plus fines, des défauts de dépôt de callose, une dégradation incomplète du noyau et une dérégulation du gène PD1 (Truernit et al., 2012). Un phénotype similaire a été observé chez les mutants du gène *BREVIX RADIX* (*BRX*), suggérant que ce gène était également impliqué dans l'acquisition de l'identité des tubes criblés. En parallèle, d'une voie dépendante d'*OPS* et d'une voie dépendante de *BRX*, qui agissent comme des régulateurs positifs de la différenciation des tubes criblés, une voie régulant négativement cette différenciation a également été identifiée. Cette voie implique le peptide CLAVATA/EMBRYO SURROUNDING REGION 45 et le récepteur kinase BAM3. Le peptide CLE45 est originaire de phloème et s'exprime en aval du gène *OPS* (Blob et al., 2018).

### 2.2.3. Le xylème

#### 2.2.3.1. Structure et fonction

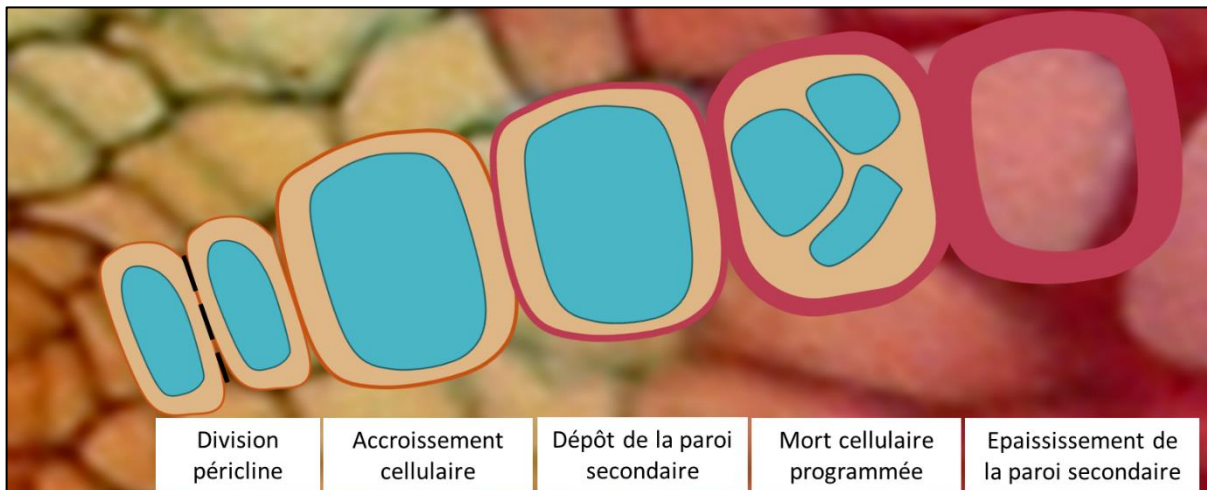
Le xylème est également constitué de trois types cellulaires : les cellules de parenchyme xylémien, les fibres xylémiennes et les vaisseaux. Dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*, les fibres sont généralement de petite taille et sont responsables du support structural alors que les vaisseaux sont plus grands que les fibres et de taille plus variable et permettent le transport de la sève brute (Chaffey et al., 2002, Schuetz et al., 2012). Du fait de leurs rôles dans le support structural et le transport de l'eau, les cellules conductrices de xylème présentent une paroi secondaire très largement épaissie qui confère une rigidité à la plante permettant ainsi de résister aux pressions négatives très fortes permettant le transport de l'eau mais également de maintenir un port érigé (Raven et al., 1992).

## I. INTRODUCTION GENERALE

Les travaux de Fukuda sur la transdifférenciation de cellules de mésophylles de *Zinnia elegans* en cellules trachéides a permis de mieux appréhender les étapes de différenciation cellulaire et l'implication des voies de signalisation hormonale dans ces processus (Fukuda, 1992). Depuis l'amélioration des outils génétiques, l'analyse de mutants a permis de déterminer les gènes impliqués dans ces mécanismes *in planta* (EtcHELLS et Turner, 2010, Schuetz et al., 2012n Campbell et Turner, 2017).

### 2.2.3.2. Etapes de développement des vaisseaux et des fibres xylémiennes

Les cellules de xylème sont également produites à partir d'une cellule de procambium (Schuetz et al., 2012). La cellule de procambium se divise de manière péricline afin de produire une cellule de procambium indifférenciée et une cellule précurseur de xylème (Figure 10).



**Figure 10** : Représentation schématique des étapes de développement des fibres et des vaisseaux de xylème au cours de la xylogénèse avec le cytoplasme en beige et la vacuole en bleue.

#### ➤ Du procambium au protoxylème

Au niveau de la différenciation du procambium en protoxylème, une étude détaillée et fine du système vasculaire de racines de différents mutants d'*Arabidopsis* déficients dans la signalisation auxine et/ou cytokinine a permis de montrer que dans le système racinaire d'*Arabidopsis* les cellules du protoxylème montrent une forte signalisation de l'auxine et une faible signalisation cytokinines alors que c'est l'opposé dans les cellules procambiales (faible auxine et forte CKs signalisation) (Bishopp et al., 2011). Un mécanisme d'inhibition mutuelle se met alors en place ainsi la forte signalisation cytokinines présentent dans les cellules du



## I. INTRODUCTION GENERALE

procambium va induire l'expression et la localisation des transporteurs PIN. De ce fait, la présence des PIN va induire le transport latéral de l'auxine vers les cellules du protoxylème (Figure X). Ensuite la forte signalisation de l'auxine va induire la transformation du protoxylème en métaxylème et la transcription de AHP6 qui inhibe la voie de signalisation des cytokinines, fermant ainsi la boucle. Ainsi, l'auxine s'accumulerait dans les cellules de procambium en développement (Aloni et al., 2003, Mattson et al., 2003 cités par Schuetz et al., 2012) puis contrôlerait l'initiation de la différenciation des vaisseaux de xylème et leurs tailles (Aloni and Zimmermann, 1983). De plus, il a été montré que la surexpression d'un gène de biosynthèse d'auxine chez le pétunia entraîne une augmentation du nombre de vaisseaux et une diminution de leur taille (Klee et al., 1987) et que l'inhibition de l'auxine endogène chez le tabac par la mutation du gène *INDOLEACETIC ACID (IAA)-lysine SYNTHETASE* provoque une augmentation du nombre de vaisseaux et une réduction de leurs diamètres (Romano et al., 1991). Outre l'implication de l'auxine, d'autres hormones interviennent dans la différenciation des cellules vasculaires. Les brassinostéroïdes permettent quant à eux d'initier les étapes de finalisation du processus de différenciation des vaisseaux (Yamamoto et al., 1997, 2001). En effet, les brassinostéroïdes sont impliqués dans l'induction d'un ou plusieurs gènes régulant la dernière étape de la différenciation des vaisseaux de xylème, à savoir la mort cellulaire programmée et le dépôt de la paroi secondaire (Yamamoto et al., 1997). Les brassinostéroïdes contrôlent également le nombre de pôles en stimulant les divisions du procambium (Ibanes et al., 2009). L'éthylène joue également un rôle dans la différenciation des cellules souches en vaisseaux de xylème (Fukuda, 1996). En effet, des inhibiteurs de la biosynthèse entraînent la suppression de la différenciation des vaisseaux en culture *in vitro*.

### ➤ **Elongation cellulaire**

A la suite de la division du procambium les cellules précurseurs de vaisseaux et de fibres vont suivre un programme d'expansion longitudinale et radiale différent à l'origine de leur taille et morphologie différentes. Ainsi dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*, les fibres ont une surface comprise entre 5 et 150  $\mu\text{m}^2$  alors que les vaisseaux présentent une surface comprise entre 150 et 800  $\mu\text{m}^2$ . Ainsi les vaisseaux vont avoir une expansion radiale bien plus importante que celle des fibres alors que leur expansion longitudinale sera plus importante chez les fibres que chez les vaisseaux (Chaffey et al., 2002).

Durant cette phase d'élongation et d'expansion, la paroi primaire se met en place. Cette paroi se compose de 90 % de polysaccharides (i.e. cellulose, hémicelluloses et pectines) et de 10 % de protéines. Les microfibrilles de cellulose entourent la cellule pour lui permettre de

## I. INTRODUCTION GENERALE

résister aux fortes pressions osmotiques. En complément les hémicelluloses (principalement des xyloglucanes) sont liées à la cellulose afin de rigidifier la paroi. Enfin, les pectines contribuent à la paroi en la rendant hydrophile (Turner et al., 2010). Afin d'assurer l'expansion cellulaire des fibres et des vaisseaux, la paroi doit se réorganiser. Ainsi, bien que peu d'étude aient été réalisées sur l'élongation cellulaire des vaisseaux de xylème, les gènes codant des expansines ou des xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase (XTH) ont été analysés (Turner et al., 2007) et semblerait avoir un rôle dans ce processus à travers le relâchement de la paroi cellulaire, permettant ainsi sa croissance.

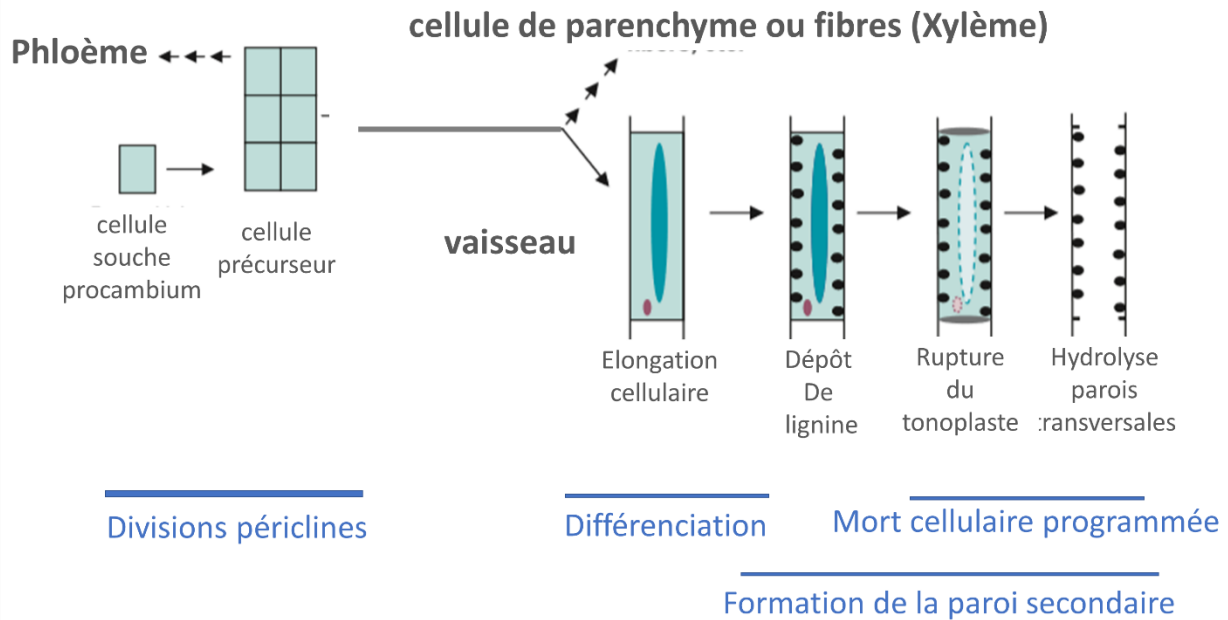
En complément, et bien que peu d'études ont été réalisées à ce sujet, le rôle de la vacuole dans l'expansion radiale des vaisseaux et des fibres doit aussi être important. En effet chez les cellules végétales, la vacuole occupe une large partie de la cellule et il a été proposé que la croissance radiale d'une cellule est contrôlée par les différences de potentiel osmotique de cet organite. Ainsi chez les fruits, comme la tomate, il a été décrit que l'accroissement de la taille de la vacuole, conduit à l'augmentation de la taille globale du fruit (Beauvoit et al., 2014). Plus précisément, l'expansion de la vacuole résulte de façon concomitante d'un influx d'eau ainsi que de sucres qui module la force osmotique de ce compartiment. Sur cette base on peut penser que dans un tissu comme le xylème, une modification du transport intracellulaire de sucres pourrait avoir des conséquences sur les processus de croissance radiale de ces cellules. Cette hypothèse est supportée par l'observations que dès les premières étapes de développement, les cellules conductrices diffèrent des cellules de parenchymes xylémien puisqu'elles ont une taille bien plus importante et un nombre important de vacuoles contenues dans le cytoplasme (Wooding and Northcote, 1964).

### ➤ **Différenciation du xylème et formation de la paroi secondaire**

Une fois leur tailles finale atteinte, les fibres et les vaisseaux ont la particularité d'avoir une mort cellulaire programmée qui vide la cellule de ses organites et sur laquelle nous reviendrons après. Durant ce processus, la paroi secondaire se dépose et s'épaissie fortement jusqu'à former une paroi cellulaire très rigide (Bollhöner et al., 2012, Figure 10). Cette paroi secondaire se compose de cellulose (45-50 %), d'hémicelluloses (20-30 %), de lignine (7-10 %) ainsi que quelques traces de pectines et de protéines (Marriott et al., 2016). Afin d'assurer la synthèse des polysaccharides de parois, les cellules de xylème nécessitent donc un fort apport de sucres pour subvenir à la formation de leurs parois cellulaires. Cependant, bien que la biosynthèse des parois cellulaires soit bien connue (McFarlane et al., 2014), l'origine des sucres nécessaires à la biosynthèse des polysaccharides de parois et leurs transports jusqu'à leur lieu

## I. INTRODUCTION GENERALE

d'utilisation reste à ce jour peu exploré. Récemment il a été suggéré que les transporteurs SWEET11 et SWEET12 pourraient être impliqués dans ce processus, en assurant le transport des sucres entre les cellules de parenchyme xylémien et les cellules de xylème en cours de développement (Le Hir et al., 2015 ; Dinant et al., 2019).



**Figure 11 : Développement des cellules du système vasculaire à partir du procambium vasculaire**

Représentation schématique des étapes de différenciation d'un vaisseau de xylème avec la vacuole en bleu foncé, le cytoplasme en bleu, les parois en noir et les dépôts de paroi secondaire représentés sous forme de rond noir (D'après Turner et al., 2007 et Schuetz et al., 2012)

Le dépôt de lignine dans la paroi pecto-cellulosique est tout d'abord observé aux extrémités de la cellule (Wooding and Northcote, 1964 ; Schuetz et al., 2012, Figure 11). Des études bien plus antérieures relataient déjà une accumulation d'organites tels que l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et les mitochondries à l'endroit où la paroi secondaire se dépose (Cruger, 1855 ; Barkley, 1927, Sinott and Bloch, 1945). Les vaisseaux de protoxylème produits lors de la croissance primaire ont un dépôt de paroi secondaire hélicoïdale qui permet à la cellule de continuer de croître alors que les vaisseaux de métaxylème présentent un dépôt de paroi secondaire réticulé ne permettant pas à la cellule de continuer à s'accroître (Schuetz et al., 2012). Une fois le vaisseau mature totalement vidé, la lignine vient renforcer la paroi secondaire (Schuetz et al., 2012). En termes de composition en lignine, les fibres et des



## I. INTRODUCTION GENERALE

vaisseaux différent chimiquement. Ainsi, les fibres xylémiennes sont composées de monolignols de type-S dérivée d'alcool sinapylique tandis que les vaisseaux de xylème sont composés de lignines de type-G et de type-H tous deux dérivées respectivement d'alcool coniférylique et d'alcool coumarylique (Vanholme et al., 2010, Schuetz et al., 2012).

Enfin, une étape d'hydrolyse des parois transversales est nécessaire pour les vaisseaux acquièrent leur rôle de transport dans le transport de d'eau depuis les racines vers les parties aériennes (Schuetz et al., 2012, Nakano et al., 2015). Les perforations se forment sur les parois des vaisseaux matures et non sur les vaisseaux en cours de maturation (Nakashima et al., 2000). Ces études portées sur la différenciation de cellules de mésophylles en éléments de vaisseaux a mis en évidence un programme cellulaire propre à chaque cellule permettant la formation de ces perforations, et une polarité des cellules de xylème.

### ➤ **Régulation transcriptionnelle de la formation de la paroi secondaire**

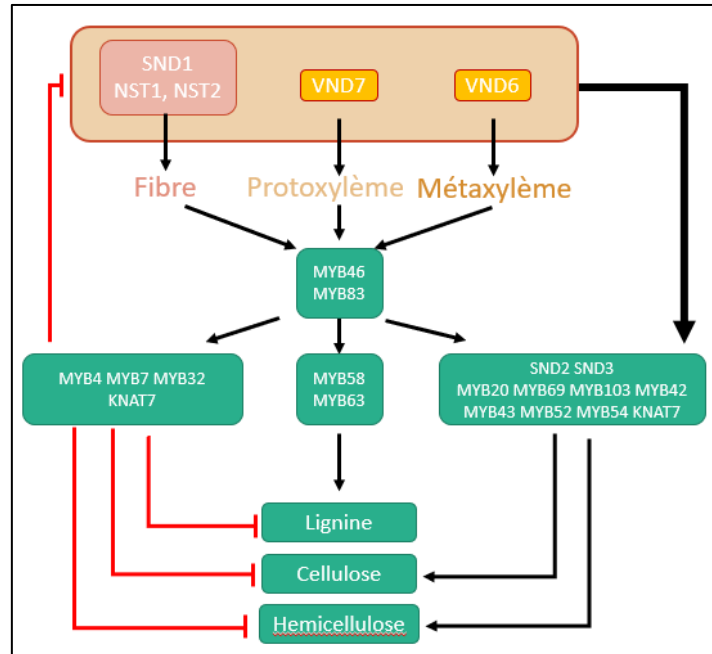
De nombreux gènes participent à la régulation transcriptionnelle de la différenciation des fibres et des vaisseaux de xylème. Ainsi plusieurs niveaux de régulation ont été identifiés (Hussey et al., 2013). Ainsi au premier niveau de régulation, les facteurs de transcription SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 1 (SND1) et NAC DOMAIN THICKENING PROMOTING FACTOR 1-2 (NST1, NST2) sont impliqués dans la différenciation des fibres tandis que les facteurs de transcription appartenant à la famille des VASCULAR RELATED NAC DOMAIN (VND) régulent la formation des vaisseaux de xylème (Kubo et al., 2005, Schuetz et al., 2012, Figure 9). Ces protéines activent la transcription des gènes du second niveau de régulation parmi lesquels on trouve les gènes codant pour deux facteurs de transcription appartenant à la famille des MYB ; MYB46 et MYB83 (Hussey et al., 2013). Ces deux facteurs de transcriptions activent par la suite l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse des lignines, de la cellulose ou des hémicelluloses lors de la formation de la paroi secondaire des cellules de xylème (Figure 12).

### ➤ **Mort cellulaire programmée**

A un stade final de la différenciation, les vaisseaux subissent une mort cellulaire programmée qui vident la totalité du contenu de la cellule. En effet, au cours de la maturation des vaisseaux, un remaniement cytoplasmique opère et la rupture du tonoplaste entraîne la libération des enzymes de dégradation provoquant ainsi l'hydrolyse de la majorité des

## I. INTRODUCTION GENERALE

organites. Une fois le noyau et les autres organites détruits, l'hydrolyse du réticulum endoplasmique survient et la cellule se vide de son contenu (Schuetz et al., 2012). Les vaisseaux perdent la majorité de leurs organites quelques heures après la rupture du tonoplaste, et la totalité du contenu de la cellule disparaît six heures après l'épaississement de la paroi secondaire (Fukuda, 1997).



**Figure 12 :** La régulation transcriptionnelle de la différenciation des fibres et des vaisseaux de xylème

SND1: SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 1; NST: NAC DOMAIN THICKENING PROMOTING FACTOR 1-2; VND: VASCULAR RELATED NAC DOMAIN (D'après Schuetz et al., 2012).

L'incrustation de lignine sur la couche externe de la paroi pecto-cellulosique intervient au cours de la dégénérescence des organites, avant la rupture du tonoplaste (Fukuda, 1997, Schuetz et al., 2012). Les régions de la paroi primaire sur lesquelles ne s'est pas déposée la lignine sont alors digérées et des perforations aux extrémités des vaisseaux allongés apparaissent après la rupture du tonoplaste (Fukuda, 1997). La rupture du tonoplaste est donc une étape clé de la mort cellulaire programmée au cours de la différenciation des vaisseaux (Fukuda, 1997). Il est difficile de dissocier la mort cellulaire programmée de la lignification des parois des vaisseaux de xylème car ses deux événements interviennent en même temps au cours de la différenciation des vaisseaux (Fukuda, 1997). En effet, les transcrits des enzymes de la mort cellulaires et des enzymes impliquées dans la formation de la paroi secondaire

## I. INTRODUCTION GENERALE

s'accumulent au même moment ce qui sous-entend qu'un signal commun induit la mort cellulaire programmée et la formation de la paroi secondaire (Fukuda, 1997).

### 2.2.3.3. Rôles des sucres dans le développement des cellules de xylème

Comme présenté précédemment, de nombreux facteurs de transcription contrôlent l'expression des gènes de biosynthèse des composés pariétaux. Cependant, peu de travaux se sont intéressés à l'impact d'une modification de la quantité ou du transport de précurseurs de ces composés (i.e. saccharose, glucose, fructose, UDP-glucose) sur la composition de la paroi secondaire.

La première étude qui s'est intéressée à la question d'une modification du transport des sucres sur la formation de la paroi secondaire a été faite chez le peuplier. Chez cette espèce, il était précédemment suggéré que le transport de sucres nécessaire à la formation du bois était principalement symplasmique. Pourtant Mahboubi et al. (2013) ont montré que, bien que le peuplier soit une espèce symplasmique, la dérégulation du transporteur actif PttSUT3 provoquait de modifications la formation de la paroi des cellules de xylème (Mahboubi et al., 2013), suggérant l'existence d'une composante apoplasmique au transport de sucres nécessaire à la formation du bois chez cette espèce. Ensuite, chez *Arabidopsis thaliana*, les travaux réalisés précédemment dans l'équipe ont mis en évidence l'implication de deux transporteurs de sucres plasmalemmiques dans la formation de la paroi secondaire des cellules de xylème (Le Hir et al., 2015). Il s'agit de deux membres de la famille des SWEETs permettant un transport facilité de saccharose, glucose et fructose : AtSWEET11 et AtSWEET12. Ils sont tous deux situés dans les cellules parenchymateuses du phloème et du xylème (Chen et al., 2012 ; le Hir et al., 2015). Les simples mutants et le double mutant *Atsweet11sweet12* présentent des défauts de la composition de la paroi secondaire du xylème mais également du phloème (Le Hir et al., 2015 ; Dinant et al., 2019). Ainsi, l'utilisation de la Spectroscopie à Transformée de Fourier (FT-IR) et de microscopie Raman ont permis de mettre en évidence l'importance des échanges de sucres entre les cellules de parenchyme et les cellules conductrices du xylème pour assurer une correcte composition de la paroi secondaire des fibres et des vaisseaux de xylème (Le Hir et al., 2015, Dinant et al., 2019).

Cette hypothèse d'un échange de composés entre les cellules de parenchyme xylémien et les vaisseaux en formation n'est pas nouvelle et a notamment été proposée dans le cas du transport des monolignols. En effet, Smith et al. (2017) ont décrit l'hypothèse du « good neighbor » mettant en évidence des échanges des monolignols précurseurs de la biosynthèse de

## I. INTRODUCTION GENERALE

la lignine, entre les cellules parenchymateuses et/ou les fibres xylémiennes du xylème et les vaisseaux. En effet, les cellules parenchymateuses pourraient subvenir aux besoins en monolignols des vaisseaux pour former la lignine de la paroi secondaire. L'ensemble de ces résultats suggèrent l'existence d'échanges importants entre les cellules parenchymateuses, les fibres du xylème et les vaisseaux, permettant ainsi de fournir des quantités importantes de sucres/monolignols nécessaires durant la différenciation des cellules de xylème afin de renforcer la paroi secondaire des fibres et des vaisseaux. Toutefois la question des conséquences d'une modification intracellulaire du transport des sucres dans ces types cellulaires reste posée.

### 2.2.4 Les fibres interfasciculaires

Les fibres interfasciculaires forment un anneau continu qui relie les pôles vasculaires entre eux (Altamura et al., 2001, Schuetz et al., 2012). Bien qu'elles n'appartiennent pas au système vasculaire proprement parlé, l'origine de ces fibres, leurs natures et leurs rôles restent à ce jour largement discuté dans la littérature (Altamura et al., 2001). Au cours du développement de la plante, la croissance primaire cesse et le cambium vasculaire remplace le procambium (Campbell et al., 2017). Dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*, le cambium fasciculaire se développe à partir du procambium responsable de la croissance du protofloème et du protoxylème. Le cambium interfasciculaire se développe par la suite à partir des cellules de parenchymes retrouvées entre les faisceaux cribro-vasculaires. A la base de la hampe florale, la production de ces fibres interfasciculaires permet de supporter le poids de la hampe en élévation (Lev-Yadun, 1994, Mazur et al., 2014). Contrairement à certaines espèces ligneuses, le cambium interfasciculaire d'*Arabidopsis thaliana* ne produit pas de vaisseaux mais uniquement des fibres (Altamura et al., 2001). Le signal déclenchant l'initiation du cambium interfasciculaire est à ce jour inconnu (Campbell et Turner, 2010).

La mutation du gène *REVOLUTA/INTERFASCICULAR FIBRELESS (REV)* entraîne la disparition des fibres interfasciculaires dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* mais l'expression ectopique du gène *REV* n'entraîne pas une différenciation ectopique de cellules en fibres suggérant qu'il s'agit d'un facteur qui régulerait indirectement la différenciation des fibres, probablement en favorisant le transport polarisé d'auxine (PAT) (Zhong et al., 1997 ; Zhong and Ye, 1999). Le gène *REV* code un facteur de transcription de la classe HD-ZIP qui est donc nécessaire pour la différenciation des fibres interfasciculaires mais également pour la mise en place de l'orientation des organes et la régulation de l'organisation spatiale des pôles vasculaires (Emery et al., 2003).

### **3. La réponse des plantes aux changements environnementaux : conséquences sur le transport des sucres et le développement du système vasculaire**

Du fait de leur immobilité, les espèces végétales sont soumises aux variations de leur environnement et doivent en permanence mettre en place des stratégies pour s'y adapter. Ces stratégies sont multiples et dépendent bien sûr du type de changement perçus (i.e. contraintes biotiques ou abiotiques) mais également de l'intensité de la contrainte, sa fréquence, et le moment du développement de la plante au cours duquel il survient. Le monde actuel subit de nombreux changements environnementaux parmi lesquels une accentuation des périodes de sécheresse, des variations de températures importantes, une salinisation des sols mais également une élévation de la concentration du CO<sub>2</sub>. Ces différentes contraintes subit par les végétaux vont engendrer d'importantes modifications physiologiques et/ou morphologiques. Dans le cadre de cette partie, nous reviendrons plus précisément sur les conséquences de stress ayant une composante osmotique : stress hydrique, salin et températures négatives sur le développement du système vasculaire ainsi que sur les réponses mis en jeu par la plante pour y faire face.

#### **3.1. Impact d'un stress osmotique sur le transport des sucres**

Il est depuis longtemps décrit qu'une des réponses communes des plantes face à un stress abiotique est l'accumulation de sucres (Rolland et al., 2006). Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de glucose, de fructose et des sucres appartenant à la famille des oligosaccharides de raffinose (RFOs) en réponse à un stress de type osmotique (Seki et al., 2007, Urano et al., 2009 ; Krasensky and Jonak, 2012). Chez *Arabidopsis thaliana* ainsi que chez le riz, en réponse à un stress hydrique, les RFOs sont les premiers à s'accumuler, avec une accumulation de raffinose suivi de l'accumulation de deux autres RFOs : la galactinol et le myo-inositol, puis le tréhalose et l'érythritol (Todaka et al., 2017 ; Fabregas and Fernie, 2018).

Au sein des cellules, les sucres auraient un rôle en tant d'osmoprotecteur mais également comme antioxydants face aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Hinch et al., 2003 ; Nishizawa et al., 2008 ; Van den Ende and Valluru, 2009 ; Valluru and Van den Ende, 2011, Keunen et al., 2013, Elsayed et al., 2014). Enfin, les sucres pourraient également agir en tant que molécule signal qui déclencherait des cascades de signalisation en réponse aux stress. Ainsi, bien qu'aucun récepteur de sucres n'ait à ce jour été identifié, le tréhalose-6-phosphate serait une des molécules signal impliqué dans la réponse des plantes face aux stress abiotiques (Figueroa and Lunn, 2016).

## I. INTRODUCTION GENERALE

Dans ce contexte, le transport intercellulaire et intracellulaire des sucres semble donc représenter une variable d'ajustement importante. Notamment, le maintien de l'homéostasie des sucres entre le cytosol et le tonoplaste semble jouer un rôle essentiel dans la réponse des plantes face aux stress abiotiques (Pommerrenig et al., 2018). Ainsi les lignées mutées dans l'expression de plusieurs gènes codant pour des transporteurs tonoplastiques présentent une meilleure résistance à la sécheresse, à un stress salin ou froid (Wormit et al., 2006 ; Yamada et al., 2010 ; Gong et al., 2014 et Klemens et al., 2014). Ainsi, il a été montré que les gènes codant les transporteurs vacuolaires TST1 et TST2 sont induits en condition de température fraîches et que leur activité de transport vacuolaire de glucose est augmentée en conditions de températures fraîches de 9°C (Wormit et al., 2006). De plus, une surexpression de *SWEET16* codant pour un facilitateur tonoplastique induit une meilleure résistance des plantes face au gel (Klemens et al., 2013) et la lignée mutée dans l'expression de *SWEET17* accumule plus de sucres en réponse à un stress froid (Chardon et al., 2013). En réponse au gel il a également été décrit que les plantes mutées dans l'expression des gènes codant les transporteurs plasmalémniques SWEET11 et SWEET12 présentent une meilleure résistance au gel, probablement du fait d'une accumulation de sucres dans les feuilles sources (Le Hir et al., 2015). Enfin, sur la base de variations d'expression génique, il a été proposé que les transporteurs SWEET11 à SWEET15 serait impliqué dans la réponse au stress hydrique induit par l'ajout de polyéthylène glycol (Durand et al., 2018). A l'inverse l'expression de *SWEET13*, *SWEET2*, *SWEET16* et *SWEET17* est réprimée dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* en réponse à un stress salin (Sellami et al., 2019). Se basant sur ces résultats, il semble donc que la régulation de l'homéostasie des sucres entre les différents compartiments subcellulaires et/ou entre les différents types cellulaires est différente selon le type de stress appliqué. De plus cette régulation va également être différente selon le moment du développement auquel le stress est appliqué. Ainsi la majorité des études ont été réalisées sur des plantes au stade végétatif et peu d'études ont adressé les conséquences d'un stress au niveau reproducteur (Shafi et al., 2015 ; Sellami et al., 2019a et b) et encore moins dans le cadre d'un contexte mutant dans lequel le transport des sucres est modifié. Considérant que la hampe florale contribue plus que la rosette au gain total de carbone au cours de la vie de la plante (Earley et al., 2009 ; Leonardos et al., 2014) et que l'allocation carbonée dans cet organe est critique pour la production des graines, il serait donc intéressant d'adresser plus précisément les conséquences d'un stress sur le développement et la croissance de la hampe florale.

### **3.2. Impact d'un stress osmotique sur le développement du système vasculaire**

Bien que le système vasculaire ait un rôle central dans le transport des sucres à longue distance, peu d'étude se sont focalisée sur les conséquences d'un stress abiotique sur le développement du système vasculaire chez les herbacées (pour revue Qaderi et al., 2019).

Ainsi, chez la pomme de terre, il a été montré que l'exposition à des températures élevées conduisait à la production de vaisseaux de xylème plus larges et déformés alors qu'une diminution de la division des cellules du phloème est observée (Paul et al., 2017). Chez le pois, exposé à une augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> de l'air, une augmentation du diamètre des vaisseaux de la tige accompagnée d'une diminution de la densité de ces vaisseaux est mesurée (Medeiros et al., 2013). A l'inverse, l'exposition à un stress hydrique induit une diminution de la taille des vaisseaux de xylème chez *Zinnia* et une augmentation de la lignification des vaisseaux de la tige chez la canne à sucre (Twumasi et al., 2005 ; Dos Santos et al., 2015). Enfin, en réponse à une croissance à 5°C pendant 1 mois, une augmentation du diamètre la tige, de la largeur du xylème et du phloème est mesurée chez différents cultivars de *Stévia* (Hajihashemi et al., 2018). En complément un rôle important des cellules de parenchyme dans la réponse des plantes aux stress a été identifié notamment chez les espèces ligneuses. Parmi les nombreux rôles des cellules de parenchymes de la hampe florale, le stockage de l'eau représente une part importante (Secchi et al., 2017). Ainsi, le grand nombre de cellules de parenchymes dans le xylème permettrait de subvenir à la capacité hydraulique de la hampe en facilitant les échanges entre le phloème et le xylème et en augmentant la capacité de stockage en eau et en énergie. Chez les arbres, cela permettrait ainsi de maintenir une capacité de transport aux cellules de xylème lors d'embolie induite par des situations de stress hydrique (Nardini et al., 2011a, Nardini et al., 2011b, Salleo et al., 2004, Secchi & Zwieniecki, 2011, Zwieniecki & Holbrook, 2009). De plus, il est intéressant de noter que, selon les conditions climatiques de leur milieu de vie, les plantes ont plus ou moins de cellules de parenchymes radiales ou axiaux dans leurs tiges. Ainsi, les arbres des régions tropicales ont plus de cellules de parenchymes que les arbres des régions tempérées et des zones subtropicales (Morris et al., 2016). Les lianes et les hampes des plantes succulentes présentent, quant à elles, les tiges les plus riches en cellules de parenchymes (Spicer, 2014), ce qui reflète l'importante demande liée à l'élasticité mécanique que requièrent les plantes grimpantes et le besoin en eau des plantes succulentes (Brandes and Barros, 2008, Carlquist, 2015, Chapotin et al., 2006, DeSmidt, 1922). Sur basant sur ces observations on peut se demander si les plantes utilisent effectivement les



## I. INTRODUCTION GENERALE

cellules de parenchyme comme paramètre d'ajustement (en termes de nombre et de taille) pour répondre aux modifications de l'environnement.

Néanmoins, l'ensemble de ces travaux illustrent clairement qu'une modification du développement des tissus vasculaires des tiges est mise en place en réponse à un stress biotique chez les herbacées. Notamment il pourrait être intéressant de mieux caractériser chez *Arabidopsis thaliana*, la morphologie de la hampe florale et l'anatomie du système vasculaire (y compris les cellules de parenchyme vasculaire) en réponse à un stress abiotique.

### 4. Objectifs des travaux de thèse

Le développement des cellules de xylème et notamment les étapes de différenciation des vaisseaux ont largement été décrits dans la littérature. Depuis les cultures *in vitro* réalisées chez *Zinnia elegans* jusqu'aux techniques de génétiques inverses actuelles, les voies de signalisation hormonales et les gènes impliqués dans ces processus développementaux ont pour beaucoup été identifiés. Le modèle racinaire d'*Arabidopsis thaliana* a beaucoup été utilisé pour décrire les étapes de développement du système vasculaire. Ce n'est que récemment que le développement du système vasculaire de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* est étudié du fait de sa complexité. Cet organe qui porte les inflorescences latérales, les fleurs et les fruits, contribuerait plus que la rosette au gain de carbone et représenterait à elle seule un puit transitoire et une source photosynthétique (Leonardos et al., 2014). Des transporteurs de sucres appartenant à la famille des SWEETs sont localisés dans les cellules de xylème. Cependant, ce tissu conducteur décrit comme transportant l'eau et les éléments minéraux puisés dans le sol jusqu'aux parties aériennes n'est pas connu pour transporter des sucres. Pourtant, les parois secondaires qui composent les fibres et les vaisseaux de xylème se composent majoritairement de polysaccharides de paroi. En effet, la paroi secondaire est composée de celluloses, d'hémicelluloses et de lignine mais la lignine ne représenterait que 18%. La constitution de ces parois et l'important épaissement de ces parois dans les cellules conductrices de xylème nécessite donc un fort apport de sucres mais la provenance et le transport de ces derniers restent à ce jour inconnu.

Dans le cadre de l'équipe « Carbone, Allocation, Transport et Signalisation », ces travaux de thèse vise à approfondir le rôle des transporteurs de sucres SWEETs dans la mise en place du système vasculaire et dans la formation de la paroi secondaire des cellules de xylème chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. Dans cette thèse, l'attention a été portée sur quatre membres appartenant à la famille des SWEETs: SWEET11, SWEET12, SWEET16 et



## I. INTRODUCTION GENERALE

SWEET17. Ces candidats ont été choisis du fait de leur localisation commune dans les cellules du xylème. En effet l'analyse des plantes exprimant des fusions transcriptionnelles pSWEET:GUS et/ou des expériences *d'hybridation in situ* ont permis de montrer une localisation de l'expression de ces gènes dans les cellules du xylème de la hampe florale (Chardon et al., 2013 ; Klemens et al., 2013 ; Le Hir et al., 2015 ; Résultats non publiés stage de M2). Les transporteurs SWEET11 et SWEET12 ont également été décrit comme étant localisés sur la membrane plasmique des cellules de parenchyme phloémien dans les feuilles notamment (Chen et al., 2012; Cayla et al., 2019). Quant aux transporteurs SWEET16 et SWEET17 sont des transporteurs tonoplastiques permettant les échanges de sucres entre la vacuole et le cytosol. Les gènes codant ces protéines se localisent dans les cellules du xylème de la hampe florale (Chardon et al., 2013; Klemens et al., 2013). Ces protéines sont également exprimées dans le cortex de la racine où elles contribueraient ainsi aux échanges subcellulaires de sucres dans les organes puits (Guo et al., 2013).

Afin de mieux comprendre l'implication des SWEETs dans le développement du xylème de la hampe florale, une caractérisation phénotypique des simples mutants, des doubles mutants *sweet11sweet12* et *sweet16sweet17*, des triples mutants *sweet11sweet12sweet16* et *sweet11sweet12sweet16* et du quadruple mutant *sweet11sweet12sweet16sweet17* a été réalisée à l'échelle de la plante entière, à l'échelle tissulaire, cellulaire et pariétale. Les résultats des travaux de thèse sont présentés sous forme de quatre chapitres. Le premier chapitre vise à mieux comprendre l'impact d'une perturbation des échanges de sucres dans les tissus vasculaires sur la croissance de la plante. Ainsi, des analyses de paramètres de croissance de la rosette, et de la hampe florale ainsi que des quantifications de sucres solubles et C:N ont été réalisés sur ces différents organes ainsi que sur les siliques. Le deuxième chapitre se concentre sur l'impact d'une perturbation des échanges de sucres sur le développement du système vasculaire. Les patrons d'expression des gènes *SWEETs* ont été redéfini dans nos conditions de culture et l'analyse plus approfondie du développement du xylème a été réalisé chez les plantes sauvages et chez les lignées mutées. Le troisième chapitre correspond à l'implication des gènes *SWEETs* dans la formation de la paroi secondaire des vaisseaux et des fibres de xylème. Enfin, le quatrième chapitre regroupe les analyses des mutants *sweet* en conditions de stress abiotiques. Ce dernier chapitre vise à mieux comprendre l'impact d'une perturbation des échanges de sucres sur le développement de la plante en conditions de stress.

## Publication associée

Revue publiée dans le journal *plants*

### **Lateral Transport of Organic and Inorganic Solutes**

E. Aubry, S. Dinant, F. Vilaine, C. Bellini and Rozenn Le Hir



Review

# Lateral Transport of Organic and Inorganic Solutes

Emilie Aubry<sup>1</sup>, Sylvie Dinant<sup>1</sup>, Françoise Vilaine<sup>1</sup>, Catherine Bellini<sup>1,2</sup> and Rozenn Le Hir<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France; emilie.aubry@inra.fr (E.A.); sylvie.dinant@inra.fr (S.D.); francoise.vilaine@inra.fr (F.V.); catherine.bellini@inra.fr (C.B.)

<sup>2</sup> Umeå Plant Science Centre, Department of Plant Physiology, Umeå University, 90183 Umeå, Sweden

\* Correspondence: rozenn.le-hir@inra.fr; Tel.: +33-183-3057

Received: 14 November 2018; Accepted: 11 January 2019; Published: 15 January 2019



**Abstract:** Organic (e.g., sugars and amino acids) and inorganic (e.g.,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $PO_4^{2-}$ , and  $SO_4^{2-}$ ) solutes are transported long-distance throughout plants. Lateral movement of these compounds between the xylem and the phloem, and vice versa, has also been reported in several plant species since the 1930s, and is believed to be important in the overall resource allocation. Studies of *Arabidopsis thaliana* have provided us with a better knowledge of the anatomical framework in which the lateral transport takes place, and have highlighted the role of specialized vascular and perivascular cells as an interface for solute exchanges. Important breakthroughs have also been made, mainly in Arabidopsis, in identifying some of the proteins involved in the cell-to-cell translocation of solutes, most notably a range of plasma membrane transporters that act in different cell types. Finally, in the future, state-of-art imaging techniques should help to better characterize the lateral transport of these compounds on a cellular level. This review brings the lateral transport of sugars and inorganic solutes back into focus and highlights its importance in terms of our overall understanding of plant resource allocation.

**Keywords:** phloem; xylem; lateral transport; organic solutes; inorganic solutes

## 1. Introduction

In plants, organic (e.g., organic acids, sugars, amino acids) and inorganic (e.g.,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{2-}$ ,  $Ca^{2+}$ ) solutes are dissolved in a water-based mixture (i.e., phloem and xylem sap) that is distributed throughout the plant. Understanding how these nutrients are transported between organs and how this transport is coordinated is of major interest for the long-term goal of improving resource allocation in plants and *in fine* plant biomass production. The solute movement between and within the different organs or tissues of a plant depends on the plant's developmental stage and on the environmental conditions that the plant is facing. Nevertheless, depending on the type of compound, different transport systems act in a complementary way to allow the solutes to reach their targeted tissue and cell (i.e., long-distance versus short-distance transport, apoplasmic versus symplasmic pathway).

Over the long-distance, the transport of water and nutrients is achieved by the plant's vascular system, which is composed of phloem and xylem tissues [1]. In addition, several compounds, including sugars [2], amino acids [2], minerals [3], ions [4], water [5], miRNA [6], transcription factors [6–9], hormones [10,11], secondary metabolites [12,13], and more complex molecules like monolignols [14,15], have been shown to be transported inside the different vascular cell types and between the vascular and the perivascular tissues (i.e., the endodermis, the pericycle, and vascular parenchyma cells). More specifically, when addressing the cell-to-cell movement of solutes (e.g., sugars, amino acids, and ions), authors refer equally to “solute exchange” [16], “radial solute exchange”, “radial transport” [2,5],

or “lateral transport” [17]. Moreover, this cell-to-cell movement has in some cases been associated with transport between specific tissues in a preferential direction, such as “xylem-to-phloem transfer” or “phloem-to-xylem transfer” [2,18,19].

During the 1960s and 1970s, extensive literature addressing lateral transport in various species was published, and was last reviewed by van Bel in 1990 [2]. These studies unequivocally stress the importance of this process in overall plant resource allocation. Since then, the use of the model plant *Arabidopsis thaliana* has allowed significant progress to be made in the identification of the molecular actors involved in such processes, even if direct experimental proof of lateral transport in this species is scarce (Table 1). After presenting experimental evidence for the existence of lateral transport in various plant species, this review will detail the anatomical framework in which solute exchanges take place, as well as the molecular actors involved in the process, mostly identified in *Arabidopsis thaliana*. Of the various organic and inorganic solutes for which lateral transport has been shown (Table 1), this review will not address (or will only mention briefly) xylem-to-phloem transport of calcium, magnesium, sulfate, and nitrogen, because this has been reviewed elsewhere [20–24]. Instead, the review will focus on the transport of photosynthates and on the transport of potassium, sodium, and phosphate as inorganic ions.

## 2. Evidence for the Existence of Lateral Transport in Vascular Plants

Stout and Hoagland first reported the experimental existence of lateral transport at the end of the 1930s. Radioactive isotopes of potassium, sodium, and phosphorus were used to show that these ions were transported from xylem to phloem in geranium (*Pelargonium zonale*) and in willow (*Salix lasiandra*) [25]. Later, during the 1960s and 1970s, numerous articles were published that addressed the lateral transport of organic and inorganic solutes in both herbaceous and woody species (Table 1 and references therein). Most of these studies also used radio-labelled sugars, amino acids, or ions to support their conclusions. Interestingly, not all inorganic ions are equal with regard to lateral transport. According to Pate (1975), a solute should fulfil several physiological criteria in order to move freely within the plant, such as a low degree of involvement in organic linkage, rapid cycling through the leaves, and a high concentration in the vascular tissues [16]. Among the different inorganic ions, potassium ( $K^+$ ), phosphate ( $PO_4^{2-}$ ), and sulfate ( $SO_4^{2-}$ ) come closest to meeting all of these criteria. Sodium ( $Na^+$ ) is also transferred from xylem to phloem, but to a lesser extent than  $K^+$ , while calcium ions fail to cross from xylem to phloem, even if perfused at a high concentration [26,27]. Regardless of the plant species, amino acids mainly move from xylem to phloem, while sugars move in both phloem-to-xylem and xylem-to-phloem directions (Table 1). For instance, Van Bel (1984) demonstrated in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) that the nutritional demands of young leaves were almost completely met by xylem-to-phloem transport of amino acids in the tomato stem [28]. In the legume species, *Lupinus albus*, it was shown that vegetative apices received 73% of their N and 14% of their C through the xylem [29], while in soybean (*Glycine max*), 6% of C and 51% of N enters the fruit via xylem-to-phloem transfer in the stem [30]. Phloem-to-xylem transfer of sugars has also been described in several species, including woody species (Table 1 and references therein). Moreover, bidirectional movement of water and ions (e.g., potassium, sodium, phosphorus, calcium, and magnesium) in both angiosperms and gymnosperms (Table 1 and references therein) was reported. Lateral transport of solutes is thus an important component of resource allocation, as has been shown in several species [31] (Table 1 and references therein). However, most of these studies lacked specific data about the anatomical framework in which lateral transport takes place. Over the past 15 years, studies performed on the model plant *Arabidopsis thaliana* have given us a better picture of the cell types involved and have highlighted the role of vascular and perivascular cells in this process.

**Table 1.** Experimental evidence for lateral transport of solutes in angiosperms and gymnosperms.

Lateral Process	Compound	Method Used	Species	Reference
Xylem-to-phloem	Sucrose	<sup>14</sup> C-sucrose	<i>Populus deltoids</i>	[32]
	Glumatic acid, aspartic acid	<sup>14</sup> C-labeled amino acid	<i>Populus deltoids</i>	[32]
	Valine, asparagine, threonine, serine, citrulline, glutamine	<sup>14</sup> C-labeled amino acid	<i>Lupinus albus</i>	[33]
	Asparagine	<sup>14</sup> C-asparagine	<i>Spartium junceum</i>	[34]
	Glucose	<sup>14</sup> C-glucose	<i>Vitis vinifera</i>	[35]
	Inulin, valine, aminobutyric acid	<sup>14</sup> C-labeled compounds	<i>Lycopersicum esculentum</i>	[28]
	Carbon and nitrogen	C/N ratio, sap analysis, and modeling	<i>Glycine max</i>	[30]
	Potassium and sodium	Sap analysis	<i>Salix viminalis</i>	[26]
	Potassium, sodium, and phosphorus	Radioactive isotopes	<i>Pelargonium zonale</i> <i>Salix lasiandra</i>	[25]
	Sucrose, glucose, and fructose	<sup>14</sup> C-labeled sugars	<i>Salix viminalis</i>	[36]
Glutamic acid, aspartic acid	<sup>14</sup> C-labeled amino acid	<i>Salix viminalis</i>	[37]	
Phloem-to-xylem	Photosynthates	Physiological analysis	<i>Ricinus communis</i>	[31]
	Photosynthates	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub>	<i>Vitis labruscana</i>	[38]
	Glucose, fructose, and sucrose	<sup>14</sup> C-labeled sugars	<i>Glycine max</i>	[39]
	Sucrose	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub>	<i>Salix viminalis</i>	[40]
	Phosphorus and sulfur	<sup>35</sup> S and <sup>32</sup> P tracking experiments	<i>Phaseolus vulgaris</i>	[41]
Leakage-retrieval process along the phloem	Photosynthates	<sup>11</sup> CO <sub>2</sub>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	[42]
	Sucrose and hexoses	Ringing experiment	<i>Gossypium</i> sp.	[43]
	Photosynthates	Defoliation experiment	<i>Fraxinus americana</i>	[44]
	Sucrose	<sup>11</sup> CO <sub>2</sub> tracking experiment	<i>Arabidopsis thaliana</i>	[45]
Bidirectional exchange	Glutamine and asparagine	<sup>14</sup> C- and <sup>15</sup> N-labeled compounds	<i>Picea abies</i>	[46]
	Potassium and sodium	Sap analysis	<i>Lupinus albus</i>	[47]
	Potassium	Sap analysis and modeling	<i>Ricinus communis</i>	[31]
	Potassium	Sap analysis	<i>Hordeum vulgare</i>	[47]
	Calcium and magnesium	Sap analysis	<i>Ricinus communis</i>	[48]
	Water	Fluorescent marker	<i>Eucalyptus saligna</i>	[5]

### 3. Going In and Out of the Vascular System: The Role of Specialized Vascular and Perivascular Cells

In higher plants, the vascular system is composed of phloem and xylem tissues, which are organized in an organ-specific manner (Figure 1). Anatomically, the phloem tissue is composed of phloem parenchyma cells, companion cells, and sieve elements, and mainly accounts for the long-distance transport of sugars [49], amino acids [50], phytohormones [51], and nucleic acids [52] from source (carbon fixing) to sink (carbohydrate import dependent) organs. The xylem tissue is composed of xylem parenchyma cells, xylem fibers, and xylem vessels that provide structural support, as well as enable the transport of water [53], minerals [1], and phytohormones [51] from below- to above-ground organs. Additionally, layers of specialized parenchyma cells and perivascular cells surrounding the phloem and xylem tissues, such as the pericycle in roots or the bundle sheath in leaves, also constitute an important interface involved in the lateral distribution of solutes between vascular cell types, as well as from vascular tissue to the outer cell layers, and vice versa.

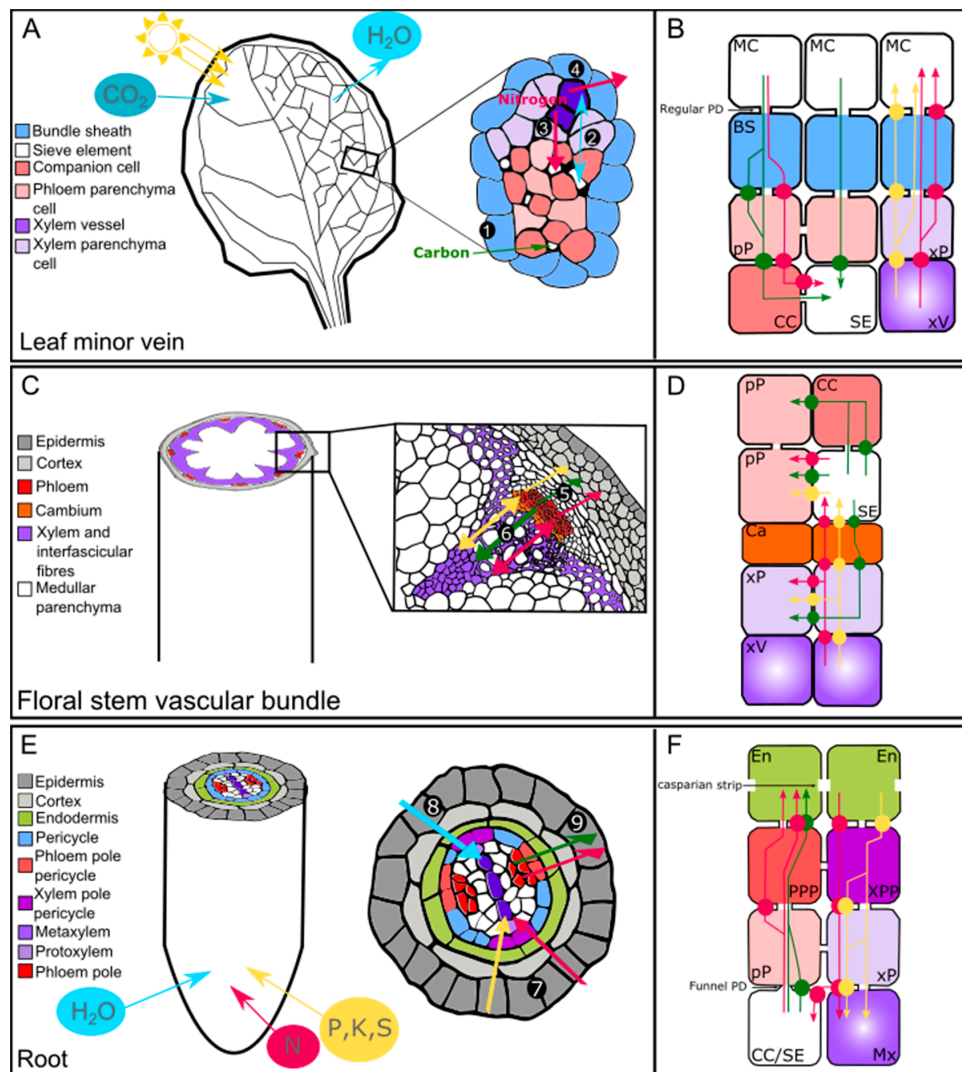
#### 3.1. The Bundle Sheath and Transfer Cells in Leaves

In leaves, phloem and xylem tissues face the adaxial and the abaxial part of the lamina, respectively, and are organized into bundles encircled by a parenchymatous layer of cells known as the bundle sheath (BS) [54] (Figure 1A). In previous studies, the BS cells of C<sub>4</sub> plants have received the most attention because of their specialized role in efficient CO<sub>2</sub> fixation in the Calvin–Benson cycle [55], while the role of BS cells in C<sub>3</sub> plant leaves has been much less widely explored. Nevertheless, several studies performed on *Arabidopsis* indicate an important role for BS cells in the lateral transport of organic and inorganic solutes and suggest that BS cells facing phloem and xylem may play distinct roles [56]. In particular, those that face the xylem may form a selective barrier, preventing excessive amounts of ions entering or leaving the xylem [57]. In addition, they might also act as a hydraulic regulatory barrier to reduce loss of water from the veins during abiotic stress conditions [58]. In minor veins of source leaves, structural evidence suggests that sugars will cross the BS cells (those facing the phloem tissue), preferably through plasmodesmata, to reach the phloem parenchyma cells before being loaded into the phloem sieve elements [59] (Figure 1A,B). In addition, an apoplasmic route is also likely for the transport of organic and inorganic solutes between BS cells and vascular tissues, as suggested by the identification of candidate plasma membrane transporters detailed below [56,60–62] (Figure 1B).

Besides the important role of the bundle sheath in the lateral transport of solutes, other vascular cell types are involved in cell-to-cell transport between the phloem and the xylem and within each of these tissues. For instance, transfer cells (TCs), which can differentiate from existing vascular or non-vascular cell types (e.g., bundle sheath, xylem or phloem parenchyma cells), and which are characterized by prominent plasma membrane ingrowths, have been suggested to be a site of intense transport activity between the different vascular cell types [63]. Most studied in the phloem of minor veins, TC development occurs quite early (after an average of 10 days of growth) in cotyledons as well as in young leaves of *Arabidopsis thaliana* plants grown in normal conditions [64]. In adult leaves, a basipetal gradient of wall ingrowth deposition that has parallels with the sink/source transition is observed [64]. Additionally, TCs can develop in response to changing environmental conditions, most probably as a result of an increased demand for solute transport [65]. It has been proposed, for example, that phloem parenchyma transfer cells (PP TCs), which are highly metabolically active, could fuel massive transmembrane transport, notably of sugar compounds, through the plasmodesmata as well as through active and/or passive transporter systems [66]. Finally, the role of PP TCs in controlling membrane transport capacity has been extended to their role as a physical barrier that prevents access of invading pathogens to sugar-rich sieve elements [67]. Even if progress has been made in our understanding of the role of TCs, the molecular actors involved in the transport of organic solutes (i.e., sugar and amino acids) between TCs and phloem companion cells still need to be identified. On the basis of the localization of members of the SUGAR WILL EVENTUALLY BE EXPORTED



TRANSPORTERS (SWEET) family in the plasma membrane ingrowths of TCs [68,69], the existence of a facilitated transport of sugars should be further explored.



**Figure 1.** Organic and inorganic solutes take several paths to enter and exit the plant vascular system. This scheme is based on the *Arabidopsis thaliana* anatomy. (A,C,E) Schematic representation of a source organ (source leaf) (A), a transport organ (floral stem) (C), and a sink organ (root) (E). (B,D,F) Schematic representation of the possible transport pathways taken by the organic and inorganic solutes between the different cell types in each organ ((B): leaf; (D): floral stem; and (F): root). 1. Loading of carbohydrates, organic acids, and amino acids in the sieve tubes. 2. Water flow between xylem and phloem. 3. Lateral transfer of amino acids from xylem to phloem. 4. N metabolism and N remobilization. 5. Leakage and retrieval of carbohydrates, amino acids, and ions between the phloem and the surroundings tissues. 6. Unloading of carbohydrates, organic acids, amino acids, and ions for the supply of metabolic precursors for cell division and expansion. 7. Uptake, efflux, and influx of inorganic solutes (e.g.,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) and nitrogen to the xylem. 8. Absorption and flow of water to the xylem. 9. Unloading of carbohydrates, organic acids, and amino acids that will later be used as precursors for cell division and expansion. The light blue, pale yellow, pink, and green arrows represent the water, inorganic solutes, nitrogen, and sugar movement, respectively. The circles represent the transporter-mediated movement of organic and inorganic solutes. BS: bundle sheath; CC: companion cell; En: endodermis; PD: plasmodesmata; Ph: phloem; pP: phloem parenchyma cell; PPP: phloem–pole pericycle; Px: protoxylem; MC: mesophyll cell; Mx: metaxylem; SE: sieve element; xV: xylem vessel; xP: xylem parenchyma cell; XPP: xylem-pole pericycle.



### 3.2. Vascular Parenchyma Cells, Fibers, and Rays in the Stem

In *Arabidopsis thaliana*, the floral stem (also referred to as the inflorescence stem) is composed of collateral vascular bundles of phloem, cambium, and xylem, separated from each other by interfascicular fibers (Figure 1C). In particular, fibers referred to as bast fibers or xylary fibers (depending on whether they belong to phloem or xylem tissue) are found in the phloem and xylem [70]. Fibers can also be found in the hypocotyl phloem and xylem during secondary growth [71]. Even if the two types of fibers (i.e., xylary fibers and interfascicular fibers) do not originate from the same vascular cambium (i.e., the interfascicular cambium for interfascicular fibers and the fascicular cambium for xylary fibers), both provide structural support for the plant, thanks to their thick secondary cell walls [72]. It has recently been proposed that *Arabidopsis* xylary fibers also provide some of the monolignols used for xylem vessel lignification [15]. Xylem parenchyma cells (also referred to as xylary parenchyma cells) are also involved in supplying monolignols to the developing xylem vessels [15]. However, it is not currently known exactly which transport pathway is involved in this type of process. Certain members of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family that have been shown to transport monolignols could be good candidates [73,74]. Additionally, whether or not exchanges between parenchyma cells/xylary fibers and developing vascular conducting cells exist for compounds other than monolignols (e.g., sugars) or occur in other tissues (e.g., phloem) remains an open question. Furthermore, if sugar exchanges do exist, questions of whether these are mediated through plasmodesmata, or active and/or passive transport pathways, represent interesting issues that should be addressed (Figure 1D), especially in terms of xylem secondary cell wall formation, which requires a significant amount of sugar to sustain cell wall polysaccharide synthesis.

Like in the *Arabidopsis* floral stem, in ligneous species, the woody stem is composed of xylem vessels and xylary fibers, but it also contains an additional cell type known as a ray. Rays, which are rarely found in the *Arabidopsis* floral stem and hypocotyl [71,75], are living cells responsible for the lateral transport of nutrients across the wood and for storage of carbohydrates [72]. Given their role, ray cells might thus be compared to the xylary parenchyma cells found in the *Arabidopsis* floral stem. In particular, it has been shown that during wood xylem development, there is an increasing requirement of sugars (i.e., glucose, fructose, and phosphate-sugars) that can be used for sustaining secondary cell wall formation [76]. Regarding the route taken by these sugars, they are most probably unloaded from the sieve elements into the wood rays and then reach the developing xylem vessels through a combination of symplasmic and apoplasmic pathways [77,78].

### 3.3. The Vascular Parenchyma Cells, Pericycle, and Endodermis in the Root

In a sink organ such as the *Arabidopsis* root, the young stele (composed of phloem, xylem, and vascular parenchyma cells, also known as stelar parenchyma) is surrounded by the pericycle and the endodermis (Figure 1E) [79]. As the roots get older, the pericycle cells start to divide and contribute, along with the dividing procambium, to the generation of the vascular cambium [80].

The term “stelar parenchyma” encompasses both the phloem parenchyma cells and the xylem parenchyma cells. In general, little attention has been given to the exact role of the root phloem parenchyma cells, while the root xylem parenchyma cells have received the most attention, mainly because of their role in ion/metal transport through the root. Nevertheless, experimental proof of lateral transport of organic and/or inorganic solutes between the phloem and the xylem through the vascular parenchyma cells in the roots is still lacking. Interestingly, a pioneering study of onion root (*Allium cepa*), which established a map of plasmodesmata distribution between the different vascular root cell types, identified several plasmodesmata at the interface between phloem–stelar and parenchyma–xylem vessels, suggesting a possible “direct” symplasmic pathway (i.e., without passing through the pericycle) for lateral transport (Figure 1F) [81].

The study conducted by Ma et al. (2001) also highlighted the fact that the pericycle would also play a significant role in the symplasmic transport of ions and sugars, both along the radial path and in a tangential direction across the radial walls (Figure 1F) [81]. However, direct proof of

plasmodesmata-mediated transport of ions still needs to be provided. Later, a more refined analysis of the young root in the model plant *Arabidopsis* showed the existence of two types of pericycle cells; namely xylem-pole pericycle cells and phloem-pole pericycle cells (Figure 1E,F) [82]. Xylem-pole pericycle cells have been shown to be involved in lateral root formation as well as in the apoplasmic xylem loading of boron [83,84], while phloem-pole pericycle cells are specifically involved in the unloading of molecules from the phloem sieve elements [85]. In a recent study, Ross-Elliott et al. (2018), using a combination of imaging and mathematical modelling, accurately proved the existence of a novel type of plasmodesmata named funnel plasmodesmata, which are specifically responsible for connecting the phloem-pole pericycle cells to the protophloem sieve elements at the *Arabidopsis* root tip (Figure 1F). Ross-Elliott et al. suggest that sugars unloaded from the protophloem sieve elements move through the funnel plasmodesmata and are then able to access all other cell types through the “regular” plasmodesmata system (Figure 1F). Other molecules, such as macromolecules, are also able to pass through the funnel plasmodesmata, but are subsequently retained in the phloem-pole pericycle cells [85]. These results represent an important advance in our understanding of how these different cell types are connected, but also raise the question of whether funnel plasmodesmata exist in sink organs other than roots, and thus represent a potential sink-specific mode for sugar unloading.

The role of the endodermis as a bidirectional barrier that controls the solutes’ access to the vascular cylinder, as well as prevents nutrients from leaking out, is also quite well established [86,87]. Recently, it has been shown that, as in the pericycle, two endodermal cell types co-exist in roots and each cell type responds differently to nutrients and hormones [88]. It is also suggested that these cells display different uptake and sensing potential [88]. These findings add an extra level of complexity to the role of the endodermis in the lateral transport of solutes and raise the long-standing question regarding the coordination of lateral transport of solutes between the endodermis and the pericycle cells.

#### 4. Molecular Actors Involved in Lateral Transport of Solutes

In the context of lateral transport, determining whether a solute follows an active or a facilitated transport pathway depends mostly on its relative concentration in the different tissue layers that it crosses. Thus, if a solute (e.g., sucrose) is more concentrated in the phloem sap than it is in the xylem sap, it is logical to assume that its phloem-to-xylem transfer will follow the concentration gradient through plasmodesmata and/or the action of facilitators. Conversely, xylem-to-phloem transfer of the solute would need an active transport step in order to overcome the concentration gradient.

Sugar gradients have been shown at the tissue level in *Vicia faba* cotyledons; in the *Ricinus communis* hypocotyl; in the *Populus tremula* wood forming region [76,89,90]; and, very recently, at the microscopic level in different Barley (*Hordeum vulgare*) and *Arabidopsis* organs [91]. In contrast, almost no direct experimental proof of inorganic gradients exists [3,92,93]. Nonetheless, over the last 15 years, numerous plasma membrane solute transporters that could be involved in the intercellular transport of solutes have been characterized. These are expressed either in the leaf, in the root, or in the stem vascular and perivascular cells of dicotyledonous species (Table 2). Interestingly, both active and passive transporters (i.e., facilitators) acting mostly at the interface between vascular parenchyma cells and conducting cells have been identified (Table 2).

**Table 2.** Plasma membrane solute transporters showing a localization in vascular or perivascular cells in dicotyledonous species.

Gene Name	Gene Locus or Accession n°	Function	Organ	Expression Domain	Method Used	Species/[Reference]
<b>Ion transport</b>						
AKT2/3	At4g22200	Potassium/sodium channel	Leaf, stem	Phloem and xylem parenchyma	Promoter GUS fusion	At/[94,95]
CCC	At1g30450	Cation–chloride cotransporter	Leaf, root	Xylem parenchyma	Promoter GUS fusion	At/[96]
CHX14	At1g06970	Potassium efflux transporter	Root	Xylem parenchyma	Promoter GUS fusion	At/[97]
CHX21	At2g31910	Sodium transporter	Root	Endodermis	Protein immunolocalization	At/[98]
HKT1	At4g10310	Sodium/Potassium symporter	Leaf, root and stem	Phloem/xylem parenchyma, endodermis	Immuno-electron microscopy and promoter GUS fusion	At/[99,100]
NRT1.5/NPF7.3	At1g32450	Potassium and nitrate transporter	Root	Pericycle	In situ hybridization	At/[101]
PHO1	At3g23430	Inorganic phosphate exporter	Root	Stele, xylem-pole, endodermis	Promoter GUS fusion	At/[102]
PHO1;H1	At1g68740	Inorganic phosphate transporter	Leaf, root	Vascular cylinder, pericycle	Promoter GUS fusion	At/[103]
PHT1;5	At2g32830	Inorganic phosphate transporter	Leaf	Phloem	Promoter GUS fusion	At/[104]
GmPT7	FJ814695	Phosphate transporter	Leaf, root	Vascular cylinder	Promoter GUS fusion	Gm/[105]
SKOR	At3g02850	Potassium efflux transporter	Root	Xylem parenchyma, pericycle	Promoter GUS fusion	At/[106]
SLAH1-3	At1g62280; At4g27970; At5g24030	Anion channel	Root	Xylem-pole pericycle	Promoter GUS and GFP fusion	At/[107]
SOS1	At2g01980	Sodium antiporter	Leaf, stem, root	Xylem parenchyma, pericycle	Promoter GUS fusion	At/[108]
SULTR2;1	At5g10180	Sulfate transporter	Leaf, root	Xylem parenchyma, phloem, pericycle	Promoter GUS and GFP fusion	At/[109]
SULTR2;2	At1g77990	Sulfate transporter	Leaf, root	Bundle sheath, phloem parenchyma	Promoter GUS and GFP fusion	At/[109]
SULTR3;5	At5g19600	Sulfate transporter	Root	Xylem parenchyma, pericycle	Promoter GFP fusion	At/[110]
PtaSULTR1;1	DQ906929	Sulfate transporter	Stem	Phloem companion cells, cambium	In situ hybridization	Pta/[111]
PtaSULTR3;3a	DQ906924	Sulfate transporter	Leaf, stem	Companion cells, xylem parenchyma, rays	In situ hybridization	Pta/[111]

Table 2. Cont.

Gene Name	Gene Locus or Accession n°	Function	Organ	Expression Domain	Method Used	Species/[Reference]
<b>Sugar transport</b>						
DcSUT2	Y16768	Sucrose transporter	Root	Xylem and phloem parenchyma	Northern blot	Dc/[112]
JrSUT1	AY504969	Sucrose transporter	Stem	Xylem parenchyma	In situ hybridization	Jr/[113]
PtaSUT3	POPTR_0019s11560	Sucrose transporter	Stem	Xylem vessel, fiber	In situ hybridization	Pta/[114]
PttSUT3	POPTR_0019s11560	Sucrose transporter	Stem	Cambium, xylem vessels	Gene expression by qPCR	Ptt/[77]
SUC2	At1g22710	Sucrose transporter	Leaf	Phloem companion cells	Promoter GUS/GFP fusion Protein immunolocalization	At/[115,116]
SUC3	At2g02860	Sucrose transporter	Leaf, stem	Phloem companion cells	immunolocalization and promoter GFP fusion Protein immunolocalization	At/[117,118]
SUT1	X82276 (Nt); X82275 (Sly); X69165 (St)	Sucrose transporter	Leaf	Xylem parenchyma	Protein immunolocalization	St, Nt, Sly/[119]
SWEET4	At3g28007	Hexose facilitator	Root	Stele	Promoter GUS fusion	At/[120]
SWEET11	At3g48740	Sucrose and hexose facilitator	Leaf, stem	Phloem transfer cells, phloem/xylem parenchyma	GFP fusion protein	At/[68,121]
SWEET12	At5g23660	Sucrose and hexose facilitator	Leaf, stem	Phloem transfer cells, phloem/xylem parenchyma	GFP fusion protein	At/[68,121]
IbSWEET10		Sucrose transporter	Root	Stele	Promoter GUS fusion	Ib/[122]

Table 2. Cont.

Gene Name	Gene Locus or Accession n°	Function	Organ	Expression Domain	Method Used	Species/[Reference]
<b>Organic and inorganic nitrogen</b>						
AAP2	At5g09220	Amino acid transporter	Leaf, stem	Phloem companion cells	Promoter GUS and GFP fusion protein	At/[18]
AAP6	At5g49630	Amino acid transporter	Leaf	Xylem parenchyma	Promoter GUS	At/[123]
AMT1;1	At4g13510	Ammonium transporter	Root	Pericycle	GFP fusion protein	At/[124]
AMT2;1	At2g38290	Ammonium transporter	Root	Pericycle	Promoter GFP	At/[125]
AtProT1	At2g39890	Proline transporter	Leaf, root	Phloem and phloem parenchyma	Promoter GFP	At/[126]
NPF2.3	At3g45680	Nitrate transporter	Root	Pericycle	Promoter GUS and GFP fusion protein	At/[127]
NRT1.4/NPF6.2	At2g26690	Nitrate transporter	Leaf	Vascular system	In situ hybridization	At/[128,129]
NRT1.8/NPF7.2	At4g21680	Nitrate transporter	Root	Xylem parenchyma	Promoter GUS and in situ hybridization	At/[130]
NRT1.9/NPF2.9	At1g18880	Nitrate transporter	Root	Phloem companion cells	Promoter GUS and GFP fusion protein	At/[131]
NRT1.11/NPF1.2	At1g52190	Nitrate transporter	Leaf	Phloem companion cells	Promoter GUS and GFP fusion protein	At/[132]
NRT1.12/NPF1.1	At3g16180	Nitrate transporter	Leaf	Phloem companion cells	Promoter GUS and GFP fusion protein	At/[132]

At: *Arabidopsis thaliana*; Bv: *Beta vulgaris*; Dc: *Daucus carota*; Gm: *Glycine max*; Ib: *Ipomoea batatas*; Jr: *Juglans regia*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Vv: *Vitis vinifera*; Pta: *Populus tremula x Populus alba*; Ptt: *Populus tremula x Populus tremuloides*; Sly: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*.

#### 4.1. Lateral Transport of Inorganic Solutes from Xylem-To-Phloem

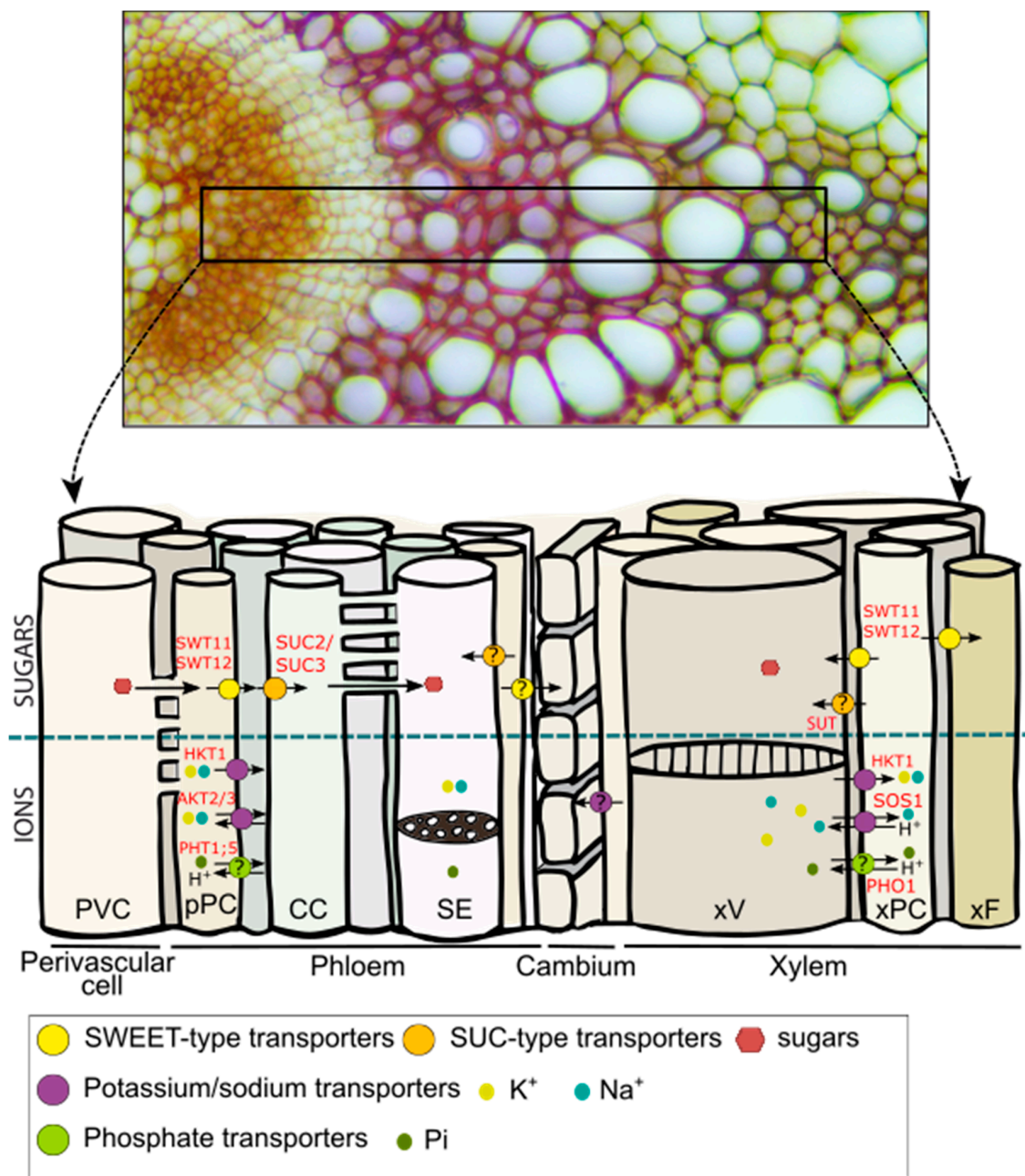
Inorganic solutes can be divided into anions (i.e., nitrite, nitrate, chloride, sulfate, and phosphate) and cations (i.e., ammonium, potassium, sodium, calcium, and magnesium). The lateral transport of inorganic nitrogen (i.e., nitrite, nitrate, and ammonium) has been the most studied (for review, [23]), and some of the molecular actors have been characterized (Table 2). Other inorganic ions are also most probably transported from xylem to phloem through an apoplasmic and/or coupled trans-cellular pathway. Nonetheless, movement of inorganic ions through plasmodesmata, for example, between the pericycle and protoxylem in a sink organ such as the onion root (*Allium cepa*) [81], cannot be excluded. In this section, we will more specifically address transporters expressed in vascular and perivascular cells that could be good candidates for the lateral transport of potassium, sodium, and phosphate, because a substantial cycling of these ions has been shown [16,133].

##### 4.1.1. Potassium and Sodium

Potassium ( $K^+$ ) is the most abundant cation and is essential for many physiological processes [134]. Sodium ( $Na^+$ ), in contrast, has a dual role, being beneficial for plants at low concentrations, but becoming toxic as its concentration rises [134]. Sodium and potassium are often exchangeable, mainly because of their chemical similarities. The lateral transfer of Na and K, along with their long-distance transport, must thus be tightly coordinated to control the balance between the two. Both cations are taken up by the root system through numerous plasma membrane-localized transporters that are mostly expressed in the xylem parenchyma cells, such as the high-affinity potassium and sodium transporter 1 (HKT1), the cation/ $H^+$  exchanger (CHX14 and CHX21), the shaker-like outward channel (SKOR), and the  $Na^+/H^+$  antiporter (SOS1) (Table 2 and references therein) [135]. Once loaded into the xylem sap through an active and/or a passive transport system [136], potassium and sodium are transported through the stem and unloaded at the target organs (e.g., the leaf) through the action of the high affinity potassium/sodium symporter (HKT1) (Table 2 and Figure 2). In addition, phloem/xylem sap analysis using radioactive isotopes of potassium and sodium showed that both cations are also partially transferred from the xylem to the phloem to be sent back to the root [25,31,137]. This process has been studied in particular in *Ricinus communis* [31]. In this species, more than 30% of the total  $Na^+$  taken up in the root is actually recycled back to the root after a xylem-to-phloem transfer. Additionally, half of the  $K^+$  loaded into the xylem sap is recycled back via the phloem to be incorporated into the roots. Even if this general flow model emphasizes the role of the lateral transfer between xylem and phloem for both cations in this species [31], the question of whether or not the unloading of potassium and sodium from the root phloem occurs through plasmodesmata needs to be further addressed.

Peuke [31] also noted that, in terms of proportion, the general flow model for  $K^+$  is quite similar to that of the N, suggesting a strong interaction between the two compounds. In tomato, the  $K^+$  concentration in the xylem sap has been shown to influence the rate of amino acid uptake, with a low  $K^+$  concentration stimulating amino acid uptake, and vice versa (Table 2 and references therein). More broadly, it has been shown that each time a substrate is taken up through a proton symport,  $K^+$  ions are released into the transpiration stream [138]. Regarding the translocation stream, analysis of mutants deficient in the expression of the AKT2/3 potassium channel localized in the phloem parenchyma cells in the Arabidopsis floral stem (Figure 2) showed that the retrieval mechanisms of sugars along the phloem tissue are also intimately linked to the transport of  $K^+$  ions via the action of AKT2/3 [139]. Subsequent studies identified that  $K^+$  ions moving in the phloem sap can be assimilated into an energy store that can be used to overcome local energy limitations generated by the action of the  $K^+$  and sugar proton-coupled transporters [140,141].





**Figure 2.** Model for sugar and ion transport in the Arabidopsis floral stem. The upper panel shows a vascular bundle transversal section stained with alcian blue/safranin O. The primary cell walls appear in different shades of orange and the secondary cell walls appear in red. The lower panel is a sketch showing a longitudinal view of the different cell types present in a vascular bundle. The white bridges between two cells represent the plasmodesmata. The model was based on current knowledge of the spatial distribution of sugar and ion transporters in the Arabidopsis floral stem. Known locations of members of the sugar and ion transporters in other Arabidopsis organ or in woody stem have been added as putative locations in Arabidopsis floral stem (question marks). pPC: phloem parenchyma cell; CC: companion cell; SE: sieve element; SUC: SUCROSE TRANSPORTER; SWEET: SUGAR WILL EVENTUALLY BE EXPORTED TRANSPORTERS; xV: xylem vessel; xF: xylary fiber; xPC: xylem parenchyma cell.

As AKT2/3 is a channel that is responsible for the facilitated diffusion of potassium, its mode of action implies the presence of a potassium gradient between the phloem companion cell/sieve element complex and the surrounding tissues that can be used locally to assure the retrieval and

subsequent reloading of sugar by and from the transport phloem [141]. However, the exact nature of the transporters involved in such a process is still not known with certainty.

Sodium ions can also be loaded into the root xylem vessel via SOS1, a xylem parenchyma-localized antiporter, which mediates  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanges [108]. Interestingly, SOS1 is also located in the xylem parenchyma cells of the floral stem and leaves [108], suggesting that this transporter could work both to load sodium into the xylem vessel and to retrieve it along the transpiration stream (Figure 2). Once in the transpiration stream, it has been suggested that sodium could be laterally transferred from xylem to phloem, likely via the action of the HKT1 transporter. This transfer has been suggested to be biologically relevant in order to prevent ion overaccumulation in the shoot of *Arabidopsis* or cotton in the context of high salinity [142,143]. However, Davenport et al. [144] later challenged the role of HKT1 in this process and, therefore, the very existence of sodium recirculation to the root through the phloem has been questioned and remains under debate [145]. One way to address this question would be to estimate the relative  $\text{Na}^+$  fluxes in the phloem and xylem sap. While in *Ricinus communis*, the recirculation of sodium has been estimated to be around 30%, similar experiments in monocotyledons suggest that lateral transfer of sodium would only account for 5–7% of the total sodium uptake [145]. Without questioning the existence of sodium recirculation, these discrepancies point out the need to carefully estimate phloem and xylem flow rates according to the plant species and environmental conditions.

#### 4.1.2. Phosphate

Phosphorus (P) is a macronutrient essential for cellular processes such as energy production, redox reactions, photosynthesis, and phosphorylation/dephosphorylation reactions [146]. Phosphorus enters the plant root system in the form of inorganic P (Pi), such as  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , or  $\text{HPO}_4^{2-}$ , through an energized process involving  $\text{H}^+/\text{Pi}$  co-transport in order to overcome the negative membrane potential [146]. Pi is then transported through the different root tissues through the action of, at least, the AtPHO1 and AtPHO1;H1 transporters, which are expressed in the endodermis and the pericycle, respectively, before being loaded into the xylem sap for root-to-shoot transport [102,103]. Additionally, under long-term Pi starvation, Pi is remobilized from the old leaves toward the sink tissues (e.g., the growing root or the seeds). This remobilization from shoot-to-root requires the action of the phloem-localized PHT1;5 transporter [104,147]. Although phosphorus was the first anion for which lateral transport was shown [25], it is still not known with certainty which transporters are involved in Pi recycling from the xylem to the phloem, although the antiporters PHO1 and PHT1;5 could be involved in such a process (Figure 2). In addition, it has been suggested that in rice, Pi might also be transported by members of the SULTR transporter family [148]. As most phosphate transporters are conserved between monocots and dicots, assessing the role of SULTR transporters in the lateral transfer of Pi may also be relevant. To improve our limited knowledge of lateral transport of Pi, one of the first steps will thus be to carefully identify the vascular cell types in which the plasmalemmal Pi transporters are expressed. Once this is achieved, genetic tools and Pi flow modelling could then be combined to help to better define the contribution of long-distance versus lateral Pi transport.

#### 4.2. Lateral Transport of Sugars in the Vascular System

Experimental proof for the lateral transport of sugars has been provided for both the phloem-to-xylem and the xylem-to-phloem direction (Table 1). This transport is thought to primarily act in carbon transport and recirculation via the phloem or the xylem. At a more local scale, the leakage-retrieval mechanism of sugars (recruiting both plasmodesmata or facilitators for leakage and energized transporters for retrieval) that occurs along the transport phloem (for review, [17]) can also be regarded as the lateral transport process.



#### 4.2.1. Leakage-Retrieval Process along the Transport Phloem

The first evidence for a leakage-retrieval process along the transport phloem was obtained in experiments performed on the *Phaseolus vulgaris* stem [42,149–152]. This was demonstrated by the combined use of  $^{11}\text{C}$ -labelled substrate, electron microscopy techniques, and application of *p*-chloromercuribenzenesulphonic acid (PCMBS), which blocks active sugar loading into the phloem [42,149–152]. In *Phaseolus vulgaris*, passive leakage of photosynthates from the phloem sieve elements was shown to occur at a rate of  $4\% \text{ cm}^{-1}$ . The lost sugars were then assumed to be continuously reloaded by active transport [152]. In *Arabidopsis*, the sucrose/ $\text{H}^+$  symporter SUC2, located at the plasma membrane of the companion cells, has been shown to play a role in retrieving leaked sucrose along the transport phloem in addition to having a well-known role in loading sucrose into the phloem sieve elements [45] (Figure 2). Another part of the leaked sucrose is used by the lateral sinks, such as the cambium and possibly the xylem, for growth and tissue maintenance [17]. However, the exact proportion of sucrose involved in this leakage-retrieval cycle, as well as the molecular actors involved, remain difficult to determine. Nevertheless, observation of a partial complementation of the *suc2* mutant line by expression of the SUC2 gene under control of the minor vein-specific galactinol synthase promoter from melon (*CmGAS1*) in this mutant suggests that the retrieval mechanism is not negligible [153]. It is worth mentioning that this type of leakage-retrieval process most likely depends on the plant species, developmental stage, and growth conditions [154].

#### 4.2.2. Phloem-To-Xylem and Xylem-To-Phloem Transport of Sugars in the Stem

In tree species, a proposed important role of the lateral transport of sugars is the prevention and/or repair of xylem embolism and/or cavitation. Transport of sugars between vascular cell types has been demonstrated during the xylem refilling process that occurs following an embolism [155]. It has been hypothesized that, during such a phenomenon, movement of water and sugars stored in the phloem towards the xylem vessels could be used to repair the embolism [155]. Additionally, as suggested for the walnut tree (*Juglans regia*), cell-to-cell transport of sugars between ray cells and xylem vessels, most likely mediated by a SUC2/SUT1 ortholog, could also account for the embolism repair [113] (Figure 2). Furthermore, it has been hypothesized that the starch stored in ray cell xylem parenchyma cells would depolymerize during xylem refilling and that the sugars produced during this phase are then loaded into cavitating conduits. In turn, the reduced level of starch in the xylem parenchyma cells would result in the cells becoming strong sinks, with the consequent unloading of sugars and water from the phloem directed to the refilling conduits [155]. The difference in sugar concentration between the two compartments/tissues would imply preferential use of plasmodesmata or a facilitated sugar transport system to sustain such a movement. Here, the sugar efflux transporters of the SWEET family could be good candidates [156].

In the *Arabidopsis* floral stem, the formation of xylem fibers and vessels and the subsequent extra-thickening of their secondary cell walls also appears to rely on lateral movement of sugars [121]. The existence of a sugar gradient between xylary parenchyma cells and xylem vessels has been suggested in a study of the double mutant *sweet11sweet12* [121]. SWEET11 and SWEET12 are encoded for facilitators that transport sugars along the concentration gradient without any energized process [68], and are expressed in the phloem and xylem parenchyma cells of the floral stem [121] (Figure 2). The *sweet11sweet12* double mutant was found to exhibit defects during development of the floral stem vascular system, as well as a modified xylem secondary cell wall composition [121]. Modification of the phloem cell wall composition has also been shown in the double mutant line using synchrotron-based Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR) [157], suggesting that facilitated sugar transport between vascular parenchyma cells and developing conducting cells (i.e., xylem vessels, xylary fibers, and phloem sieve elements) is required to sustain normal cell wall formation. However, whether this movement takes place in the phloem-to-xylem direction or more locally between vascular parenchyma cells and conducting cells needs to be further addressed.

Moreover, it is not yet known if a similar transport mode exists in other plant species, such as ligneous species, in particular during wood formation, which requires a high amount of sugars for the synthesis of cell wall polysaccharides and lignin. The recent release of the aspen transcriptome profiling datasets, with a resolution of a few microns in the wood forming region, has enabled analysis of the expression pattern of *SWEET* genes during xylem formation [78,158]. Analyses have shown that several *SWEET* genes are also expressed in this region, supporting the possible participation of PtSWEET11/12 in the sugar exchange between rays and xylem vessels [78]. Interestingly, in aspen, it has been shown that once in the apoplasm of xylem tissue, sucrose can be delivered to the developing vessels through the action of the PtSUT3 (sucrose/H<sup>+</sup> symporter) to support the secondary cell wall formation [77]. In addition, increased levels of hexoses and hexose phosphates, as well as UDP-glucose, in cells undergoing secondary cell wall formation have been identified across the wood forming region in poplar. This confirms the higher need for sugars in these cells and the existence of a sugar gradient along the xylem area undergoing secondary cell wall maturation and cell death [76]. A similar role for the SUT1 transporter has also been hypothesized in *Solanaceous* species (tomato, potato, and tobacco) because of its presence in both the phloem and the xylem parenchyma cells [119]. Further studies of members of the SUC/SUT and *SWEET* family will be needed to refine their possible role in the lateral transport of sugars (Figure 2).

#### 4.2.3. Lateral Transport of Sugar in the Leaf

Even if there is no evidence for lateral transport of sugars between the vascular tissues in leaves, previous studies have identified interesting candidates that could be involved in the cell-to-cell transport of organic solutes between leaf bundle sheath and vascular tissues. Cui et al. (2014), using ChIP-chip experiments, identified several targets of the SHORT-ROOT (SHR) and/or SCARECROW-LIKE23 (SCL23) transcription factors, which specify the fate of bundle sheath cells in *Arabidopsis* leaves. Among them, some are involved in sugar transport, including the hexose transporters *PMT5* and *STP1* and the sucrose transporter *SUC1*. Interestingly, additional targets identified in this study are known to be involved in nitrogen (*NFP6.3*, *NPF4.6*, *PROT3*, *UMAMIT1*, and *CAT6*), potassium (*KUP1* and *KT12*), magnesium (*MGT9/MRS2-2* and *MGT6/MRS2-4*), and phosphate transport (*PHT1;3*) [159]. Furthermore, by characterizing the SHORT-ROOT/SCARECROW/SCARECROW-LIKE23 (SHR/SCR/SCL23) regulatory module, Cui et al. (2014) showed that in leaf major veins, *SCR* is preferentially expressed in BS cells facing the phloem, while *SCL23* is expressed in BS cells facing the xylem. This suggests that, depending on their closest cell neighbors, BS cells could fulfil specific roles [159].

Additionally, cell-specific transcriptomic studies in *Arabidopsis* allowed the identification of differentially expressed genes in the leaf bundle sheath cells [61,62]. In particular, they identified genes coding for sugar transporters (i.e., *AtSWEET10*, *AtSUC8*), as well as amino acid/organic acid transporters (i.e., *AtGLR3.6*, *AtALMT6*).

Altogether, these works suggest the existence of a fine regulation of lateral solute transport mediated by an active and/or a passive transport system, and provide evidence that the lateral transport also integrates oriented flow of organic and inorganic solutes, either towards the adaxial or the abaxial side of the lamina.

### 5. State-Of-The-Art Biophysical Tools for Monitoring in Situ Lateral Transport of Solutes

A better understanding of lateral transport of solutes in vascular tissues requires correct description of the types of connections that exist between the vascular cells. This is particularly important for anatomically highly complex organs such as the stem. In the 1980s to 1990s, this issue was addressed using transmission electron microscopy, which allows plasmodesmata frequency maps between cells to be determined and, therefore, symplasmic continuity or discontinuity to be identified [160,161]. In addition, in rice leaf blades, combined use of fluorescent markers and confocal

scanning laser microscopy has enabled identification of a symplasmic phloem-loading pathway between xylem parenchyma cells and phloem sieve elements [162].

In addition, Liesche et al. (2012) developed the three-dimensional photoactivation microscopy technique in order to quantify plasmodesmata-mediated cell wall permeability between different cell types with cage fluorescein as tracer, enabling them to quantify the real-time mobility between cells in angiosperms and gymnosperms [163,164]. As it is now possible to synthesize conjugated-molecules, such as fluorescent phytohormones [165,166], which are mobile between different cell types, and hydrophilic gold nanoparticles, which can be transported in the vascular tissues [167], the development of conjugated sugars might also be used as a more direct approach to trace sugars at the tissue or cell level. In line with these techniques, the fluorescent coumarine glucoside esculin, which mimics sucrose translocation [168], is a promising tool for exploring lateral transport. The use of infrared spectroscopy (FTIR) combined with state-of-the-art statistical modeling has also been proven effective for quantitatively imaging the sucrose content at the microscopic level in barley leaf, stem, and seeds, as well as in *Arabidopsis* hypocotyls [91]. This breakthrough technology thus represents a great opportunity to better characterize the lateral transport of metabolites in the future.

Lateral exchanges of sugars and amino acids might also be monitored at a higher spatial resolution using isotope tracers such as  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{11}\text{C}$  and cryo-secondary ion mass spectroscopy. This technique has already been successfully used to demonstrate lateral exchanges of magnesium, potassium, and calcium between vascular tissues in the french bean (*Phaseolus vulgaris*) stem [3]. This type of mineral ion movement has also been observed in planta with the real-time radioisotope imaging system (RRIS) [169]. This technique also allowed the authors to follow the temporal evolution of  $^{14}\text{C}$ -labelled metabolites over 24 h in the different organs at the whole plant level [169]. Finally, the use of new imaging techniques in plant sciences, such as position emission tomography (PET), which exploits positron-emitting radioactive metabolite analogues, will provide exciting opportunities to improve our understanding of solute flows within the vascular system [170]. State-of-the-art techniques such as these will likely be required to better understand the lateral movement of a wide range of compounds including sugars and inorganic ions.

## 6. Concluding Remarks and Future Prospects

Since the existence of lateral movement of inorganic solutes was first reported in the 1930s, significant progress has been made in identifying several of the molecular actors involved in organic and inorganic solute exchanges. It has been discovered that the lateral transport of sugars is controlled by coordinated symplasmic and apoplasmic pathways, which constitutes a new paradigm that still needs to be confirmed for the lateral transfer of other solutes. In this scheme, another important step will be to better understand the environmental factors regulating the relative contribution of both pathways, as well as to take into account that their contributions probably vary between organs within a plant species and between plant species. Thus, more knowledge needs to be acquired at the cell level (e.g., plasmodesmata density, localization of the solute transporters) before the relative contributions of both pathways to the lateral transport can be determined. In addition, the use of cell-specific and single-cell technology combined with next generation sequencing would help to identify additional transporter families that could be involved in lateral movement [60,171]. For instance, the use of bundle sheath (e.g., *SHR* and *SCR23*), xylem parenchyma (e.g., *PRX47*), or phloem parenchyma (e.g., *GIGANTEA*) specific promoters combined with the translatome ribosome affinity purification (TRAP) technology, developed by Mustroph et al. [60], could help to provide a better understanding of the specificity of these cell types, as well as to go further in the identification of transporters involved in solute loading and unloading between vascular and perivascular cells.

Overall, addressing these questions will help to better comprehend how the carbon, ion, and nitrogen allocation and the interaction between them are coordinated throughout the plant body. This knowledge could finally be used to achieve a complete model of the resource economy in plants and thus to improve crop yield.

**Author Contributions:** All authors contributed to the writing and editing of this review article.

**Funding:** Research in the laboratories of the authors was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); from the CNRS; and from a French State grant (LabEx Saclay Plant Sciences-SPS, ANR-10-LABX-0040-SPS), managed by the French National Research Agency under an “Investments for the Future” program (ANR-11-IDEX-0003-02). EA is supported by a grant from SPS.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Lucas, W.J.; Groover, A.; Lichtenberger, R.; Furuta, K.; Yadav, S.R.; Helariutta, Y.; He, X.Q.; Fukuda, H.; Kang, J.; Brady, S.M.; et al. The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions. *J. Integr. Plant Biol.* **2013**, *55*, 294–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Van Bel, A.J.E. Xylem-phloem exchange via the rays: The undervalued route of transport. *J. Exp. Bot.* **1990**, *41*, 631–644. [[CrossRef](#)]
- Metzner, R.; Schneider, H.U.; Breuer, U.; Thorpe, M.R.; Schurr, U.; Schroeder, W.H. Tracing Cationic Nutrients from Xylem into Stem Tissue of French Bean by Stable Isotope Tracers and Cryo-Secondary Ion Mass Spectrometry. *Plant Physiol.* **2010**, *152*, 1030–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Maas, E.V.; Ogata, G. Radial Transport of Sodium and Chloride into Tomato Root Xylem. *Plant Physiol.* **1972**, *50*, 64–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pfautsch, S.; Renard, J.; Tjoelker, M.G.; Salih, A. Phloem as capacitor: Radial transfer of water into xylem of tree stems occurs via symplastic transport in ray parenchyma. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 963–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sevilem, I.; Miyashima, S.; Helariutta, Y. Cell-to-cell communication via plasmodesmata in vascular plants. *Cell Adhes. Migr.* **2013**, *7*, 27–32. [[CrossRef](#)]
- Lee, J.-Y.; Colinas, J.; Wang, J.Y.; Mace, D.; Ohler, U.; Benfey, P.N. Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6055–6060. [[CrossRef](#)]
- Chen, H.; Ahmad, M.; Rim, Y.; Lucas, W.J.; Kim, J.-Y. Evolutionary and molecular analysis of Dof transcription factors identified a conserved motif for intercellular protein trafficking. *New Phytol.* **2013**, *198*, 1250–1260. [[CrossRef](#)]
- Zhou, J.; Wang, X.; Lee, J.-Y.; Lee, J.-Y. Cell-to-Cell Movement of Two Interacting AT-Hook Factors in Arabidopsis Root Vascular Tissue Patterning. *Plant Cell* **2013**, *25*, 187–201. [[CrossRef](#)]
- Bishopp, A.; Help, H.; El-Showk, S.; Weijers, D.; Scheres, B.; Friml, J.; Benková, E.; Mähönen, A.P.; Helariutta, Y. A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 917–926. [[CrossRef](#)]
- Thorpe, M.R.; Ferrieri, A.P.; Herth, M.M.; Ferrieri, R.A. <sup>11</sup>C-imaging: Methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta* **2007**, *226*, 541–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shitan, N.; Yazaki, K. Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2007**, *8*, 244–252. [[CrossRef](#)]
- Yazaki, K.; Sugiyama, A.; Morita, M.; Shitan, N. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 513–524. [[CrossRef](#)]
- Smith, R.A.; Schuetz, M.; Roach, M.; Mansfield, S.D.; Ellis, B.; Samuels, L. Neighboring Parenchyma Cells Contribute to Arabidopsis Xylem Lignification, while Lignification of Interfascicular Fibers Is Cell Autonomous. *Plant Cell* **2013**, *25*, 3988–3999. [[CrossRef](#)]
- Smith, R.A.; Schuetz, M.; Karlen, S.D.; Bird, D.; Tokunaga, N.; Sato, Y.; Mansfield, S.D.; Ralph, J.; Samuels, A.L. Defining the Diverse Cell Populations Contributing to Lignification in *Arabidopsis thaliana* Stems. *Plant Physiol.* **2017**, *174*, 1028–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pate, J.S. *Exchange of Solutes between Phloem and Xylem and Circulation in the Whole Plant*; Zimmermann, M.H., Milburn, J.A., Eds.; Transport; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1975; ISBN 978-3-642-66163-1.
- De Schepper, V.; De Swaef, T.; Bauweraerts, I.; Steppe, K. Phloem transport: A review of mechanisms and controls. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 4839–4850. [[CrossRef](#)]

18. Zhang, L.; Tan, Q.; Lee, R.; Trethewy, A.; Lee, Y.H.; Tegeder, M. Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **2010**, *22*, 3603–3620. [[CrossRef](#)]
19. White, P.J. Long-distance Transport in the Xylem and Phloem. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 49–70. ISBN 9780123849052.
20. González-Fontes, A.; Navarro-Gochicoa, M.T.; Ceacero, C.J.; Herrera-Rodríguez, M.B.; Camacho-Cristóbal, J.J.; Rexach, J. *Understanding Calcium Transport and Signaling, and Its Use Efficiency in Vascular Plants*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; ISBN 9780128112946.
21. Chen, Z.C.; Peng, W.T.; Li, J.; Liao, H. Functional dissection and transport mechanism of magnesium in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *74*, 142–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gigolashvili, T.; Kopriva, S. Transporters in plant sulfur metabolism. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 1–16. [[CrossRef](#)]
23. Tegeder, M.; Masclaux-Daubresse, C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol.* **2018**, *217*, 35–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tegeder, M.; Hammes, U.Z. The way out and in: Phloem loading and unloading of amino acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2018**, *43*, 16–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Stout, P.R.; Hoagland, D.R. Upward and lateral movement of salt in certain plants as indicated by radioactive isotopes of potassium, sodium, and phosphorus absorbed by roots. *Am. J. Bot.* **1939**, *26*, 320–324. [[CrossRef](#)]
26. Peel, A.J. The movement of ions from the xylem solution into the sieve tubes of willow. *J. Exp. Bot.* **1963**, *14*, 438–447. [[CrossRef](#)]
27. Hoad, G.V.; Peel, A.J. Studies on the movement of solutes between the sieve tubes and surrounding tissues: I. Interference between solutes and rate of translocation measurements. *J. Exp. Bot.* **1965**, *16*, 742–758. [[CrossRef](#)]
28. Van Bel, A.J.E. Quantification of the xylem-to-phloem transfer of amino acids by use of inulin [<sup>14</sup>C]carboxylic acid as xylem transport marker. *Plant Sci. Lett.* **1984**, *35*, 81–85. [[CrossRef](#)]
29. Pate, J.S.; Layzell, D.B.; McNeil, D.L. Modeling the transport and utilization of carbon and nitrogen in a nodulated legume. *Plant Physiol.* **1979**, *63*, 730–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Layzell, D.B.; Larue, T.A. Modeling C and N transport to developing soybean fruits. *Plant Physiol.* **1982**, *70*, 1290–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Peuke, A.D. Correlations in concentrations, xylem and phloem flows, and partitioning of elements and ions in intact plants. A summary and statistical re-evaluation of modelling experiments in *Ricinus communis*. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 635–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Vogelmann, T.C.; Dickson, R.E.; Larson, P.R. Comparative Distribution and Metabolism of Xylem-Borne Amino Compounds and Sucrose in Shoots of *Populus deltoides*. *Plant Physiol.* **1985**, *77*, 418–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sharkey, P.J.; Pate, J.S. Selectivity in xylem to phloem transfer of amino acids in fruiting shoots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Planta* **1975**. [[CrossRef](#)]
34. Pate, J.S.; Sharkey, P.J.; Lewis, O.A.M. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. *Planta* **1975**, *122*, 11–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hardy, P.J.; Possingham, J.V. Studies on translocation of metabolites in the xylem of grapevine shoots. *J. Exp. Bot.* **1969**, *20*, 325–335. [[CrossRef](#)]
36. Ford, J.; Peel, A.J. The movement of sugars into the sieve elements of bark strips of willow. *J. Exp. Bot.* **1967**, *18*, 607–619. [[CrossRef](#)]
37. Gardner, D.C.J.; Peel, A.J. Metabolism and transport of <sup>14</sup>C-labelled glutamic and aspartic acids in the phloem of willow. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2385–2387. [[CrossRef](#)]
38. Swanson, C.A.; Shishiny, E.D.H. Translocation of sugars in the concord grape. *Plant Physiol.* **1958**, *33*–37. [[CrossRef](#)]
39. Nelson, C.D.; Gorham, P.R. Translocation of radioactive sugars in the stems of soybean seedlings. *Can. J. Bot.* **1957**, *35*, 703–713. [[CrossRef](#)]
40. Peel, A.J. Demonstration of Solute Movement from the Extracambial Tissues into the Xylem Stream in Willow. *J. Exp. Bot.* **1967**, *18*, 600–606. [[CrossRef](#)]
41. Biddulph, S.F.; Biddulph, O.; Cory, R. Visual indications of S<sup>35</sup> and P<sup>32</sup> translocation in the phloem. *Am. J. Bot.* **1956**, *45*, 648–652. [[CrossRef](#)]



42. Minchin, P.E.H.; Thorpe, M.R. Measurement of unloading and reloading of photo-assimilate within the stem of bean. *J. Exp. Bot.* **1987**, *38*, 211–220. [[CrossRef](#)]
43. Mason, T.; Maskell, E. Studies on the transport of carbohydrates in the cotton plant: II. The factors determining the rate and the direction of movement of sugars. *Ann. Bot.* **1928**, *42*, 571–636. [[CrossRef](#)]
44. Zimmermann, M.H. Translocation of organic substances in trees. III. The removal of sugars from the sieve tubes in the white ash (*Fraxinus americana* L.). *Plant Physiol.* **1957**, *33*, 213–217. [[CrossRef](#)]
45. Gould, N.; Thorpe, M.R.; Pritchard, J.; Christeller, J.T.; Williams, L.E.; Roeb, G.; Schurr, U.; Minchin, P.E.H. AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: Evidence from carbon-11 tracer studies. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **2012**, *188*, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Geßler, A.; Weber, P.; Schneider, S.; Rennenberg, H. Bidirectional exchange of amino compounds between phloem and xylem during long-distance transport in Norway spruce trees (*Picea abies* [L.] Karst). *J. Exp. Bot.* **2003**, *54*, 1389–1397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wolf, O.; Jeschke, W.D. Modeling of Sodium and Potassium Flows via Phloem and Xylem in the Shoot of Salt-stressed Barley. *J. Plant Physiol.* **1987**, *128*, 371–386. [[CrossRef](#)]
48. Jeschke, W.D.; Pate, J.S. Cation and chloride partitioning through xylem and phloem within the whole plant of *Ricinus communis* L. under conditions of salt stress. *J. Exp. Bot.* **1991**, *42*, 1105–1116. [[CrossRef](#)]
49. Dinant, S.; Lemoine, R. The phloem pathway: New issues and old debates. *C. R. Biol.* **2010**, *333*, 307–319. [[CrossRef](#)]
50. Tegeder, M. Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: Opportunities for crop improvement. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 1865–1878. [[CrossRef](#)]
51. Lacombe, B.; Achard, P. Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2016**, *34*, 1–8. [[CrossRef](#)]
52. Spiegelman, Z.; Golan, G.; Wolf, S. Don't kill the messenger: Long-distance trafficking of mRNA molecules. *Plant Sci.* **2013**, *213*, 1–8. [[CrossRef](#)]
53. Kim, H.K.; Park, J.; Hwang, I. Investigating water transport through the xylem network in vascular plants. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 1895–1904. [[CrossRef](#)]
54. Leegood, R.C. Roles of the bundle sheath cells in leaves of C3 plants. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 1663–1673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Furbank, R.T. Walking the C 4 pathway: Past, present, and future. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 4057–4066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Cui, H.; Hao, Y.; Kong, D. SCARECROW Has a SHORT-ROOT-Independent Role in Modulating the Sugar Response. *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 1769–1778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Sade, N.; Shatil-Cohen, A.; Attia, Z.; Maurel, C.; Boursiac, Y.; Kelly, G.; Granot, D.; Yaaran, A.; Lerner, S.; Moshelion, M. The Role of Plasma Membrane Aquaporins in Regulating the Bundle Sheath-Mesophyll Continuum and Leaf Hydraulics. *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 1609–1620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Shatil-Cohen, A.; Attia, Z.; Moshelion, M. Bundle-sheath cell regulation of xylem-mesophyll water transport via aquaporins under drought stress: A target of xylem-borne ABA? *Plant J.* **2011**, *67*, 72–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Haritatos, E.; Medville, R.; Turgeon, R. Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **2000**, *211*, 105–111. [[CrossRef](#)]
60. Mustroph, A.; Zanetti, M.E.; Jang, C.J.H.; Holtan, H.E.; Repetti, P.P.; Galbraith, D.W.; Girke, T.; Bailey-Serres, J. Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18843–18848. [[CrossRef](#)]
61. Wigoda, N.; Pismanik-Chor, M.; Yang, T.; Yu, L.; Moshelion, M.; Moran, N. Differential gene expression and transport functionality in the bundle sheath versus mesophyll—A potential role in leaf mineral homeostasis. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 3179–3190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Aubry, S.; Smith-Unna, R.D.; Bournsnell, C.M.; Kopriva, S.; Hibberd, J.M. Transcript residency on ribosomes reveals a key role for the *Arabidopsis thaliana* bundle sheath in sulfur and glucosinolate metabolism. *Plant J.* **2014**, *78*, 659–673. [[CrossRef](#)]
63. Gunning, B.E.S.; Pate, J.S. “Transfer cells” Plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes—Their occurrence, structure, and development. *Protoplasma* **1969**, *68*, 107–133. [[CrossRef](#)]

64. Wu, Y.; Hou, J.; Yu, F.; Nguyen, S.T.T.; McCurdy, D.W. Transcript Profiling Identifies NAC-Domain Genes Involved in Regulating Wall Ingrowth Deposition in Phloem Parenchyma Transfer Cells of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Adams, W.W.I. Associations between the acclimation of phloem-cell wall ingrowths in minor veins and maximal photosynthesis rate. *Front. Plant Sci.* **2014**, *15*, 5–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Arun Chinnappa, K.S.; Nguyen, T.T.S.; Hou, J.; Wu, Y.; McCurdy, D.W. Phloem parenchyma transfer cells in *Arabidopsis*—An experimental system to identify transcriptional regulators of wall ingrowth formation. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Nguyen, S.T.T.; McCurdy, D.W. Wall ingrowth deposition in phloem parenchyma transfer cells in *Arabidopsis*: Heteroblastic variations and a potential role in pathogen defence. *Plant Signal. Behav.* **2017**, *12*, e1338226. [[CrossRef](#)]
68. Chen, L.-Q.; Qu, X.-Q.; Hou, B.-H.; Sosso, D.; Osorio, S.; Fernie, A.R.; Frommer, W.B. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **2012**, *335*, 207–211. [[CrossRef](#)]
69. Cayla, T.; Le Hir, R.; Dinant, S. Live-cell imaging of fluorescently-tagged phloem proteins with confocal microscopy. In *Phloem: Methods and Protocols*; Liesche, J., Ed.; Springer Nature: Basel, Switzerland, 2019; in press.
70. Strabala, T.J.; MacMillan, C.P. The *Arabidopsis* wood model—the case for the inflorescence stem. *Plant Sci.* **2013**, *210*, 193–205. [[CrossRef](#)]
71. Chaffey, N.; Cholewa, E.; Regan, S.; Sundberg, B. Secondary xylem development in *Arabidopsis*: A model for wood formation. *Physiol. Plant.* **2002**, *114*, 594–600. [[CrossRef](#)]
72. Schuetz, M.; Smith, R.; Ellis, B. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *J. Exp. Bot.* **2012**, *64*, 11–31. [[CrossRef](#)]
73. Miao, Y.-C.; Liu, C.-J. ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**. [[CrossRef](#)]
74. Alejandro, S.; Lee, Y.; Tohge, T.; Sudre, D.; Osorio, S.; Park, J.; Bovet, L.; Lee, Y.; Geldner, N.; Fernie, A.R.; et al. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, 1207–1212. [[CrossRef](#)]
75. Mazur, E.; Kurczynska, E.U. Rays, intrusive growth, and storied cambium in the inflorescence stems of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Protoplasma* **2012**, *249*, 217–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Roach, M.; Arrivault, S.; Mahboubi, A.; Krohn, N.; Sulpice, R.; Stitt, M.; Niittylä, T. Spatially resolved metabolic analysis reveals a central role for transcriptional control in carbon allocation to wood. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 3529–3539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mahboubi, A.; Ratke, C.; Gorzsás, A.; Kumar, M.; Mellerowicz, E.J.; Niittylä, T. Aspen SUCROSE TRANSPORTER3 Allocates Carbon into Wood Fibers. *Plant Physiol.* **2013**, *163*, 1729–1740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Mahboubi, A.; Niittylä, T. Sucrose transport and carbon fluxes during wood formation. *Physiol. Plant.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Van Norman, J.M. Asymmetry and cell polarity in root development. *Dev. Biol.* **2016**, *419*, 165–174. [[CrossRef](#)]
80. Nieminen, K.; Blomster, T.; Helariutta, Y.; Mähönen, A.P. Vascular Cambium Development. *Arab B* **2015**, *13*, e0177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Ma, F.; Peterson, C.A. Frequencies of plasmodesmata in *Allium cepa* L. roots: Implications for solute transport pathways. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 1051–1061. [[CrossRef](#)]
82. Beeckman, T.; De Smet, I. Pericycle. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, 378–379. [[CrossRef](#)]
83. Parizot, B.; Roberts, I.; Raes, J.; Beeckman, T.; de Smet, I. In silico analyses of pericycle cell populations reinforce their relation with associated vasculature in *Arabidopsis*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367*, 1479–1488. [[CrossRef](#)]
84. Takano, J.; Noguchi, K.; Yasumori, M.; Kobayashi, M.; Gajdos, Z.; Miwa, K.; Hayashi, H.; Yoneyama, T.; Fujiwara, T. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature* **2002**, *420*, 337–340. [[CrossRef](#)]
85. Ross-Elliott, T.J.; Jensen, K.H.; Haaning, K.S.; Wager, B.M.; Knoblauch, J.; Howell, A.H.; Mullendore, D.L.; Monteith, A.G.; Paultre, D.; Yan, D.; et al. Phloem unloading in *Arabidopsis* roots is convective and regulated by the phloem-pole pericycle. *Elife* **2017**, *6*, 1–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Doblás, V.G.; Geldner, N.; Barberon, M. The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2017**, *39*, 136–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Barberon, M. The endodermis as a checkpoint for nutrients. *New Phytol.* **2017**, *213*, 1604–1610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Andersen, T.G.; Naseer, S.; Ursache, R.; Wybouw, B.; Smet, W.; De Rybel, B.; Vermeer, J.E.M.; Geldner, N. Diffusible repression of cytokinin signalling produces endodermal symmetry and passage cells. *Nature* **2018**, *555*, 529–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Borisjuk, L.; Walenta, S.; Rolletschek, H.; Mueller-Klieser, W.; Wobus, U.; Weber, H. Spatial analysis of plant metabolism: Sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant J.* **2002**, *29*, 521–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Verscht, J.; Tomos, D.; Komor, E. Sugar concentrations along and across the *Ricinus communis* L. hypocotyl measured by single cell sampling analysis. *Planta* **2006**, *224*, 1303–1314. [[CrossRef](#)]
91. Gündel, A.; Rolletschek, H.; Wagner, S.; Muszynska, A.; Borisjuk, L. Micro imaging displays the sucrose landscape within and along its allocation pathways. *Plant Physiol.* **2018**, *49*. [[CrossRef](#)]
92. Metzner, R.; Thorpe, M.R.; Breuer, U.; Blümler, P.; Schurr, U.; Schneider, H.U.; Schroeder, W.H. Contrasting dynamics of water and mineral nutrients in stems shown by stable isotope tracers and cryo-SIMS. *Plant Cell Environ.* **2010**, *33*, 1393–1407. [[CrossRef](#)]
93. Metzner, R.; Schneider, H.U.; Breuer, U.; Schroeder, W.H. Imaging Nutrient Distributions in Plant Tissue Using Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry and Scanning Electron Microscopy. *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 1774–1787. [[CrossRef](#)]
94. Deeken, R.; Sanders, C.; Ache, P.; Hedrich, R. Developmental and light-dependent regulation of a phloem-localised K<sup>+</sup> channel of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2000**, *23*, 285–290. [[CrossRef](#)]
95. Marten, I.; Hoth, S.; Deeken, R.; Ache, P.; Ketchum, K.A.; Hoshi, T.; Hedrich, R. AKT3, a phloem-localized K<sup>+</sup> channel, is blocked by protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7581–7586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Colmenero-Flores, J.M.; Martínez, G.; Gamba, G.; Vázquez, N.; Iglesias, D.J.; Brumós, J.; Talón, M. Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant J.* **2007**, *50*, 278–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Zhao, J.; Li, P.; Motes, C.M.; Park, S.; Hirschi, K.D. CHX14 is a plasma membrane K<sup>+</sup>-efflux transporter that regulates K<sup>+</sup>-redistribution in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **2015**, *38*, 2223–2238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Hall, D.; Evans, A.R.; Newbury, H.J.; Pritchard, J. Functional analysis of CHX21: A putative sodium transporter in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1201–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Sunarpi; Horie, T.; Motoda, J.; Kubo, M.; Yang, H.; Yoda, K.; Horie, R.; Chan, W.; Leung, H.; Hattori, K.; et al. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J.* **2005**, *44*, 928–938. [[CrossRef](#)]
100. An, D.; Chen, J.G.; Gao, Y.Q.; Li, X.; Chao, Z.F.; Chen, Z.R.; Li, Q.Q.; Han, M.L.; Wang, Y.L.; Wang, Y.F.; et al. AtHKT1 drives adaptation of *Arabidopsis thaliana* to salinity by reducing floral sodium content. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Lin, S.-H.; Kuo, H.-F.; Canivenc, G.; Lin, C.-S.; Lepetit, M.; Hsu, P.-K.; Tillard, P.; Lin, H.-L.; Wang, Y.-Y.; Tsai, C.-B.; et al. Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 Nitrate Transporter Causes Defective Root-to-Shoot Nitrate Transport. *Plant Cell Online* **2008**, *20*, 2514–2528. [[CrossRef](#)]
102. Hamburger, D.; Rezzonico, E.; Somerville, C.; Poirier, Y. Identification and Characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Society* **2002**, *14*, 889–902. [[CrossRef](#)]
103. Stefanovic, A.; Ribot, C.; Rouached, H.; Wang, Y.; Chong, J.; Belbahri, L.; Delessert, S.; Poirier, Y. Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant J.* **2007**, *50*, 982–994. [[CrossRef](#)]
104. Mudge, S.R.; Rae, A.L.; Diatloff, E.; Smith, F.W. Expression analysis suggests novel roles for members of the *Phl1* family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2002**, *31*, 341–353. [[CrossRef](#)]
105. Inoue, Y.; Kobae, Y.; Omoto, E.; Tanaka, A.; Banba, M.; Takai, S.; Tamura, Y.; Hirose, A.; Komatsu, K.; Otagaki, S.; et al. The soybean mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene, GmPT7, also shows localized expression at the tips of vein endings of senescent leaves. *Plant Cell Physiol.* **2014**, *55*, 2102–2111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Gaymard, F.; Pilot, G.; Lacombe, B.; Bouchez, D.; Bruneau, D.; Boucherez, J.; Michaux-Ferrière, N.; Thibaud, J.B.; Sentenac, H. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup>-release into the xylem sap. *Cell* **1998**, *94*, 647–655. [[CrossRef](#)]



107. Cubero-Font, P.; Maierhofer, T.; Jaslan, J.; Rosales, M.A.; Espartero, J.; Díaz-Rueda, P.; Müller, H.M.; Hürter, A.L.; AL-Rasheid, K.A.S.; Marten, I.; et al. Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 2213–2220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Shi, H.; Quintero, F.J.; Pardo, J.M.; Zhu, J.K. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transport in plants. *Plant Cell* **2002**, *14*, 465–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Takahashi, H.; Watanabe-Takahashi, A.; Smith, F.W.; Blake-Kalff, M.; Hawkesford, M.J.; Saito, K. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2000**, *23*, 171–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Kataoka, T.; Hayashi, N.; Yamaya, T.; Takahashi, H. Root-to-shoot transport of sulfate in Arabidopsis. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiol.* **2004**, *136*, 4198–4204. [[CrossRef](#)]
111. Dürr, J.; Bücking, H.; Mult, S.; Wildhagen, H.; Palme, K.; Rennenberg, H.; Ditengou, F.; Herschbach, C. Seasonal and cell type specific expression of sulfate transporters in the phloem of Populus reveals tree specific characteristics for SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> storage and mobilization. *Plant Mol. Biol.* **2010**, *72*, 499–517. [[CrossRef](#)]
112. Shakya, R.; Sturm, A. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H<sup>+</sup> symporters from carrot. *Plant-Physiology* **1998**, *118*, 1473–1480. [[CrossRef](#)]
113. Decourteix, M.; Alves, G.; Brunel, N.; Ameglio, T.; Guillot, A.; Lemoine, R.; Petel, G.; Sakr, S. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze–thaw cycles over the autumn–winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant Cell Environ.* **2006**, *29*, 36–47. [[CrossRef](#)]
114. Payyavula, R.S.; Tay, K.H.C.; Tsai, C.-J.; Harding, S.A. The sucrose transporter family in Populus: The importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning. *Plant J.* **2011**, *65*, 757–770. [[CrossRef](#)]
115. Truernit, E.; Sauer, N. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of β-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC. *Planta* **1995**, *196*, 564–570. [[CrossRef](#)]
116. Stadler, R.; Sauer, N. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* **1996**, *109*, 299–306. [[CrossRef](#)]
117. Meyer, S.; Melzer, M.; Truernit, E.; Hummer, C.; Besenbeck, R.; Stadler, R.; Sauer, N. AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J.* **2000**, *24*, 869–882. [[CrossRef](#)]
118. Meyer, S.; Lauterbach, C.; Niedermeier, M.; Barth, I.; Sjolund, R.D.; Sauer, N. Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 684–693. [[CrossRef](#)]
119. Schmitt, B.; Stadler, R.; Sauer, N. Immunolocalization of solanaceous SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: New perspectives for phloem loading and transport. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 187–199. [[CrossRef](#)]
120. Liu, X.; Zhang, Y.; Yang, C.; Tian, Z.; Li, J. AtSWEET4, a hexose facilitator, mediates sugar transport to axial sinks and affects plant development. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Le Hir, R.; Spinner, L.; Klemens, P.A.W.; Chakraborti, D.; De Marco, F.; Vilaine, F.; Wolff, N.; Lemoine, R.; Porcheron, B.; Géry, C.; et al. Disruption of the Sugar Transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 Affects Vascular Development and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 1687–1990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Li, Y.; Wang, Y.; Zhang, H.; Zhang, Q.; Zhai, H.; Liu, Q.; He, S. The Plasma Membrane-Localized Sucrose Transporter IbSWEET10 Contributes to the Resistance of Sweet Potato to *Fusarium oxysporum*. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1–15. [[CrossRef](#)]
123. Okumoto, S.; Schmidt, R.; Tegeder, M.; Fischer, W.N.; Rentsch, D.; Frommer, W.B.; Koch, W. High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45338–45346. [[CrossRef](#)]
124. Mayer, M.; Ludewig, U. Role of AMT1;1 in NH<sub>4</sub><sup>+</sup> acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* **2006**, *8*, 522–528. [[CrossRef](#)]

125. Giehl, R.F.H.; Laginha, A.M.; Duan, F.; Rentsch, D.; Yuan, L.; von Wirén, N. A Critical Role of AMT2;1 in Root-To-Shoot Translocation of Ammonium in Arabidopsis. *Mol. Plant* **2017**, *10*, 1449–1460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Grallath, S. The AtProT Family. Compatible Solute Transporters with Similar Substrate Specificity But Differential Expression Patterns. *Plant Physiol.* **2005**, *137*, 117–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Taochy, C.; Gaillard, I.; Ipotesi, E.; Oomen, R.; Leonhardt, N.; Zimmermann, S.; Peltier, J.B.; Szponarski, W.; Simonneau, T.; Sentenac, H.; et al. The Arabidopsis root stele transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. *Plant J.* **2015**, *83*, 466–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Chiu, C.C.; Lin, C.S.; Hsia, A.P.; Su, R.C.; Lin, H.L.; Tsay, Y.F. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 1139–1148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. O'Brien, J.A.A.; Vega, A.; Bouguyon, E.; Krouk, G.; Gojon, A.; Coruzzi, G.; Gutiérrez, R.A.A. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol. Plant* **2016**, *9*, 837–856. [[CrossRef](#)]
130. Li, J.-Y.; Fu, Y.-L.; Pike, S.M.; Bao, J.; Tian, W.; Zhang, Y.; Chen, C.-Z.; Zhang, Y.; Li, H.-M.; Huang, J.; et al. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.8 Functions in Nitrate Removal from the Xylem Sap and Mediates Cadmium Tolerance. *Plant Cell Online* **2010**, *22*, 1633–1646. [[CrossRef](#)]
131. Wang, Y.-Y.; Tsay, Y.-F. Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.9 Is Important in Phloem Nitrate Transport. *Plant Cell* **2011**, *23*, 1945–1957. [[CrossRef](#)]
132. Hsu, P.-K.; Tsay, Y.-F. Two phloem nitrate transporters, NRT1.11 and NRT1.12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth. *Plant Physiol.* **2013**, *163*, 844–856. [[CrossRef](#)]
133. Zhong, W.J.; Kaiser, W.; Kohler, J.; Bauer-Ruckdeschel, H.; Komor, E. Phloem loading of inorganic cations and anions by the seedling of *Ricinus communis* L. *J. Plant Physiol.* **1998**, *152*, 328–335. [[CrossRef](#)]
134. Adams, E.; Shin, R. Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **2014**, *56*, 231–249. [[CrossRef](#)]
135. Adams, H.D.; Zeppel, M.J.B.; Anderegg, W.R.L.; Hartmann, H.; Landhäusser, S.M.; Tissue, D.T.; Huxman, T.E.; Hudson, P.J.; Franz, T.E.; Allen, C.D.; et al. A multi-species synthesis of physiological mechanisms in drought-induced tree mortality. *Nat. Ecol. Evol.* **2017**, *1*, 1285–1291. [[CrossRef](#)]
136. Amtmann, A.; Armengaud, P.; Volkov, V. *Potassium Nutrition and Salt Stress*; Wiley Online Library: Hoboken, NJ, USA, 2018; Volume 15, ISBN 9781119312994.
137. Jeschke, W.D.; Pate, J.S.; Atkins, C.A. Partitioning of K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, and Ca<sup>++</sup> through Xylem and Phloem to Component Organs of Nodulated White Lupin under Mild Salinity. *J. Plant Physiol.* **1987**, *128*, 77–93. [[CrossRef](#)]
138. Van Bel, A.J.E.; Van Erven, A.J. Potassium co-transport and antiport during the uptake of sucrose and glutamic acid from the xylem cells. *Plant Sci. Lett.* **1979**, *15*, 285–291. [[CrossRef](#)]
139. Deeken, R.; Geiger, D.; Fromm, J.; Koroleva, O.; Ache, P.; Langenfeld-Heyser, R.; Sauer, N.; May, S.T.; Hedrich, R. Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. *Planta* **2002**, *216*, 334–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Gajdanowicz, P.; Michard, E.; Sandmann, M.; Rocha, M.; Corrêa, L.G.G.; Ramirez-Aguilar, S.J.; Gomez-Porras, J.L.; Gonzalez, W.; Thibaud, J.-B.; van Dongen, J.T.; et al. Potassium (K<sup>+</sup>) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 864–869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Dreyer, I.; Gomez-Porras, J.L.; Riedelsberger, J. The potassium battery: A mobile energy source for transport processes in plant vascular tissues. *New Phytol.* **2017**, *216*, 1049–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Berthomieu, P.; Conéjéro, G.; Nublat, A.; Brackenbury, W.J.; Lambert, C.; Savio, C.; Uozumi, N.; Oiki, S.; Yamada, K.; Cellier, F.; et al. Functional analysis of AtHKT1 in Arabidopsis shows that Na<sup>+</sup>recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* **2003**, *22*, 2004–2014. [[CrossRef](#)]
143. Kong, X.; Luo, Z.; Dong, H.; Eneji, A.E.; Li, W. Effects of non-uniform root zone salinity on water use, Na<sup>+</sup>recirculation, and Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> flux in cotton. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 2105–2116. [[CrossRef](#)]
144. Davenport, R.J.; Muñoz-Mayor, A.; Jha, D.; Essah, P.A.; Rus, A.; Tester, M. The Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na<sup>+</sup> from the xylem in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* **2007**, *30*, 497–507. [[CrossRef](#)]
145. Maathuis, F.J.M.; Ahmad, I.; Patishtan, J. Regulation of Na<sup>+</sup> fluxes in plants. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 1–9. [[CrossRef](#)]

146. Srivastava, S.; Upadhyay, M.; Srivastava, A.; Abdelrahman, M.; Suprasanna, P.; Tran, L.-S. Cellular and Subcellular Phosphate Transport Machinery in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Nagarajan, V.K.; Jain, A.; Poling, M.D.; Lewis, A.J.; Raghothama, K.G.; Smith, A.P. Arabidopsis Pht1;5 Mobilizes Phosphate between Source and Sink Organs and Influences the Interaction between Phosphate Homeostasis and Ethylene Signaling. *Plant Physiol.* **2011**, *156*, 1149–1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Wang, F.; Deng, M.; Xu, J.; Zhu, X.; Mao, C. Molecular mechanism of phosphate signaling in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *74*, 114–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Hayes, P.M.; Patrick, J.W.; Offler, C.E. The cellular pathway of radial transfer of photosynthates in stems of *Phaseolus vulgaris* L.: Effects of cellular plasmolysis and p-chloromercuribenzenesulphonic acid. *Ann. Bot.* **1987**, *59*, 635–642. [[CrossRef](#)]
150. Hayes, P.M.; Offler, C.E.; Patrick, J.W. Cellular structures, plasma membrane surface areas and plasmodesmatal frequencies of the stem of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to radial photosynthate transfer. *Ann. Bot.* **1985**, *56*, 125–138. [[CrossRef](#)]
151. Minchin, P.E.H.; Thorpe, M.R. Apoplastic phloem unloading in the stem of bean. *J. Exp. Bot.* **1984**, *35*, 538–550. [[CrossRef](#)]
152. Minchin, P.E.H.; Ryan, K.G.; Thorpe, M.R. Further evidence of apoplastic unloading into the stem of bean: Identification of the phloem buffering pool. *J. Exp. Bot.* **1984**, *35*, 1744–1753. [[CrossRef](#)]
153. Srivastava, A.C.; Ganesan, S.; Ismail, I.O.; Ayre, B.G. Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 sucrose/H<sup>+</sup> symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 200–211. [[CrossRef](#)]
154. Hafke, J.B.; van Amerongen, J.-K.; Kelling, F.; Furch, A.C.U.; Gaupels, F.; van Bel, A.J.E. Thermodynamic battle for photosynthate acquisition between sieve tubes and adjoining parenchyma in transport phloem. *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 1527–1537. [[CrossRef](#)]
155. Nardini, A.; Lo Gullo, M.A.; Salleo, S. Refilling embolized xylem conduits: Is it a matter of phloem unloading? *Plant Sci.* **2011**, *180*, 604–611. [[CrossRef](#)]
156. Hacke, U.G.; Laur, J. Xylem refilling—A question of sugar transporters and pH? *Plant Cell Environ.* **2016**, *39*, 2347–2349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Dinant, S.; Wolff, N.; De Marco, F.; Vilaine, F.; Gissot, L.; Aubry, E.; Sandt, C.; Bellini, C.; Le Hir, R. Synchrotron FTIR and Raman spectroscopy provide unique spectral fingerprints for Arabidopsis floral stem vascular tissues. *BioRxiv* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Sundell, D.; Street, N.R.; Kumar, M.; Mellerowicz, E.J.; Kucukoglu, M.; Johnsson, C.; Kumar, V.; Mannapperuma, C.; Delhomme, N.; Nilsson, O.; et al. AspWood: High-Spatial-Resolution Transcriptome Profiles Reveal Uncharacterized Modularity of Wood Formation in *Populus tremula*. *Plant Cell* **2017**, *29*, 1585–1604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Cui, H.; Kong, D.; Liu, X.; Hao, Y. SCARECROW, SCR-LIKE 23 and SHORT-ROOT control bundle sheath cell fate and function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2014**, *78*, 319–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Botha, C.E.J.; van Bel, A.J.E. Quantification of symplastic continuity as visualised by plasmodesmograms: Diagnostic value for phloem-loading pathways. *Planta* **1992**, *187*, 359–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Fisher, D.G. Ultrastructure, plasmodesmatal frequency, and solute concentration in green areas of variegated *Coleus blumei* Benth. leaves. *Planta* **1986**, *169*, 141–152. [[CrossRef](#)]
162. Botha, C.E.J.; Aoki, N.; Scofield, G.N.; Liu, L.; Furbank, R.T.; White, R.G. A xylem sap retrieval pathway in rice leaf blades: Evidence of a role for endocytosis? *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 2945–2954. [[CrossRef](#)]
163. Liesche, J.; Schulz, A. Quantification of plant cell coupling with three-dimensional photoactivation microscopy. *J. Microsc.* **2012**, *247*, 2–9. [[CrossRef](#)]
164. Liesche, J.; Schulz, A. In vivo quantification of cell coupling in plants with different phloem-loading strategies. *Plant Physiol.* **2012**, *159*, 355–365. [[CrossRef](#)]
165. Shani, E.; Weinstain, R.; Zhang, Y.; Castillejo, C.; Kaiserli, E.; Chory, J.; Tsien, R.Y.; Estelle, M. Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of Arabidopsis root. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**. [[CrossRef](#)]
166. Irani, N.G.; Di Rubbo, S.; Mylle, E.; Van den Begin, J.; Schneider-Pizoń, J.; Hniliková, J.; Šiša, M.; Buyst, D.; Vilarrasa-Blasi, J.; Szatmári, A.-M.; et al. Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. *Nat. Chem. Biol.* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

167. Park, J.; Kim, H.K.; Ryu, J.; Ahn, S.; Lee, S.J.; Hwang, I. Functional water flow pathways and hydraulic regulation in the xylem network of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **2015**, *56*, 520–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Knox, K.; Paterlini, A.; Thomson, S.; Oparka, K.J. The coumarin glucoside, esculin, reveals rapid changes in phloem-transport velocity in response to environmental cues. *Plant Physiol.* **2018**, *44*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Sugita, R.; Kobayashi, N.I.; Hirose, A.; Saito, T.; Iwata, R.; Tanoi, K.; Nakanishi, T.M. Visualization of uptake of mineral elements and the dynamics of photosynthates in arabidopsis by a newly developed Real-Time Radioisotope Imaging System (RRIS). *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 743–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Hubeau, M.; Steppe, K. Plant-PET Scans: In Vivo Mapping of Xylem and Phloem Functioning. *Trends Plant Sci.* **2015**, *20*, 676–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Shulse, C.N.; Cole, B.J.; Turco, G.M.; Zhu, Y.; Brady, S.M.; Dickel, D.E. High-throughput single-cell transcriptome profiling of plant cell types. *bioRxiv* **2018**, 1–19. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



---

## II. MATERIEL ET METHODES

---



### 1. Matériel végétal

#### 1.1. Préparation des graines

Quel que soit l'expérimentation, les graines ont été stérilisées puis vernalisées dans 0.1 % d'Agar pendant 48h à 4°C avant d'être semées en serre ou en chambre de culture. Les graines ont été stérilisées sous hotte avec une solution de stérilisation composée de 2 ml d'une solution de javel (2 comprimés de javel dans 50 ml d'eau distillée) et de 8 ml d'éthanol 96° durant 5 minutes en prenant soin de bien remué. Les graines sont ensuite lavées dans une solution d'éthanol 96°C durant 1 minute avant d'être séchées tube ouvert sous la hotte durant une nuit.

#### 1.2. Production des lignées mutantes *sweet*

Dans l'équipe, des lignées d'*Arabidopsis thaliana* portant une insertion ADN-T au niveau des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16*, ou *SWEET17* ont été précédemment produites. Ces lignées ont été caractérisées comme étant des allèles nuls (Chardon et al., 2013 ; Le Hir et al., 2015) (Figure 13). Les lignées doublement mutées *swt11swt12* et *sweet16sweet17* et la lignée triplement mutée *swt11swt12swt16* ont été précédemment obtenues par croisement dans l'équipe. Dans le cadre de ma thèse, j'ai réalisé des croisements entre les mutants *swt16swt17* et *swt11swt12swt16* afin d'obtenir le triple mutant *swt11swt12swt17* et le quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17*.

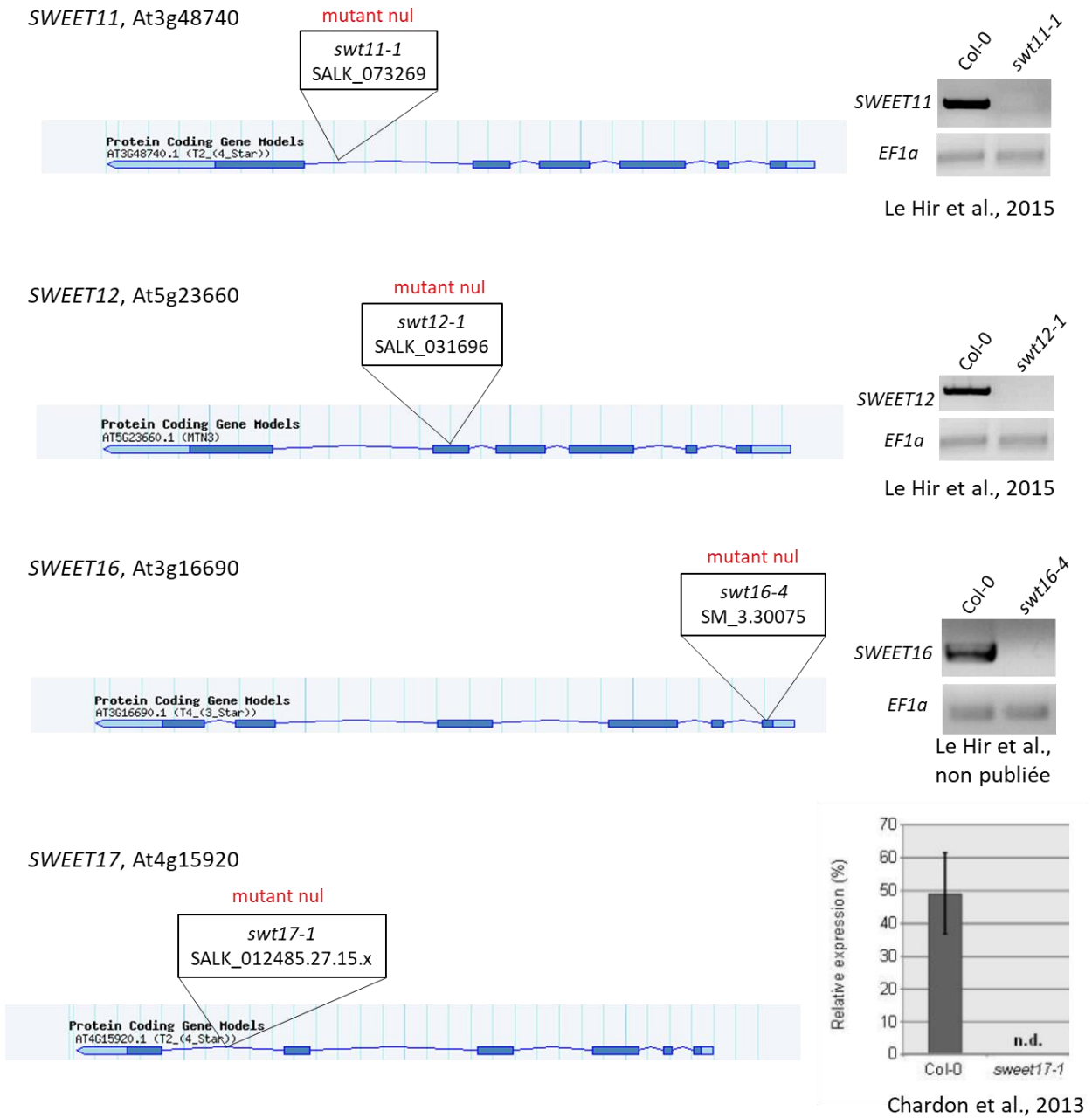
#### 1.3. Génotypage des lignées par PCR (Polymerase Chain Reaction)

##### 1.3.1. Extraction d'ADN

Environ 200 graines issues du croisement entre le double mutant *swt16swt17* et le triple mutant *swt11swt12swt16* ont été semées en serre afin d'identifier le triple mutant *swt11swt12swt17* et le quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17*. Après environ 15 jours de croissance une feuille de chaque plante a été récoltée dans un tube contenant une bille d'acier de 3 mm et 500 µl de tampon d'extraction (Tris HCl pH 7.5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5 %) (Edwards et al., 1991). Après broyage au broyeur à bille à la fréquence de 30Hz pendant 2 min, les échantillons sont laissés dans une étude à 65°C pendant 15 min. L'ADN est séparé des débris cellulaires par une centrifugation de 10 min à 4000 rpm et 4°C. Après centrifugation, 120 µl du surnageant sont prélevés et ajoutés à 120 µl d'isopropanol, et le mélange est ensuite centrifugé pendant 10 min à 4000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé à l'éthanol 75%. Après une centrifugation de 5 min à 4000 rpm l'éthanol est éliminé puis le culot séché 15 min à 65°C avant d'être resuspendu dans 100 µL d'eau milliQ.



## II. MATERIEL ET METHODES



**Figure 13 : Représentation graphique des lignées mutées dans l'expression des *SWEETs***

Localisation des insertions d'ADN-T dans les gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et *SWEET17* avec le mutant nul *swt11-1* (lignée SALK) (Le Hir et al., 2015), le mutant nul *swt12-1* (lignée SALK) (Le Hir et al., 2015), le mutant nul *swt16-4* (lignée SM) et le mutant nul *swt17-1* (lignée SALK) (Chardon et al., 2013).

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1.3.2. Génotypage par PCR

Des PCR de génotypage ont été réalisées sur les ADN précédemment extraits. Les amorces de génotypage utilisées pour les lignées *swt11-1* (SALK\_073269), *swt12-2* (SALK\_031696), *swt16-4* (SM\_3.30075) et *swt17-1* (SALK\_012485.27.15.x) et les amorces interne à l'ADN-T de type LBb1,3 (lignée SALK) ou Spm32 (Lignée SM) (Tableau SI). Les réactions de PCR ont été réalisées dans des plaques de 96 puits. Chaque réaction PCR a été faite en combinant 20 µl de Mix PCR et 5 µl d'ADN de l'échantillon végétal. Le Mix PCR contient 2,5 µl de tampon, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl de dNTPs (25 mM), 0,3 µl de chaque amorces (100 mM), et 0,2 µl de DreamTaq (ThermoFisher Scientifique). Le programme PCR était le suivant : 94°C 5 minutes puis 40 cycles de 30 sec à 96°C (dénaturation), 30 sec à 58°C (hybridation avec les amorces) et 1 min à 72°C (élongation du fragment d'ADN). L'élongation finale se fait à 72°C pendant 5 min. 10 µl de chaque réaction de PCR est ensuite mis à migrer dans un gel d'agarose à 1% (w/v) contenant du bromure d'éthidium (BET) comme agent intercalant. La révélation se fait sous la lumière UV.

## 2. Conditions de culture

### 2.1. Cultures réalisées au cours de ma thèse

Au cours de ma thèse, j'ai réalisé plusieurs cultures afin de reproduire les phénotypes observés. Les résultats présentés dans les chapitres sont issus d'une même culture mais de nombreux phénotypes ont été répétés plusieurs fois au cours de ma thèse à partir de cultures différentes (Tableau SIII). Les résultats présentés dans les Chapitres 1 et 2 sont issus de plantes cultivées dans les mêmes conditions. Cette culture comprenait 8 plantes par génotype avec les 10 génotypes suivants : WT, *swt11*, *swt12*, *swt16*, *swt17*, *swt11swt12*, *swt16swt17*, *swt11swt12swt16*, *swt11swt12swt17* et le quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17*.


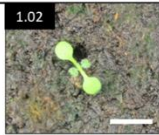
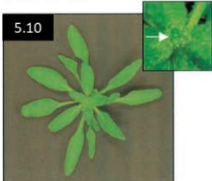


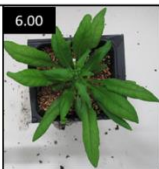
### 2.2. Condition de culture en jours longs

La germination des graines a été synchronisée en stratifiant les graines dans un milieu liquide contenant 0,1 % d'agar conservées à 4°C durant 48 heures. Les graines ont par la suite été semées en sol en chambre de culture dans des plaques contenant 24 pots en prenant soin de semées 2 à 3 graines par pot. Le semis et la croissance des graines ont été réalisés en chambre de culture en conditions de jours longs avec une photopériode de 16 h d'exposition lumineuse

## II. MATERIEL ET METHODES

contre 8 h d'obscurité. Après avoir retiré les plantules supplémentaires afin de ne garder qu'une plantule par pot, les plantes ont été réparties aléatoirement au sein de chaque plateau et dans la chambre de culture. Dans cette chambre de culture, la température de jour est de 22°C et celle de nuit est de 18°C. Les lampes à sodium présentes dans la chambre de culture ont une irradiance de 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  au niveau de la rosette. Les plantes ont été arrosées avec une solution nutritive de type NPK deux fois par semaine. Le matériel végétal a été récolté après 49 jours de croissance soit 7 semaines de croissance. Les stades de développement des plantes en conditions de jours longs plantes sont représentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

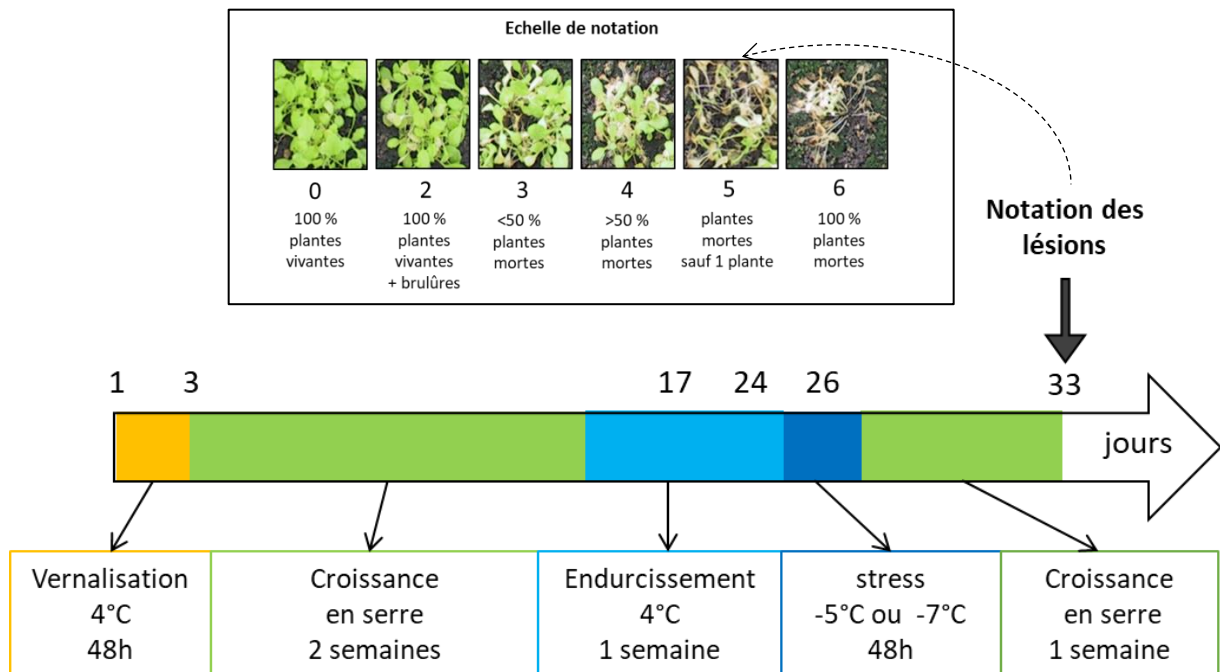
**Tableau I : Représentation des stades de développement des plantes en conditions de jours longs décrit par Boyes et al., 2001 en serre et dans nos conditions de culture en jours longs**

Stade de développement	Description	Serre (Boyes et al., 2001)		Phénotype	Chambre de culture jours longs (Thèse)	
		DAS	SD		DAS	Phénotype
<b>Stade 1</b>	<b>Développement foliaire</b>					
1.02	2 feuilles de taille > 1mm	12,5	1,3		7	
1.03	3 feuilles de taille > 1mm	15,9	1,5		[10-11]	
1.04	4 feuilles de taille > 1mm	16,5	1,6			
1.05	5 feuilles de taille > 1mm	17,7	1,8			
1.06	6 feuilles de taille > 1mm	18,4	1,8			
1.07	7 feuilles de taille > 1mm	19,4	2,2			
1.08	8 feuilles de taille > 1mm	20,0	2,2			
1.09	9 feuilles de taille > 1mm	21,1	2,3			
1.10	10 feuilles de taille > 1mm	21,6	2,3		21	
1.11	11 feuilles de taille > 1mm	22,2	2,5			
1.12	12 feuilles de taille > 1mm	23,3	2,6			
1.13	13 feuilles de taille > 1mm	24,8	3,2			
1.14	14 feuilles de taille > 1mm	25,5	2,6			
<b>Stade 3</b>	<b>Croissance de la rosette</b>					
3.20	Rosette atteint 20% de sa taille finale	18,9	3,0			
3.50	Rosette atteint 50% de sa taille finale	24,0	4,1			
3.70	Rosette atteint 70% de sa taille finale	27,4	4,1			
3.90	Croissance maximale de la rosette	29,3	3,5		35	
<b>Stade 5</b>	<b>Emergence de l'inflorescence</b>					
5.10	Apparition du bouton floral	26,0	3,5		28	
<b>Stade 6</b>	<b>Production de fleurs</b>					
6.00	Première fleur ouverte	31,8	3,6		[32-35]	
6.10	10% des fleurs produites ouvertes	35,9	4,9			
6.30	30% des fleurs produites ouvertes	40,1	4,9			
6.50	50% des fleurs produites ouvertes	43,5	4,9			
6.90	100% des fleurs produites ouvertes	49,4	5,8			
<b>Stade 8</b>	<b>Remplissage de la graine</b>					
8.00	Première siliqua ouverte	48,0	4,5			
<b>Stade 9</b>	<b>Senescence</b>					
9.70	Senescence achevée	NA	NA			

2.3. Condition de culture en condition de stress

2.3.1. Condition de culture pour la contrainte gel

Une analyse de la tolérance au gel du WT et des lignées *sweet* a été réalisée en collaboration avec Carine Géry et Evelyne Téoulé de l'équipe Variabilité et Tolérance aux stress abiotiques de l'IJPB selon le protocole publié par McKhann et al. (2008). Les graines ont tout d'abord été vernalisées 48 heures à 4°C à l'obscurité dans 2 ml d'Agar 0.1 %. Les graines (150 µl) ont ensuite été semées en serre dans des terrines de 12 \* 15 cm sous forme de poquet. Après deux semaines de croissance en serre, les plantes ont été transférées à 17h30 dans une chambre de culture à 4°C avec une photopériode de 12 heures jour/nuit. Après 7 jours d'endurcissement à 4°C, les plantes ont été transférées à 17h30 à -5°C ou -7°C selon le stress étudié. La durée de stress est de 48 heures, elles sont par la suite de nouveau transférées en serre à 17h30. Après une semaine de croissance en serre, les poquets sont alors photographiés et annotés selon l'échelle de notation suivante (Figure 14). Les notations ont été réalisées par deux personnes différentes et des moyennes ont été réalisées sur les notations provenant des deux personnes différentes (Figure 14).



**Figure 14 : Représentation schématique des conditions de croissance pour le stress gel**

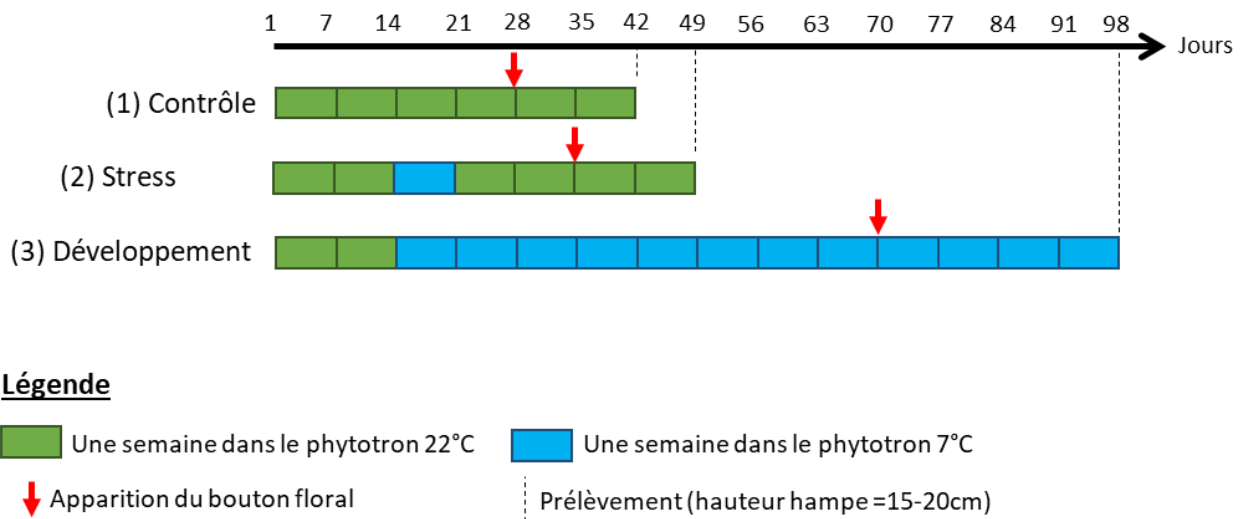
Représentation des différentes étapes de croissance en fonction du temps (jours) avec 48h de vernalisation (en jaune), deux semaines en serre (en vert), 7 jours d'acclimatation à 4°C (en bleu clair), 48h de contrainte -5°C ou -7°C (en bleu foncé), une semaine en serre (en vert) avec la date de notation des lésions le 33<sup>ème</sup> jour de croissance.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 2.3.2. Condition de culture pour la contrainte température fraîche

Les expérimentations de températures fraîches ont été réalisées dans des phytotrons en conditions contrôlées. Trois conditions de culture ont été appliquées : (1) une condition « Contrôle », (2) une condition « Stress » et (3) une condition « Développement » (Figure 15). Deux phytotrons étaient à disposition, un alloué à la température 22°C, le second réglé à une température 7°C. Les deux phytotrons ont les mêmes conditions de culture à savoir des conditions de jours longs avec 16 h d'exposition lumineuse contre 8 h de nuit. Les installations lumineuses sont des lampes LED neuves avec une irradianance de 170µmol/m<sup>2</sup>/s. Les plantes ont été arrosées 1 à 2 fois par semaine selon l'humidité de la motte.

#### Protocole expérimental



**Figure 15 : Représentation des trois conditions de culture de température fraîche 7°C**

Représentation schématisée du nombre de semaines passées à 22°C (en vert) et à 7°C (en bleu) en fonction des conditions de cultures (1) contrôle, (2) stress, (3) développement.

Les génotypes WT, les deux doubles mutants *swt11swt12*, *swt16swt17* et le quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17* ont été analysés. Dans chaque condition, 5 plantes par génotype ont été analysés. Ces expérimentations ont été répétées trois fois durant ma thèse. Les résultats présentés dans le Chapitre 3 correspondent aux résultats d'une seule culture.

## II. MATERIEL ET METHODES

### (1) Condition « Contrôle »

La condition « Contrôle » correspond à la croissance des plantes à 22°C tout au long de leur croissance (Figure 15).

### (2) Condition « Stress »

Dans la condition « Stress » les plantes ont tout d'abord cultivées pendant 14 jours de croissance à 22°C puis elles ont été transférées le 14<sup>ème</sup> jour dans le phytotron à 7°C. Les plantes ont ensuite été de nouveau transférées le 21<sup>ème</sup> jour dans le phytotron à 22°C. Les plantes ont terminé leur croissance dans le phytotron à 22°C jusqu'au prélèvement du matériel végétal (Figure 15).

### (3) Condition « Développement »

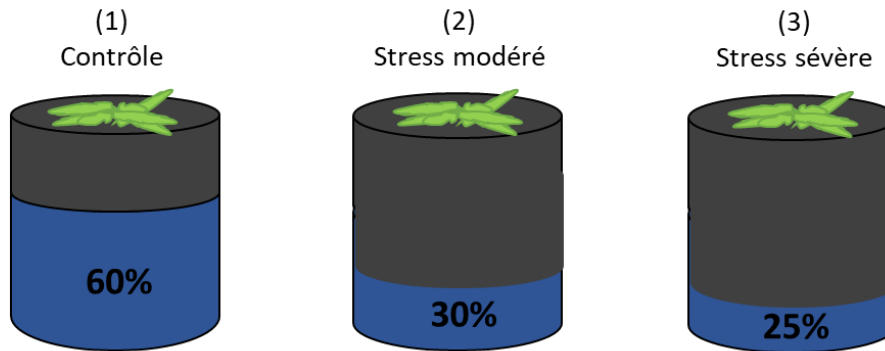
Dans la condition « Développement » Les plantes ont, comme pour les deux autres conditions, passées les deux premières semaines de croissance à 22°C. Les plantes ont par la suite été transférées dans le phytotron à 7°C et le matériel végétal a été prélevé lorsque la hampe florale atteignait 15 à 20 cm de hauteur (Figure 15).

### 2.3.3. Condition de culture pour la contrainte sécheresse

Les génotypes de type sauvage (WT), les deux doubles mutants *swt11swt12*, *swt16swt17* et le quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17* ont été analysés en conditions de stress sécheresse sur le phénoscope à l'IJPB à Versailles. Le phénoscope est une plateforme de phénotypage haut débit. En effet, cet équipement permet la croissance de 600 plantes et est une plateforme permettant l'analyse de phénotypes en conditions de stress. Le phénoscope permet de peser la motte sur lesquels croient les plantes afin d'ajuster le contenu en eau le plus précisément possible. Ainsi, trois conditions de stress ont été appliquées : (1) condition « Contrôle » dans laquelle le contenu en eau de la motte est de 60 % (60 % SWC, Soil Water Content), (2) condition « Stress modéré » dans laquelle le contenu en eau de la motte est de 30 % (30% SWC), et (3) la condition « Stress sévère » dans laquelle le contenu en eau de la motte est de 25 % (25 % SWC) (Figure 16). Le phénoscope est équipée d'une caméra visible et infra-rouge permettant de prendre quotidiennement des photographies et de mesurer ainsi la surface verte projetée.



## II. MATERIEL ET METHODES



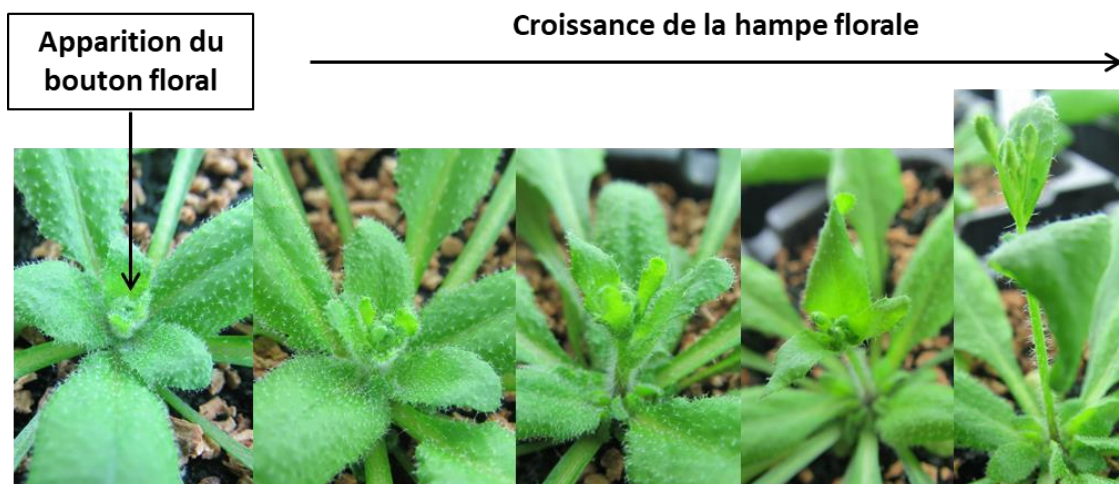
**Figure 16** : Représentation schématique du contenu en eau appliqué en condition de stress sécheresse

La condition contrôle (1) correspond à 60 % d'eau dans la motte, la condition stress modéré correspond à 30% d'eau dans la motte et la condition stress sévère correspond à 25% d'eau dans la motte.

### 3. Mesures des paramètres de croissance de la plante

#### 3.1. Critères de détermination de l'émergence du bouton floral

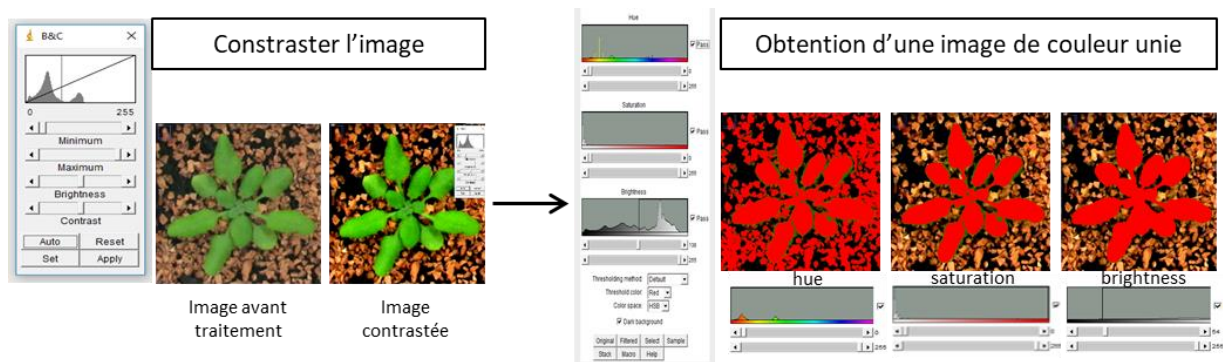
Le critère d'émergence du bouton floral a été déterminé visuellement lorsque le bouton floral fait plus de 0,5 cm de hauteur. Dans nos conditions de culture en jours longs, l'apparition du bouton floral a été relevé à 28 jours, pour tous les génotypes et ce critère a été répété dans toutes les cultures effectuées (Figure 17).



**Figure 17** : Photographie de l'apparition du bouton floral : critère retenu pour déterminer l'émergence du bouton floral chez les différentes lignées

### 3.2. Mesures de la surface verte projetée

Afin de mesurer la surface verte projetée, j'ai pris des photographies des plantes individuellement à l'aide d'un trépied afin de les prendre à la même distance tout en prenant soin de mettre une échelle. J'ai réalisé ces photographies tous les deux à trois jours du 1<sup>er</sup> jour après semis jusqu'au 38<sup>ème</sup> jour afin de pouvoir suivre la croissance de la rosette au cours du temps. En effet, après le 38<sup>ème</sup> jour, il devient difficile d'effectuer l'analyse d'image avec une hampe florale de 15 cm de hauteur. Les mesures de surface verte projetée ont été réalisées avec le logiciel ImageJ (ImageJ 1.37 ; NIH, Bethesda, MD, USA). Après avoir pris soin de calibrer l'échelle sur les photographies et de l'avoir appliquée à toutes les photographies, le contraste des photographies a été modifié afin de pouvoir obtenir une rosette de couleur unie à l'outil Threshold. En modifiant la saturation et la luminosité de l'image, la rosette est alors de couleur unie et peut être sélectionnée avec le curseur « wand tracing tool ». Le logiciel mesure alors la surface de l'élément sélectionné (Figure 18).



**Figure 18:** Représentation du traitement d'image pour mesurer la surface verte projetée de la rosette

Utilisation du logiciel ImageJ pour traiter l'image (la contraster et obtenir une rosette de couleur unie) afin de pouvoir sélectionner la totalité de la rosette et mesurer la surface de l'objet sélectionné.

J'ai réalisé ces mesures sur 8 plantes pour chaque génotype et ait calculé à l'aide du logiciel Excel la moyenne à chaque date de photographie. Ainsi, j'ai pu réaliser une cinétique de croissance de la rosette au cours du temps. Ainsi, j'ai calculé la vitesse de croissance à savoir la différence de surface verte projetée d'un génotype entre la date  $t^{n+1}$  et  $t^n$ , divisé par le nombre de jours séparant ces deux dates selon la formule suivante ci-après.



## II. MATERIEL ET METHODES

$$\text{Vitesse de croissance (cm}^2\text{/j)} = \frac{[\text{Surface verte projetée}] t^{n+1} - [\text{Surface verte projetée}] t^n}{t^{n+1} - t^n}$$

### 3.3. Mesures effectuées sur la hampe florale principale et les organes axillaires

➤ Mesures de la hauteur de la hampe florale principale

La hauteur de la hampe florale de chaque plante a été mesurée en chambre de culture sur le plateau à l'aide d'un triple décimètre. Les mesures ont été effectuées quelques heures avant le prélèvement du matériel végétal.

➤ Comptabilisation du nombre d'inflorescences latérales et mesures de la taille des entre-nœuds

Le nombre d'inflorescences latérales a été comptabilisé sur plante entière. Il s'agit des hampes latérales qui se développent sur la hampe florale principale. La taille des entre-nœuds séparant deux inflorescences latérales a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse. Le premier entre-nœud correspond à la distance séparant la base de la hampe florale et la première inflorescence latérale.

➤ Comptabilisation du nombre de siliques sur la hampe florale principale

Le nombre de siliques situées sur la hampe florale principale a également été comptabilisé le 44<sup>ème</sup> jour de croissance. Toutes les siliques ont été prises en compte à savoir les siliques les plus matures se trouvant à mi-hauteur de la hampe florale et les siliques les plus jeunes situées sous le bouton floral.

➤ Mesures du pourcentage de carbone et d'azote dans les siliques par EA-IRMS

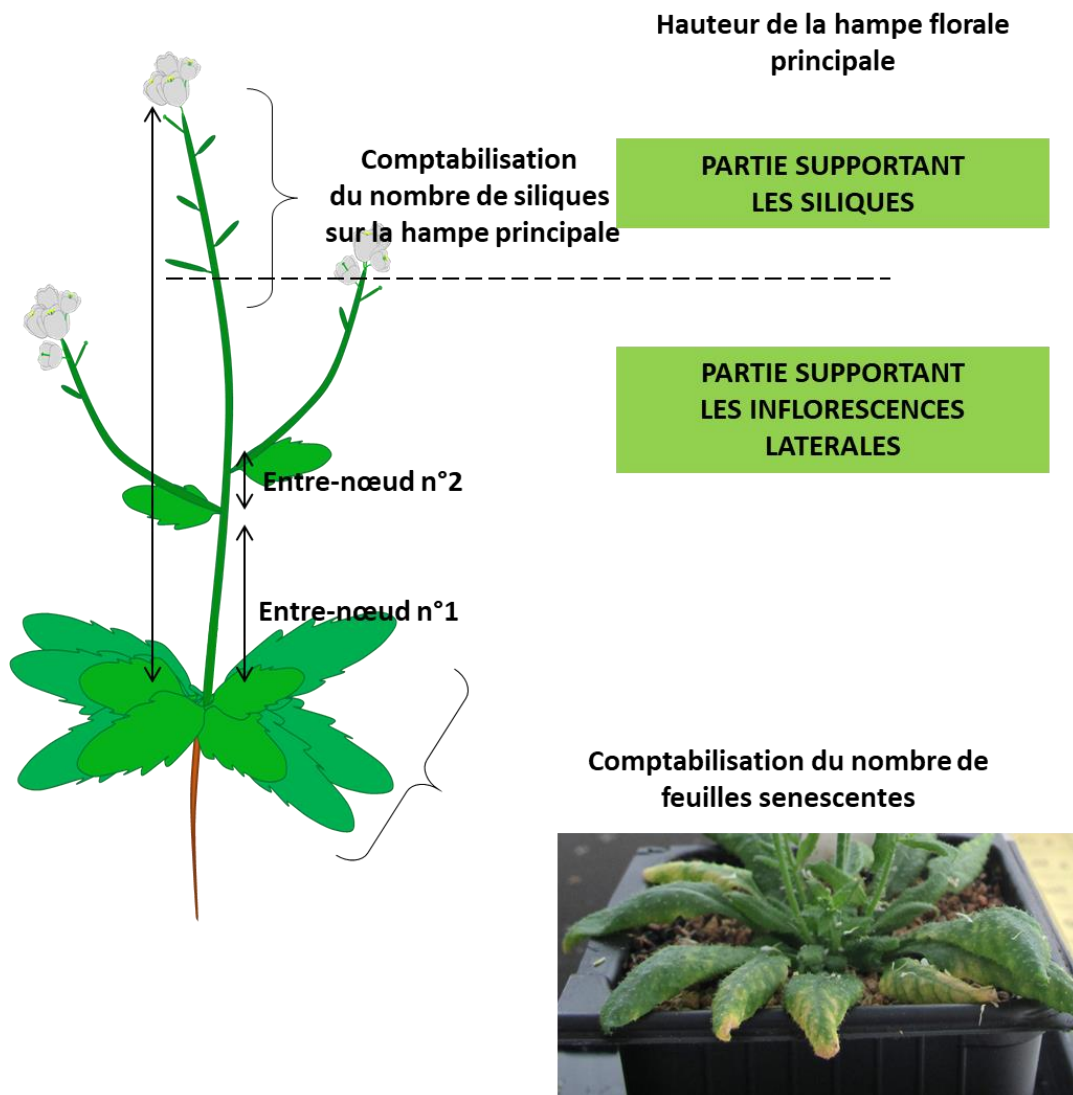
En collaboration avec Fabien Chardon et Anne Marmagne de l'équipe SATURNE à l'IJPB de Versailles des analyses de poids de siliques et de ratio C/N ont été réalisés sur une culture indépendante. Cependant, les phénotypes les plus robustes tel que la cinétique de croissance de la rosette et le diamètre de la hampe florale des lignées mutantes ont été mesurés. Toutes les siliques de la hampe florale principale ont été prélevés le 49<sup>ème</sup> jour de croissance, broyés puis placés dans des capsules en étain dans une étuve à 70°C durant 24h. Les échantillons ont été analysés par un analyseur élémentaire (EA) couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS, NA1500, Carlo Erba, GV Instruments, UK) Cet appareil de mesure permet

## II. MATERIEL ET METHODES

de mesurer l'abondance relative des isotopes du carbone et de l'azote. Les échantillons sont alors brûlés, réduits puis séparés en chromatographie en phase gazeuse. Enfin, les données ont été traitées par Anne Marmagne afin d'obtenir les abondances relatives des rapports isotopiques.

### 3.4. Comptabilisation du nombre de feuilles sénescentes

Le nombre de feuilles sénescentes a été comptabilisé le 44<sup>ème</sup> jour de croissance, soit 5 jours avant le prélèvement du matériel végétal. J'ai appelé feuilles sénescentes les feuilles de couleur jaune qui présentaient une chlorose au niveau des nervures principales des feuilles de rosette (Figure 19).



**Figure 19** : Représentation schématique des mesures effectuées sur la hampe florale principale, les organes latéraux et la comptabilisation du nombre de feuilles sénescentes

#### 4. Analyses morphologiques de la hampe florale

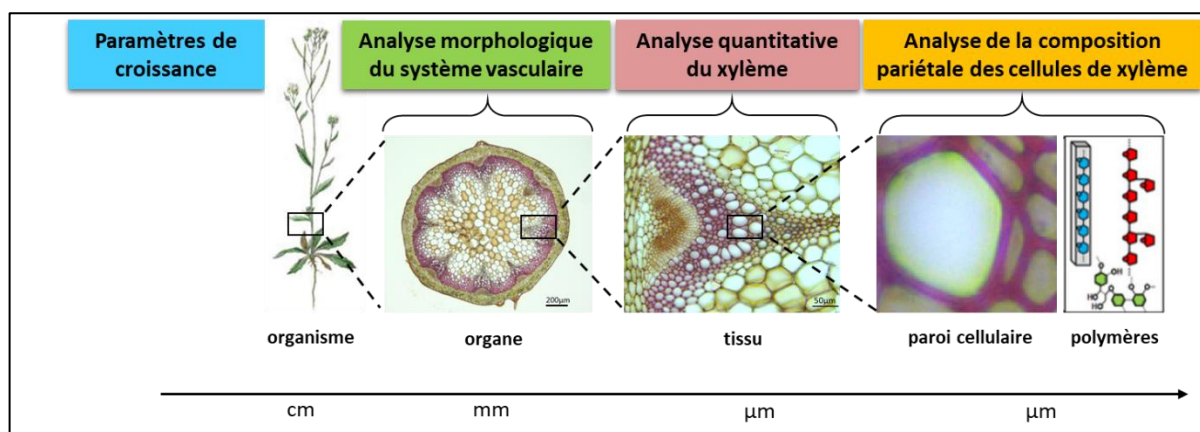
##### 4.1. Matériel végétal et préparation des échantillons

###### 4.1.1. Inclusion des échantillons dans l'agarose

La récolte du matériel végétal a été effectuée après sept semaines de croissance. Une section de 1,5 cm de hauteur situé dans le premier entre-nœud à la base de la hampe florale principale a été récolté et inclus dans de l'agarose 8% (w/v). Pour ce faire, 1 ml d'agarose a été déposé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml préalablement placés dans un bain-marie de 75°C. Après une minute au repos sur la paillasse, le temps que l'agarose refroidisse légèrement, les sections de hampe florale ont été placés verticalement dans le tube. Les échantillons sont ensuite placés une nuit au réfrigérateur à 4°C afin que l'agarose durcisse.

###### 4.1.2. Réalisation des coupes transversales

Des coupes transversales de 50 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un vibratome Leica VT1000S. Pour ce faire, l'appareil de coupe a été réglé à une fréquence rapide de 7 et une vitesse intermédiaire de 7. 20 coupes ont été réalisées par échantillon et les coupes sont conservés dans de l'éthanol 70% au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation. Les coupes obtenues ont été utilisées pour les analyses morphologiques du système vasculaire et les analyses de spectroscopie infra-rouge (Figure 20)



**Figure 20:** Représentation schématique des analyses réalisées sur les sections basales de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*

##### 4.2. Caractérisation morphologique

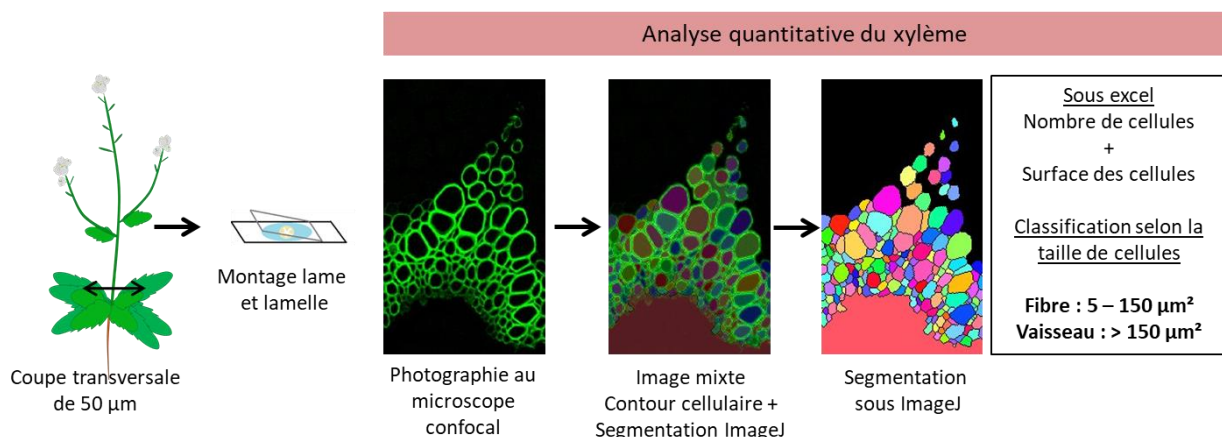
Les coupes transversales de hampes florales précédemment obtenues ont été colorés dans une dilution au 1/10<sup>ème</sup> d'un mélange contenant 5 mL de Safranine O et 5 mL de Bleu Alcian

## II. MATERIEL ET METHODES

(Tolivia et Tolivia, 1987), pendant 30 secondes. Ce colorant permet de différencier les tissus lignifiés (en rouge), des tissus non lignifiés (en vert). Elles ont par la suite été rincées dans trois bains successifs d'eau stérile. Chaque coupe a été montée dans de l'eau entre lame et lamelle. Les photographies des coupes ont été réalisées avec un microscope photonique de type Axio zoom V16 équipé d'un objectif Plan-NEOFLUARZ 2.3x/0.57 FWD 10.6mm. Les images obtenues ont permis de réaliser des mesures de surface totale des sections basales de hampe florale à l'aide du logiciel ImageJ (ImageJ 1.37; NIH, Bethesda, MD, USA).

### 4.3. Analyse quantitative des pôles de xylème

Les coupes ont également été observées au microscope confocal Leica TCS-SP2-AOBS avec un objectif HC PL APO x-20. Grâce à l'autofluorescence naturelle de la lignine, les images ont permis de réaliser une segmentation morphologique des différentes cellules composant le xylème. Ainsi, les échantillons ont été excités par le laser Argon à 488 nm et l'auto-fluorescence en résultant a été collectée entre 512 et 590 nm. 5 plantes par génotype ont été observés et tous les pôles de xylème ont été identifiés selon la classification de Park et al., 2015 et ont été photographiés au même grossissement. Ces photographies ont par la suite été traitées sous ImageJ (ImageJ 1.37; NIH, Bethesda, MD, USA) à l'aide d'une méthode utilisée dans l'équipe permettant d'individualiser chaque cellule lignifiée de xylème et de mesurer ainsi leurs surfaces respectives (Le Hir et al., 2015, Figure 21). Les données ont été traitées sous Excel afin de dénombrer les cellules du xylème selon leurs tailles (5-150  $\mu\text{m}^2$  correspondant à des fibres et de 150 à 850  $\mu\text{m}^2$  correspondant aux vaisseaux). Ces analyses ont permis de comparer la morphologie du xylème des différents génotypes.

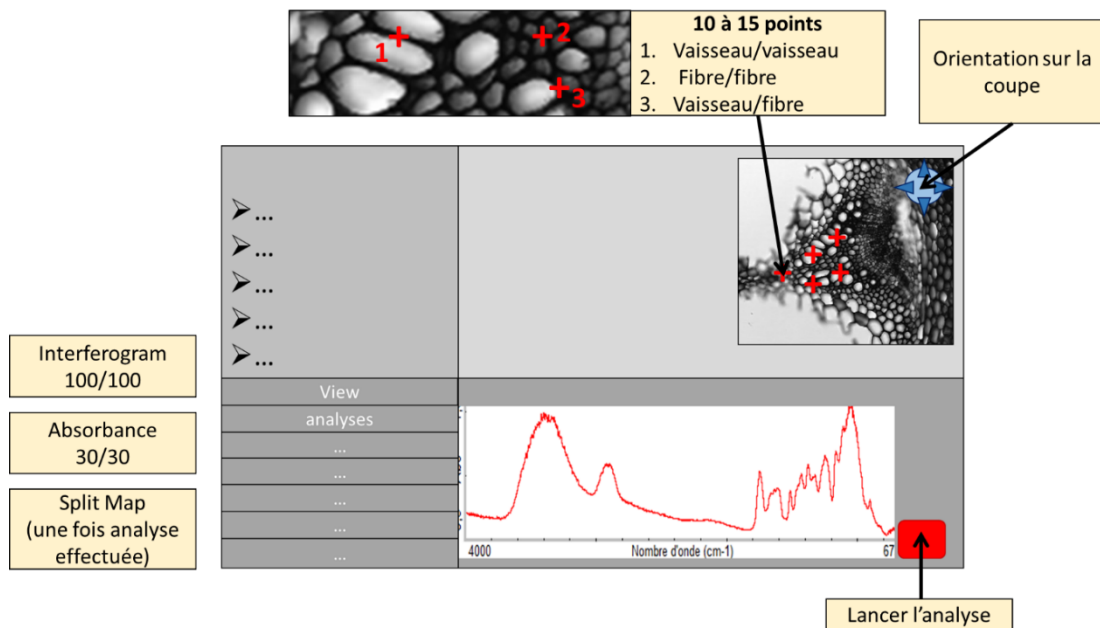


**Figure 21** : Représentation schématique de l'analyse quantitative réalisée sur les pôles de xylème dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*

**5. Analyse de la composition pariétale par Spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR)**

**5.1. Acquisition spectrale**

Lors de mon stage de M2, l'analyse de la composition des parois du xylème des WT, *sweet16*, *sweet17*, *sweet16sweet17*, *sweet11sweet12* et *sweet11sweet12sweet16* a été réalisée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) sur l'appareil FT-IR 10 NicoletTMiNTM disponible au synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE) situé à Paris-Saclay. Les acquisitions ont été réalisées en mode transmission sur une surface de 30 µm \* 30 µm ciblant les cellules du xylème (Figure 22). Dans le cadre de ma thèse, l'analyse de la composition pariétale des lignées WT, *sweet17*, *sweet11sweet12sweet17* et *sweet11sweet12sweet16sweet17* a été réalisée sur l'appareil FT-IR 10 NicoletTMiNTM disponible dans l'entreprise ThermoFisher aux Ulis dans la zone commerciale de Courtaboeuf. Les analyses ont été réalisées sur les sections basales de la hampe florale de 50 µm d'épaisseur. Elles ont été conservées à 4°C dans de l'éthanol 70°C avant d'être déposées et séchées sur des lames BaF<sub>2</sub>, un matériau qui permet le passage des rayons infra-rouges. J'ai réalisé entre 8 et 10 points d'acquisition pour chaque pôle de xylème en prenant soin de nommer le type de pôle vasculaire décrit par Park et al. (2015). Les acquisitions spectrales ont été réalisées sur tous les pôles de xylème (10 en moyenne) d'une section basale de plante (Figure 22). Entre trois et quatre individus par génotype ont été analysés. Le logiciel OmnicSpectra permet de collecter les spectres dans la région 800 cm<sup>-1</sup> à 1800 cm<sup>-1</sup>.



**Figure 22:** Représentation schématique de l'acquisition spectrale réalisée en spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier

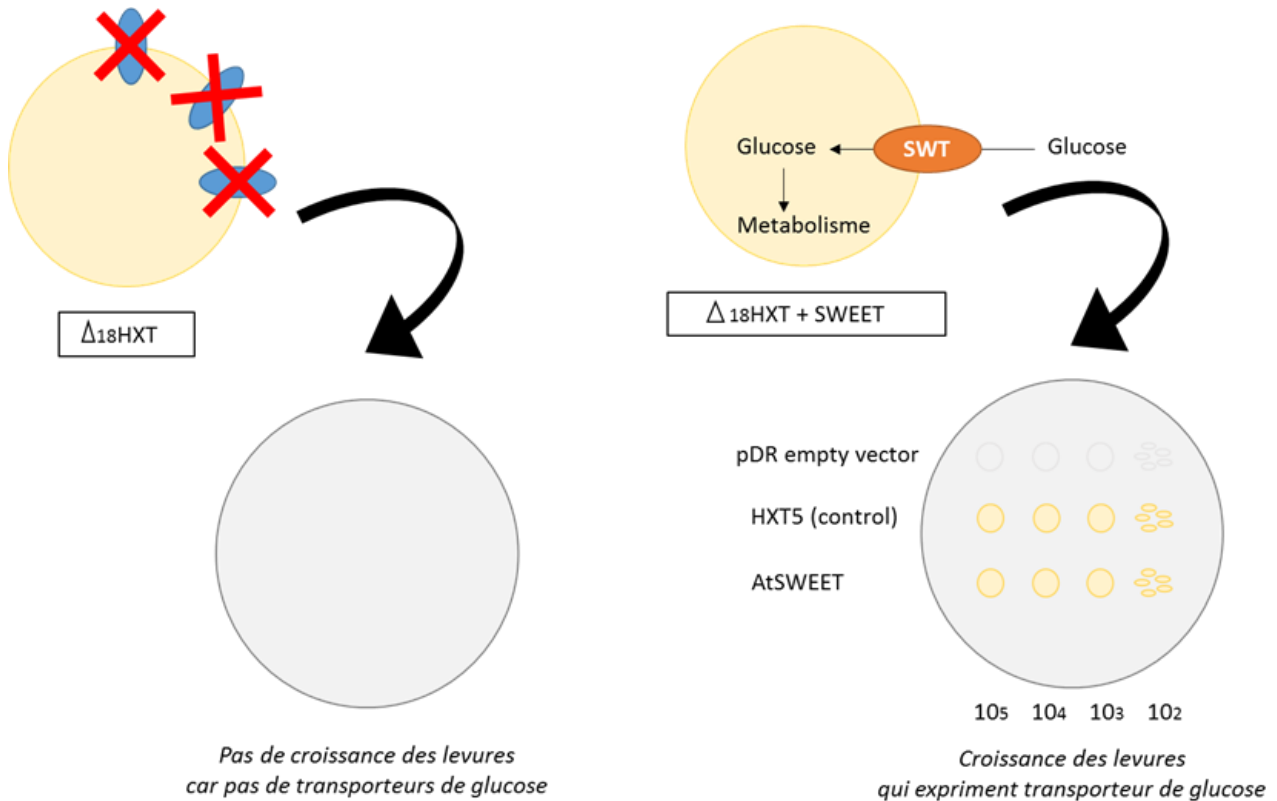
### 5.2. Traitement de données et analyses statistiques

Une fois les spectres acquis, je les ai triés sous le logiciel OmnicSpectra afin de vérifier l'homogénéité des absorbances en écartant les spectres ayant trop de bruit de fond, ceux dont l'absorbance est inférieure à 0,00010 ou ceux dont l'absorbance est supérieure à 0,002. Les étapes de correction de la ligne de bases de normalisation et d'analyse statistique ont été réalisées à l'aide de scripts sous le logiciel statistique R fournis par Grégory Mouille de l'équipe Adhésion Cellulaire et Communication Intracellulaire et responsable de la plateforme de Chimie de l'IJPB (Mouille et al., 2003). L'analyse statistique réalisée sous R correspond à un test *t* de Student permettant de comparer les moyennes d'absorbance pour deux groupes d'échantillons. Ainsi, pour chaque nombre d'onde (800 cm<sup>-1</sup> à 1800 cm<sup>-1</sup>), le test de Student compare les absorbances obtenues pour un génotype avec les absorbances mesurées pour un génotype de référence. Ce test *t* permet d'évaluer la significativité des différences entre deux génotypes pour chaque nombre d'onde. Les différences sont significatives si la valeur de *t* est supérieure ou égale à 2 et si la valeur de *t* est inférieure ou égale à -2 (Mouille et al., 2003).

### 6. Test de complémentation fonctionnelle chez la souche de levure *EBY.WV.4000*

Les tests de complémentation fonctionnelle consistent à exprimer le gène codant le transporteur d'intérêt dans un plasmide intégré dans une souche de levure. J'ai réalisé une expérience de complémentation des souches de levures mutées dans le transport des sucres à l'Université de Poitiers en collaboration avec Benoît Porcheron et le Dr. Rémi Lemoine (DR CNRS). Afin de tester la capacité de transport de SWEET11 et SWEET12, 6 sucres ont été testés : le maltose (témoin), le glucose (témoin, Le Hir et al., 2015), le mannose, le galactose, l'arabinose, et le xylose. 5 souches de levures ont été mises en croissance (le vecteur vide pDR, les souches N3B n°1 et N3B n°3 correspondants aux souches portant le gène *SWEET11*, les souches N3C n°1 et N3C n°3 correspondants aux souches portant le gène *SWEET12*).

## II. MATERIEL ET METHODES



**Figure 23 : Principe du test de complémentation fonctionnelle chez la levure *EBY.VW.4000***

Représentation schématique de la souche de levure *EBY.VW.4000* mutée dans l'expression de ses 18 transporteurs de sucres HXT (A). Représentation schématique de la souche *EBY.VW.4000* mutée comprenant le transporteur SWEET11 ou SWEET12 capable de croître sur un substrat glucose (Le Hir et al., 2015) (B).

### ➤ Croissance des levures (préculture)

Chaque souche de levure a été mise en croissance en milieu liquide dans un volume de 5 ml. Ce milieu contient 500  $\mu$ l de maltose, des acides aminés (10  $\mu$ l d'histidine, 10  $\mu$ L de tryptophane, 15  $\mu$ l de leucine) et 4,465 ml de milieu de culture YNB. Cette préculture a été mise en croissance dans une chambre de culture à 28°C agitée à 200 rpm durant une nuit. Il s'agit de la préculture de levure qui sera utilisée par la suite.

### ➤ Mesures de l'absorbance à 600 nm

Des mesures d'absorbance à 600 nm ont été réalisées afin de vérifier la croissance des levures et de déterminer ainsi le volume nécessaire pour le test de complémentation fonctionnelle (Figure XA). Pour ce faire, 1 ml des précultures des levures a été prélevé en condition stérile afin de mesurer la densité optique à 600 nm. Une densité optique de 0,5 correspond à 2000 cellules/ $\mu$ l soit  $2 \cdot 10^6$  cellules/ml.



## II. MATERIEL ET METHODES

A Densité optique de la préculture			B Densité optique de la culture de levure		
n° Spectro	Souches	DO	n° Spectro	Souches	DO
0	pDR	0,832	0	pDR	0,627
1	N3B n°1	0,701	1	N3B n°1	0,538
2	N3B n°3	0,713	2	N3B n°3	0,542
3	N3C n°1	0,773	3	N3C n°1	0,598
4	N3C n°3	0,767	4	N3C n°3	0,605

**Figure 24 :** Mesures de la densité optique des cultures de levures  
 Résultats des mesures d'absorbance des 5 souches de levures : pDR (vecteur vide), N3B (vecteur comprenant SWEET11), N3C (vecteur comprenant SWEET12) de la préculture de levures (A) et de la culture de levure utilisé pour le test de complémentation (B)

Un second milieu de culture a été préparé contenant 2,5 ml de maltose, 50 µl d'histidine, 50 µl de tryptophane, 75 µl de leucine et 22,325 ml de milieu de culture YNB pour un volume final de 25 ml. Ce milieu de culture a été réparti dans 5 tubes à essai avec un volume de 5 ml. Puisque la densité optique varie entre 0,7 et 0,8, 100 µl de levures (préculture) ont été ajoutée. De nouveau, les levures ont été mises en croissance en chambre de culture à 28 °C avec une agitation de 200 rpm durant une nuit. La densité optique a été mesurée sur cette nouvelle culture de levure après une nuit de croissance (Figure XB). Sous une hotte stérile, les 5 ml de levures ont été centrifugés 5 minutes à 3000 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans 1,5 ml d'eau miliQ. Ce lavage a été répété trois fois.

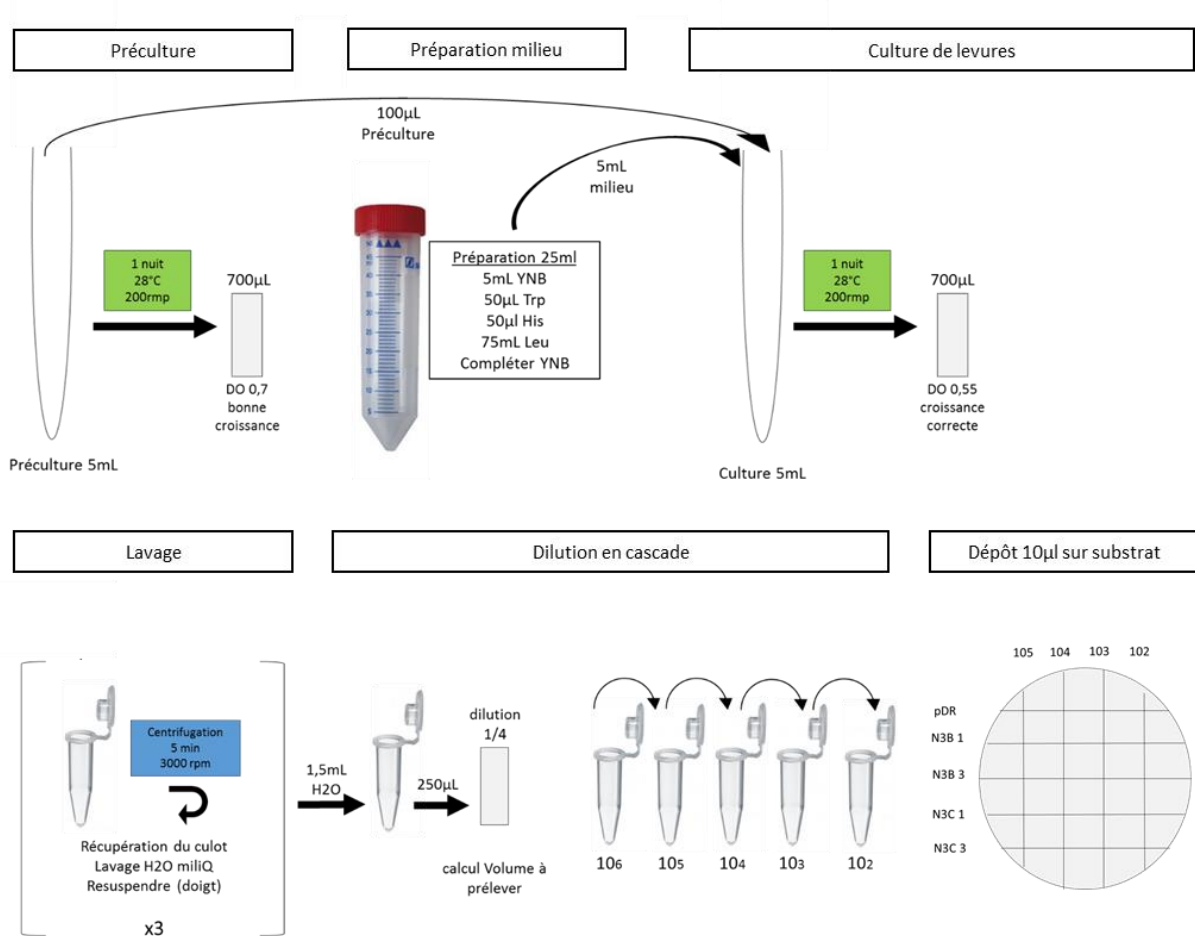
Clones	DO après lavage dil 1/4	DO 1mL	Do arrondie	Facteur de dilution	Vol levure	Vol H2O
0	0,399	1,596	1,6	3,2	313	688
1	0,372	1,488	1,49	2,98	336	664
2	0,365	1,46	1,46	2,92	342	658
3	0,388	1,552	1,55	3,1	323	677
4	0,473	1,892	1,9	3,8	263	737

**Figure 25 :** Calculs effectués afin de déterminer le volume d'eau à ajouter pour les dilutions  
 Le clone 0 correspond au vecteur vide (pDR), les clones 1 et 2 correspondent aux souches de levures comprenant le vecteur SWEET11 (N3B n°1 et N3B n°3), les clones 3 et 4 correspondent aux souches de levures comprenant le vecteur SWEET12 (N3C n°1 et N3C n°3). Résultats de la densité optique après dilution au 1/4 et calculs du volume de levures et du volume d'eau nécessaires (µL) pour les tests de complémentation et les différentes dilutions à réaliser.



## II. MATERIEL ET METHODES

Les levures ont alors été resuspendues dans 1,5 ml d'eau miliQ et des mesures de densité optique ont été réalisées à 600 nm sur des dilutions  $\frac{1}{4}$  avec des solution contenant 250  $\mu\text{l}$  de levures et 750  $\mu\text{l}$  d'eau (Tableau x). Des dilutions en cascade ont été réalisées avec 100  $\mu\text{l}$  de levures et 900  $\mu\text{l}$  d'eau. 4 concentrations de levures ont été obtenues avec  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  et  $10^5$ . Des photographies des levures ont été réalisées à différents temps et les résultats présentés dans la figure 10 du chapitre 2 correspond aux photographique des concentrations  $10^5$  après 144 heures de croissance.



**Figure 26** : Représentation schématique des différentes étapes du test de complémentation

La densité optique a été mesurée pour chaque culture après une nuit de croissance en milieu liquide en chambre de culture à 28°C avec une agitation de 200 rpm. A partir de cette préculture, une seconde culture de levures a été mise en croissance dans ces mêmes conditions de culture. Ces levures ont été lavées trois fois à l'eau avant d'être resuspendues. Une dilution en cascade a été réalisée et 10  $\mu\text{l}$  de chaque dilution ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ) a été déposé sur chaque boîte contenant un substrat (maltose, glucose, mannose, arabinose, galactose ou xylose).

### 7. Quantification de l'expression de gènes par qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

#### 7.1. Extraction d'ARN

Environ 30 mg de poudre de hampe florale des différents génotypes sont extraits en présence de 1 ml de Trizol® (Invitrogen) et de 200 µl de chloroforme. L'ensemble est vortexé environ 30 sec puis centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 min. La phase supérieure est prélevée dans un nouveau tube et environ 400 µl d'isopropanol sont ajoutés. Les ARNs sont précipités après une centrifugation de 15 min à 14 000 rpm. Après l'élimination du surnageant, le culot est lavé après ajout d'1 ml d'éthanol à 70° et une centrifugation de 15 min à 14 000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est séché sous la hotte avant d'être resuspendu dans 50 µl d'eau stérile.

Un traitement DNase est ensuite appliqué sur l'ensemble des ARNs resuspendus par l'ajout de 5 µl de DNase (Fermentas) et une incubation de 30 min à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 5 µl d'EDTA (25 mM) et une incubation de 10 min à 65°C. Après ce traitement, une nouvelle extraction d'ARN à l'aide de phénol est réalisée. Pour ce faire, 200 µl d'eau et 200 µl de Phénol/Chloroforme/Isoamyl alcool (24/23/1) sont ajoutés à la réaction précédente et centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 min. La phase supérieure est prélevée dans un nouveau tube puis 200 µl de Chloroforme sont ajoutés et l'ensemble est centrifugé à 14 000 rpm pendant 15 min. La phase supérieure est prélevée dans un nouveau tube et 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M, pH 5,2) et 2 volumes d'Ethanol à 100°. Les échantillons sont laissés une nuit à -20°C afin de précipiter les ARNs. Le lendemain les ARNs sont culottés par une centrifugation de 30 min à 14 000 rpm puis lavés en présence d'1 ml de d'éthanol à 70° et centrifugés pendant 15 min à 14 000 rpm. Enfin les culots sont séchés sous la hotte et les ARNs totaux sont resuspendus dans 50µl d'eau stérile.

La quantité des ARNs est quantifiée à l'aide d'un SPECTROstar nano (BMG Labtech) à 260 nm. La qualité des ARNs est vérifiée par le calcul des ratios à 260/230 (contaminants copurifiés, solvants) et 260/280 (présence de protéines, phénol). Ainsi le ratio 260/230 doit être compris entre 1,8 et 2,2 et le ratio 260/280 doit être autour de 2 pour des ARNs purs.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 7.2. Transcription inverse des ARN totaux

La rétrotranscription des ARNs totaux se fait grâce au kit « RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis » de chez Fermentas. Ainsi, 1 µg d'ARN totaux dans un volume de 12 µl est ajouté 1 µl d'Oligo (dT)<sub>12</sub>V puis incubé 5 min à 65°C. Ensuite 4 µl de tampon 5x First-Strand buffer, 0,8 µl d'un mélange de dNTPs (25 mM) et 1 µl de la retrotranscriptase sont ajoutés. L'ensemble est mélangé par pipettage et incubé 60 min à 42°C dans un bain marie. La réaction de reverse transcription est stoppée par une incubation de 10 min à 70°C puis 1 min sur la glace. Les ADNc ainsi produits sont dilués au 1/30<sup>ème</sup> avec de l'eau stérile avant utilisation en qPCR.

### 7.3. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La quantification relative de l'expression des gènes impliqués dans le développement du système vasculaire a été réalisée par qPCR. Les réactions de qPCR ont été réalisées en triplicats techniques dans des plaques 96 puits transparentes sur une machine Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR machine (Bio-Rad) ; Chaque réaction de qPCR est réalisée dans un volume total de 10 µl contenant 7,5 µl de MESA Fast qPCR™ Mastermix Plus for SYBR Assay (Eurogentec), 0,2 µL des oligonucléotides gauche et droit (dilué à 30 µM), 2,4 µl d'eau stérile and 2,5 µl de Cdna (Tableau SII). Le programme de qPCR suivant est appliqué : dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, 39 cycles de 95°C pour 10 sec, 60°C pour 20 sec et 72°C pour 30 sec. Les courbes de dissociation sont obtenues après chaque amplification en augmentant la température de 0,5°C par cycle entre 65°C et 95°C. La valeur du C<sub>q</sub> est obtenue pour chaque échantillon à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.0. La spécificité de l'amplification est obtenue pour chaque gène en utilisant la courbe de dissociation. Ainsi, un seul pic doit être obtenu si l'amplification est spécifique. Les valeurs des C<sub>q</sub> sont ensuite vérifiées et dans certains cas, une valeur est supprimée si elle est différente des deux autres réplicats de plus de 0,5. L'efficacité de chaque paire d'oligonucléotides utilisés a été calculée en utilisant une série de dilution au 1/10<sup>ème</sup> des ADNc. Quatre gènes de références ont été testés : *APT1* (At1g27450), *TIP41* (At4g34270), *EF1α* (At5g60390) and *UBQ5* (At3g62250). Pour chaque expérience, l'algorithme geNorm (Vandesompele et al., 2002) a été utilisé pour déterminer le gène le plus stable dans nos conditions de croissance et entre les différents génotypes.

## II. MATERIEL ET METHODES

L'expression relative de chaque échantillon a été calculé selon la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001) en utilisant la formule suivante :  $\text{moyenne } Et \Delta Cq(A-B) / \text{moyenne } Er \Delta Cq(A-B)$ , où  $Et$  est la valeur de l'efficacité du couple d'oligonucléotides du gène cible,  $Er$  est la valeur de l'efficacité du couple d'oligonucléotides du gène de référence, A représente l'échantillon du type sauvage, et B est l'échantillon de la lignée mutante.

### 8. Quantification des sucres solubles et de l'amidon par dosage enzymatique

#### 8.1. Prélèvement du matériel végétal

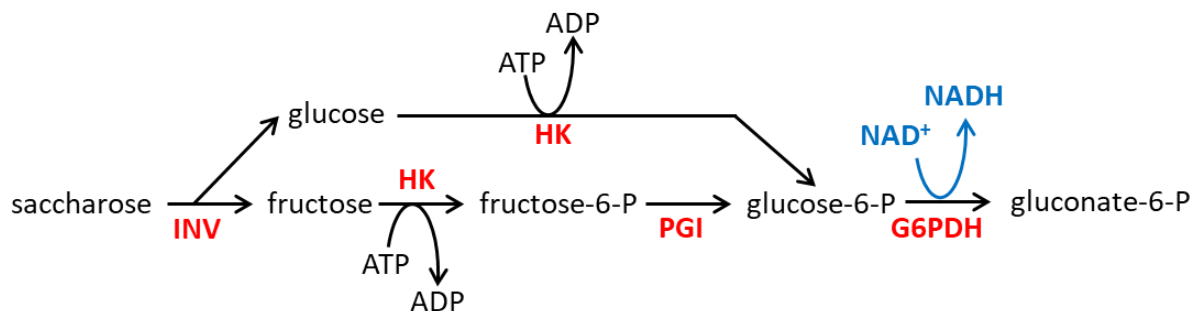
Les sucres solubles de type saccharose, glucose et fructose ont été dosés par voie enzymatique sur les échantillons de hampe florale principale. Pour ce faire, le matériel végétal a été prélevé de 11h à 12h dans la matinée, ce qui correspond au milieu de journée en condition de jours longs. Seule la hampe florale principale a été prélevée dans de l'azote liquide après avoir retiré les inflorescences latérales, les siliques et le bouton floral. Ces échantillons ont été conservés dans un congélateur à -80 °C.

#### 8.2. Extraction des sucres solubles

Après broyage dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon, une aliquote d'environ 50 mg est pesée pour chaque échantillon. Les sucres solubles sont alors extraits par une double extraction alcoolique à froid avec de l'éthanol à 80°. Pour ce faire, 500 µl d'éthanol à 80° est ajouté à chaque aliquote de poudre de hampe florale. L'extraction se déroule dans la glace et les échantillons sont mélangés au vortex toutes les 10 minutes pendant une heure. Afin de séparer les débris cellulaires des sucres, une centrifugation est réalisée à 4°C à 14000 rpm durant 10 minutes. Après récupération du surnageant, une seconde extraction alcoolique est réalisée en ajoutant 500 µl d'éthanol à 80 °C sur le culot contenant les débris cellulaires. Comme précédemment, les échantillons placés dans la glace sont mélangés au vortex toutes les 10 minutes durant 1 heure. De nouveau, les échantillons sont centrifugés à 4°C à 14000 rpm durant 10 minutes. Le surnageant est alors additionné au premier et l'ensemble est séché au speedvac toute une nuit. Une fois sec, les échantillons sont repris dans 50 µl d'eau afin de quantifier le saccharose, le glucose et le fructose contenu dans la hampe florale.

8.3. Dosages des sucres solubles par voie enzymatique

Le dosage enzymatique correspond à un dosage du pouvoir réducteur (réduction du NAD<sup>+</sup> en NADH) décrit par Bergmeyer et Bernt en 1974. Ce dosage repose sur une succession de réactions enzymatiques décrites dans la figure X ci-dessous. Ces réactions sont stochiométriques, i.e. pour chaque molécule de gluconate-6-P formée, une molécule de pouvoir réducteur est réduite. Ainsi, la quantité d'hexoses est mesurée indirectement grâce à la quantité proportionnelle de NADH produit dont on mesure l'absorbance à 340 nm.



**Figure 27** : Représentation schématique des réactions enzymatiques impliquées dans le dosage des sucres solubles

Les enzymes en rouges correspondent aux enzymes utilisées dans le dosage des sucres solubles et en bleu la réduction du pouvoir réducteur quantifiée à 340 nm. INV : INVertase ; HK : HexoKinase ; PGI : PhosphGlucoIsomérase ; G6PDH : Glucose-6-Phosphate DesHydrogénase ; ATP : Adénosine Tri-Phosphate ; NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée) ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite).

Les dosages ont été effectués en plaque de 96 puits, et comparés à une gamme étalon grâce au kit « Roche Yellow line » (RBioPharm). Deux réplicats techniques sont réalisés pour chaque échantillon et pour la gamme étalon. L'ensemble des mesures de densité optique est réalisé dans un spectrophotomètre à plaque de type IEMS (Thermo IEMS microplatereader, MTX LabSystems) à 340 nm.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 8.3.1. Dosage enzymatique du glucose et du fructose

Dans chaque puit, 130  $\mu\text{l}$  d'eau stérile et 10  $\mu\text{l}$  d'échantillon ou 140  $\mu\text{l}$  de la gamme étalon sont déposés. 60  $\mu\text{l}$  de NADP/ATP est alors ajouté dans chaque puit et mis à incuber durant 15 minutes à 30°C. La densité optique mesurée à la fin de l'incubation (DO1) représente la quantité de pouvoir réducteur avant réaction enzymatique. Par la suite, 5  $\mu\text{l}$  d'un mélange d'HexoKinase (HK) et de Glucose-6-Phosphate DesHydrogénase (G6PDH) dilué au 1/5<sup>ème</sup> est ajoutée à chaque puit. Ces enzymes sont responsables de la production de gluconate-6-P à partir du glucose (sous l'action de l'HK) et du fructose (sous l'action de l'HK et de la G6PDH) (Figure X). La densité optique mesurée après 40 minutes d'incubation (DO2) correspond à la quantité de pouvoir réduction NADH libéré lors de ces réactions enzymatiques. La DO1 (quantité de pouvoir réducteur avant réaction enzymatique) est alors soustraite à la DO2 (quantité de pouvoir réducteur lors de la production de gluconate-6-phosphate). Cette soustraction représente la quantité de pouvoir réducteur libéré lors de la phosphorylation du glucose en glucose-6-P (sous l'action de l'HK) et du glucose-6-P en gluconate-6-P soit la quantité de glucose contenue dans la hampe florale. Afin de quantifier le fructose contenu dans les échantillons, 5  $\mu\text{l}$  de PhosphoGlucose Isomérase (PGI), diluée au 1/5<sup>ème</sup>, est ajouté à chaque échantillon et mis à incuber durant 20 minutes afin de convertir toutes les molécules de fructose-6-P en glucose-6-P (Figure X) La densité optique est mesurée (DO3) et à cette DO est soustraite la DO2 précédemment obtenue après l'ajout de l'HK et de la G6PDH. Cette soustraction correspond à la quantité de fructose contenu dans les échantillons.

### 8.3.2. Dosage enzymatique du saccharose

Le dosage de saccharose repose sur le même principe que le dosage de glucose et de fructose décrit précédemment. Cependant, il est nécessaire au préalable d'hydrolyser le saccharose en glucose et en fructose par l'ajout de 15  $\mu\text{l}$  d'invertase. Les échantillons sont alors mis à incuber environ 1h afin d'être certain d'avoir hydrolyser la totalité des molécules de saccharose. Par la suite, 60  $\mu\text{l}$  de NADP/ATP est ajouté aux échantillons et mis à incuber durant 15 minutes. La densité optique est alors mesurée (DO1) puis 5  $\mu\text{l}$  de mélange enzymatique d'HK et de G6PDH, dilué au 1/5<sup>ème</sup> est ajouté aux échantillons. La densité optique est mesurée après 40 minutes d'incubation (DO2) et est soustraite à la DO1 ce qui représente les variations de saccharose et de glucose. Enfin, la soustraction de cette valeur à la valeur de glucose endogène mesurée précédemment permet d'obtenir la quantité de saccharose dans chaque échantillon. Les quantités de saccharose, de glucose et de fructose sont exprimées en nmol sucres/mg de matière fraîche.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 8.3.3. Dosage enzymatique de l'amidon

Le dosage de l'amidon est réalisé sur le culot obtenu après la double extraction alcoolique des sucres solubles. Le culot est séché dans une étuve à 50°C pendant 1 heure puis resuspendu dans 150 µl de MOPS (50 mM, pH 7) additionné de 5 µl d'une solution d'amylase thermostable à 4 mg/ml (15U). Il est important de bien décoller les culots avec une micro-spatule lors de cette étape. Il faut ensuite bien vortexer les échantillons avant l'incubation dans un bain marie à 100°C pendant 6 min. Après refroidissement des échantillons il faut ajouter 200 µL de tampon acétate de sodium 0,2 M pH = 4,8 dans lequel a été dissout 0,5 mg amyloglucosidase (35 U). Les échantillons sont ensuite incubés pendant 4h dans un bain marie à sec à 50°C, en vortexant régulièrement. Enfin, le glucose libéré par l'hydrolyse de l'amidon est dosé selon le protocole décrit dans le paragraphe 8.3.1.

## 9. Quantification des acides aminés totaux

La teneur en acides aminés totaux est déterminée selon la méthode colorimétrique de Rosen (1957). La glutamine est utilisée comme acide aminé de référence. La technique est basée sur la réaction des groupements α-aminés avec la ninhydrine, réduite à pH 5,0 par une solution de KCN 2% dans un tampon acétate. Le dosage est réalisé sur le même extrait que celui utilisé pour le dosage des sucres solubles. Un volume de 10 µL d'extrait complété à 100 µL avec de l'eau sont mélangés à 50 µL d'une solution de KCN à 10 mM dilué à 2% (v/v) dans un tampon acétate 2,6 M pH 5,3 et à 50 µL d'une solution de ninhydrine à 3% dans de l'éthylène glycol monométhyl éther. Après agitation et incubation de 15 min à 100°C, la réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout immédiat de 500 µL d'un mélange d'isopropanol-eau (1:1, v:v). L'absorbance est mesurée à 570 nm. La comparaison de l'absorbance de l'extrait face à celle d'une gamme de glutamine permet de déduire la quantité d'acides aminés totaux présents dans l'extrait.

## 10. Analyse métabolomique par Spectrométrie de Masse en Chromatographie Gazeuse (GC-MS)

Les analyses métabolomiques par Spectrométrie de Masse en Chromatographie Gazeuse (GC-MS) ont été réalisées sur (1) des échantillons de hampe florale des plantes sauvages WT et des mutant *sweets* (doubles, triples et quadruple) en condition normale (jours longs) et (2) des échantillons de rosette des plantes WT et des mutants *sweets* (doubles et quadruple) en condition de stress hydrique. Ces analyses ont été réalisées sur deux plateformes différentes



## II. MATERIEL ET METHODES

### 10.1. Analyse métabolomique de la hampe florale des lignées mutantes

Deux analyses métabolomiques ont été réalisées au cours de ma thèse. Une première analyse a été réalisée sur la hampe florale des lignées WT, les doubles mutants *swt11swt12*, *swt16swt17*, les triples mutants *swt11swt12swt16*, *swt11swt12swt17* et le quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17* sur n=8 plantes par génotype. Cette analyse a été réalisée en collaboration avec Françoise Gilard sur la plateforme de l'Institut des sciences végétales de Paris-Saclay (IPS2). Pour ce faire les échantillons de hampe florale ont été broyés au mortier et au pilon (50 mg de matière fraîche) dans l'azote liquide avant d'être lyophilisé. Toutes les réactions se font à froid dans de la glace. Dans chaque échantillon, 1 ml d'eau/acétonitrile/isopropanol (2/3/3) froid (-20°C) contenant des étalons internes : ribitol et  $\alpha$ -ABA. Les échantillons ont été placés au thermomixer 10 min à 4°C à 1500 rpm puis centrifugés 10 min à 13 500 rpm à 4°C. Chaque échantillon et contrôle ont été fractionnés en trois avec 100  $\mu$ l de chaque. 10  $\mu$ l d'acide myristique d27 à 0,3 g/l ont été ajouté à la solution eau/MeOH/isopropanol (2/5/2) dans chaque fraction. Les échantillons ont par la suite été séchés 5h au speed-vacuum.

### 10.2. Analyse métabolomique de la rosette en contrainte sécheresse

Une seconde analyse métabolomique a été réalisée sur la plateforme de chimie, métabolisme, métabolome à l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB – INRA Versailles) en collaboration avec Gilles Clément (Fiehn et al., 2008). En effet, les lignées WT, les doubles mutants et le quadruple mutant étudiées en contrainte de stress hydrique au phénoscope ont été analysées en GC-MS. Avec n=6 plantes par génotype. Pour ce faire, la rosette des échantillons a été récolté après 23 jours de croissance et placé dans l'azote liquide. Les échantillons ont été broyés au mortier et au pilon et une aliquote de 50 mg a été réalisé sur chaque échantillons. Les échantillons ont été resuspendue dans 1 ml d'eau/acétonitrile/isopropanol (2/2/3) contenant du ribitol de concentration 4 $\mu$ g/ml et ils ont été placés 10 min à 4°C avec 1400 rpm d'agitation au thermomixer. Le matériel insoluble a été enlevé par centrifugation à 20000g durant 5 min. Pour chaque échantillon, 50  $\mu$ l de surnagent a été séché au speed-vacuum 35°C une nuit et conservé dans un congélateur -80°C. Des contrôles (blancs) ont été réalisés avec les mêmes étapes que les échantillons végétaux. Les échantillons doivent être réchauffés 15 min avant utilisation puis séché à nouveau au speed-vacuum durant 1h30 à 35°C. par la suite, 10  $\mu$ l de methoxyamine pyridine de concentration 20 mg/ml ont été ajoutés aux échantillons puis placé durant 1h30 à 28°C en agitation. 90  $\mu$ l de N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) (Aldrich 394866-10x1ml) ont été ajoutés à la réaction et ce durant 30 min à 37°C. 4 heures après la

## II. MATERIEL ET METHODES

dérivation, 1 µl d'échantillon a été injecté dans la machine de chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. La colonne utilisée est une Rxi-5SilMS et elle a été changée tous les 24 échantillons. Les températures étaient de 70°C durant 7 min puis 10°C/min jusqu'à atteindre 330°C pendant 5 minutes. 5 scans / sec ont été acquis. L'injection des contrôles a été réalisée en début, en milieu et en fin d'expérience afin d'évaluer la stabilité de la dérivation. Un mix alcane a été injecté en milieu afin de calibrer la machine.

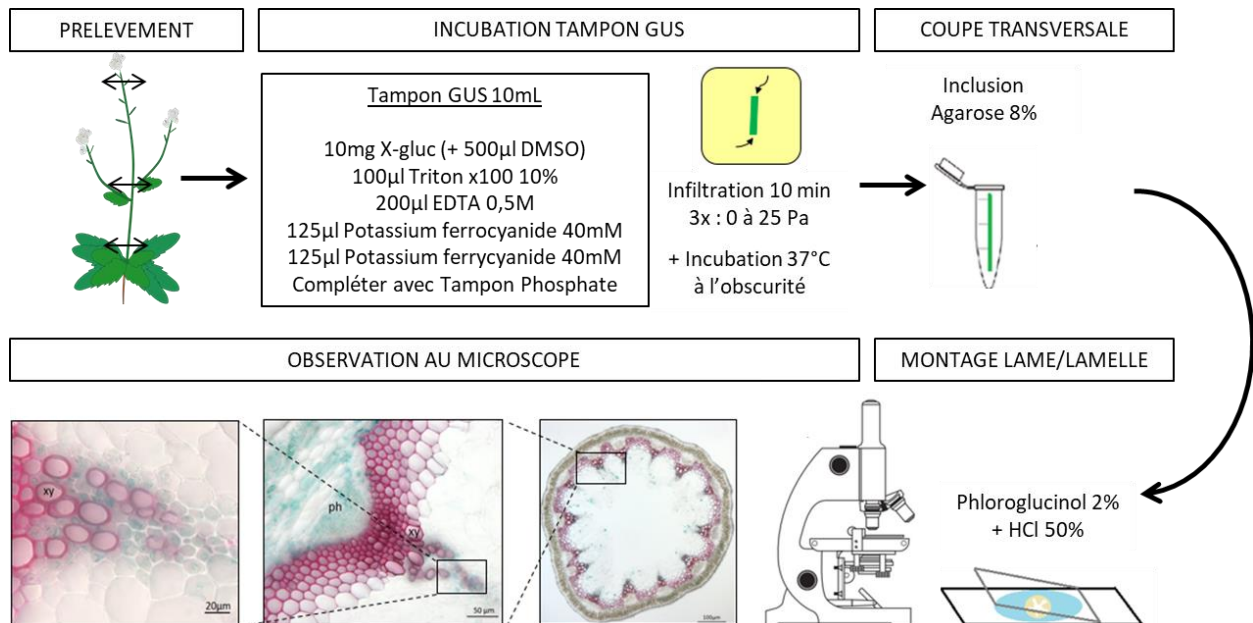
Le traitement des données a été réalisé par Gilles Clément sur la plateforme en utilisant le logiciel AMDIS <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/> et une librairie maison construite à partir de la librairie NIST, Golm, <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/> et Fiehn afin d'identifier les métabolites. Les aires sous les pics ont également été déterminées avec le logiciel Targetlynx. Après soustraction des blancs, les aires sous les pics ont alors été normalisées par rapport au Ribitol et à la matière fraîche de l'échantillon. Des analyses statistiques de type ANOVA à un facteur ou plusieurs facteurs avec une valeur de  $p < 0.01$  ont été réalisées avec TMEV <http://www.tm4.org/mev.html>. Enfin, un coefficient a été déterminé sur 4 ng sur les 103 métabolites. Ce facteur a permis d'estimer la concentration absolue des métabolites.

### 11. Localisation tissulaire des lignées *pSWEET :GUS*

Afin d'évaluer la localisation de l'expression des promoteurs des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et *SWEET17* dans les différents organes, des lignées exprimant le gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase (GUS) sous le contrôle des promoteurs des gènes d'intérêt ont été analysées. Ces lignées ont été cultivées dans les mêmes conditions que le matériel végétal utilisé dans les autres expériences. Différentes sections ont été réalisées sur la hampe florale principale : (1) une section basale correspondant à un stade de développement où l'élongation est terminée, (2) une section à mi-hauteur dans un entre-nœud en cours d'élongation et (3) une section sous le bouton floral où les tissus jeunes sont peu lignifiés. Une coloration histochimique GUS a été réalisée sur ces échantillons. Plus précisément, les échantillons ont été incubés dans de l'acétone 80% (v/v) durant 20 minutes à 4°C afin de perméabiliser les parois. Trois lavages successifs à l'eau distillée ont ensuite été réalisés avant d'incuber les sections dans le tampon GUS. À l'aide d'une pompe à vide, une infiltration de 10 minutes a été réalisée afin d'optimiser la pénétration du tampon GUS dans la totalité des tissus. Les échantillons sont ensuite incubés à 37°C dans le noir durant 12 heures afin que la réaction enzymatique se produise. La réaction enzymatique est stoppée dans de l'éthanol 70° et les échantillons sont conservés à 4°C avant inclusion dans de l'agarose 8%. Comme décrit

## II. MATERIEL ET METHODES

précédemment, des coupes de 50 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un vibratome. Les coupes ainsi obtenues sont montées entre lames et lamelles en présence de 100 µl de Phloroglucinol 2% (w/v) et de 100 µl d'acide chlorhydrique 50% (v/v) afin de contre-colorer les lignines en rouge. Les échantillons ont été observés en microscopie à fond clair avec un microscope Leica DMR B DIC épifluorescence.



**Figure 28** : Représentation schématique du protocole d'observations des lignées *pSWEET :GUS*

### 12. Analyses statistiques

J'ai réalisé les graphiques et les analyses statistiques des données des différents paramètres à partir des logiciels Prism (Alcor System), R ou Excel. Les données obtenues pour chaque paramètre ont été représentés sous forme de boîte à moustache avec les écart-types et la médiane pour chaque génotype. Un code couleur a été choisi avec la représentation du WT en violet, *swt11* en orange, *swt12* en rose foncé, *swt16* en vert, *swt17* en rose clair, *swt11swt12* en bleu clair, *swt16swt17* en rouge, *swt11swt12swt16* en bleu foncé, *swt11swt12swt17* en vert foncé et *swt11swt12swt16swt17* en jaune.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 12.1. Analyse de la variance à un facteur (ANOVA)

Afin d'homogénéiser les analyses, j'ai fait le choix de réaliser une analyse de variance à un facteur (ANOVA paramétrique) pour évaluer si au sein de chaque jeu de données, des différences significatives existent entre un ou plusieurs génotypes. J'ai réalisé en complément un post-test de Tukey permettant de comparer deux à deux les données obtenues pour les différents génotypes. En effet, l'intérêt de ces analyses est de déterminer (1) s'il existe des différences significatives entre le génotype sauvage et les lignées mutantes, et (2) s'il existe des différences significatives entre les mutants. Ces analyses ont permis de former des groupes d'individus annotés sur les graphiques par des lettres a, b, c et/ou d. Lorsque qu'une même lettre est retrouvée chez plusieurs génotypes, cela signifie que les différences observées entre ces génotypes ne sont pas significativement différentes (la valeur de  $P$  du post-test de Tukey est supérieure à 0,05). A l'inverse, lorsque deux ou plusieurs génotypes portent des lettres différentes, cela signifie que les différences observées entre ces génotypes sont significativement différentes (la valeur de  $p$  du post-test de Tukey est inférieure à 0,05). Un génotype A peut porter plusieurs lettres s'il n'est pas significativement différent des génotypes B et C mais que ces derniers sont significativement différents entre eux.

### 12.2. Test $t$ de Student

Comme expliqué précédemment dans les paragraphes 5.2 et 10, un test  $t$  de Student a été réalisé sur les données de spectroscopie infra-rouge, les données d'expression de gènes et les données de métabolomiques afin de comparer les moyennes obtenues chez les lignées mutantes avec celles des plantes sauvages. De plus, un test  $t$  de Student a été réalisé sur les valeurs de ratio de surface occupée par les cellules conductrices de xylème rapportée. Les différences significatives sont représentées avec une ou plusieurs étoiles pour une valeur de  $p \leq 0.05$  (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

### 12.3. Analyse en Composante Principale (ACP)

J'ai réalisé une analyse en composante principale (ACP) sur les données de métabolomique d'échantillons de hampe florale sur les métabolites pour lesquelles des différences significatives ont été observées afin d'évaluer si une ou plusieurs variables permet de déterminer un ou plusieurs groupes parmi les génotypes.

---

## II. RESULTATS ET DISCUSSIONS

---



---

# CHAPITRE 1

---

Rôle des échanges de sucres à l'échelle  
cellulaire sur le développement, la croissance  
et la physiologie de la plante





#### I. Introduction

Les sucres, produits au cours de la photosynthèse, représentent une source énergétique importante pour la croissance et le développement des végétaux. Le saccharose est la forme majoritairement transportée à longue distance (Dinant, 2008). Il est transporté depuis les organes photosynthétiques (organes sources) vers les organes demandeurs en énergie (organes puits) à travers le phloème. Outre un transport à longue distance à l'échelle de la plante, des échanges de sucres à courte distance contribuent au développement et à la croissance des cellules, et à plus long terme au développement des tissus. Parmi les transporteurs impliqués dans ces échanges de sucres intracellulaires ou intercellulaires, la famille des transporteurs SWEETs a la particularité de transporter des sucres selon le gradient de concentration (Chen et al., 2010).

Chez *Arabidopsis thaliana*, quatre d'entre eux ont retenu notre attention du fait de leur localisation commune dans le xylème, le tissu responsable du transport de l'eau et des éléments minéraux. Les transporteurs plasmalemmiques SWEET11 et SWEET12 et les transporteurs tonoplastiques SWEET16 et SWEET17 sont localisés dans le xylème des feuilles, des racines, et de la hampe florale (Chardon et al., 2013, Klemens et al., 2013, Guo et al., 2013, 2014, Le Hir et al., 2015). Il s'agit de transporteurs de saccharose, de glucose et/ou de fructose (Chen et al., 2012, Chardon et al., 2013, Le Hir et al., 2015). Chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines SWEET11 et SWEET12 participent au chargement du phloème (Chen et al., 2012), au développement du système vasculaire et à la formation de la paroi secondaire (Le Hir et al., 2015), au transfert de sucres vers l'embryon (Chen et al., 2015), mais sont également impliqués dans la réponse des plantes aux pathogènes (Gebauer et al., 2017 ; Walesrowski et al., 2018). Les transporteurs tonoplastiques quant à eux permettent de réguler l'homéostasie des sucres dans les cellules de parenchyme du système vasculaire (Chardon et al., 2013 et Klemens et al., 2013). La perte de fonction du gène *SWEET17* entraîne ainsi une importante accumulation de fructose dans les feuilles (Chardon et al., 2013) et dans les racines (Guo et al., 2014). La surexpression du gène *SWEET16* entraîne peu de modification de teneurs en fructose ou en saccharose mais une importante accumulation de glucose et une meilleure tolérance au gel (Klemens et al., 2013).

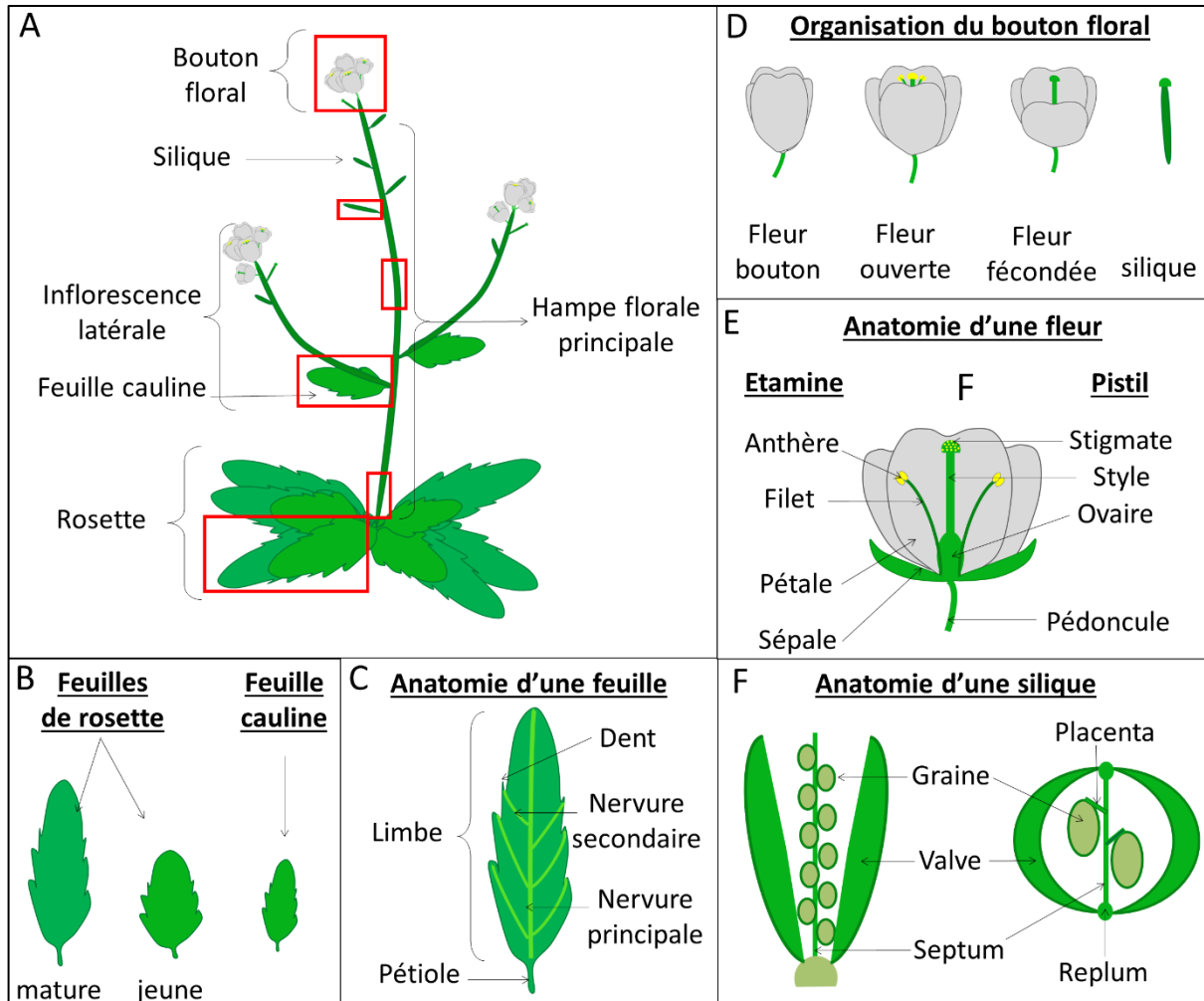
Afin de mieux comprendre le rôle de ces gènes dans la croissance, le développement et la physiologie de la hampe florale, une analyse phénotypique des lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et/ou *SWEET17* a été réalisée en conditions de jours

longs. Dans un premier temps, la localisation du domaine d'expression des promoteurs de ces quatre gènes a été affinée dans les feuilles de rosette, les feuilles caulines, la hampe florale principale, le bouton floral et les siliques dans nos conditions de culture. Par la suite, des paramètres de croissance de la rosette et de la hampe florale ont été mesurés chez des plantes sauvages, des lignées mutées pour l'expression des gènes *SWEETs* et des lignées complémentées dans l'expression de ces gènes. Des dosages de sucres solubles ont été réalisés dans les feuilles matures de rosette et dans la hampe florale afin d'évaluer les quantités de sucres contenus dans ces organes. Une analyse plus approfondie du métabolisme de la hampe florale a été réalisée en GC-MS chez les doubles, les triples et le quadruple mutant comparés aux plantes sauvages. Enfin, une analyse du statut carboné et du statut azoté des siliques a été réalisée afin d'évaluer l'impact d'une mutation des gènes *SWEETs* sur le développement des siliques

## II. Résultats

### 1. Localisation tissulaire de l'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle des promoteurs des gènes *SWEETs*

Le domaine d'expression des promoteurs des quatre gènes *SWEETs* a été analysé dans différents organes de la plante grâce à l'analyse de plantes exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* ou *SWEET17*, précédemment produites dans l'équipe (Chardon et al., 2013 ; Klemens et al., 2013 ; Le Hir et al., 2015). La Figure 29 est une représentation schématique rappelant l'anatomie d'*Arabidopsis thaliana* et présente les différents organes analysés (encadrés en rouge sur la Figure 29A). Ainsi le domaine d'expression des *SWEETs* a été observé dans des organes sources et des organes puits et également au cours du développement d'un organe.

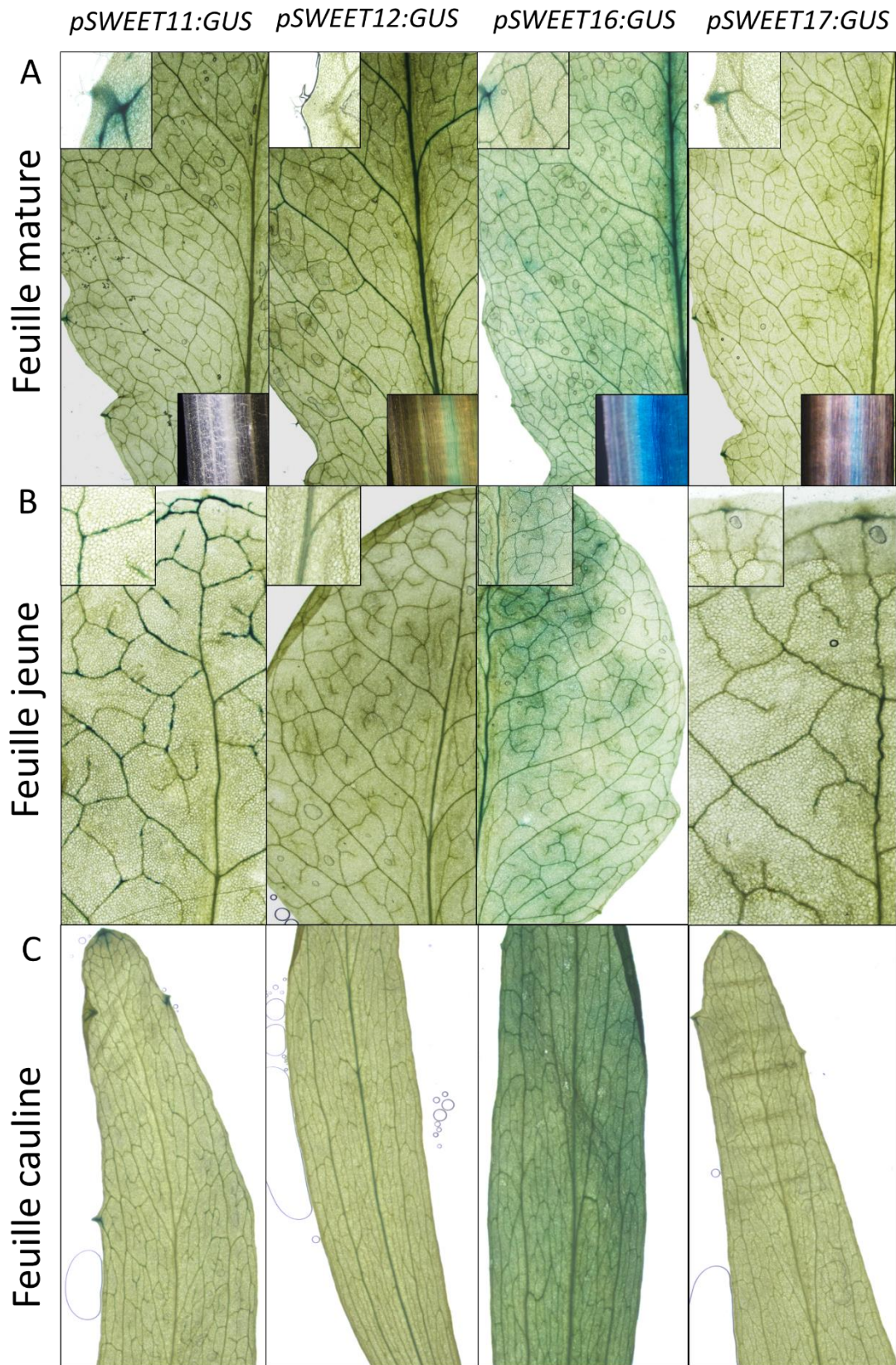


**Figure 29 :** Représentation schématique des organes d'*Arabidopsis thaliana*

A l'échelle de la plante entière (A). Les organes dans lesquels la localisation des gènes *SWEET*s a été étudiée dans ce chapitre sont encadrés en rouge ; Organisation des feuilles (B) ; Anatomie d'une feuille (C) ; Organisation du bouton floral (D) ; Anatomie d'une fleur (E) et Anatomie d'une silique (F).

### 1.1 Expression dans les feuilles

La Figure 30 présente les photographies des lignées comprenant le promoteur du gène *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* ou *SWEET17* fusionné au gène rapporteur *GUS* dans une feuille de rosette mature (Figure 30A), dans une feuille de rosette juvénile (Figure 30B) et dans la feuille cauline sous-jacente à la première inflorescence latérale (Figure 30C). La coloration bleue indique le domaine d'expression du promoteur du gène.



**Figure 30** : Localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* dans les feuilles

Expression des promoteurs des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et *SWEET17* couplés au gène rapporteur *GUS* dans un fond sauvage Col-0 dans une feuille mature (A), une jeune feuille (B) et une feuille cauline (C).

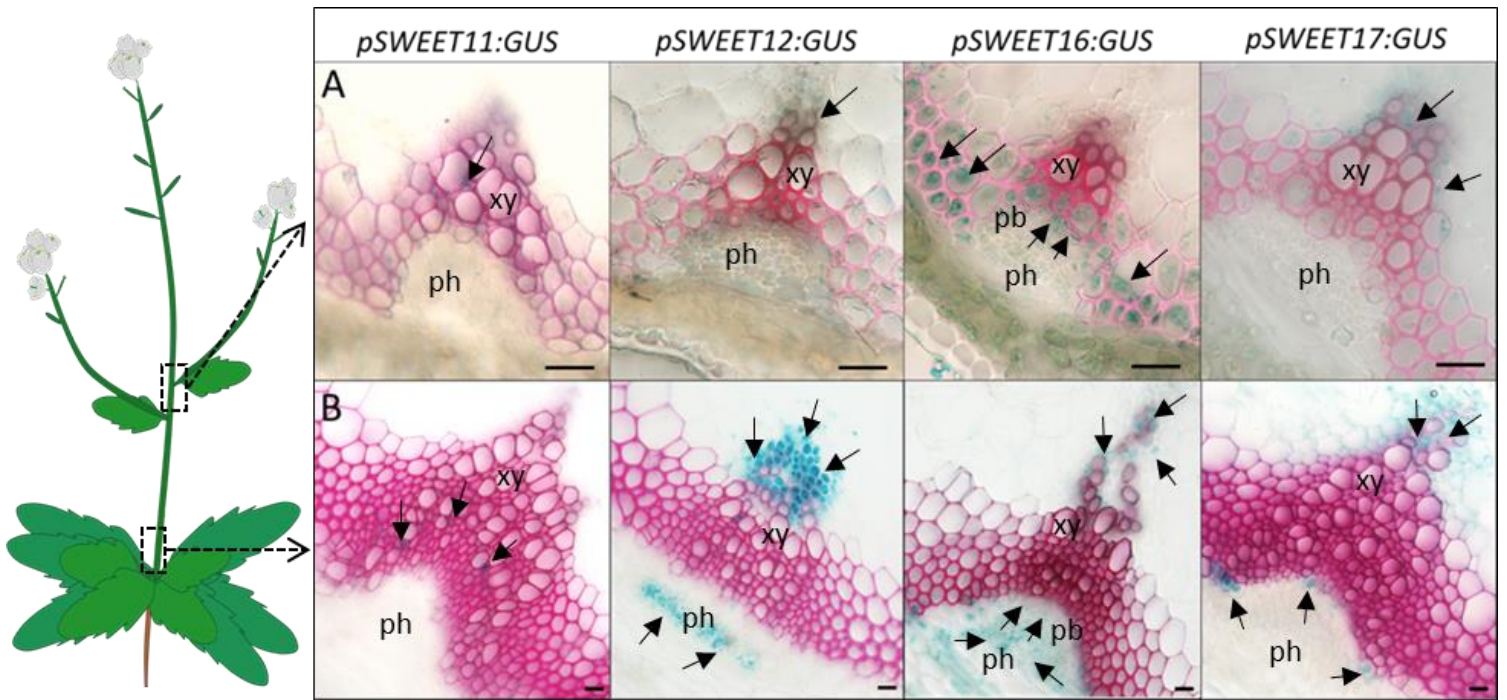


Dans la Figure 30A, les encadrés en haut à gauche représentent un hydathode, et ceux en bas à droite représentent la veine principale du pétiole des feuilles matures. On remarque que la localisation de l'expression des promoteurs diffère selon les gènes *SWEETs*. Ainsi, le domaine d'expression de *SWEET11* est restreint aux hydathodes et au système vasculaire adjacent à ces hydathodes, l'expression étant absente de la veine principale et des veines secondaires (Figure 30A). L'expression de *SWEET12* est quant à elle localisée principalement dans la veine principale et les veines secondaires du limbe et du pétiole, avec une absence d'expression dans les hydathodes. La localisation de l'expression de *SWEET16* est quant à elle plus diffuse, avec une localisation plus intense dans les veines principales, secondaires et tertiaires du limbe et du pétiole et une accumulation de la protéine GUS dans les hydathodes. Enfin, l'expression de *SWEET17* est observée dans les hydathodes ainsi que dans la veine principale. Dans les jeunes feuilles, la protéine GUS sous contrôle du promoteur de *SWEET11* s'accumule de façon discontinue dans les veines secondaires et tertiaires (Figure 30B), tandis que sous contrôle du promoteur de *SWEET12* elle est localisée uniquement dans la nervure principale du limbe. Dans nos conditions expérimentales, le domaine d'expression du promoteur *SWEET16* est diffus avec néanmoins une accumulation de la protéine GUS dans les nervures principales, secondaires et tertiaires (Figure 30B). Le domaine d'expression du promoteur *SWEET17* est quant à lui restreint aux nervures principales et secondaires avec une accumulation de la protéine GUS à la pointe du limbe. Dans la feuille cauline sous-jacente à la première inflorescence latérale, l'expression des promoteurs *SWEET11* et *SWEET17* est restreinte aux hydathodes, avec une absence d'expression dans les veines (Figure 30C) tandis que l'expression de *SWEET12* est restreinte aux veines principale et secondaires du limbe (Figure 30C). Enfin, la localisation de l'expression du promoteur du gène *SWEET16* est diffuse dans tout le limbe y compris dans toutes les veines du limbe (Figure 30C).

Pour conclure, le domaine d'expression des promoteurs des gènes *SWEET11*, *SWEET17* et *SWEET16* est commun dans les hydathodes, mais différent dans les veines avec une localisation dans les nervures tertiaires et quaternaires pour *SWEET11*, une localisation dans les nervures principale et secondaires pour *SWEET17* ou dans toutes les veines pour *SWEET16*. Enfin, le domaine d'expression du promoteur de *SWEET12* est quant à lui uniquement restreint aux nervures principale et secondaires du limbe, quel que soit le type de feuille. Les gènes *SWEETs* analysés présentent dans les feuilles des domaines d'expression spécifiques et complémentaires. Ils s'expriment tous dans le système vasculaire quel que soit le type de feuille et son stade de développement.

1.2 Expression dans la hampe florale principale

La hampe florale des plantes exprimant les constructions *pSWT11:GUS*, *pSWT12:GUS*, *pSWT16:GUS* et *pSWT17:GUS* a été observée au microscope après 49 jours de croissance, c'est-à-dire lorsque la hampe florale mesure entre 25 et 30 cm de hauteur. Des sections transversales ont été réalisées à deux niveaux : à la base du premier entre-nœud ce qui correspond à un stade où l'entre-nœud a terminé son élongation (Figure 31A) et au milieu de la hampe florale, c'est à dire à un stade où l'entre-nœud est encore en cours d'élongation (Figure 31B).



**Figure 31 : Localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* dans la hampe florale**

Expression de la protéine GUS sous contrôle des promoteurs des gènes *SWT11*, *SWT12*, *SWT16* et *SWT17* dans la hampe florale à différents stades de développement. Photographies de sections transversales au milieu de la hampe florale principale correspondant à un stade de développement en cours d'élongation avec des fibres interfasciculaires et des cellules de xylème en cours de lignification. (A) Photographies de sections transversales à la base de la hampe florale principale correspondant à un stade de développement mature avec épaissement important des parois secondaires des vaisseaux et des fibres de xylème et des fibres interfasciculaires (B). Les coupes ont été montées dans un mélange de Phloroglucinol 2 % et HCl 50 % afin de colorer les lignines en rouge. ph : phloème, xy : xylème, pb : procambium. Echelle : 20  $\mu$ m.



Dans un entre-nœud en cours d'élongation, l'expression du promoteur de *SWEET11* est observée dans certaines fibres et dans certaines cellules de parenchyme xylémiennes (Figure 31A). L'expression du promoteur de *SWEET12* est également retrouvée dans les cellules de parenchyme xylémiennes, dans certaines fibres xylémiennes mais semble être absente des cellules de phloème (Figure 31A). Le promoteur *SWEET16* présente un domaine d'expression plus large puisqu'un signal GUS est observé dans le phloème, dans les cellules parenchymateuses du xylème mais également dans les cellules de procambium et les vaisseaux accolés aux cellules de procambium, et dans les fibres interfasciculaires (Figure 31A). Enfin, le domaine d'expression du promoteur *SWEET17* est localisé dans les vaisseaux accolés aux cellules de procambium et dans les cellules de parenchyme du xylème (Figure 31A).

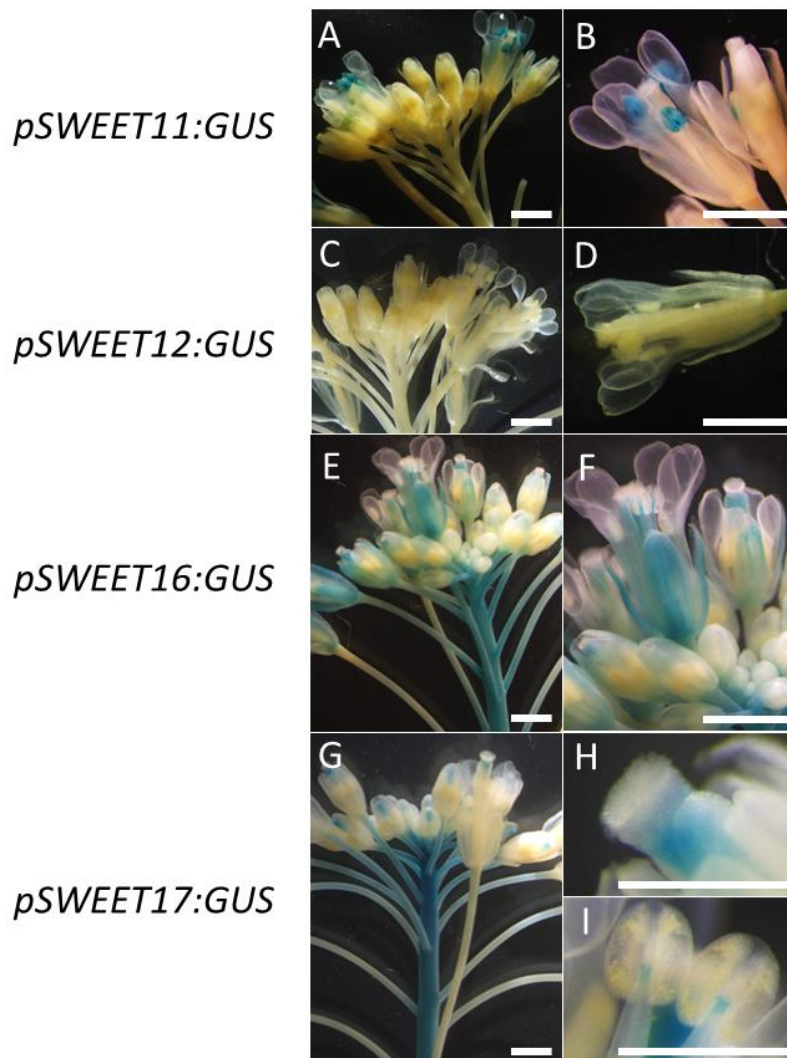
A la base de la hampe florale, c'est à dire sur un entre-nœud dont l'élongation est terminée, l'expression des promoteurs de *SWEET12* et *SWEET16* est observée dans le xylème et dans le phloème tandis que l'expression des promoteurs de *SWEET11* et *SWEET17* est restreinte au xylème (Figure 31B). Plus précisément, l'expression du promoteur *SWEET11* est retrouvée uniquement dans certaines petites cellules accolées aux vaisseaux, correspondant probablement à des fibres (Figure 31B). L'expression des promoteurs de *SWEET12* et *SWEET16* est retrouvée dans les cellules de phloème et à la pointe du xylème correspondant aux cellules parenchymateuses (Figure 31A). Le domaine d'expression de *SWEET17* est retrouvé uniquement dans le xylème, dans certains vaisseaux accolés aux cellules du procambium correspondant à des jeunes vaisseaux et dans les cellules parenchymateuses localisées à la pointe du xylème (Figure 31A). Il est également important de noter que les domaines d'expression observés dans la hampe florale l'ont été invariablement quelles que soient les cultures analysées. En effet, ces expériences ont été répétées 5 fois au cours de la thèse.

#### 1.3 Expression dans l'inflorescence

L'expression des promoteurs des gènes *SWEETs* a également été analysée dans l'inflorescence de la hampe principale et dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 32). Les photographies de droite (Figure 32A, 32C, 32E et 32G) représentent la portion apicale de la hampe florale qui porte les boutons floraux, les photographies de gauche (Figure 32B, 32D, 32F, 32H et 32I) correspondent aux fleurs. Aucune expression du promoteur *SWEET12* n'est observée dans la hampe portant les boutons floraux ni dans les fleurs (Figure 32C et 32D). Dans la portion de hampe florale portant les fleurs, seule l'expression des promoteurs des gènes *SWEET16* et *SWEET17* est observée (Figure 32E et 32G). De plus, on remarque un gradient de

### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 1

coloration dans les pédoncules en fonction du stade de développement de la fleur avec une coloration plus dense dans les fleurs fermées au stade bouton dans la partie apicale et une coloration plus faible dans les pédoncules des fleurs en devenir de siliques (Figure 32E et 32G). En revanche, leur localisation dans les fleurs varie avec une expression de *SWEET17* observée à la pointe du pistil sous le stigmate quel que soit le stade de développement des fleurs (Figure 32G et 32H) et dans le filet des étamines (Figure 32I). L'expression de *SWEET16* est observée, quant à elle, également à la base du stigmate quel que soit le stade de développement des fleurs, dans le filet des étamines et dans le système vasculaire des sépales à un stade de développement de la fleur ouverte (Figure 32F). Enfin, l'expression du promoteur du gène *SWEET11* est observée uniquement dans les anthères des étamines des fleurs ouvertes (Figure 32B).

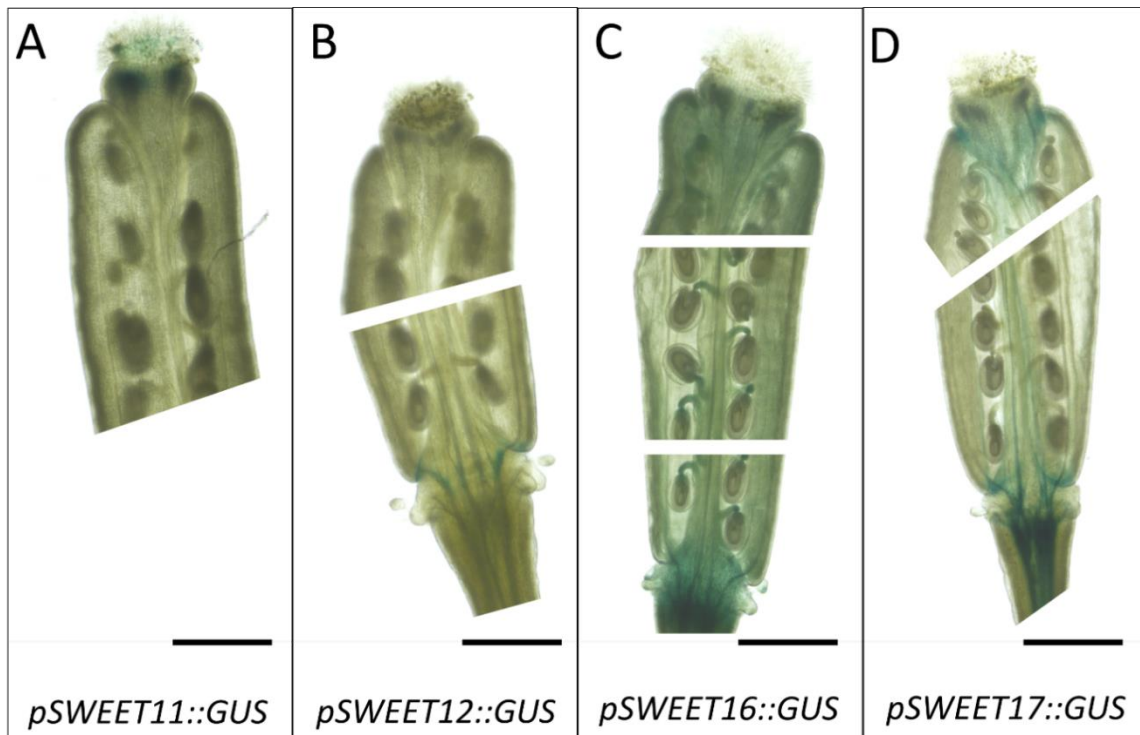


**Figure 32** : Localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* dans les fleurs

Expression des promoteurs des gènes *SWEET11* (A et B), *SWEET12* (C et D), *SWEET16* (E et F) et *SWEET17* (G, H et I) couplés au gène rapporteur GUS dans un fond sauvage Col-0 dans la hampe florale et dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana*. Echelle : 500  $\mu$ m

1.4 *Expression dans les siliques*

La localisation de l'expression des quatre gènes *SWEETs* a également été analysée dans les siliques (Figure 33). On remarque que l'expression du promoteur du gène *SWEET11* est restreinte au stigmate (Figure 33A) et que l'expression du promoteur de *SWEET12* est quant à elle uniquement retrouvée à la base de la silique, c'est-à-dire dans le système vasculaire à la jonction entre le pédoncule et les valves (Figure 33B). L'expression des promoteurs des gènes *SWEET16* et *SWEET17* est également retrouvée dans le système vasculaire du pédoncule et des valves et dans la partie basale de l'ovaire (Figure 33C et 33D). Cependant, leur domaine d'expression est plus étendu que celui des gènes *SWEET11* et *SWEET12*. Ainsi, les promoteurs des gènes *SWEET16* et *SWEET17* semblent avoir une localisation d'expression commune et sont tous exprimés dans le système vasculaire du style, à la base du stigma. L'unique différence observée entre le domaine d'expression de ces deux gènes est la localisation de l'expression du promoteur *SWEET16* dans la partie qui relie les graines au septum, alors que celle du promoteur de *SWEET17* est absente de cette zone mais retrouvée dans le septum (Figure 33C et 33D).

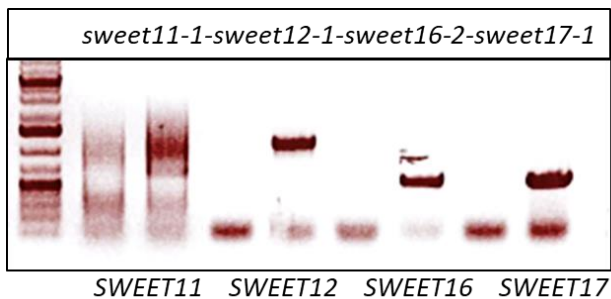


**Figure 33** : Localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* dans les siliques

Expression des promoteurs des gènes *SWEET11* (A), *SWEET12* (B), *SWEET16* (C) et *SWEET17* (D) couplés au gène rapporteur GUS dans un fond sauvage Col-0 dans les siliques. Echelle : 200  $\mu$ m

## 2. Production des triples mutants et du quadruple mutant

Au début de cette thèse, plusieurs lignées d'*Arabidopsis thaliana* portant une insertion T-DNA au niveau des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et/ou *SWEET17* étaient disponibles i.e les simples mutants : *swt11-1/swt11* (Le Hir et al., 2015), *swt12-1/swt12* (Le Hir et al., 2015), *swt16-2/swt16* (collaboration avec l'équipe du Pr Ekkehard Neuhaus de l'Université de Kaiserslautern, Allemagne, lignée non publiée) et *swt17-1/swt17* (Chardon et al., 2013), les doubles mutants : *swt11-1swt12-1/swt11swt12* (Le Hir et al., 2015), *swt16-4swt17-1/swt16swt17* (produit dans l'équipe, lignée non publiée) et le triple mutant : *swt11-1swt12-1swt16-4/swt11swt12swt16* (produit dans l'équipe, lignée non publiée). Dès mon arrivée en thèse, j'ai produit par croisement le triple mutant *swt11-1swt12-1swt17-1/swt11swt12swt17* (lignée non publiée) ainsi que le quadruple mutant *swt11-1swt12-1swt16-4swt17-1/swt11swt12swt16swt17* (lignée non publiée).



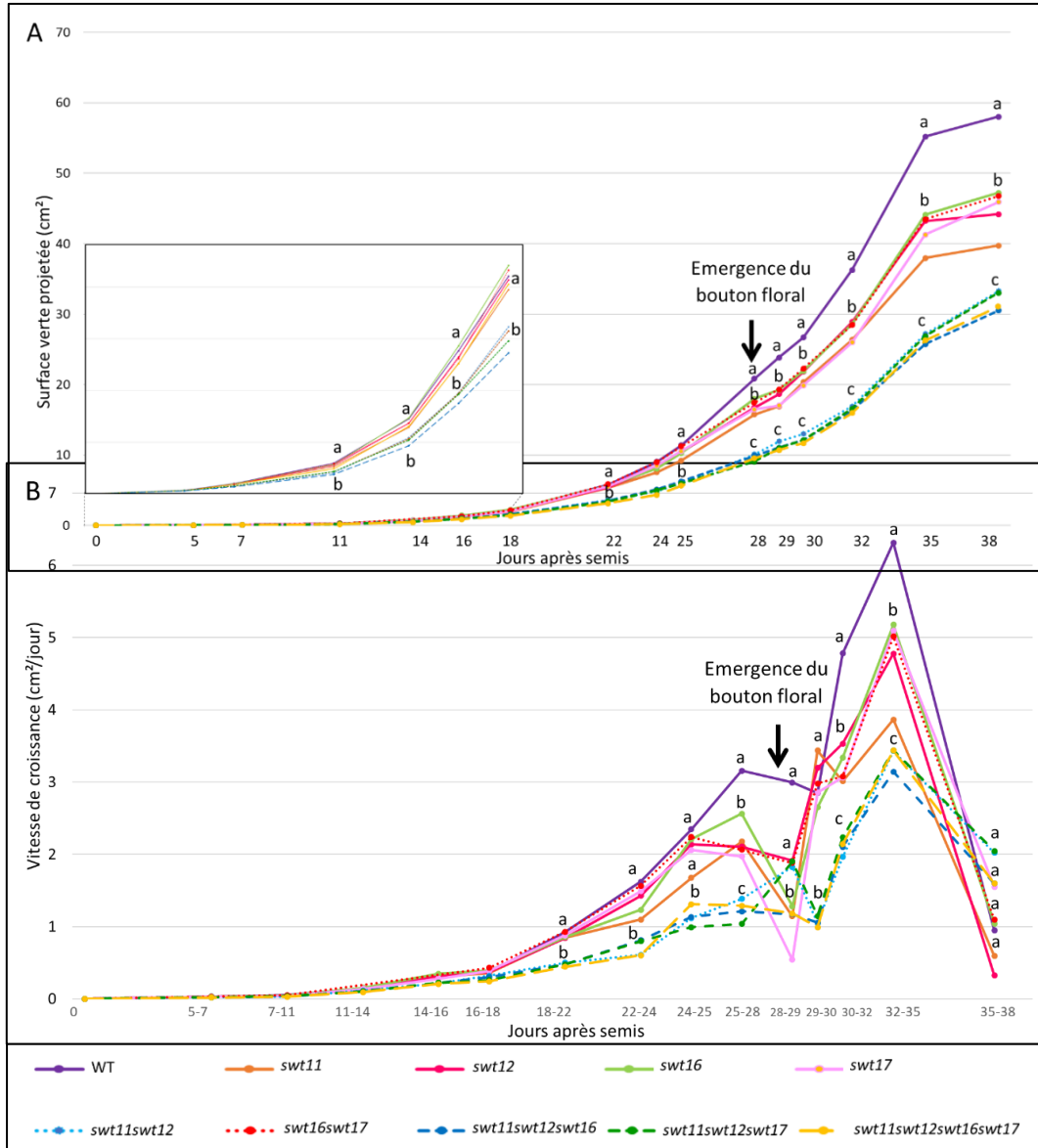
**Figure 34 :** Photographie du gel des produits PCR lors du génotypage du quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17*. Marqueur de taille (à gauche) avec pour chaque gène testé les amorces sens (à gauche) et antisens (à droite). Homozygotie pour les gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et *SWEET17* chez le quadruple mutant.

## 3. Impact d'une perturbation du transport des sucres médié par les transporteurs SWEETs sur la croissance et le développement des plantes

### 3.1. Impact sur la croissance de la rosette

Une cinétique de croissance de la rosette des lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEETs* a été réalisée en mesurant la surface verte projetée (cm<sup>2</sup>) à partir de photographies prises tous les deux jours en conditions de jours longs (Figure 35A). Afin d'évaluer la vitesse de croissance de la rosette au cours du temps, les différences de surfaces vertes projetées calculées entre deux dates ont été divisées par le nombre de jours séparant ces deux mesures (Figure 35B). Au-delà du 38<sup>ème</sup> jour de croissance de la rosette, les mesures n'ont pas été poursuivies car la hampe florale alors en pleine croissance ne permet pas d'effectuer des photographies nettes de la rosette. Il est à noter que la date d'apparition du bouton floral a été déterminée lorsque le bouton faisait 1 cm de hauteur. Quel que soit le génotype, l'apparition du bouton floral a eu lieu, dans nos conditions de culture, 28 jours après le semis (Figure 35). Il

n’y a donc pas de décalage entre l’émergence de la hampe florale chez ces mutants par rapport au type sauvage.



**Figure 35 : Croissance de la rosette en fonction du temps des mutants *sweet***

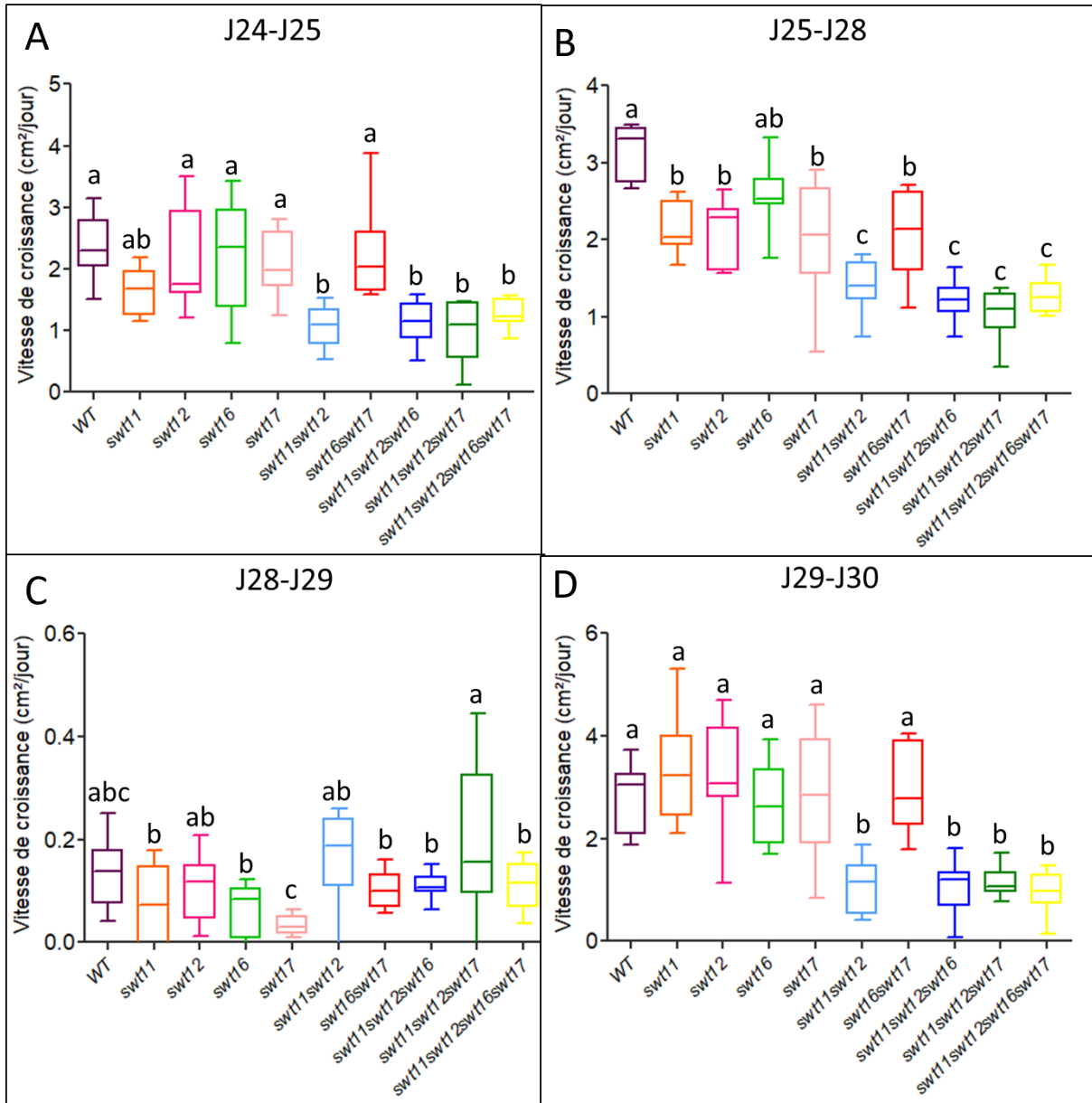
Cinétique des mesures de surface verte projetée en fonction des jours (A). Cinétique des mesures de vitesse de croissance en cm<sup>2</sup> par jour (B). La flèche noire représente la date de l’apparition du bouton floral apparu à la même date pour tous les génotypes soit 28 jours après le semis. Chaque point représente les moyennes (n ≥ 7). Les écart-types ne sont volontairement pas représentés afin de ne pas surcharger le graphique. Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents (P < 0.05).

### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 1

Chez tous les génotypes, la rosette atteint sa taille finale 35 jours après le semis, soit environ 10 jours après l'émergence de la hampe florale (Figure 35A). L'analyse plus détaillée des courbes de croissance montre que le double mutant *swt11swt12*, les triples et le quadruple mutants ont à chaque date des valeurs de surface verte projetée environ deux fois plus petites que celles du WT (Figure 35A), alors que la réduction de la taille de rosette observée chez les simples et le double mutant *swt16swt17* est d'environ 25% (Figure 35A).

La vitesse de croissance au cours du développement de la rosette a également été calculée pour chaque génotype. Chez les plantes de type sauvage, la vitesse de croissance augmente graduellement jusqu'au 25<sup>ème</sup> jour de croissance atteignant une valeur supérieure à 3 cm<sup>2</sup>/jour puis la vitesse de croissance atteint un plateau entre le 25<sup>ème</sup> et le 29<sup>ème</sup> jour de croissance (Figure 35B et Figure 36A et 36B). C'est durant cette phase plateau que l'émergence du bouton floral a lieu. Ensuite, la vitesse de croissance augmente très rapidement entre le 29<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour et atteint une valeur maximale de 6,3 cm<sup>2</sup>/jour entre le 32<sup>ème</sup> et 35<sup>ème</sup> jour (Figure 35B). Des variations similaires de la vitesse de croissance ont également été observées pour les lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEETs*, malgré des vitesses de croissance globalement plus faibles notamment pour le double mutant *swt11swt12*, les triples mutants et le quadruple mutant (Figure 35B). Cependant, la période entourant l'émergence du bouton floral mérite d'être observée plus précisément (Figure 36).





**Figure 36 : Vitesse de croissance de la rosette au moment de l'apparition du bouton floral** Entre le 24<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour (A), le 25<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour (B), le 28<sup>ème</sup> et le 29<sup>ème</sup> jour (C) et le 29<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour (D). Les données sont présentées sous forme de boîtes à moustaches. Le trait au milieu de la boîte représente la valeur de la médiane. Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 7$ ).



### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 1

Ainsi, entre le 24<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour de croissance, le double mutant *swt11swt12*, les triples mutants et le quadruple mutant ont des vitesses de croissance significativement plus faibles que les plantes sauvages et les autres mutants (Figure 36A). Après cette date, leur vitesse de croissance atteint un plateau jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour de croissance (Figure 35B). La vitesse de croissance de ces génotypes reste ensuite environ deux fois plus faible que celle du type sauvage même si la tendance reste la même avec une vitesse maximum de croissance atteinte à la même date que les plantes de type sauvage. Entre le 25<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour, un second groupe de génotypes se détachent du type sauvage (Figure 36B). Ainsi, la rosette des simples mutants et du double mutant *swt16swt17* présentent une vitesse de croissance significativement différente du type sauvage à partir du 25<sup>ème</sup> jour de croissance c'est-à-dire juste avant l'émergence du bouton floral (Figure 36B). Une chute drastique de la vitesse de croissance de la rosette est même observée entre le 28<sup>ème</sup> et le 29<sup>ème</sup> jour de croissance pour les simples mutants *swt11*, *swt16* et *swt17* (Figure 36C). Enfin, entre le 29<sup>ème</sup> jour et le 30<sup>ème</sup> jour de croissance, seule la vitesse de croissance du double mutant *swt11swt12*, des triples mutants et du quadruple mutant sont significativement différentes par rapport au type sauvage (Figure 36D). Il est également intéressant de noter que la phase plateau de la croissance commence plus tôt pour les mutants *swt12*, *swt16* et *swt16swt17* (entre le 24<sup>ème</sup> et le 25<sup>ème</sup> jour) comparés au type sauvage (entre 25<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour).

En conclusion, même si la forme globale de la courbe de croissance est similaire pour tous les génotypes, deux groupes se distinguent :

(1) le double mutant *swt11swt12*, les triples mutants et le quadruple mutant qui sont significativement plus petits que le type sauvage (WT) dès les premiers jours de croissance et ceci jusqu'au dernier jour de croissance (Figure 35A) et dont le ralentissement de la vitesse de croissance de la rosette intervient plus précocement que chez le type sauvage.

(2) les simples mutants *swt11*, *swt12*, *swt16* et *swt17* et le double mutant *swt16swt17* qui ne sont pas significativement différents du type sauvage (WT) jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour. Après cette date qui correspond à la date d'apparition du bouton floral, la surface verte projetée de ces génotypes est significativement plus petite que celle du WT et ce jusqu'au 38<sup>ème</sup> jour (Figure 35A).

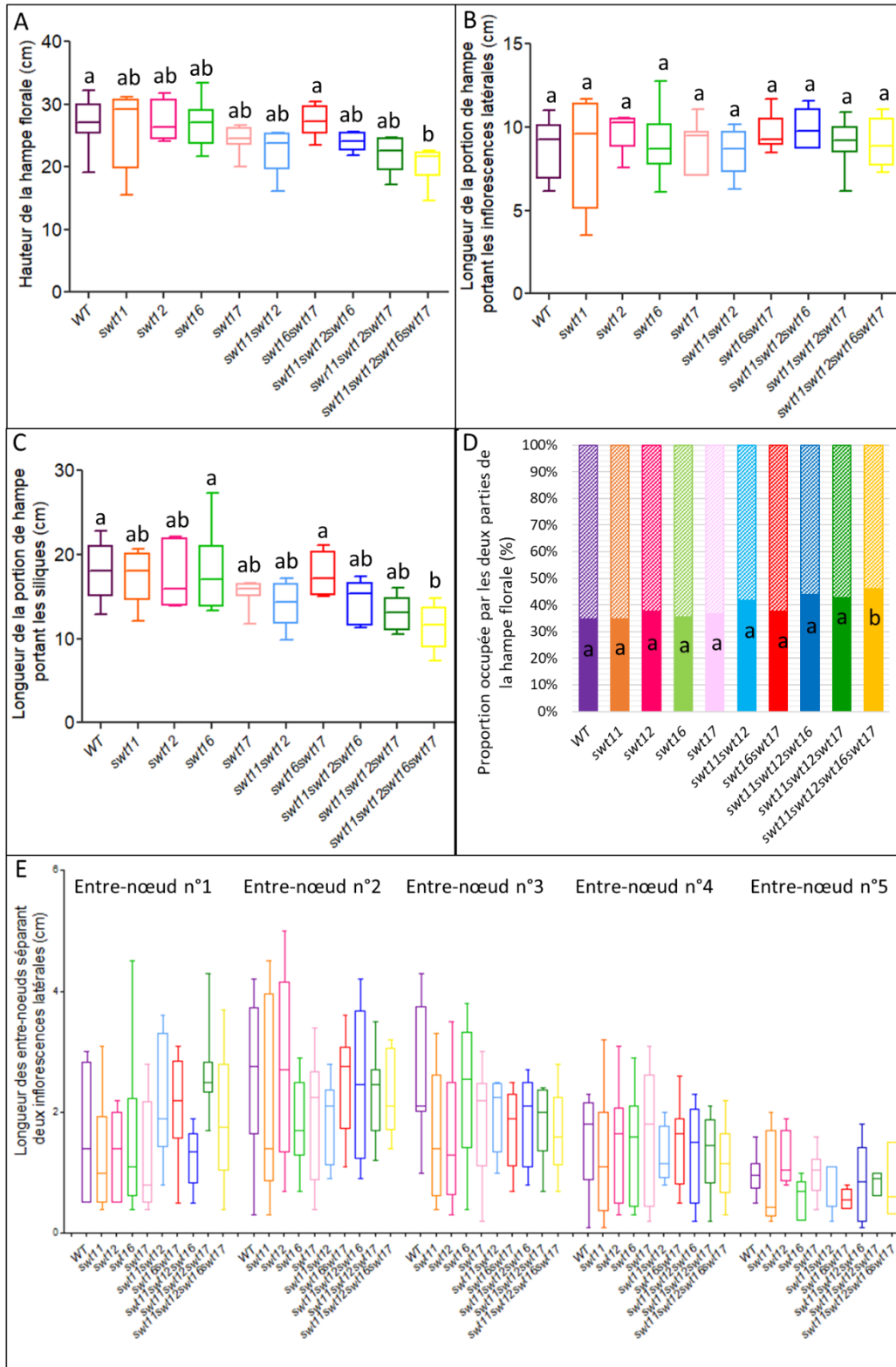
#### 3.2. Impact sur la croissance et le développement de la hampe florale

##### 3.2.1. Croissance de la hampe florale principale

La Figure 37 regroupe les mesures effectuées sur la hampe florale principale de chaque génotype après 44 jours de croissance c'est à dire la hauteur moyenne de la hampe principale (Figure 37A), la longueur de la partie de la hampe portant les inflorescences latérales (Figure 37B), la longueur de la partie de la hampe portant les siliques (Figure 37C), le pourcentage de ces portions par rapport à la hauteur de la hampe principale (Figure 37D). Enfin, la mesure de la longueur des entre-nœuds séparant chaque inflorescence latérale a également été mesurée (Figure 37E).

On remarque que seul le quadruple mutant présente une hampe florale significativement plus petite que le WT à 44 jours de croissance (Figure 37A). Excepté le double mutant *swt16swt17*, les autres génotypes ont un phénotype intermédiaire non significativement différent du WT ni du quadruple mutant (Figure 37A). Afin d'évaluer la croissance de la hampe florale chez ces génotypes, des mesures de longueur de la portion de la hampe portant les inflorescences latérales et de la portion de la hampe portant les siliques ont été effectuées. Aucune différence significative entre les génotypes concernant la partie portant les inflorescences latérales n'a été observée (Figure 37B). En revanche, la partie de la hampe supportant les siliques est réduite chez le quadruple mutant comparé au WT (Figure 37C). La réduction de la hauteur de la hampe florale observée chez ce mutant (Figure 37A) est donc spécifiquement due à une réduction de la partie de la hampe portant les siliques (Figure 37C). En termes de proportion par rapport à la hauteur totale de la hampe principale, on observe également que seul le quadruple mutant présente des différences significatives par rapport au type sauvage (Figure 37D). En effet, chez les plantes sauvages, la partie de la hampe principale supportant les inflorescences latérales compte pour 34,5% de la hauteur totale de la hampe contre 65,5% pour la partie supportant les siliques. Chez le quadruple mutant, la partie basale portant les inflorescences latérales compte pour 45,7 % contre 54,3% pour la partie apicale portant les siliques (Figure 37D). La taille des entre-nœuds portant les inflorescences latérales a également été mesurée (Figure 37E). Ainsi, l'entre nœud n°1 correspond au premier entre-nœud à la base de la hampe florale et le n°5 correspond au dernier entre-nœud avant les siliques. Il n'y a aucune différence significative entre les génotypes pour chacun des entre-nœuds. L'ensemble de ces résultats confirment donc que la réduction de la hauteur de la hampe florale observée chez le quadruple mutant est causée par la réduction de la partie de la hampe portant les siliques.

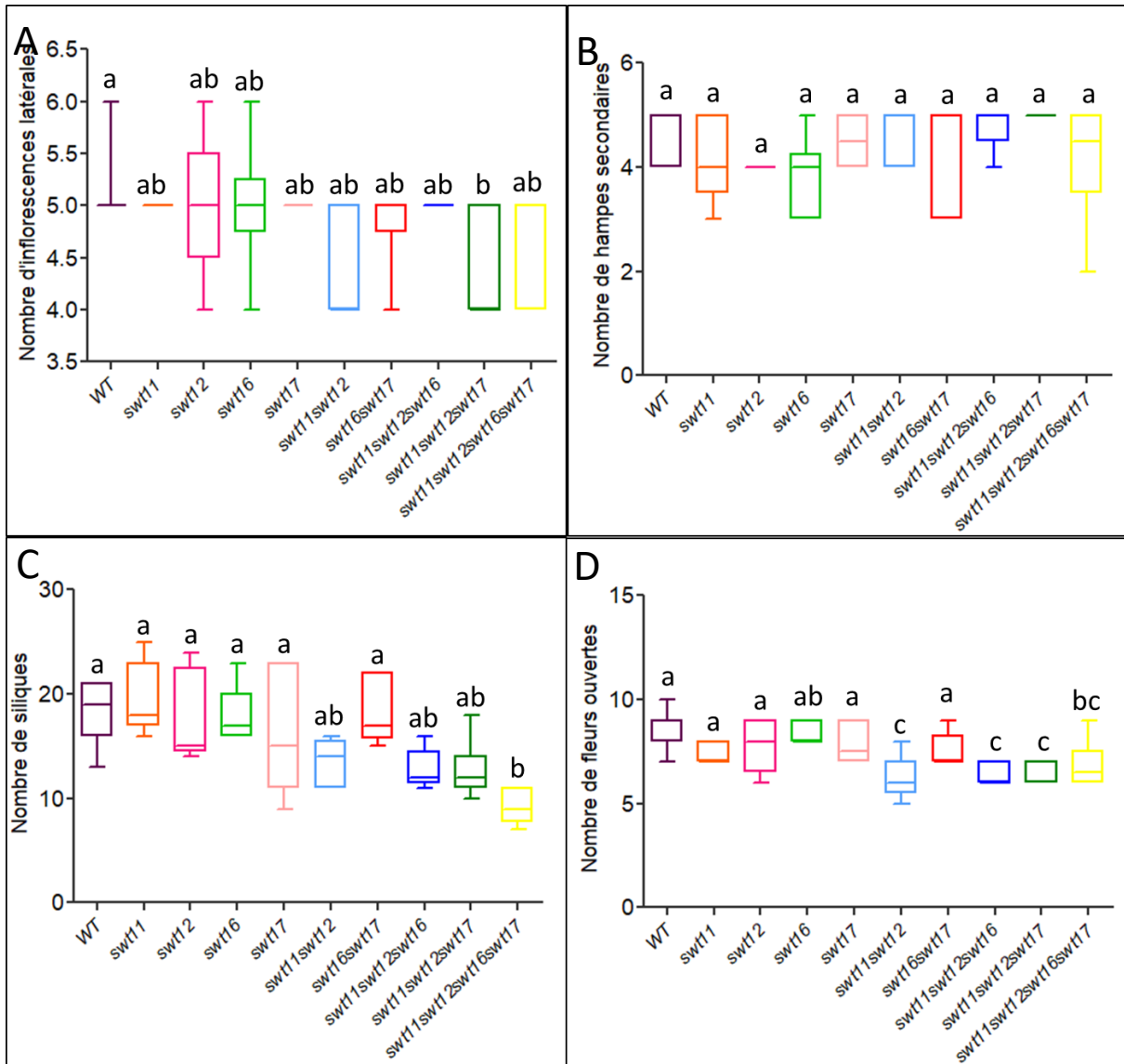
### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 1



**Figure 37 : Mesures des paramètres de croissance de la hampe florale**

Hauteur totale de la hampe florale (cm) (A). Longueur de la portion de hampe florale supportant les inflorescences latérales (B). Longueur de la portion de hampe florale supportant les siliques (C). Proportion occupée par ces deux portions rapportées à la hauteur de la hampe totale exprimée en % (D). Longueur des entre-nœuds portant les inflorescences latérales (E). Représentation graphique sous forme de boîte à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à une facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 5$ ).

3.2.2 Développement des organes latéraux



**Figure 38 : Développement des organes latéraux sur la hampe florale principale**

Nombre d'inflorescences latérales (A). Nombre de hampes florales secondaires (B). Nombre de siliques (C) et nombre de fleurs ouvertes à 44 jours de croissance (D). Représentation graphique sous forme de boîte à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à une facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 5$ ).

Compte tenu des domaines d'expression des différents gènes *SWEETs* et afin d'avoir une image la plus complète possible du développement de la hampe florale chez les différents génotypes, j'ai également comptabilisé le nombre d'inflorescences latérales (hampes florales portées par la hampe principale) (Figure 38A), le nombre de hampes secondaires (générées par les bourgeons axillaires des feuilles de la rosette) (Figure 38B), le nombre de siliques (Figure

38C) et le nombre de fleurs ouvertes (Figure 38D). Aucune différence significative n'a été mesurée entre les génotypes concernant le nombre d'inflorescences latérales ou le nombre de hampes florales secondaires (Figure 38A-B). Par contre, le nombre de siliques ainsi que le nombre de fleurs ouvertes du quadruple mutant est significativement plus faible par rapport au type sauvage (Figure 38C-D). De plus, le nombre de fleurs ouvertes est également significativement différent entre le type sauvage, le double mutant *swt11swt12* et les triples mutants *swt11swt12swt16* et *swt11swt12swt17* (Figure 38D) bien qu'aucune différence concernant le nombre de siliques n'ait été observée pour ces génotypes (Figure 38C).

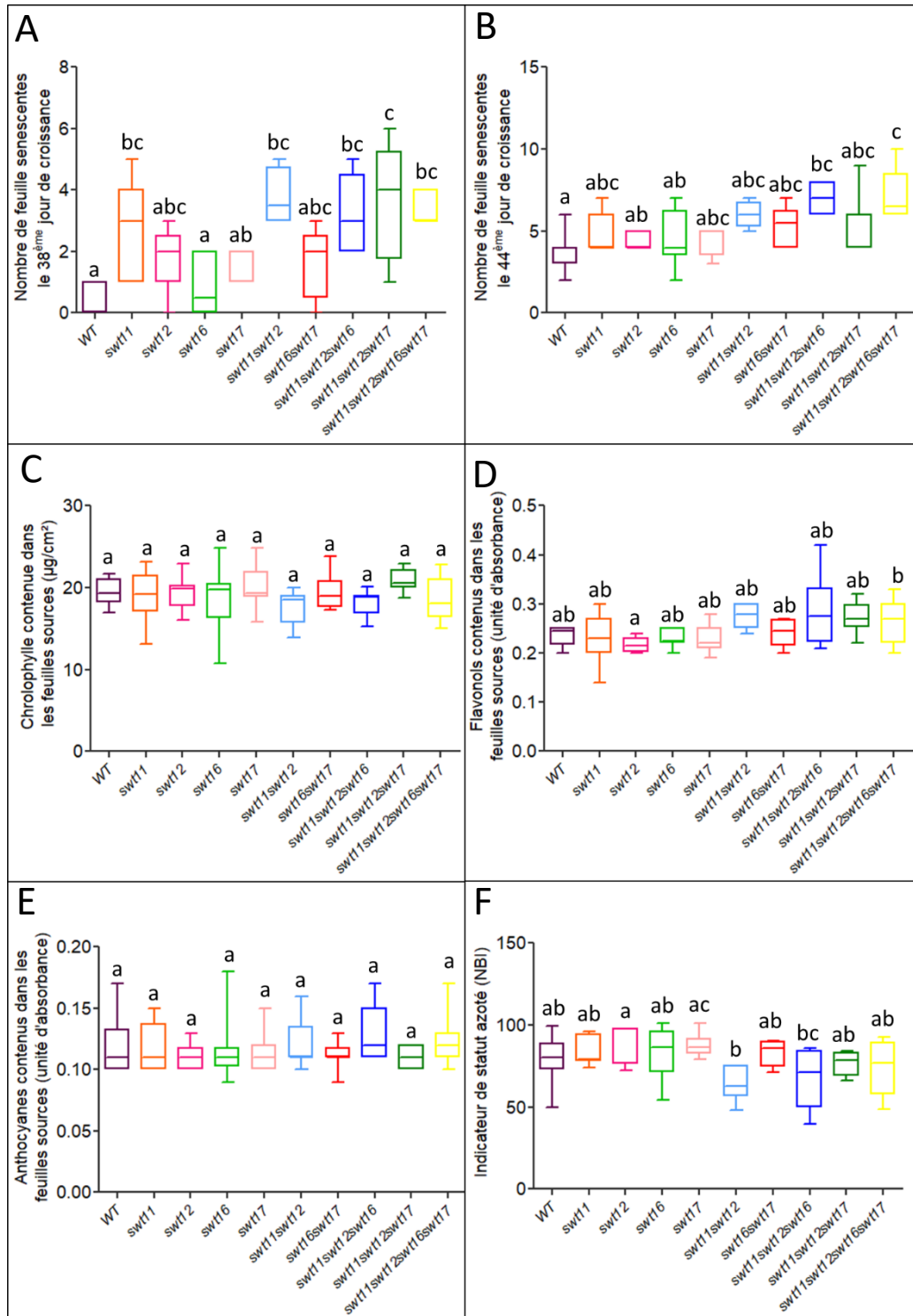
#### **4. Impact d'une perturbation des échanges de sucres médiés par les transporteurs SWEETs sur la physiologie et le métabolisme de la plante**

##### 4.1. Organe source : la rosette

Afin d'évaluer l'impact des mutations des gènes *SWEETs* sur la physiologie de la plante, des mesures grâce à une pince Dualex ont été réalisées sur une feuille mature de rosette pour chaque plante. Cet appareil de mesure permet d'évaluer le contenu en chlorophylle, en flavonols et en anthocyanes des feuilles. Ce système de mesure permet également d'obtenir une évaluation du statut azoté de la feuille analysée. Enfin, le nombre de feuilles sénescences a été comptabilisé à deux dates : le 38<sup>ème</sup> jour et le 44<sup>ème</sup> jour (Figure 39).

Le simple mutant *swt11*, le double mutant *swt11swt12*, les triples mutants et le quadruple mutant présentent significativement plus de feuilles sénescences le 38<sup>ème</sup> jour de croissance, c'est-à-dire seulement 3 jours après que la rosette ait atteint la taille maximale par rapport au type sauvage qui à cette date ne présente presque aucune feuille sénescence (Figure 39A). Les autres simples mutants et le double mutant *swt16swt17* présentent des phénotypes intermédiaires (Figure 39A). A 44 jours de croissance, seuls le triple mutant *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant sont différents du WT avec une moyenne de 7 feuilles sénescences contre 3,8 chez le WT (Figure 39B). Les autres génotypes ont entre 4 et 6 feuilles sénescences.

Aucune différence significative entre les génotypes concernant le contenu en chlorophylle et en anthocyanes n'a été mesurée (Figure 39C et 39E). En revanche, une accumulation en flavonols dans les feuilles sources du quadruple mutant comparé au simple mutant *swt12* a été mesurée (Figure 39D). Tous les autres génotypes présentent des phénotypes intermédiaires. Enfin, le statut azoté est réduit chez le double mutant *swt11swt12* comparé au simple mutant *swt12*.



**Figure 39 : Statut physiologique de la rosette des différentes lignées *sweet*** Nombre de feuilles sénescentes à 38 jours et à 44 jours de croissance (A et B). Indices du statut carboné et azoté des feuilles sources mesurés à la pince Dualex. Contenu en chlorophylle ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (C); Contenu en flavonols (unité d'absorbance) (D); Contenu en anthocyanes (unité d'absorbance) (E) et Indicateur de statut azoté correspondant au ratio du contenu en flavonols/contenu en chlorophylle (F). Représentation graphique sous forme de boîte à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à une facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 8$ ).

#### 4.2. La hampe florale

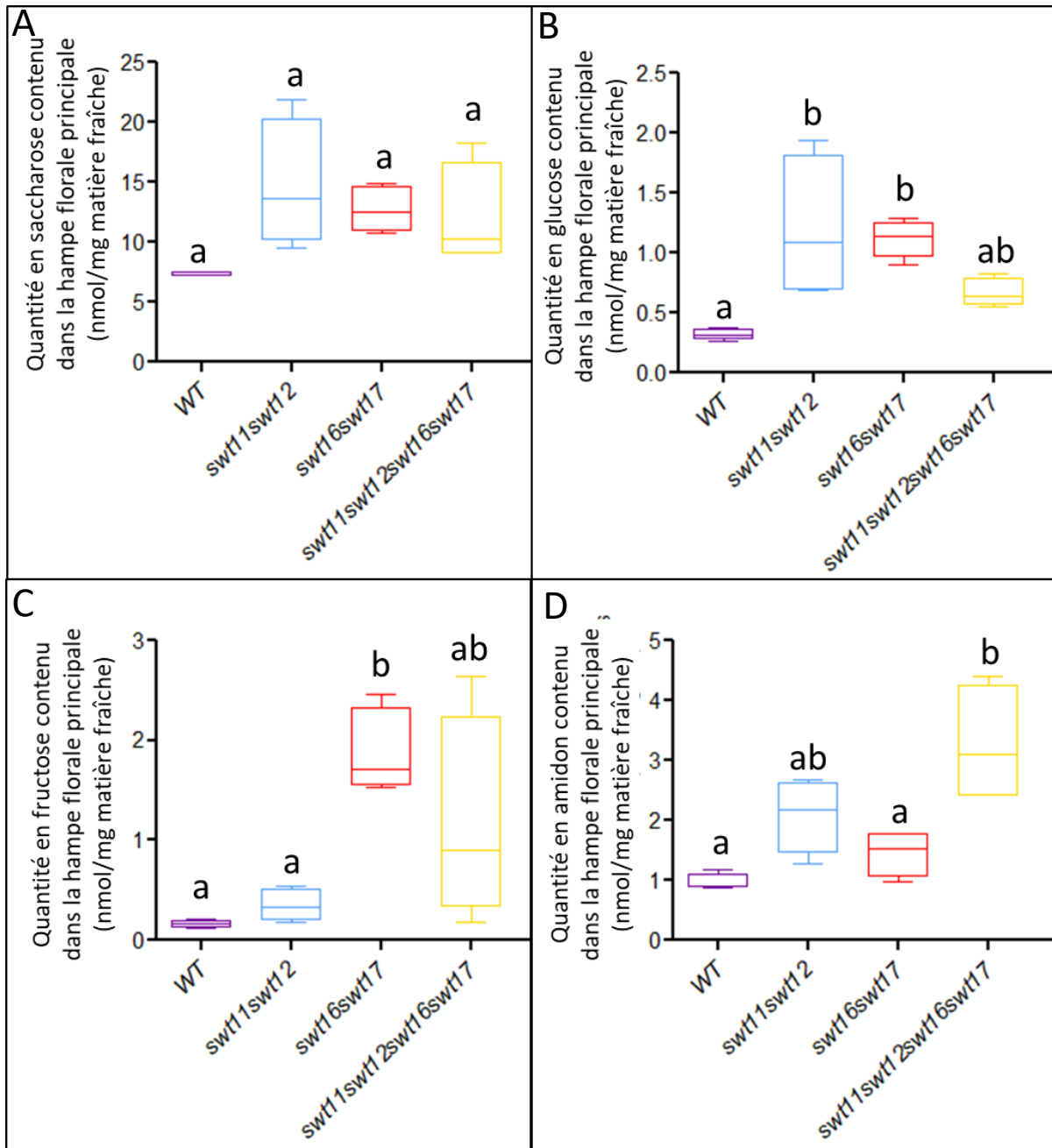
##### 4.2.1. Dosage des sucres solubles et de l'amidon

Les travaux précédemment décrits ont permis de montrer que le double mutant *swt11swt12* présentait une accumulation de saccharose, glucose et fructose dans les feuilles sources (Le Hir et al., 2015) alors que le simple mutant *swt17* et le double mutant *swt16swt17* accumulent uniquement du fructose dans les feuilles sources des plantes cultivées en conditions de jours longs (Chardon et al., 2013 ; Stage de M2). De plus, lors de mon stage de M2 nous avons montré une accumulation significative du saccharose dans la hampe florale du simple mutant *swt17* et une accumulation significative du glucose dans le double mutant *swt16swt17*. Afin de compléter cette analyse, un dosage enzymatique des sucres solubles et de l'amidon contenus de la hampe a également été réalisé sur des plantes de type sauvage, les doubles mutants *swt11swt12*, *swt16swt17* et le quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17* (Figure 40).

De façon consistante avec les résultats précédents, aucune différence significative du contenu en saccharose n'a été mesuré chez ces mutants (Figure 40A). En revanche, une accumulation significative de glucose a été mesurée pour les doubles mutants *swt11swt12* et *swt16swt17* (Figure 40B). Il est intéressant de noter que seul le double mutant *swt16swt17* accumule significativement plus (11 fois plus) de fructose que le type sauvage (Figure 40C).

Enfin, le quadruple mutant accumule significativement plus d'amidon que le type sauvage (Figure 40D). Le double mutant *swt11swt12* présente un phénotype intermédiaire avec 2 nmol/mg d'amidon contenu dans la hampe florale, alors que le contenu en amidon de la hampe florale du double mutant *swt16swt17* ne présente aucune différence significative avec le type sauvage.



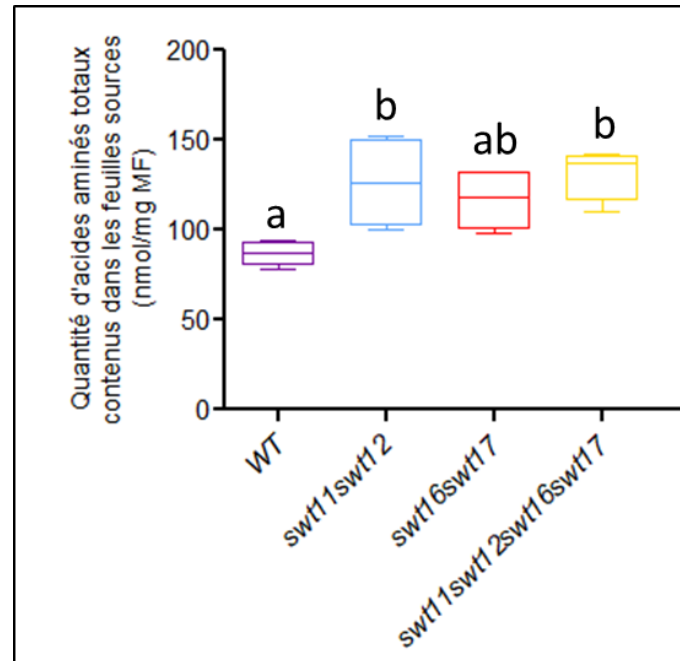


**Figure 40** : Variations des contenus en sucres solubles et en amidon de la hampe florale des différents mutants *sweet*

Concentration de saccharose (A), de glucose (B), de fructose (C) et d'amidon (D) contenu dans la hampe florale. Représentation graphique sous forme de boîte à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à une facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ).

4.2.2. Dosages des acides aminés totaux

Le contenu en acides aminés totaux a également été mesuré dans la hampe florale des différents génotypes (Figure 41). Le double mutant *swt11swt12* et le quadruple mutant accumulent tous deux significativement des acides aminés dans la hampe florale par rapport au type sauvage. En revanche, le double mutant *swt16swt17* n'est pas significativement différent des autres génotypes, il présente un phénotype intermédiaire.



**Figure 41** : Concentration d'acides aminés totaux de la hampe florale principale des différents mutants *sweet*

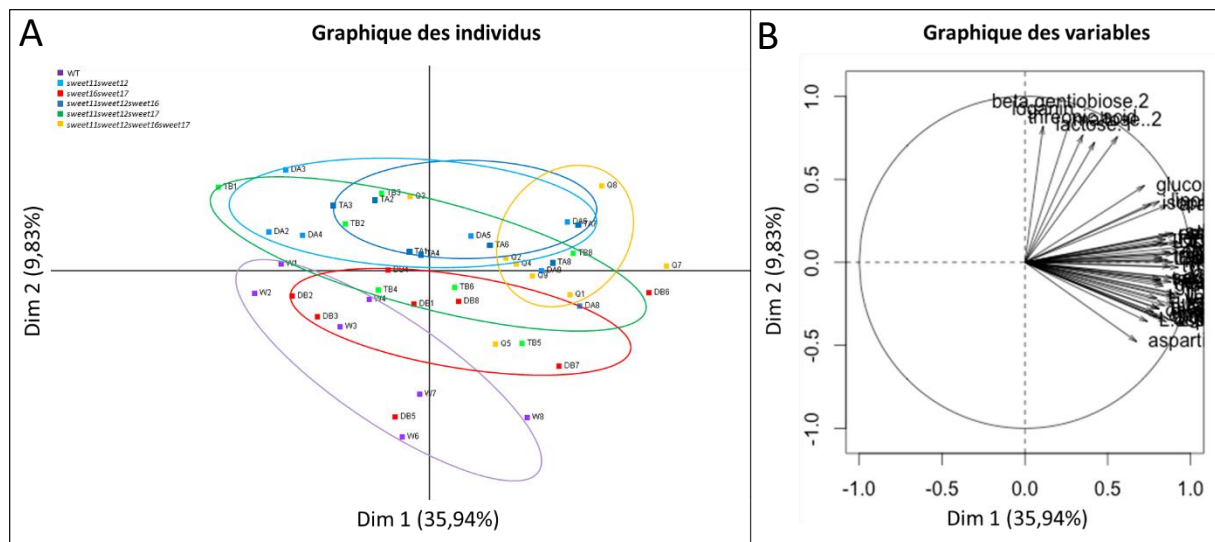
Représentation graphique sous forme de boîtes à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ).

4.2.3. Analyse métabolomique de la hampe florale

Afin de compléter l'analyse précédente des contenus en sucres solubles et en acides aminés totaux, une analyse métabolomique de la hampe florale principale a été réalisée par GC-MS (Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la spectroscopie de masse) avec Françoise Gilard de la plateforme Métabolisme Métabolome à l'IPS2 (Institut des Sciences des plantes) à

Paris-Saclay. Dans cette analyse les hampes florales des plantes de type sauvage, les doubles, les triples et le quadruple mutants ont été inclus.

La méthode d'analyse utilisée sur la plateforme permet d'obtenir des données relatives et non absolues pour les différents génotypes, permettant ainsi de comparer les génotypes entre eux. Au total, 158 métabolites ont pu être identifiés dans ces échantillons de hampe florale. Un test statistique de type ANOVA paramétrique a permis d'identifier 33 métabolites pour lesquels des différences significatives ont été mesurées entre au moins deux génotypes. J'ai réalisé une analyse en composante principale (ACP) sur ces 33 métabolites pour lesquelles des différences significatives ont été observées afin d'évaluer si une ou plusieurs variables permet de déterminer un ou plusieurs groupes parmi les génotypes (Figure 42).



**Figure 42** : Analyse en composante principale des données de métabolomiques acquises sur la hampe florale des différents mutants *sweet*

ACP montrant la projection des 2 premières composantes principales des individus (A) et des variables (B). Sur le graphe des individus, les plantes de type sauvage sont en violet (WT), le *swt11swt12* est en bleu, le *swt16swt17* est en rouge, le *swt11swt12swt16* est en bleu foncé, le *swt11swt12swt17* est en vert et le quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17* est en jaune. Cette ACP a été réalisée à partir des métabolites pour lesquels il y a une différence significative entre au moins deux génotypes (ANOVA à un facteur) soit 33 métabolites parmi les 158 métabolites identifiés. Analyses statistique réalisée sur  $n \geq 7$  plantes par génotype.

On remarque avec cette analyse sans *a priori* que la première et la deuxième composante principale expliquent plus de 45% de la variabilité totale observée dans l'ensemble des données et permet de regrouper certains individus entre eux (Figure 42A). Ainsi, la première dimension

permet de dissocier les plantes de type sauvage de celles du quadruple mutant très distinctement (Figure 13A). La deuxième dimension permet quant à elle de dissocier le type sauvage WT (en violet) et le *swt16swt17* (en rouge) des autres génotypes (Figure 42A). Sur le graphique des variables, on remarque que cette différence est expliquée notamment par une différence au niveau des contenus en sucres chez le double mutant *swt11swt12* ainsi que les triples et le quadruple mutants (Figure 42B). Afin d'évaluer la variabilité au sein d'un génotype, j'ai également réalisé une carte des chaleurs sur ce jeu de données en représentant tous les échantillons. Ils sont organisés en grille avec chaque colonne représentant un échantillon et chaque ligne correspondant à un métabolite. Les métabolites sont regroupés en cluster en fonction de leurs quantités contenues dans la hampe florale. Les valeurs de  $p$  du test statistique de type ANOVA paramétrique sont répertoriées dans le tableau S3 en annexe. Parmi les métabolites statistiquement différents en fonction des génotypes, 39,4% appartiennent à la classe des acides aminés, 22,4% sont des sucres, 21,2% sont des acides organiques et 15,4% sont des terpènes.

Compte tenu de la variabilité observée au sein de chaque génotype, j'ai choisi de calculer les médianes et de représenter les résultats sous la forme d'une carte des chaleurs en positionnant les métabolites selon les grandes voies de biosynthèse du métabolisme primaire (Figure 43). Seuls les métabolites présentant un test  $t$  de Student significatif sur les médianes sont présentés sur le schéma de synthèse.

#### ➤ La glycolyse

Il est important de noter qu'en accord avec les résultats précédents (Figure 40A), aucun mutant ne présente de différence significative de quantités de saccharose contenues dans la hampe florale. De plus, les doubles mutants et le quadruple mutant ne présentent pas de différence pour le contenu en glucose. En revanche, les triples mutants contiennent significativement moins de glucose que les plantes sauvages. A l'inverse, concernant les quantités de fructose, le double mutant *swt16swt17* et le quadruple mutant accumulent du fructose dans la hampe florale. Le glucose-6-phosphate, impliqué dans de nombreux processus métaboliques, est également accumulé chez le quadruple mutant (Figure 43). Les autres métabolites impliqués dans la glycolyse ne sont pas significativement différents entre les mutants et les plantes sauvages. On peut donc en conclure que dans la hampe florale, la mutation des gènes *SWEET16* et *SWEET17* n'impacte que les quantités de fructose avec une accumulation dans la hampe florale. La mutation des deux gènes *SWEET11* et *SWEET12* n'entraîne pas de différence de quantités de métabolites impliqués dans la glycolyse. En

revanche, les triples mutants sont impactés dans les quantités de glucose et présentent moins de glucose dans la hampe florale que les sauvages, et le quadruple mutant présente une accumulation de fructose et de glucose-6-phosphate.

➤ Voie des pentoses phosphate

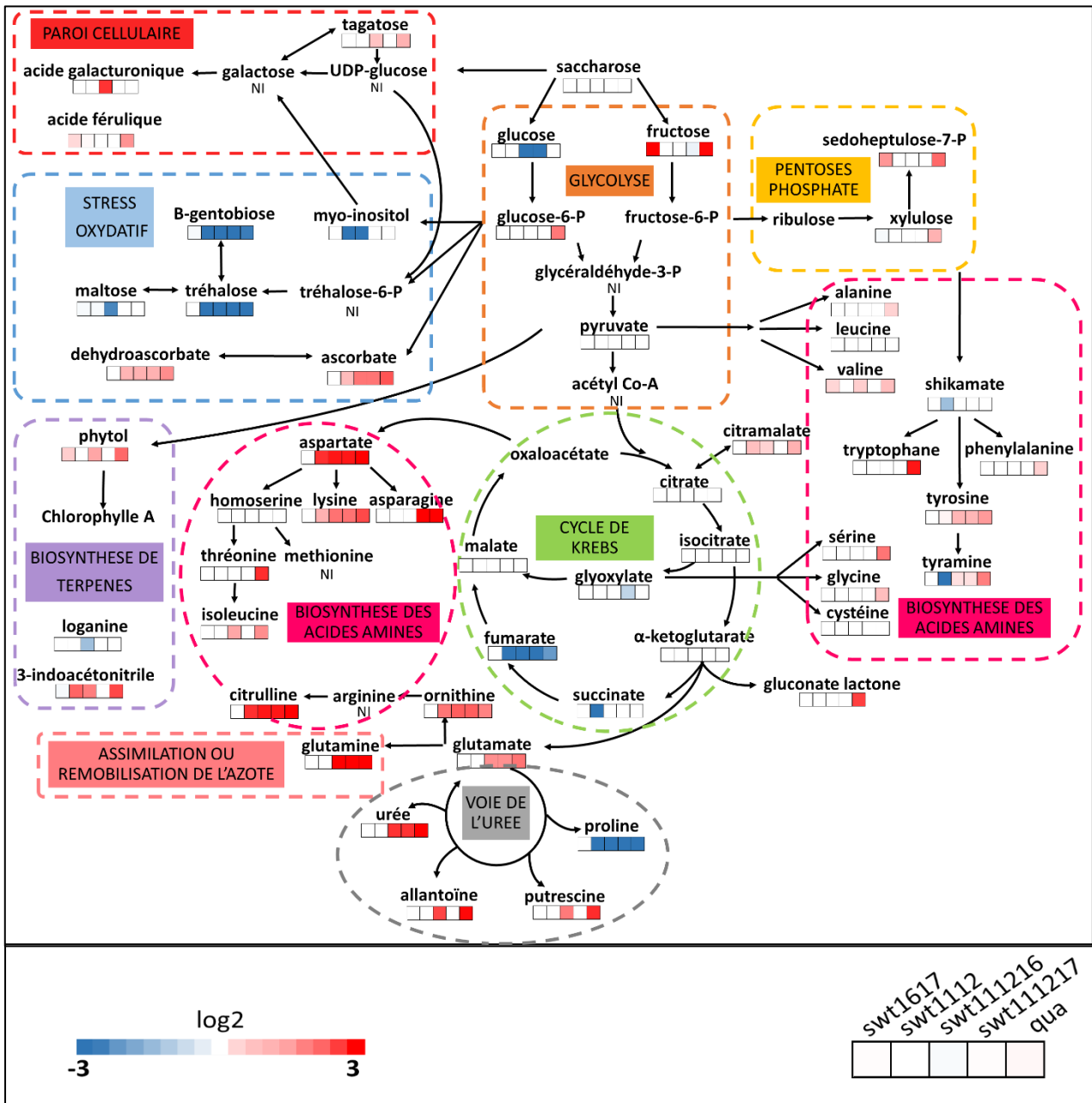
Certains sucres impliqués dans la voie des pentoses phosphates sont également accumulés chez certains mutants. Ainsi, le double mutant *swt16swt17* accumule du sédohéptulose-7-phosphate et le quadruple mutant accumule du sédohéptulose-7-phosphate et du xylulose.

➤ Voie de biosynthèse des polysaccharides de paroi

L'UDP-glucose n'a pas pu être identifié en GC-MS. Le galactose n'a pas non plus pu être identifié par cette technique mais le tagatose, un isomère du galactose, est accumulé chez le double *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant. On remarque également que certains acides carboxyliques impliqués dans la voie de biosynthèse des hémicelluloses ou des pectines sont impactés par ces mutations. En effet, l'acide galacturonique est accumulé chez le triple mutant *swt11swt12swt16* et l'acide férulique est accumulé chez le double mutant *swt16swt17* et le quadruple mutant.

➤ Le cycle de Krebs

Peu d'acides organiques impliqués dans le cycle de Krebs sont affectés et lorsqu'ils le sont, ils sont en quantité réduite par rapport au type sauvage. En effet, seules les quantités de glycoxylate, succinate et fumarate sont affectées, ils sont tous trois en quantités réduites dans la hampe florale des mutants. Le double mutant *swt16swt17* n'est cependant pas affecté dans le cycle de Krebs. En revanche, le double mutant *swt11swt12* contient moins de succinate et de fumarate que le WT. Le triple *swt11swt12swt17* contient moins de glycoxylate et moins de fumarate que le WT et le triple *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant contiennent uniquement moins de fumarate que le WT. Les acides organiques dérivant du cycle de Krebs tels que le citramalate et le gluconate lactone sont quant à eux accumulés chez le quadruple mutant alors que *swt11swt12* et les triples mutants n'accumulent que du citramalate.



**Figure 43 : Représentation schématique des principales voies de biosynthèse du métabolisme dans une cellule végétale**

Les résultats de l'analyse métabolomique sont représentés sous forme de carte des chaleurs sous chaque métabolite. Ainsi une accumulation du métabolite chez un mutant comparé au type sauvage apparaît en rouge et une réduction apparaît en bleu. La couleur blanche indique aucune différence significative. Chaque carré représente la valeur du Log2 des ratios des médianes entre le mutant et le type sauvage ( $n \geq 7$ ).

#### ➤ Cycle de l'Urée

L' $\alpha$ -kétoglutarate impliqué dans le cycle de Krebs permet également la production de glutamate, un acide aminé essentiel dans la voie de l'urée. Les métabolites issus du cycle de l'urée sont pour la plupart accumulés chez les triples et le quadruple mutants. L'allantoïne et la putrescine sont quant à eux également accumulées chez le triple *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant. A l'inverse, la proline est quant à elle réduite chez le double mutant *swt11swt12*, les triples et le quadruple mutants.

#### ➤ Voie de biosynthèse des acides aminés

Le glutamate, impliqué dans le cycle de Krebs, est également impliqué dans la voie de biosynthèse des acides aminés. En effet, il permet la production de glutamine, l'acide aminé majeur transporté à longue distance. Cet acide aminé est impliqué dans l'assimilation ou la remobilisation de l'azote et il est accumulé chez les triples et le quadruple mutants. On remarque également que tous les acides aminés sont accumulés chez le double *swt11swt12* (citrulline, ornithine, lysine, aspartate), les triples mutants et le quadruple mutant. Seul le double mutant *swt16swt17* ne présente aucune différence significative avec le WT quant au contenu en acides aminés dans la hampe florale ce qui est en cohérence avec les résultats obtenus ci-dessus (Figure 12).

#### ➤ Métabolites impliqués dans le stress oxydatif

Les métabolites impliqués dans le stress oxydatif sont également impactés par la mutation des gènes *SWEETs*. En effet, l'ascorbate et le déhydroascorbate sont tous deux accumulés chez les mutants, excepté chez le double mutant *swt16swt17*. En revanche, les sucres impliqués dans le stress oxydatif tels que le tréhalose et le  $\beta$ -gentobiose sont quant à eux en quantités réduites chez les mutants *swt11swt12*, les triples et le quadruple mutants. Le maltose présente quant à lui une quantité réduite chez le triple *swt11swt12swt16*. Le myo-inositol, impliqué dans le stress oxydatif, et également impliqué dans la voie de biosynthèse du galactose est présent en quantité réduite chez le double *swt11swt12* et le triple *swt11swt12swt16*.

#### ➤ Voie de biosynthèse des terpènes

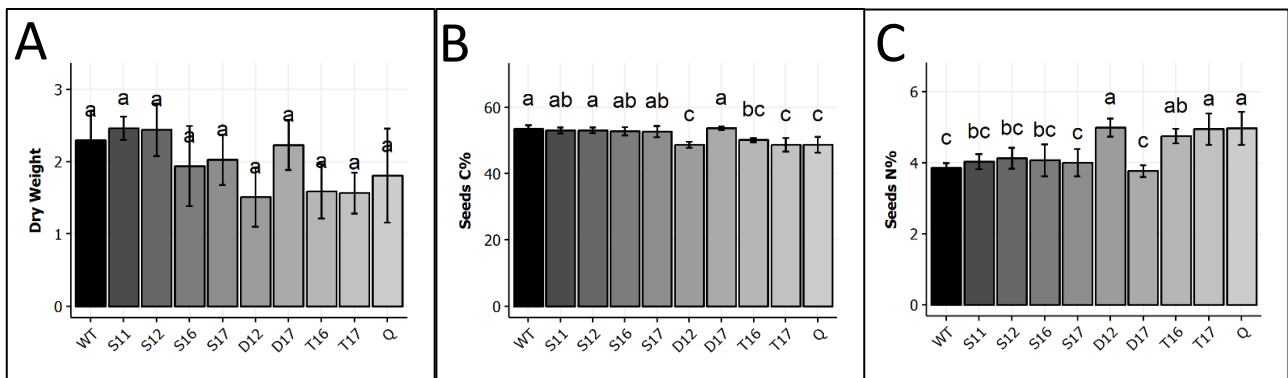
Certains terpènes tels que le phytol impliqué dans la biosynthèse de la chlorophylle et le 3-indoacétonitrile sont accumulés chez les mutants *sweets*. Ainsi, une accumulation de phytol est observée chez les mutants *swt16swt17*, *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant. Le 3-indoacétonitrile est accumulé chez le double *swt11swt12*, *swt11swt12swt16* et chez le quadruple mutant. Enfin, le contenu en loganine est diminué chez le triple *swt11swt12swt16* comparé au WT.



De façon générale, les mutations dans les gènes *SWEET16* et *SWEET17* affectent relativement peu le métabolisme de la hampe florale alors que les mutations dans les gènes *SWEET11* et *SWEET12* ont un impact fort sur le métabolisme de la hampe florale avec une accumulation de sucres et d'acides aminés chez ces mutants, ainsi qu'une diminution des contenus en acides organiques du cycle de Krebs ou de sucres impliqués dans le stress oxydatif.

#### 4.1 *Organes puits : les siliques*

L'analyse métabolomique réalisée sur la hampe florale principale a révélé une perturbation du métabolisme carboné et azoté dans certaines des lignées mutantes. Compte tenu de ces résultats, une analyse du statut carboné et azoté des siliques des plantes sauvages et des plantes mutées pour les gènes *SWEETs* a été réalisée en collaboration avec Anne Marmagne et Fabien Chardon de l'équipe Signalisation, Transport et Utilisation de l'Azote à l'IJPB. Le poids sec des siliques, les pourcentages de carbone et d'azote contenus dans les siliques, ainsi que la taille des graines ont été mesurés (Figure 15 et Figure S5). Aucune différence significative du poids secs des graines n'a été mesurée entre les lignées analysées (Figure 15A). Cependant, l'analyse élémentaire des graines grâce à l'IRMS (spectrométrie de masse à rapport isotopique) a permis de montrer que les graines du double mutant *swt11swt12*, des triples et du quadruple mutants ont significativement moins de carbone par rapport au type sauvage (Figure 15B). De plus, les graines de ces mutants contiennent significativement plus d'azote que les plantes sauvages (Figure 15C). Enfin, les graines des simples mutants et du double mutant *swt16swt17* ne sont significativement pas différentes des graines des plantes sauvages (Figure 15B et 15C). Ces résultats sont en cohérence avec les résultats précédemment obtenus dans l'équipe sur les graines du double mutant *swt11swt12* (données non publiées).



**Figure 44 : Analyses du statut carboné et azoté dans les graines des différents mutants *sweet***

Poids secs des siliques (A), pourcentage de carbone (B) et d'azote des graines (C). Les valeurs présentées sont les moyennes  $\pm$ SD ( $n \geq 7$ ). Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ).

#### III. Discussion

Contrairement aux transporteurs de sucres transportant les sucres contre le gradient de concentration décrits précédemment, les transporteurs de type SWEETs permettent le transport facilité de sucres selon le gradient de concentration (Chen et al., 2010). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, il a précédemment été décrit que les transporteurs SWEET11 et SWEET12 sont localisés à la membrane plasmique des cellules du système vasculaire (Chen et al., 2010 ; Le Hir et al. 2015). Ils permettent les échanges de saccharose, de glucose et de fructose entre les cellules de parenchyme et les cellules conductrices du phloème et/ou du xylème de la hampe florale (Chen et al., 2012 ; Le Hir et al., 2015). De plus, les transporteurs tonoplastiques SWEET16 et SWEET17 permettent la régulation de l'homéostasie des sucres (saccharose, glucose et/ou fructose) entre le cytosol et la vacuole (Chardon et al., 2013, Klemens et al., 2013, Guo et al., 2013, 2014). L'analyse de lignées mutées dans l'expression d'un ou de plusieurs de ces gènes devrait permettre de mieux évaluer l'implication des gradients de sucres, à l'échelle intercellulaire et/ou intracellulaire, dans le développement, la physiologie et la croissance des plantes.

#### 1. Perturber l'expression des gènes SWEETs impacte la croissance de la rosette

Dans ce chapitre nous avons montré que des mutations dans un ou plusieurs gènes *SWEETs* entraînent une réduction de la croissance et donc au final de la taille de la rosette par rapport à celle du type sauvage, soit dès les premiers stades de développement pour le double mutant *swt11swt12*, soit à partir du jour d'apparition du bouton floral dans le cas des simples mutants *swt11*, *swt12*, *swt16*, *swt17* et du double mutant *swt16swt17*. De façon intéressante nos résultats montrent que les triples mutants *swt11swt12swt16* et *swt11swt12swt17*, ou le quadruple mutant ont le même phénotype que le double mutant *swt11swt12*. Ce résultat suggère que seuls les gènes *SWEET11* et *SWEET12* jouent un rôle dans le développement de la rosette au début du développement.

Les sucres produits au cours de la photosynthèse représentent la ressource énergétique principale pour la croissance de la plante (Sulpice et al., 2009). Ainsi, au cours du développement de la rosette, les feuilles sources photosynthétiques produisent de grandes quantités de sucres directement utilisés pour la croissance de ces dernières. Ces sucres sont également stockés sous forme d'amidon pour maintenir le métabolisme durant la nuit et sont exportés à travers le phloème jusqu'aux organes puits et participent ainsi à la croissance de

nouvelles feuilles (Ainsworth et Bush, 2011). Ainsi, le phénotype du double mutant *swt11swt12* pourrait être dû à une perturbation de l'allocation du carbone. En effet, il a précédemment été décrit que les transporteurs SWEET11 et SWEET12 étaient impliqués dans le chargement du phloème en assurant le transport facilité des sucres entre les cellules de parenchyme phloémien et les cellules compagnes (Chen et al., 2012). D'après Chen et collaborateurs (Chen et al., 2012) la réduction de la croissance de la rosette du double mutant *swt11swt12* pourrait être due à un problème de chargement du phloème, et l'accumulation des sucres solubles dans les feuilles sources est en faveur de cette hypothèse (Chen et al., 2012 ; Le Hir et al., 2015). Cependant, l'analyse des sèves phloémiennes effectuées par l'équipe n'a mis en évidence aucune modification du contenu en saccharose dans la sève du double mutant *swt11swt12* (données non publiées). De plus, dans nos conditions de culture, nous n'avons observé aucune expression des promoteurs *pSWEET11* et *pSWEET12* dans les veines mineures, lieu du chargement des sucres dans le phloème. Il est donc peu probable qu'une réduction de taille de la rosette chez le double mutant *swt11swt12* soit due à un défaut d'allocation du carbone.

Une différence de la taille des graines peut également influencer la croissance et le développement de la rosette à la génération suivante (Elwell et al., 2011). Ainsi, la plus petite rosette du double mutant *swt11swt12* pourrait également être due à une moins bonne qualité des graines dont elle dérive. En effet, en 2015, Chen et al. ont montré que le poids des graines produites par le double mutant *swt11swt12* et le triple mutant *swt11swt12swt15* est significativement réduit par rapport au type sauvage. Ils ont également montré que ce phénotype est dû à un nombre réduit de siliques produit par la plante chez ces mutants. Enfin, les graines produites par ces mutants présentent un contenu en lipides plus faible par rapport aux graines du type sauvage. (Chen et al., 2015). Nos résultats sont en accord avec les résultats publiés par Chen et al. (2015) et en complément, nous montrons que les graines produites par le double mutant *swt11swt12* sont de taille réduite et présentent un pourcentage d'azote plus élevé associé à une réduction du pourcentage de carbone. La taille réduite des graines peut être mise en regard du défaut de développement de l'embryon précédemment observé (Chen et al., 2015) ou être due à un défaut de remplissage des graines qui pourrait entraîner un retard de croissance de la rosette à la génération suivante. Il est à noter qu'aucun décalage de germination n'a été observé sur ces lignées dans les expériences précédemment réalisées dans l'équipe (données non publiées). L'étude des mutants de riz *Ossweet11* et/ou *Ossweet15* et de maïs *ZmSWEET4c* ont également mis en évidence un problème de remplissage des graines bien qu'aucun phénotype

de taille de plantes à la génération suivante n'ait été observé (Sosso et al., 2015 ; Yang et al., 2018).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les valves des siliques sont photosynthétiques et les sucres qui y sont synthétisés contribuent au pool de carbone utilisé par les graines notamment au début de leur développement. Ainsi, les valves des siliques jouent un rôle clé dans le rendement des graines et leur qualité (Bennett et al., 2011 ; Zhu et al., 2018). Cependant les acteurs moléculaires impliqués dans le transfert de sucres entre les valves de la silique et les graines ne sont pas connus. De façon intéressante, nous avons montré une expression spécifique du promoteur du gène *SWEET12* dans le système vasculaire à la jonction entre le pédoncule et les valves de la silique et dans les valves. Ainsi, en complément d'un rôle des transporteurs SWEET dans le transport facilité des sucres dans les différents tissus de la graine (Chen et al., 2015 ; Sosso et al., 2015 ; Yang et al., 2018), les SWEETs pourraient également contribuer au développement, la croissance et le remplissage des graines du fait de leur expression dans les valves de la silique.

Outre la croissance des feuilles de la rosette, l'émergence du bouton floral et la croissance de la hampe requièrent également une grande quantité d'énergie, principalement sous forme de sucres. Ainsi chez la moutarde blanche (*Sinapis alba* L), une accumulation de saccharose dans la sève phloémienne au moment de l'induction florale a été observée (Lejeune et al., 1993). De plus, chez *Arabidopsis thaliana*, il est connu que durant les premiers stades de développement du bouton floral (entre 0 et 72 heures) de nombreux facteurs de transcription et hormones permettent la mise en place d'un primordia floral (Denay et al., 2017). Une fois l'organe floral développé (entre 96 et 150 heures), ce dernier émerge et est visible à l'œil nu (Boyes et al., 2007, Denay et al., 2017). L'induction florale débute ainsi 4 à 5 jours avant l'émergence de la hampe soit aux alentours du 24<sup>ème</sup> jour dans nos conditions de culture. Les analyses de vitesse de croissance présentées dans ce chapitre montrent effectivement une phase plateau dans la croissance de la rosette des plantes de type sauvage à partir du 25<sup>ème</sup> jour de croissance. Ceci suggère que l'énergie produite par les feuilles de rosette est allouée préférentiellement à l'émergence de l'inflorescence et le début de la croissance de la hampe florale plutôt qu'à la croissance de la rosette. Chez le simple mutant *swt17* et le double mutant *swt16swt17* cette phase plateau intervient à partir du 24<sup>ème</sup> jour de croissance et elle n'est même pas présente chez le simple mutant *swt16* qui présente une chute brutale de la vitesse de croissance entre le 28<sup>ème</sup> et le 29<sup>ème</sup> jour. Ces résultats semblent donc suggérer un rôle différent des deux transporteurs tonoplastiques dans la croissance de la rosette mais également une relation entre le maintien de

l'homéostasie des sucres entre le cytosol et la vacuole médiée par SWEET16 et SWEET17 et les événements entourant l'induction florale. L'induction florale est déclenchée par un stimulus provenant des feuilles matures (Bernier et al., 1981) d'origine multifactorielle (Corbesier et al., 1998). Les sucres y joueraient notamment un rôle important (Yu et al., 2000, Corbesier et al., 2005, Matsoukas et al., 2018 et Wingler, 2018) en étant transportés dans le nouvel organe en développement notamment grâce à l'utilisation des réserves en amidon (Corbesier et al., 2005). Les études menées sur les transitions développementales entraînant l'émergence de nouveaux puits ont également mis en évidence l'implication de nombreuses voies de signalisation diverses associées au métabolisme des sucres (ex : TOR, tréhalose-6-phosphate, et hexokinase1), suggérant ainsi que ces transitions ne sont possibles que lorsqu'une quantité de carbone est suffisante pour promouvoir le développement des nouveaux organes (Wingler, 2018). Pourtant, contrairement aux lignées mutées dans la biosynthèse d'amidon, la mutation d'un ou plusieurs gène(s) *SWEET* n'entraîne pas de retard d'apparition du bouton floral, seulement un ralentissement de la croissance de la rosette. Sur la base des résultats produits ici, il convient donc d'être prudent sur la relation entre le défaut de transport de sucres observé dans les feuilles (i.e. accumulation de sucres dans les feuilles), le ralentissement de la vitesse de croissance de la rosette au moment de l'induction florale et la réduction de la hauteur de la hampe florale. Afin d'approfondir ce point, il serait donc intéressant d'observer si le promoteur de ces gènes s'exprime ou non dans le méristème floral mais également de réaliser des dosages des sucres solubles, d'amidon et d'acides aminés totaux dans les différents organes (ex feuilles sources, feuilles puits, bouton floral, hampe florale) au cours de la transition florale chez ces différentes lignées mutantes.

#### **2. Les gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et/ou *SWEET17* sont nécessaires pour l'allocation des sucres et le développement de la hampe florale**

Au cours du développement de la hampe florale chez *Arabidopsis thaliana*, le méristème d'inflorescence produit dans un premier temps la portion de la hampe portant les inflorescences latérales puis dans un second temps la portion de la hampe portant les fleurs puis les fruits (Pouteau et al., 2011). Chez le quadruple mutant, c'est uniquement la partie de la hampe qui porte les siliques qui est affectée. De plus ce phénotype s'accompagne d'un nombre réduit de siliques. Ces résultats suggèrent soit un dysfonctionnement précoce du fonctionnement du méristème floral ou bien le fait que le méristème floral est plus petit et donc que la production

d'organes va être réduite. Par ailleurs, des observations faites dans l'équipe ont montré que le double mutant *swt11swt12* présente un méristème floral plus petit que celui du type sauvage. Pourtant le double mutant *swt11swt12* ne présente pas de différence significative quant à la hauteur de la hampe et au nombre de siliques. Ces observations doivent être répétées et surtout étendues au double mutant *swt16swt17* et au quadruple mutant afin d'évaluer si ce phénotype est effectivement lié à un épuisement plus rapide du méristème floral du fait d'une plus petite taille de ce méristème. Chez *Arabidopsis*, une inhibition de l'initiation des primordia floraux a été décrit en situation de limitation en carbone (Lauxmann et al., 2016). Ainsi les phénotypes observés chez le quadruple mutant pourraient également être dus à un défaut d'allocation des réserves carbonées au niveau du méristème.

L'analyse métabolomique de la hampe florale des doubles, triples ou quadruple mutants SWEETs a également révélé que parmi 158 métabolites identifiés, la quantité de 33 d'entre eux est significativement modifiée chez les mutants. Parmi ces 33 métabolites, 39,4% sont des acides aminés, 24,2% sont des sucres, 21,2% sont des acides organiques et 15,2% sont des terpènes. La comparaison des quantités de métabolites contenus dans la hampe florale des mutants et des plantes sauvages révèle une différence d'implication des gènes codant les transporteurs plasmalemmiques SWEET11 et SWEET12 et ceux codant les transporteurs tonoplastiques SWEET16 et SWEET17. En effet, le double mutant *swt16swt17* présente peu de modifications comparées à celles observées dans les autres mutants également affectés dans l'expression des gènes *SWEET11* et *SWEET12*. Ainsi, les dosages enzymatiques de sucres et l'analyse métabolomique de la hampe florale du double mutant *swt16swt17* montrent uniquement une accumulation de fructose dans la hampe florale. Par contre l'accumulation de glucose mesurée par la méthode enzymatique n'a pas été corroborée par l'analyse métabolomique. Ce résultat suggère donc que la perturbation des gradients de sucres entre la vacuole et le cytoplasme dans les cellules vasculaires (phloème et xylème) induit une accumulation de fructose suffisamment importante pour qu'elle soit visible à l'échelle de la hampe florale entière bien qu'aucun phénotype ne soit visible à l'échelle de l'organe.

Dans le cas du double mutant *swt11swt12* et du quadruple mutant, les données de dosage enzymatique et l'analyse métabolomique sont cohérents, excepté pour le contenu en glucose. De façon intéressante, aucune variation du contenu en saccharose n'a été mise en évidence dans la hampe florale par les deux techniques alors que, chez *Arabidopsis thaliana*, les transporteurs SWEET11, SWEET12 et SWEET16 transportent notamment du saccharose (Chen et al., 2012 ; Klemens et al., 2013) et qu'une augmentation du contenu en saccharose est observée dans les

feuilles sources du double mutant *swt11swt12* (Chen et al., 2012, Le Hir et al., 2015). Le saccharose, produit au cours de la photosynthèse dans les feuilles sources est chargé dans le phloème, transporté à longue distance puis déchargé dans les organes demandeurs en énergie (Dinant, 2008). Chez *Arabidopsis thaliana* et chez le Sorgho (*Sorghum bicolor*) AtSWEET11, AtSWEET12 et SbSWEET8 (Chen et al., 2012 ; Mizuno et al., 2016) ont été décrits comme étant impliqués dans le chargement du phloème dans les feuilles sources. Ainsi, si l'on considère que la hampe florale constitue un puit pour le saccharose alors un défaut de chargement du phloème dans les feuilles sources devrait conduire à une diminution du contenu en saccharose de la hampe florale. Ce n'est pourtant pas ce que nous avons observé. Dans ce contexte, la question du statut source/puits de la hampe florale se pose. Chez *Arabidopsis thaliana*, il est connu depuis longtemps que la hampe florale est photosynthétiquement active (y compris les feuilles caulines) et constitue le contributeur majeur au gain total de carbone qui a lieu tout au long de la vie de la plante (Earley et al., 2009). De plus, grâce à des marquages au  $^{14}\text{CO}_2$  et l'utilisation de la technique d'imagerie de radioisotopes en temps réel (real-time radioisotope imaging system, RRIS), il a été décrit qu'avant l'apparition des premières fleurs, les feuilles de rosette sont la principale source de carbone pour la hampe florale alors qu'après l'apparition des fleurs, le carbone nécessaire est produit par la hampe florale, les siliques et les feuilles caulines (Sugita et al., 2016). Ces résultats ont été récemment supportés par l'analyse de l'expression des gènes codant pour les principaux transporteurs de sucres (SUC et SWEETs) dans les différents organes au cours du développement (Durand et al., 2018). Dans le contexte de ce travail de thèse, la hampe florale constitue vraisemblablement un organe source et il semble donc envisageable de suggérer que les contenus en sucres mesurés dans la hampe florale ne sont que peu dépendants des contenus en sucres des feuilles sources. Ainsi, l'absence de variations des contenus en sucres dans la hampe florale du double mutant *swt11swt12* tend à suggérer que les transporteurs SWEET11 et SWEET12 n'auraient pas un rôle majeur dans le chargement des sucres du phloème produit dans la hampe florale ou qu'il existerait une compensation fonctionnelle par d'autres transporteurs plasmalémmiques. Par contre l'augmentation du contenu en amidon mesurée dans la hampe florale du quadruple mutant suggère une augmentation du stockage de sucres dans cet organe et donc moins de ressources disponibles pour les autres processus physiologiques dont la production d'organes floraux/siliques par le méristème apical. Ainsi plutôt qu'un défaut de transport à longue distance des sucres, les phénotypes observés chez le quadruple mutant pourraient être dus à un défaut dans la remobilisation des réserves carbonées.



Enfin, l'analyse métabolomique de la hampe florale de ces mutants permet également de suggérer une modification du statut oxydatif de cet organe. Ainsi, l'allantoïne, un métabolite issu du cycle de l'urée, est accumulé chez le triple *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant. Ce métabolite est impliqué dans la réponse au stress oxydatif causé par une accumulation de métaux lourds tels que le cadmium chez le concombre (Dresler et Wojciak-Kosior, 2019) et *Arabidopsis thaliana* (Nourimand et al., 2016) ou un stress salin chez *Arabidopsis thaliana* (Lescano et al., 2016). De plus, une augmentation du contenu en ascorbate et en déhydroascorbate est mesurée chez le double mutant *swt11swt12*, les triples et le quadruple mutant, suggérant une augmentation de l'activité antioxydante dans ces lignées. En revanche, plusieurs métabolites impliqués dans la réponse au stress sont présents en concentration réduite chez le double *swt11swt12*, les triples mutants et le quadruple mutant. C'est le cas de la proline, du myo-inositol, du  $\beta$ -gentobiose et du tréhalose. Sur la base de ces résultats, il semblerait donc qu'une modification des gradients de sucres médiés par les gènes SWEETs dans le système vasculaire de la hampe florale impacte le statut redox de cet organe et potentiellement la réponse de la plante à des changements environnementaux.

### **3. La perturbation des gradients de sucres médiés par les transporteurs SWEETs semble favoriser la remobilisation de l'azote vers les graines**

Dans la plante, l'azote inorganique est assimilé par les racines principalement sous forme d'ammonium puis incorporé dans la glutamine, l'asparagine, le glutamate et l'aspartate (Mifflin and Habash, 2002). Les acides aminés, notamment la glutamine qui est la forme de transport majoritaire, sont alors chargés dans le système vasculaire et transportés jusqu'aux organes puits afin de constituer les protéines. (Coruzzi, 2003, Näsholm et al., 2009, cités par Borgie et Fernie, 2017). Outre une implication dans la synthèse de protéines, les acides aminés jouent également un rôle important dans la signalisation ou dans la réponse aux stress (Hildebrandt et al., 2015). Dans le cadre de cette étude, l'analyse métabolomique mets en évidence une accumulation d'acides aminés dans la hampe florale du double mutant *swt11swt12*, des triples et du quadruple mutant et montrent que ce sont essentiellement les acides aminés transportés qui s'accumulent (glutamine, glutamate, asparagine et aspartate). De plus, il a été décrit que l'urée s'accumule dans les feuilles sénescents et serait utilisée comme molécule de transport de l'azote dans le phloème (Bohner et al., 2015). Dans nos conditions de culture, l'urée s'accumule également dans la hampe florale des triples et du quadruple mutant. Enfin, ces lignées présentent également une sénescence précoce des feuilles et l'augmentation du pourcentage d'azote dans

les graines. L'ensemble de ces résultats suggère donc une augmentation de la remobilisation de l'azote dans la hampe florale chez les mutants *swt11swt12* puisque qu'il n'y a pas ou peu de variations des quantités d'acides aminés dans la hampe florale des mutants *swt16swt17*.

Nous avons également observé une accumulation des acides aminés issus du cycle de Krebs provenant de l'oxaloacétate (aspartate, lysine, arginine, thréonine, isoleucine) et de ceux provenant du  $\alpha$ -kétooglutarate (glutamate, glutamine, ornithine, citrulline) chez les triples et le quadruple mutant tandis que ceux dérivant du glyoxylate (sérine, glycine et cystéine), du pyruvate (alanine, leucine et valine) ou de la voie des pentoses phosphates (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) augmentent uniquement chez le quadruple mutant. Ces résultats mettent en évidence que la majorité des acides aminés sont accumulés uniquement chez les triples et le quadruple mutant. Ces résultats montrent ainsi qu'une modification du transport facilité des sucres médié par les transporteurs SWEETs entraîne une augmentation globale du métabolisme de l'azote. Une interaction entre le métabolisme carboné et azoté est connue depuis longtemps et est importante pour une croissance et une productivité optimale de la plante. Ainsi il existe une régulation fine du ratio C/N en fonction du statut cellulaire du C et de l'N (Coruzzi et al., 2001). Le statut cellulaire du C va dépendre non seulement du métabolisme mais aussi de l'efficacité de transport des formes de C au niveau inter et intracellulaire. Cependant les mécanismes moléculaires sous-jacents à la régulation conjointe de ces deux voies métaboliques restent largement inconnus. Compte tenu de nos résultats, il semble donc les lignées dérégulées dans l'expression des gènes SWEETs représentent un matériel génétique intéressant pour explorer ces questions.

L'analyse métabolomique de la hampe florale a également montré une accumulation d'ornithine et de putrescine chez le triple mutant *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant. La putrescine est produite lors du cycle de l'urée par la dégradation de l'ornithine et de l'arginine (pour revue Handa et al., 2018). Chez *Arabidopsis thaliana*, une augmentation des contenus en putrescine et en ornithine est notamment observée en réponse à des contraintes de froid et à la sécheresse (Alet et al., 2011). Du fait de l'accumulation de ces composés, il serait donc intéressant d'évaluer si ces lignées mutantes présentent ou non une meilleure résistance à certaines contraintes environnementales.

La putrescine est aussi le précurseur de la biosynthèse de spermine et de thermospermine (Handa et al., 2018). De façon intéressante, il a récemment été montré que la thermospermine contrôle la prolifération des tissus vasculaires et la différenciation du xylème (pour revue Barra-Jimenez and Ragni, 2017). Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, une mutation dans le gène

*ACAULIS5* qui code pour une thermospermine synthase induit un défaut d'élongation des entrenœuds de la hampe florale (Hanzawa et al., 1997 ; Hanzawa et al., 2000) mais provoque également une mort cellulaire programmée précoce des vaisseaux de xylème au moment de la formation de la paroi secondaire (Muniz et al., 2008). Compte tenu du domaine d'expression des gènes SWEETs et du défaut de développement du système vasculaire précédemment décrit (Le Hir et al., 2015), il pourrait être intéressant, dans le futur, d'analyser plus finement le contenu en polyamines des hampes florales.

#### IV. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons procédé à la caractérisation phénotypique de lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et/ou *SWEET17* ainsi qu'à la localisation plus précise du domaine d'expression des promoteurs de ces quatre gènes. L'ensemble des résultats obtenus a ainsi permis de mettre en évidence l'importance des échanges de sucres entre les cellules du système vasculaire sur la croissance et le développement de la plante. Ainsi, la perturbation du transport facilité des sucres entre les cellules de parenchyme vasculaire (i.e. parenchyme phloémien et xylémien) et les cellules conductrices (i.e. cellule compagnes et vaisseaux de xylème) provoque une modification de l'allocation carbonée mais également de l'allocation azotée chez ces plantes. Ces résultats suggèrent donc un rôle des gradients de sucres dans la régulation de la balance C/N. Afin d'aller plus loin dans cette hypothèse il serait intéressant de suivre l'incorporation de  $^{15}\text{N}$  (Havé et al., 2017) et de  $^{13}\text{C}$  au cours du développement en phase reproductrice des lignées mutantes en comparaison avec des plantes de type sauvage.



---

# CHAPITRE 2

---

Rôle du transport facilité des sucres dans le développement du système vasculaire de la hampe florale



#### I. Introduction

Le système vasculaire des végétaux est composé du phloème responsable du transport des éléments nutritifs depuis les organes sources vers les organes puits, du xylème assurant le transport ascendant d'eau et d'éléments minéraux et de (pro)cambium, un tissu méristématique permettant la production des cellules de phloème et de xylème. Dans la hampe florale, ces tissus vasculaires sont organisés en faisceaux cribro-vasculaires reliés entre eux par des fibres interfasciculaires. Plus précisément, le xylème est composé de vaisseaux, de fibres et de cellules parenchymateuses. Les vaisseaux et les fibres sont des cellules permettant de maintenir un port érigé du fait d'un épaissement très important de leur paroi secondaire (Nakano et al., 2015). La paroi secondaire est majoritairement composée de polysaccharides (i.e. cellulose et hémicelluloses) dont la synthèse dérive des sucres simples comme le saccharose, le glucose et le fructose (Marriott et al., 2015 ; Verbančič et al., 2018). Au cours du développement de la paroi secondaire, les vaisseaux et les fibres en développement vont donc avoir une demande importante en sucres afin de finaliser la formation de leurs parois. Cependant, le xylème permet essentiellement le transport d'eau et d'éléments nutritifs et bien que la biosynthèse des composés pariétaux et les étapes de la formation des parois primaires et secondaires soient bien connues (McFarlane et al., 2014), la question de la provenance des sucres qui serviront à la synthèse des polysaccharides pariétaux se pose. Les précédents travaux de l'équipe sur la caractérisation fonctionnelle des transporteurs SWEET11 et SWEET12 ont permis de mettre de montrer que les lignées mutées dans l'expression de ces deux gènes présentent des défauts de formation du système vasculaire et de composition de la paroi secondaire (Le Hir et al., 2015 ; Dinant et al., 2019). Compte tenu du domaine d'expression de ces gènes, ces travaux suggèrent donc qu'il existe un transport de saccharose et d'hexoses entre les cellules de parenchyme vasculaires et les cellules conductrices en formation qui serviraient de précurseurs à la synthèse de la paroi secondaire. De récentes études ont en effet mis en évidence l'importance du métabolisme et du transport des sucres dans les tissus vasculaires afin de permettre aux cellules, dont les vaisseaux du xylème, de produire leur paroi secondaire. Ainsi, la dérégulation de l'expression des gènes codant pour des fructokinases (enzyme permettant la phosphorylation du fructose) induit des conséquences dans le développement du xylème (Stein et al., 2016 ; 2017). De plus, il a été proposé que l'activité des saccharose synthases (enzyme responsable du clivage du saccharose en UDP-glucose et en fructose) pourrait être impliqué dans la biosynthèse de cellulose chez *Arabidopsis* (Baroja-Fernandez et al., 2012). Enfin chez le peuplier, il a été montré que l'activité de transport du transporteur de saccharose SUT3



était indispensable pour une formation correcte de la paroi secondaire du xylème (Mahboubi et al., 2013).

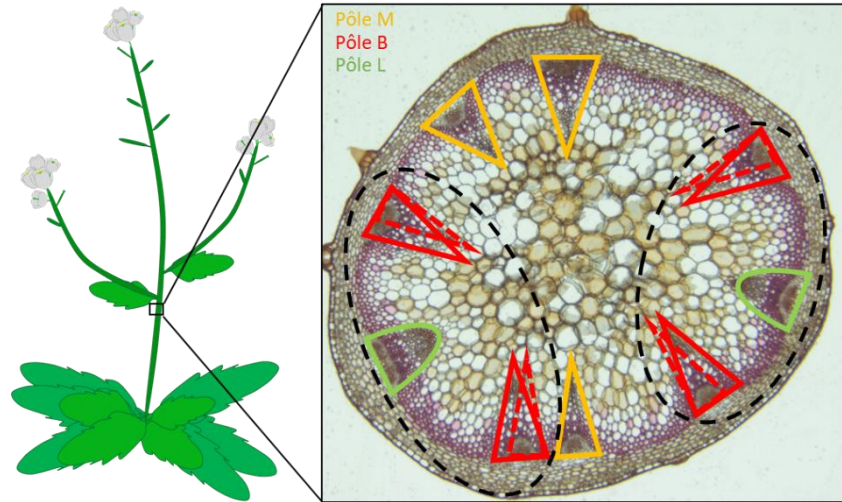
Dans le cadre de ce chapitre, l'objectif a été de mieux comprendre le rôle des gènes *SWEETs* dans le développement du xylème de la hampe florale et la composition de la paroi secondaire. Ainsi, le domaine d'expression de ces gènes a été affiné en analysant leurs localisations en fonction des différents types de pôles vasculaires de la hampe florale et en fonction du type cellulaire. Des analyses de surfaces des tissus vasculaires ont été réalisées chez les lignées simplement, doublement, triplement et quadruplement mutées dans l'expression des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et/ou *SWEET17*. Une analyse plus approfondie du xylème a été réalisée en quantifiant le nombre de cellules contenus dans un pôle de xylème et en mesurant la taille des fibres et des vaisseaux. Enfin, afin de mieux appréhender l'importance des échanges de sucres entre les cellules ou l'homéostasie des sucres sur la formation de la parois secondaires, l'analyse des parois des vaisseaux et des fibres du xylème a été réalisée en Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR).

## II. Résultats

### 1. Localisation tissulaire et cellulaire de l'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle des promoteurs des gènes *SWEETs* dans les différents types de pôles vasculaires de la hampe florale

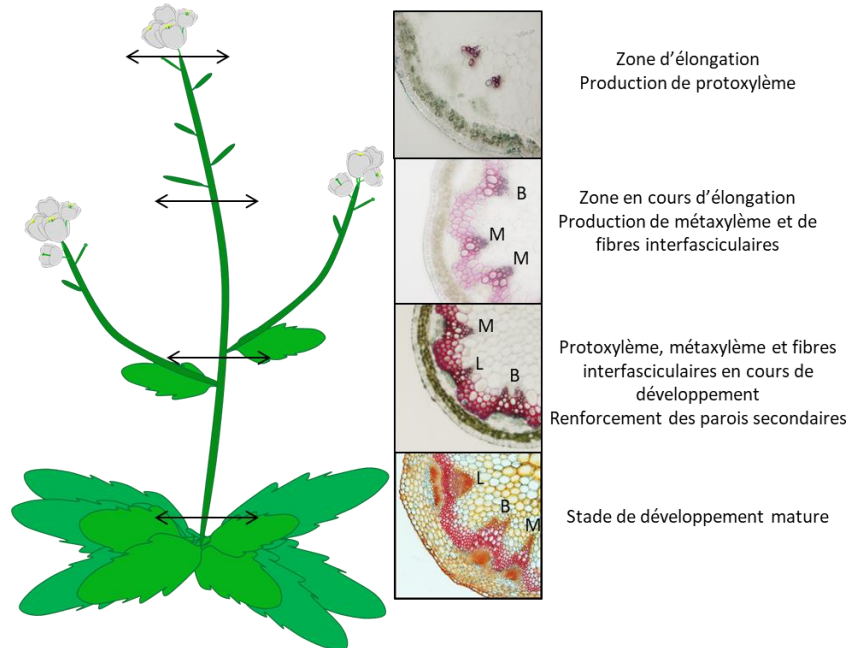
Lors des observations réalisées dans le Chapitre 1, j'ai noté des différences dans le domaine d'expression des promoteurs des quatre gènes en fonction de la forme du faisceau cribro-vasculaire. Pour rappel, une classification des pôles vasculaires selon leur forme a été proposée par Park et al. (2015) qui a mis en évidence l'existence de trois types de pôles (Figure 45) : (1) les **pôles de type-M** (Main inflorescence stem, en jaune) correspondant aux pôles de formes triangulaires permettant d'alimenter la totalité de la hampe florale principale en eau et en éléments nutritifs. (2) les **pôles de type-B** (Branching connexions, en rouge) de forme large généralement composés de deux ou trois pointes de xylème. Il s'agit d'un pôle M qui, lors d'une coupe transversale, est regroupé à un second pôle vasculaire alimentant l'inflorescence latérale voisine. (3) les **pôles de type-L** (Cauline Leave, en vert) de forme arrondie composée d'un grand nombre de cellules de parenchyme xylémien. Ces pôles se situent entre deux pôles B et assurent la connexion entre le système vasculaire de la hampe principale et celui de la feuille cauline.

Se basant sur cette classification, j'ai affiné le domaine d'expression des promoteurs de ces 4 gènes en fonction du type de pôles vasculaires et également en fonction du stade de développement de la hampe florale (Figure 46). Il est à noter que les domaines d'expression présentés ici ont été observés de façon constante au cours des 5 cultures réalisées au cours de ma thèse.



**Figure 45** : Représentation schématique des différents types de pôles retrouvés dans un entre-nœud de la hampe florale principale

Les pôles de type-M (Main inflorescence stem, en jaune) ; les pôles de type-B (Branching connexions, en rouge) et les pôles de type-L (Cauline Leave, en vert. Les pointillés noirs entourent un pôle L (en vert) et deux pôles B (en rouge), correspondant à la position d'une inflorescence latérale et de la feuille cauline sous-jacente.



**Figure 46** : Représentation schématique des niveaux de la hampe florale pour lesquels la localisation des promoteurs des gènes *SWEETs* a été approfondie

#### 1.1. Expression du promoteur *SWEET11*

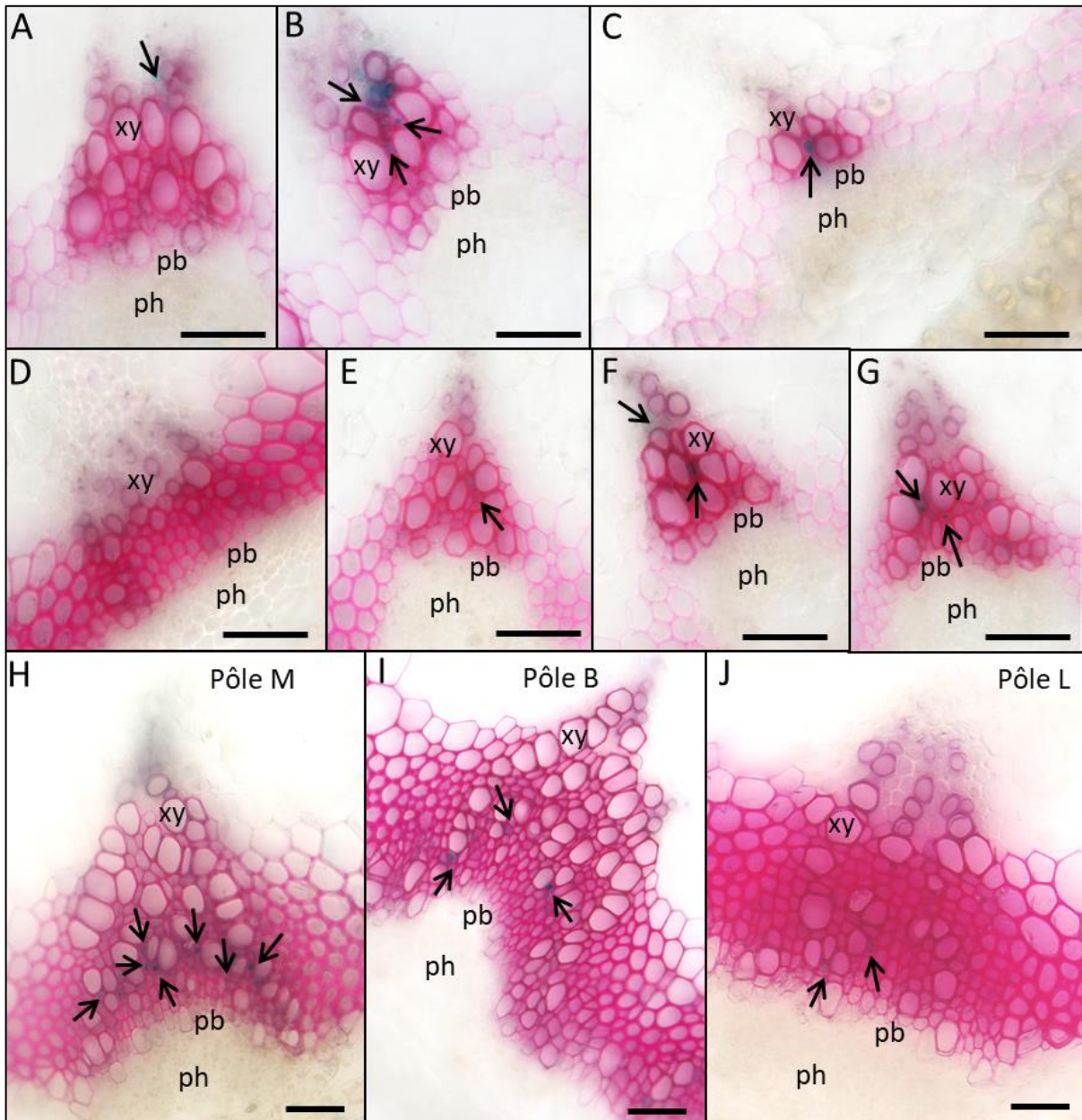
La Figure 47 présente le domaine d'expression de *SWEET11* dans les différents pôles vasculaires et à différents niveaux de la hampe florale.

A un stade de développement précoce, une expression du promoteur de *SWEET11* est observée dans certaines cellules de parenchymes xylémien (Figure 47A et B) et/ou dans certaines petites cellules à paroi lignifiée accolées aux vaisseaux de protoxylème et qui pourraient correspondre à des fibres en cours de différenciation (Figure 47B et C).

Dans une section de hampe à mi-hauteur, c'est-à-dire au niveau d'un entre-nœud en cours d'élongation où la lignification des parois du xylème s'intensifie, l'expression du promoteur de *SWEET11* est également observée certaines fibres du xylème et dans certaines cellules de parenchyme du xylème (Figure 47D-G). L'expression de ce promoteur est toutefois absente des pôles vasculaires de type-L (Figure 47D), elle n'est donc observée que dans les pôles vasculaires de types-M connectée à la hampe florale principale et dans les pôles de type-B alimentant les inflorescences latérales (Figure 47E, 47F et 47G).

A la base de la hampe florale, c'est-à-dire au niveau d'un entre-nœud dont la croissance est arrêtée, on observe l'expression du promoteur de *SWEET11* dans les trois types de pôles vasculaires, uniquement dans certaines petites cellules du xylème accolées aux vaisseaux, correspondant probablement à des fibres du xylème (Figure 47H-J). Peu de fibres sont colorés en bleus mais dans chaque pôle d'une section basale, le promoteur de *SWEET11* est exprimé dans au moins une fibre.

Ainsi le domaine d'expression du promoteur de *SWEET11* se restreint au cours du développement de la hampe florale puisqu'il s'exprime dans les fibres et les cellules de parenchyme en haut de la hampe florale puis uniquement dans les fibres dans un entre-nœud ayant stoppé son élongation.



**Figure 47** : Domaine d'expression du promoteur *SWEET11* dans la hampe

Localisation dans une section d'entre-nœud en cours d'élongation (A, B et C) ; dans une section d'entre-nœud à mi-hauteur de la hampe floral (D, E, F et G) et dans une section d'entre-nœud à la base de la hampe florale (H, I et J). Expression dans un pôle de type-M (D et H), de type-L (E, F et J) et de type-B (G et I). Les coupes ont été montées dans un mélange de Phloroglucinol 2% et d'HCl 50% afin de colorer les lignines en rouge. Les flèches indiquent les cellules présentant une coloration bleue. xy : xylème ; pb : procambium ; ph : phloème. Echelle : 50µm.

#### 1.2. Expression du promoteur *SWEET12*

La Figure 48 présente la localisation tissulaire du promoteur de *SWEET12* dans la hampe florale.

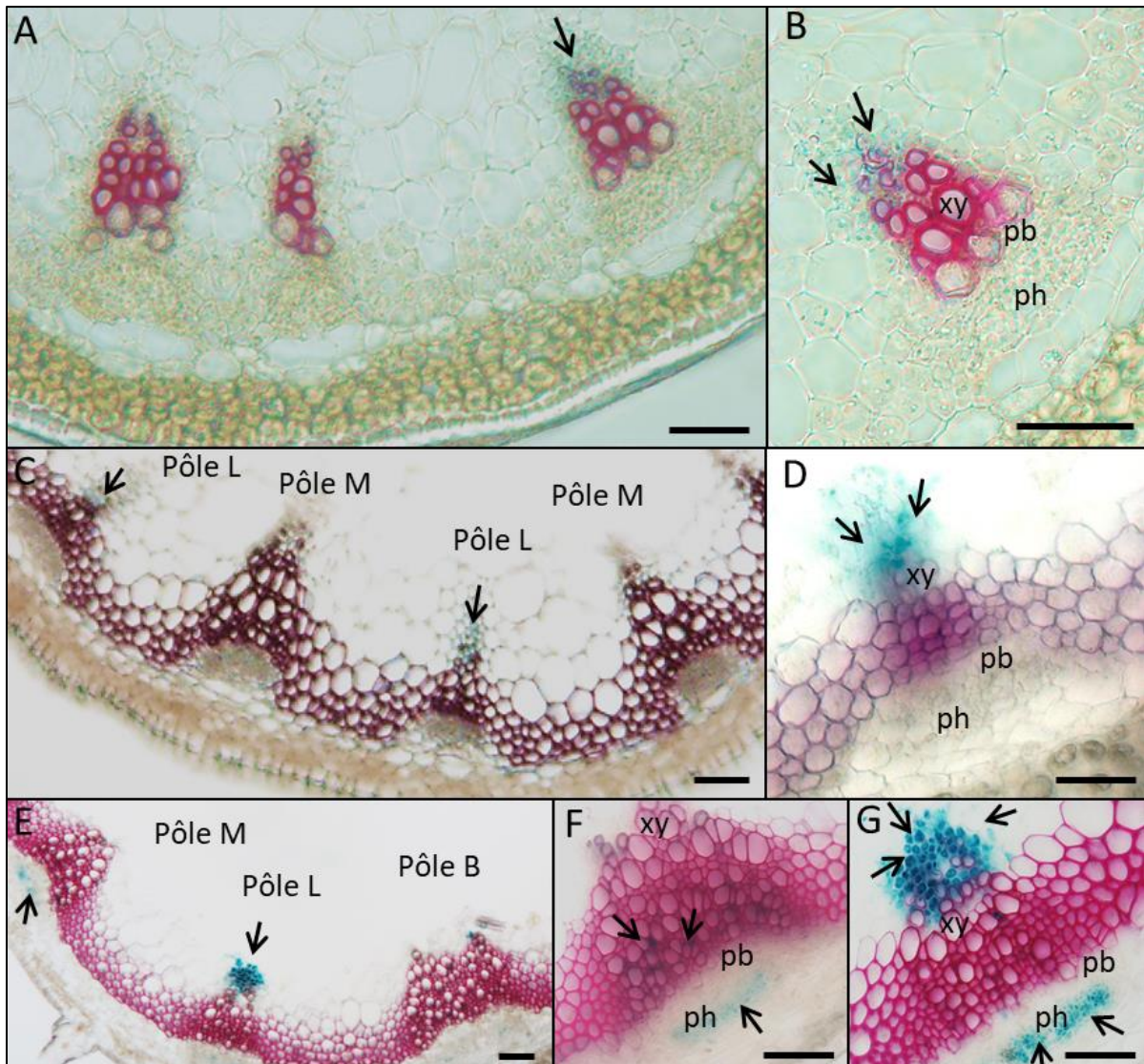
Dans une section de hampe florale prélevé sous le bouton floral, le promoteur de *SWEET12* est exprimé dans les cellules de parenchyme xylémien dans certains pôles cribro-vasculaires (Figure 48A et B).

A mi-hauteur de la hampe florale, dans un entre-nœud en élévation, le promoteur de *SWEET12* s'exprime exclusivement à la pointe du xylème dans les cellules de parenchyme xylémien et principalement dans les pôles vasculaires de type-L (Figure 48C et D).

Enfin à la base de la hampe florale, l'expression du promoteur de *SWEET12* dépend du type de pôle vasculaire et du type cellulaire (Figure 48E-G). En effet, il s'exprime principalement dans les pôles vasculaires de type-L (Figure 48E et G). Ces pôles vasculaires de formes arrondies permettent la connexion entre la hampe florale principale et les feuilles caulines et sont composés de nombreuses cellules de parenchyme xylémien. Dans ce type de pôle, le promoteur de *SWEET12* est exprimé dans la totalité des cellules de parenchyme xylémien et dans les cellules phloémiennes (Figure 48G). Dans les pôles de type-B connectés au système vasculaire des inflorescences latérales, le promoteur de *SWEET12* s'exprime dans le phloème et dans quelques cellules de petites tailles proches des vaisseaux de xylème qui pourraient être des fibres (Figure 48F). Enfin, dans un pôle de type-M, le promoteur de *SWEET12* est exprimé uniquement dans les cellules phloémienne (Figure 48E).

Ainsi, contrairement au promoteur de *SWEET11*, le domaine d'expression du promoteur de *SWEET12* s'accroît au cours du développement de la hampe florale. De plus, il a la particularité d'être exprimé dans toutes les cellules de parenchyme du xylème dans un pôle vasculaire de type-L.





**Figure 48 : Domaine d'expression du promoteur *SWEET12* dans la hampe**

Localisation dans une section d'entre-nœud en cours d'élongation (A et B), dans une section d'entre-nœud à mi-hauteur de la hampe florale (C et D) et dans une section d'entre-nœud à la base de la hampe florale (E, F et G). Expression dans un pôle de type-B (E et D), de type-L (C, D, E et G) et de type-M (C et E). Les coupes ont été montées dans un mélange de Phloroglucinol 2% et d'HCl 50% afin de colorer les lignines en rouge. Les flèches indiquent les cellules présentant une coloration bleue. xy : xylème ; pb : procambium. ph : phloème ; fi : fibre interfasciculaire. Echelle : 50µm.

#### 1.3. Expression du promoteur *SWEET16*

La Figure 49 représente le domaine d'expression du promoteur de *SWEET16* dans la hampe florale.

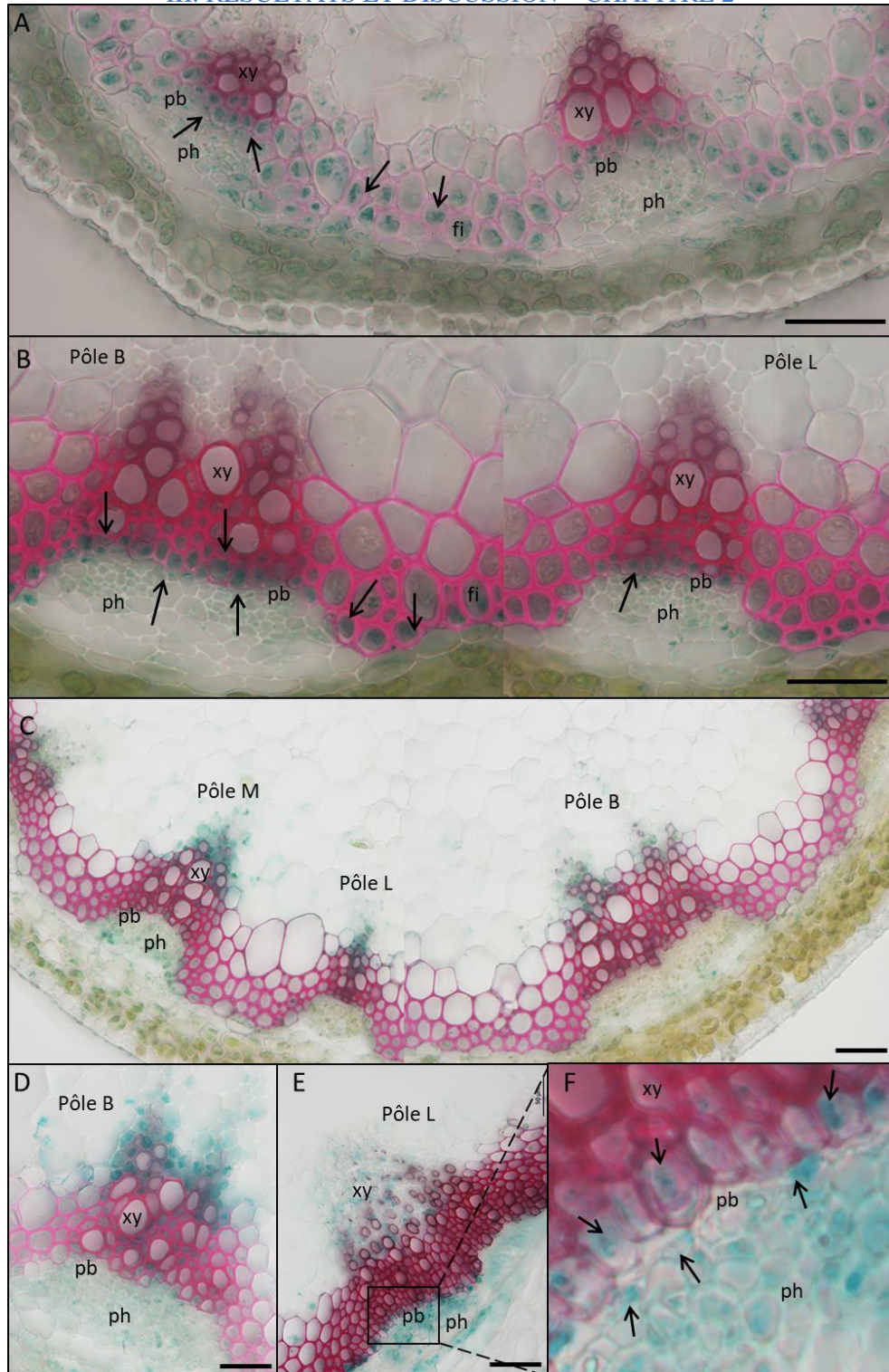
Dans une section réalisée dans un entre-nœud en cours d'élongation lorsque les fibres interfasciculaires comment leur lignification, l'expression du promoteur de *SWEET16* est observée dans les deux premières assises de fibres interfasciculaires ainsi que dans les jeunes cellules du xylème, dans le procambium et dans le phloème (Figure 49A).

A un stade de développement plus tardif, c'est-à-dire lorsque les fibres interfasciculaires sont lignifiées, l'expression du promoteur de *SWEET16* est observée dans le phloème, le procambium et les jeunes cellules de xylème mais semble être absent des cellules de parenchymes xylémien présents à la pointe du pôle (Figure 49B). De plus, on remarque une localisation dans les deux premières assises de fibres interfasciculaires reliant les pôles vasculaires entre eux (Figure 49B). Au cours de la lignification, le domaine d'expression du promoteur de *SWEET16* se restreint et une expression est observée dans le phloème, à la pointe du xylème et éventuellement dans le procambium quel que soit le type de pôle vasculaire (Figure 49C).

Enfin, à la base de la hampe florale, l'expression du promoteur *SWEET16* est observée dans le phloème, dans le xylème et dans les cellules à la jonction avec le procambium, quel que soit le type de pôle vasculaire (Figure 49D-F). En effet, on le retrouve dans les cellules phloëmiennes et à la pointe du xylème, correspondant dans les deux cas probablement aux cellules de parenchymes. Dans un pôle de type-B, la majeure partie des cellules de parenchymes du xylème est colorée en bleue (Figure 49D) alors que dans un pôle de type-L, uniquement quelques cellules de parenchymes le sont (Figure 49E). L'expression du promoteur de *SWEET16* est également retrouvée des petites cellules rectangulaires à la jonction entre le phloème et le xylème, correspondant aux cellules du procambium et aux cellules précurseurs de xylème (Figure 49F).

Tout comme l'expression du promoteur de *SWEET11* et *SWEET12*, l'expression du promoteur de *SWEET16* varie en fonction du stade de développement de la hampe florale mais ne dépend pas du type de pôle vasculaire.





**Figure 49 : Domaine d’expression du promoteur *SWEET16* dans la hampe**  
 Localisation dans une section d’entre-nœud sous le bouton floral (A), dans une section d’entre-nœud en élongation (B), dans une section d’entre-nœud à mi-hauteur de la hampe florale (C) et dans une section d’entre-nœud à la base de la hampe florale (D, E et F). Expression dans un pôle de type-M (C), de type-B (B, C et D) et de type-L (B, C et E). Grossissement de la photographie E en zoomant sur le procambium (F). Les coupes ont été montées dans un mélange de Phloroglucinol 2% et d’HCl 50% afin de colorer les lignines en rouge. Les flèches indiquent les cellules présentant une coloration bleue. xy : xylème ; ph : phloème ; pb : procambium. fi : fibre interfasciculaire. Echelle : 50µm.

#### 1.4. Expression du promoteur *SWEET17*

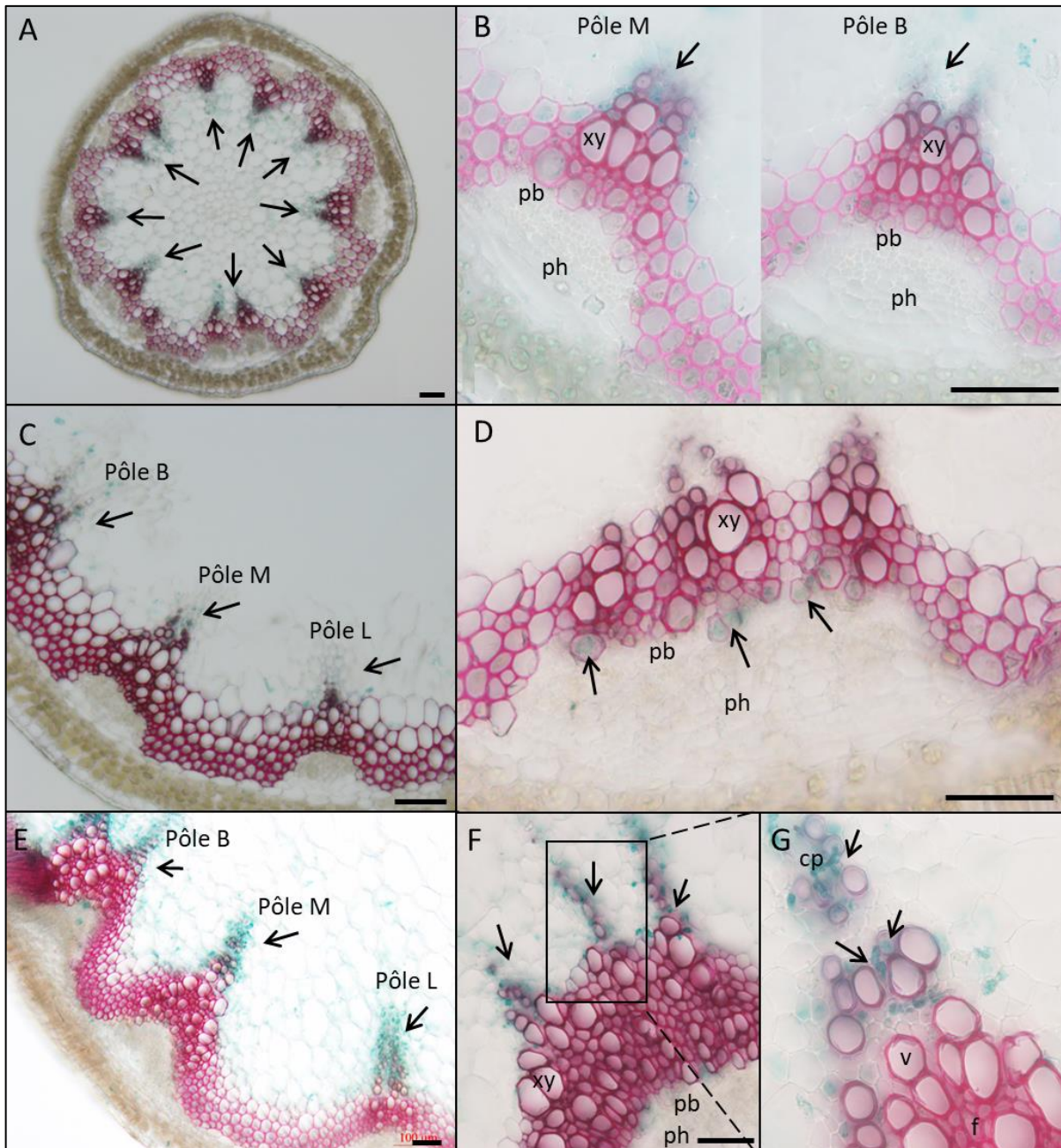
Sur une section d'entre-nœud en cours d'élongation, l'expression du promoteur de *SWEET17* est observée dans tous les pôles vasculaires (Figure 50A) mais uniquement dans les cellules de parenchyme de xylème (Figure 50B).

A un stade de développement plus tardif, son expression est également retrouvée à la pointe du xylème quel que soit le type de pôle vasculaire (Figure 50C). En complément, une expression du promoteur de *SWEET17* est également observée dans les vaisseaux en cours de maturation (Figure 50D).

A la base de la hampe florale, l'expression du promoteur de *SWEET17* est observée uniquement dans le xylème quel que soit le type de pôles vasculaires (Figure 50E). En effet, il est retrouvé à la pointe du xylème dans certaines cellules de parenchymes et dans certains vaisseaux en cours de maturation à la jonction avec le procambium (Figure 50E et F). A la pointe du xylème, son expression est observée quasiment uniquement les cellules de parenchyme accolées aux vaisseaux de xylème (Figure 50G).

On peut donc en conclure que l'expression du promoteur de *SWEET17*, tout comme celle de *SWEET11*, est spécifique du xylème. Son expression ne dépend pas du type de pôles cribro-vasculaires et varie peu en fonction du stade de développement.





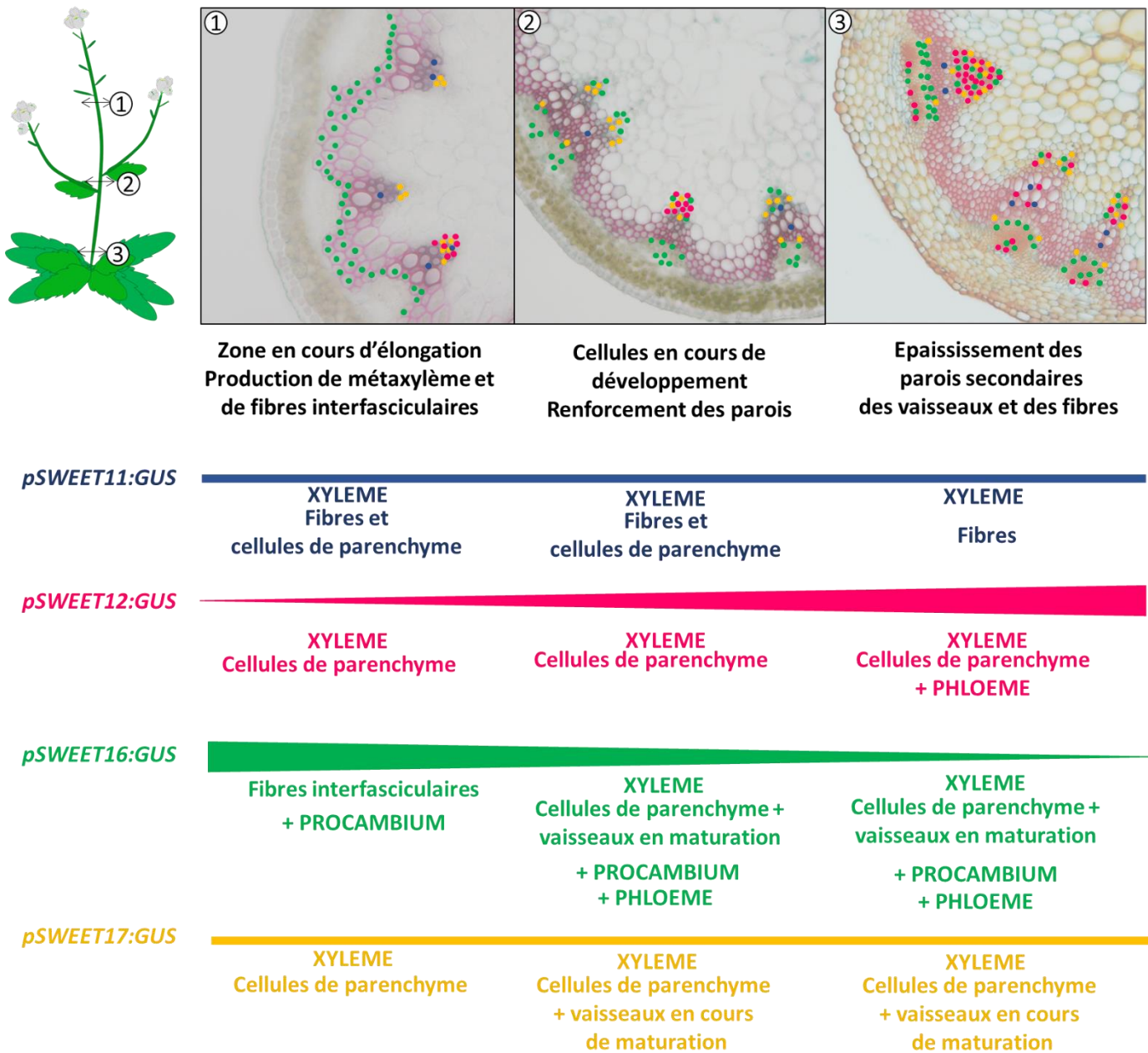
**Figure 50** : **Domaine d’expression du promoteur *SWEET17* dans la hampe**

Localisation dans une section d’entre-nœud à mi-hauteur de la hampe (A et B), dans une section d’entre-nœud à mi-hauteur de la hampe florale (C et D) et dans une section d’entre-nœud à la base de la hampe florale (E, F et G). Expression dans un pôle de type-M (B, C et E), de type-B (B, C, D, E et F) et de type-L (C et E). Grossissement de la pointe du xylème (G). Les coupes ont été montées dans un mélange de Phloroglucinol 2% et d’HCl 50% afin de colorer les lignines en rouge. Les flèches indiquent les cellules présentant une coloration bleue. xy : xylème ; ph : phloème ; pb : procambium. cp : cellule de parenchyme ; v : vaisseau ; f : fibre. Echelle : 50µm.

#### 1.5. Synthèse sur le domaine d'expression des promoteurs des *SWEETs* en fonction du stade de développement de la hampe florale

Comme décrit précédemment, la localisation des promoteurs des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et *SWEET17* varie en fonction du stade développement de la hampe florale, du type de pôles cribro-vasculaires et du type cellulaire. Afin de synthétiser au mieux leurs localisations, j'ai replacé les domaines d'expression des promoteurs des quatre gènes à chaque stade de développement (Figure 51). De plus j'ai représenté le nombre de cellules dans lequel s'exprime les promoteurs des gènes *SWEETs* sous la forme d'un trait plus ou moins épais. Ainsi, un trait fin correspond à un nombre de cellules constant au cours du développement de la hampe florale (*SWEET11* et *SWEET17*) alors qu'un trait plus ou moins épaissi correspond à un nombre variable de cellules dans lequel s'exprime les promoteurs (*SWEET12* et *SWEET16*) (Figure 51).

Dans un entre-nœud en cours d'élongation, on retrouve les promoteurs de *SWEET11*, *SWEET12* et *SWEET17* à la pointe des pôles de xylème, dans les cellules de parenchyme xylémien (Figure 51). *SWEET12* est uniquement exprimé dans les pôles vasculaires de forme ronde, correspondant aux pôles de type-L connectés au système vasculaire des pétioles des feuilles caulines. *SWEET11* est le seul exprimé dans les fibres de xylème. *SWEET16* est quant à lui exprimé dans les deux premières assises des fibres interfasciculaires, et dans le procambium. Enfin, *SWEET17* est le seul exprimé dans les vaisseaux accolés aux cellules de procambium, les vaisseaux en cours de développement. Dans un entre-nœud séparant deux inflorescences latérales, on retrouve de nouveau les promoteurs des quatre gènes *SWEETs* dans les cellules à la pointe des pôles de xylème correspondant aux cellules de parenchyme xylémien avec une localisation du promoteur de *SWEET12* majoritairement exprimé dans les pôles de type-L. Dans les vaisseaux en cours de maturation, on retrouve l'expression de *SWEET16* et *SWEET17*. Dans les fibres du xylème, seul *SWEET11* est exprimé et dans le phloème et le procambium, seul *SWEET16* est exprimé. A un stade de développement mature à la base de la hampe florale, *SWEET11* est exprimé exclusivement dans les fibres de xylème. A la pointe du xylème, on retrouve l'expression de *SWEET12*, *SWEET16* et *SWEET17*. De la même manière, *SWEET12* et *SWEET16* sont tous deux localisés dans le phloème. *SWEET16* et *SWEET17* sont tous deux localisés dans les vaisseaux en cours de maturation. De nouveau, on retrouve l'expression de *SWEET16* dans les cellules de procambium ou dans les cellules précurseurs de xylème et de phloème.



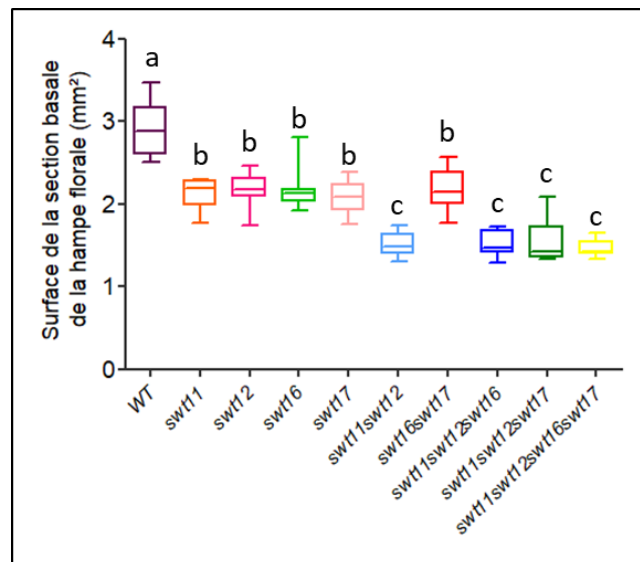
**Figure 51** : Synthèse des domaines d'expression des promoteurs des *SWEETs*

Représentation schématique d'une plante d'*Arabidopsis thaliana* présentant l'emplacement des sections d'entre-nœud analysées (1, 2 et 3). L'expression des promoteurs de ces gènes a été analysé dans un entre-nœud qui s'allonge avec production de cellules de métaxylème et de fibres interfasciculaires (1), dans un entre-nœud entre deux inflorescences latérales où les cellules sont en cours de développement et où les parois secondaires commencent à se renforcer (2) et dans le premier entre-nœud à la base de la hampe florale représentant une zone dont l'élongation est terminée et les parois secondaires des vaisseaux et des fibres de xylème subissent un fort épaississement (3). Un rond de couleur a été placé dans la cellule pour laquelle une expression du promoteur de *SWEET11* (en bleu), *SWEET12* (en rose), *SWEET16* (en vert) et/ou *SWEET17* (en jaune) a été observée. Le panneau du bas présente les détails de la localisation cellulaire dans le xylème de chaque promoteur et l'évolution du nombre de cellules dans lesquelles ils s'expriment.

2. **Rôle des échanges de sucres sur la croissance et le développement des tissus vasculaires de la hampe florale**

2.1. Impact sur la croissance radiale de la hampe florale

Afin d'évaluer l'impact de la mutation des gènes *SWEET* sur la croissance radiale de la hampe florale, des mesures de la surface de la hampe florale ont été réalisées sur les sections réalisées dans le premier entre-nœud (Figure 52A). On remarque que tous les génotypes ont une surface de hampe plus petite que celle du type sauvage. Parmi les lignées mutantes, on distingue deux groupes avec (1) les simples mutants et le double mutant *swt16swt17* qui ont une surface de hampe florale réduite de 25% et (2) le double mutant *swt11swt12*, les triples mutants et le quadruple mutant qui ont une surface de hampe florale réduite d'environ 50%.



**Figure 52 : Variations de la surface de la section basale de la hampe florale**

Représentation graphique sous forme de boîte à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 3$ ).

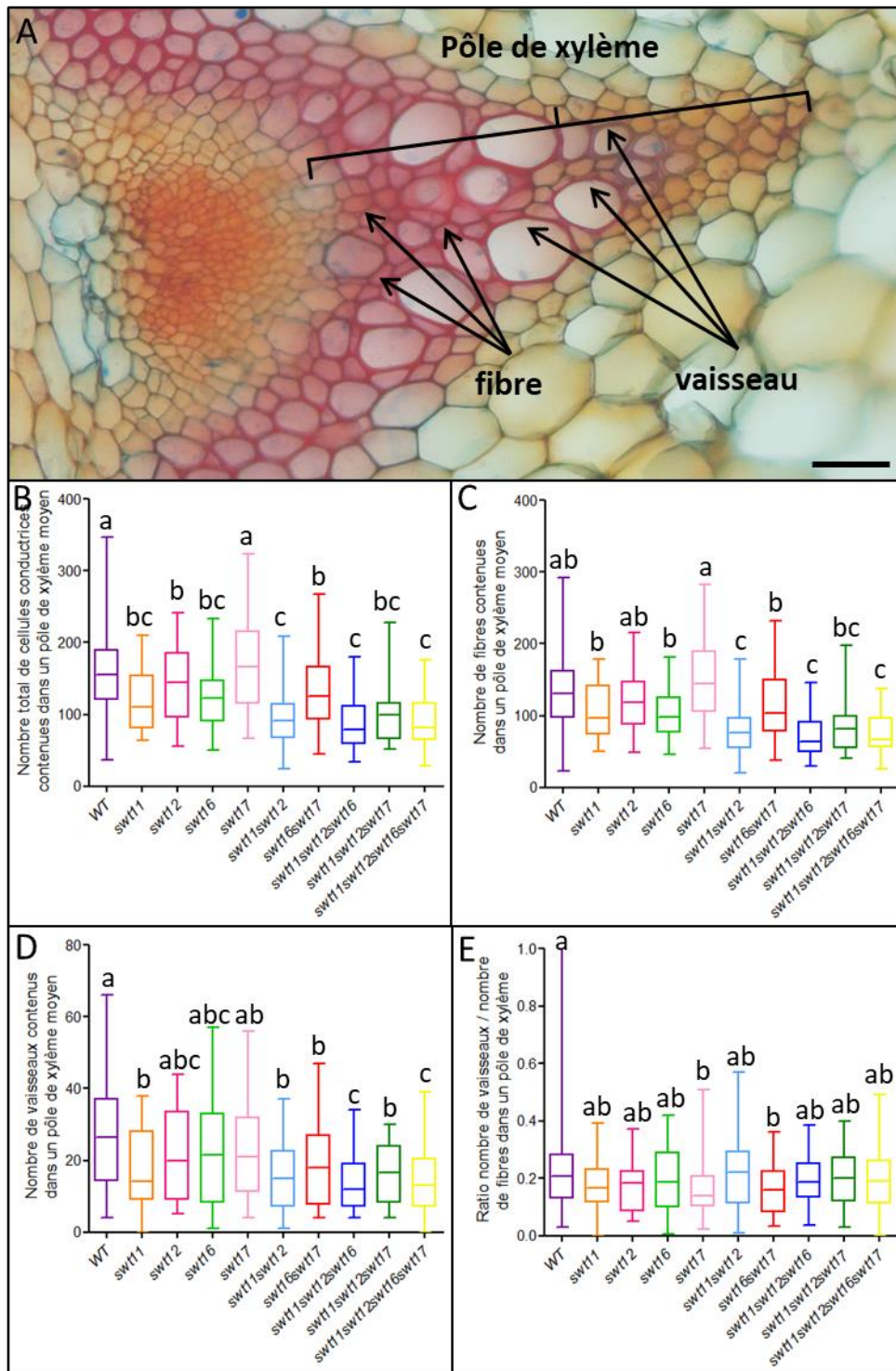


#### 2.2. Impact sur le nombre de cellules dans un pôle de xylème

Le xylème est composé de trois types cellulaires : les fibres, les vaisseaux et les parenchymes xylémiens. Dans cette partie, le nombre total de cellules (fibres et vaisseaux) ou le nombre de fibres ou de vaisseaux a été comptabilisé (Figure 53A) Une cellule a été considérée comme une fibre si sa surface était comprise entre 5 et 150  $\mu\text{m}^2$  et comme un vaisseau si sa surface avait plus de 150  $\mu\text{m}^2$  (Figure 53). Les mesures ont été réalisées sur l'ensemble des pôles quel que soit leur type.

Chez le type sauvage, un pôle de xylème contient en moyenne 160 cellules dont environ 130 fibres et 30 vaisseaux. Chez toutes les lignées mutées dans l'expression des *SWEETs*, on remarque que le nombre total de cellules contenues dans un pôle de xylème est significativement plus faible comparé au type sauvage, à l'exception du simple mutant *swt17* (Figure 53B). Les simples mutants *swt11*, *swt12* et *swt16* ont quant à eux moins de cellules conductrices dans un pôle de xylème qu'une plante sauvage. De la même manière, les doubles, triples mutants et le quadruple mutant ont moins de cellules au total dans un pôle de xylème (Figure 53B). Si on analyse plus précisément le type cellulaire impacté, on remarque que chez le simple mutant *sweet11*, un pôle de xylème contient significativement moins de fibres que le type sauvage alors que le nombre de vaisseaux est identique entre les deux génotypes (Figure 53C et D). Les autres simples mutants ne présentent aucune différence significative concernant le nombre de fibres ou de vaisseaux par rapport au type sauvage (Figure 53C et D). Chez le double mutant *swt11swt12* le nombre de fibres et de vaisseaux est significativement plus faibles que chez le type sauvage alors que chez le double mutant *swt16swt17* c'est uniquement le nombre de vaisseaux qui est impacté (Figure 53C et D). Enfin, le triple mutant *swt11swt12swt17* est affecté uniquement dans le nombre de vaisseaux alors que le mutant *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant contiennent significativement moins de fibres et moins de vaisseaux (Figure 53C et D). Le ratio du nombre de vaisseaux sur le nombre de fibres a également été calculé afin d'estimer les proportions de chaque type cellulaire dans un pôle de xylème (Figure 53E). De façon intéressante, seuls le simple mutant *swt17* et le double mutant *swt16swt17* ont un ratio significativement plus petit que le WT.



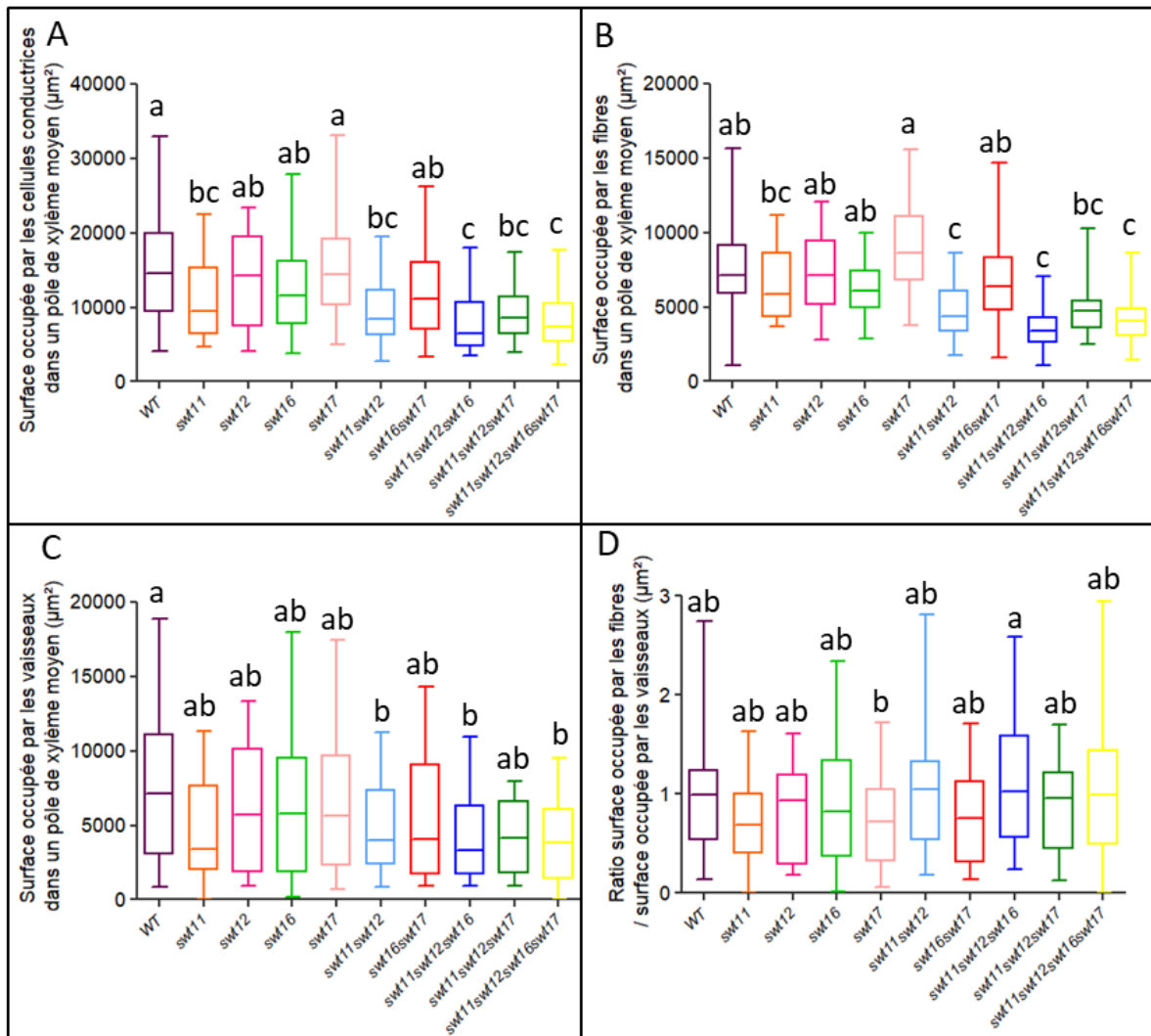


**Figure 53**: Nombre de cellules conductrices dans un pôle de xylème. Photographie d'un pôle de xylème, échelle 50  $\mu\text{m}$  (A), nombre total de cellules dans un pôle de xylème (B), nombre de fibres dont la taille est comprise entre 5 et 150  $\mu\text{m}^2$  dans un pôle de xylème (C), nombre de vaisseaux dont la taille est comprise entre 150 et 850  $\mu\text{m}^2$  dans un pôle de xylème (D) et ratio du nombre de vaisseaux sur le nombre de fibres dans un pôle de xylème moyen (E). Représentation graphique sous forme de boîte à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 50$  pôles vasculaires provenant de 5 plantes exceptés *swt12* et *swt11swt12swt17*  $n=2$  plantes)

#### 2.3 Impact sur la croissance et le développement des fibres et des vaisseaux de xylème

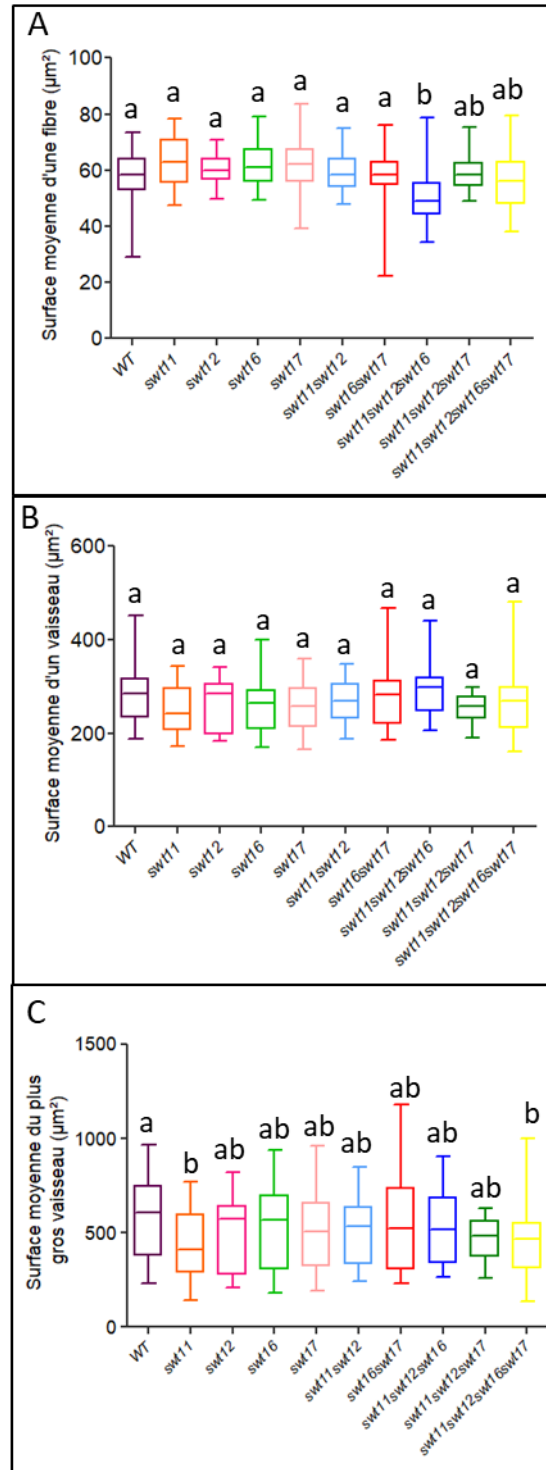
La surface occupée par les fibres et les vaisseaux de xylème a également été mesurée pour un pôle de xylème moyen (indépendamment du type de pôle) (Figure 54). Chez le type sauvage, on observe que les fibres et les vaisseaux occupent environ la même surface au sein d'un pôle ce qui conduit à une valeur du ratio proche de 1 (Figure 54A et D). Chez les simples mutants *swt16* et *swt17* et chez le double *swt16swt17*, aucune différence significative concernant la surface occupée par les fibres et les vaisseaux n'a été mesurée (Figure 54A, B et C). Etant donné que moins de cellules de xylème ont été observées chez ces génotypes, cela suggère que les fibres et les vaisseaux sont plus grands. Chez les simples mutants *swt11* et *swt12* ainsi que chez les triples mutant et le quadruple mutant, la surface totale occupée par les fibres et les vaisseaux est significativement plus faible que chez le type sauvage (Figure 54A). Si on analyse le type cellulaire impacté, on remarque que les deux types cellulaires sont affectées par ces mutations chez le double mutant *swt11swt12* et le triple mutant *swt11swt12swt16* et le quadruple mutant (Figure 54B et C). Le calcul du ratio de la surface occupée par les fibres par rapport à la surface occupée par les vaisseaux est par contre identique quel que soit le génotype analysé (Figure 54D) ce qui suggère que malgré les différences significatives observées, ces modifications restent proportionnelles à l'échelle du pôle.

On a précédemment montré que des variations dans la surface occupée par les cellules conductrices et leur nombre dans un pôle de xylème chez certains génotypes. Pour compléter cette analyse j'ai donc également calculé la taille moyenne d'une fibre et d'un vaisseau (Figure 55). On remarque que la taille moyenne d'une fibre est plus petite uniquement chez le triple *swt11swt12swt16* alors qu'aucune variation significative n'est observée pour les autres génotypes ainsi que pour la taille moyenne d'un vaisseau (Figure 54A et B). Enfin, la surface moyenne du plus gros vaisseau est significativement plus petite chez le simple mutant *swt11* et le quadruple mutant par rapport au type sauvage (Figure 54C).



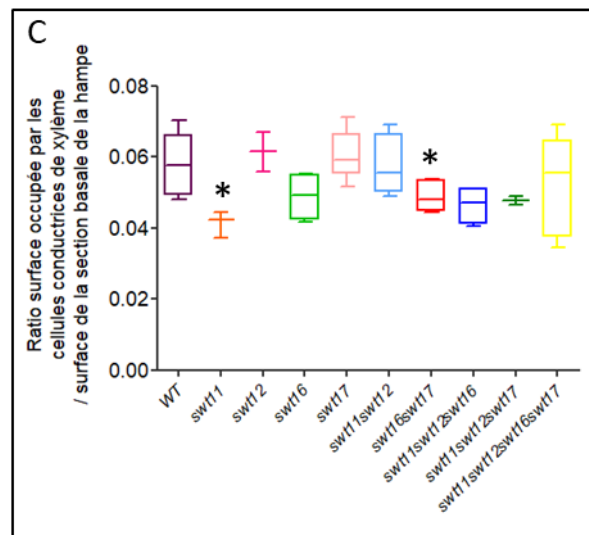
**Figure 54 : Surface occupée par les fibres et les vaisseaux dans un pôle de xylème**

Surface occupée par les cellules conductrices (fibres et vaisseaux) dans un pôle de xylème moyen (A), Surface occupée par les fibres dans un pôle de xylème moyen (B), Surface occupée par les fibres dans un pôle de xylème moyen (C) et Ratio de la surface occupée par les fibres sur la surface occupée par les vaisseaux dans un pôle de xylème moyen (D). Représentation graphique sous forme de boîte à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 50$  pôles vasculaires provenant de 5 plantes exceptés *swt12* et *swt11swt12swt17*  $n=2$  plantes)



**Figure 55:** Surface moyenne d'une fibre et d'un vaisseau de xylème. Représentation sous forme de boîtes à moustaches. Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 50$  pôles vasculaires provenant de 5 plantes exceptés *swt12* et *swt11swt12swt17*  $n=2$  plantes)

Enfin, afin d'évaluer si la réduction de la surface du xylème est proportionnelle à celle de la surface de la hampe, le ratio a été calculé pour chaque génotype (Figure 12). Ainsi, chez le type sauvage, le xylème occupe environ 6% de la surface totale de la hampe florale. Ce pourcentage est identique pour tous les génotypes à l'exception du simple mutant *swt11* et du double mutant *swt16swt17*. Ces résultats suggèrent donc que les différences observées chez le double mutant *swt11swt12* et le quadruple mutant seraient plutôt dues à un problème de croissance générale de la plante alors que chez le double mutant *swt16swt17*, un problème de développement du système vasculaire pourrait être envisagé.



**Figure 56: Ratio surface occupée par les cellules conductrices / Surface de la hampe**

Représentation graphique sous forme de boîte à moustaches. Test statistique de type *t* test de Student ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 50$  pôles vasculaires provenant de 5 plantes exceptés *swt12* et *swt11swt12swt17*  $n=2$  plantes)

### 3. Rôle des échanges de sucres sur la composition pariétale des cellules de xylème

Les travaux précédemment réalisés dans l'équipe ont permis de mettre en évidence l'implication des gènes *SWEET11* et *SWEET12* dans la composition pariétale des cellules du xylème de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* (Le Hir et al., 2015). En effet, il a été suggéré que la présence de ces gènes localisées dans les cellules de parenchymes était nécessaire pour une composition correcte de la paroi secondaire (Le Hir et al., 2015). Cependant la technique utilisée ne permettait pas d'avoir accès à la composition de la paroi des cellules du phloème et

à la composition de la paroi des cellules du xylème à l'échelle cellulaire. Ainsi, afin d'approfondir le rôle de ces gènes *SWEET11* et *SWEET12* dans la composition pariétale des cellules du système vasculaire, une analyse plus détaillée de la paroi des cellules de la hampe florale a été réalisée grâce à la lumière du synchrotron SOLEIL à Saclay en Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier et en spectroscopie Raman. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique dans le journal *Journal of Experimental Botany* en Février 2019 dans laquelle j'ai été associée en tant que co-auteur (Dinant et al., 2019). De plus, j'ai réalisé des analyses de complémentation fonctionnelle chez la levure en collaboration avec Rémi Lemoine et Benoit Porcheron à l'Université de Poitiers afin d'estimer si les transporteurs plasmalemmiques *SWEET11* et *SWEET12* sont capables de transporter des sucres précurseurs de polysaccharides de parois de formes plus complexes que le saccharose, le glucose et le fructose (Chen et al., 2012 ; Le Hir et al., 2015). Enfin, l'analyse de la paroi secondaire des cellules de xylème des lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEET16* et/ou *SWEET17* a été réalisée en Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier afin d'évaluer le rôle de ces gènes codant des transporteurs tonoplastiques dans la formation de la paroi secondaire des cellules conductrices du xylème. Enfin compte tenu du domaine d'expression des promoteurs des gènes *SWEET16* et *SWEET17*, une quantification de l'expression des gènes impliqués dans le développement des cellules du xylème a été réalisée chez les simples mutants *swt16* et *swt17* et le double mutant *swt16swt17*.

#### 3.1. Contribution des gènes *SWEET11* et *SWEET12* dans la composition pariétale des fibres et des vaisseaux de xylème

##### 3.1.1. Publication associée

###### 3.1.1.1. Résumé de l'article

Les parois cellulaires sont des structures très complexes qui se modifient au cours de la croissance et le développement des plantes. En effet, le développement des cellules vasculaires du phloème et du xylème, les tissus responsables du transport d'éléments nutritifs, de l'eau et du support structural de la plante, est influencé par la composition pariétale des cellules. Dans le cadre de ces travaux, une analyse de la composition pariétale des cellules de phloème et de xylème de la hampe florale a été réalisée en spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier couplée aux radiations synchrotron (SR-FTIR) et en spectroscopie Raman. Ainsi, les parois des cellules de phloème et celles des cellules de xylème des lignées sauvage et du double



mutant *swt11-1-swt12-1*, impacté dans le transport facilité des sucres dans le système vasculaire de la hampe florale, ont été analysées.

L'analyse spectrale des données SR-FTIR a permis de confirmer les modifications de parois des cellules de xylème observées précédemment chez le double mutant *swt1-1-swt12-1* (Le Hir et al., 2015). De plus, ces analyses ont mis en évidence que les parois des cellules de phloème du double mutant *swt1-1-swt12-1* sont caractérisées par une modification de la composition en hémicellulose. Une analyse des spectres obtenus en spectroscopie Raman couplée à une analyse statistique de type CART (Classification and Regression Tree) a permis de distinguer les parois des fibres des parois des vaisseaux de xylème. De plus, la mutation des gènes *SWEET11* et *SWEET12* entraînent des modifications de la composition des parois dépendantes du type cellulaire, avec une perturbation de la composition en hémicelluloses et en cellulose à l'interface entre deux vaisseaux. Ces résultats suggèrent que le transport facilité de sucres médié par les transporteurs de type SWEET entre les cellules de parenchymes et les cellules conductrices de xylème est important pour assurer une composition correcte de paroi des cellules de xylème. L'article scientifique est présenté à la fin de ce chapitre.

#### 3.1.1.2. Contribution personnelle

Les analyses de la composition pariétale des cellules de phloème et de xylème ont été réalisées au Synchrotron SOLEIL à Saclay avant mon arrivée dans l'équipe. En effet, Fédérica De Marco, Françoise Vilaine, Nelly Wolff, Sylvie Dinant, et Rozenn Le Hir ont réalisé l'acquisition des données spectrales et Rozenn Le Hir a réalisée l'analyse des données et la rédaction de l'article. J'ai contribué à l'élaboration de l'article en réalisant une synthèse bibliographique des nombres d'ondes FTIR connus dans la littérature. J'ai réalisé dans le cadre de mes travaux de thèse des analyses de composition pariétale en spectroscopie FTIR sur les lignées sauvage, *swt11*, *swt12*, *swt16*, *swt17*, *swt11swt12*, et *swt11swt12swt16* et l'analyse de ces données spectrales a permis de confirmer les résultats précédemment obtenus. L'article est disponible à la fin de ce chapitre.

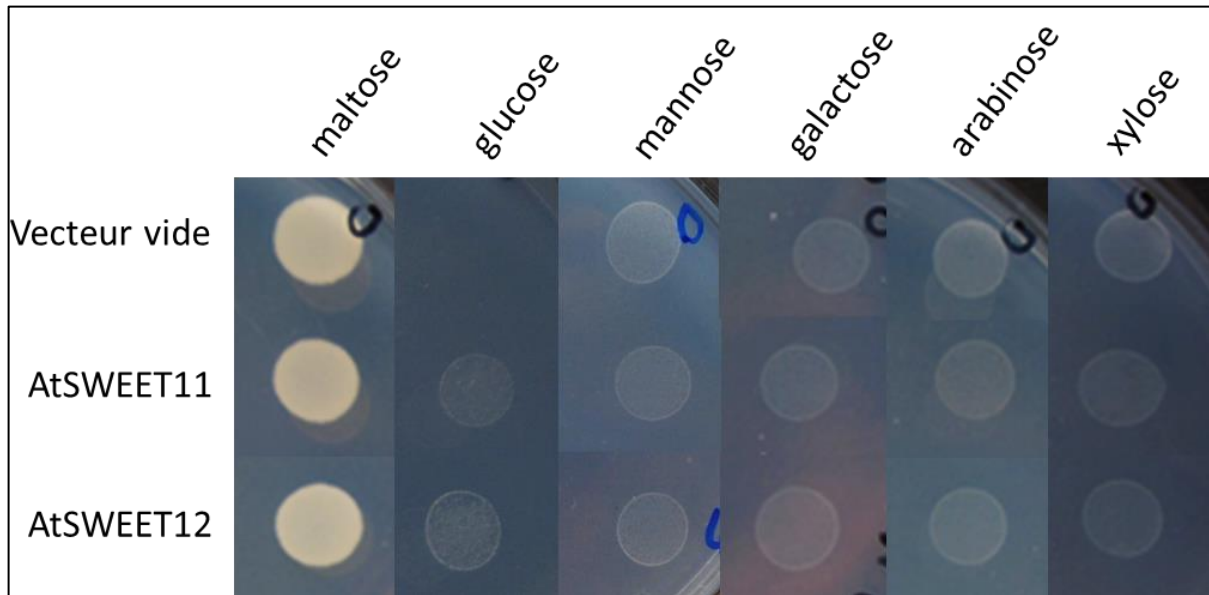
#### 3.1.2. Test Complémentation fonctionnelle chez la levure

Chez *Arabidopsis thaliana*, les transporteurs SWEETs ont majoritairement été décrits comme étant des protéines permettant le transport facilité de sucres de type saccharose, glucose, ou fructose, mannose et/ou galactose (Chen et al. 2010 ; Klemens et al., 2013 ; Chardon et al.,



2013 ; Le Hir et al., 2015). Cependant, certaines études ont étendu la capacité de transport de certains SWEETs au transport de molécules plus complexes telles que des phytohormones comme des gibbérellines (SWEET13 et SWEET14, Kanno et al., 2016). Afin de déterminer si les transporteurs plasmalemmiques SWEET11 et SWEET12 ont la capacité de transporter d'autres sucres que le saccharose, le glucose et le fructose, j'ai réalisé une expérience de complémentation des souches de levures mutées dans le transport des sucres à l'Université de Poitiers en collaboration avec Benoît Porcheron et Rémi Lemoine (DR, CNRS, Université de Poitiers). Nous avons testé des sucres impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides de paroi tels que le mannose, le galactose, le xylose, l'arabinose. En effet, le mannose et le galactose sont tous deux des précurseurs de galactinol utilisé dans la synthèse de raffinose et seraient tous deux transportés par SWEET1 (Chen et al., 2010). De plus, certains transporteurs d'hexoses appartenant à la famille HXT sont également capable de transporter du xylose, un autre sucre précurseur des polysaccharides de parois (Cheng et al., 2015, Hamacher et al., 2002).

La souche *EBY. VW 4000* portant soit le vecteur vide soit le vecteur contenant la séquence codant pour le transporteur SWEET11 ou SWEET12 a été mis en croissance sur des milieux contenant du glucose, du mannose, du galactose, du xylose ou de l'arabinose et les photographies ont été prises après 144 heures de croissance (Figure 57). L'important est de noter la différence de croissance entre le vecteur vide et le vecteur contenant la séquence du gène *SWEET11* ou *SWEET12*. On remarque une bonne croissance des souches sur le maltose, le sucre témoin qui permet de valider l'expérience. De plus on observe une croissance de la souche exprimant SWEET11 et SWEET12 sur le glucose alors que qu'aucune croissance n'est observée avec le vecteur vide (Figure 57). Ce résultat confirme donc ce qui a été précédemment publié (Le Hir et al., 2015). En revanche, aucune complémentation n'est observée pour le transport du galactose, mannose, arabinose et xylose. Les résultats ci-dessus montrent donc que les transporteurs SWEET11 et SWEET12 ne transportent pas les sucres précurseurs de composés pariétaux testés et semblent spécifique du transport du glucose, du fructose et du saccharose.



**Figure 57:** Test de complémentation fonctionnelle avec la souche de levure *EBY.WV 4000* mutée dans le transport des hexoses exprimant les transporteurs SWEET11 ou SWEET12

Six sucres ont été testés : le maltose (contrôle de croissance), le glucose, le galactose, le mannose, l'arabinose et le xylose. Les photographies présentées ci-dessous correspondent à la concentration  $10^5$  et ont été prises après 144 heures de croissance.

### 3.2. Contribution des gènes *SWEET16* et *SWEET17* dans la composition pariétale des fibres et des vaisseaux de xylème

Dans les paragraphes précédents de ce chapitre, nous avons montré que les lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEET16* et/ou *SWEET17* présentent une réduction de la taille du système vasculaire par rapport à la surface de la section de la hampe florale ainsi qu'un phénotype marqué des fibres et des vaisseaux de xylème. Ces gènes codant pour des transporteurs tonoplastiques semblent donc importants dans le développement et la croissance des cellules conductrices de xylème. Compte tenu de ces résultats, une analyse de la composition pariétale des lignées mutées dans l'expression de ces gènes a été réalisée en spectroscopie FTIR (Infra-Rouge à Transformée de Fourier). De plus, une analyse d'expression de gène codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le développement des vaisseaux et des fibres a également été réalisée.

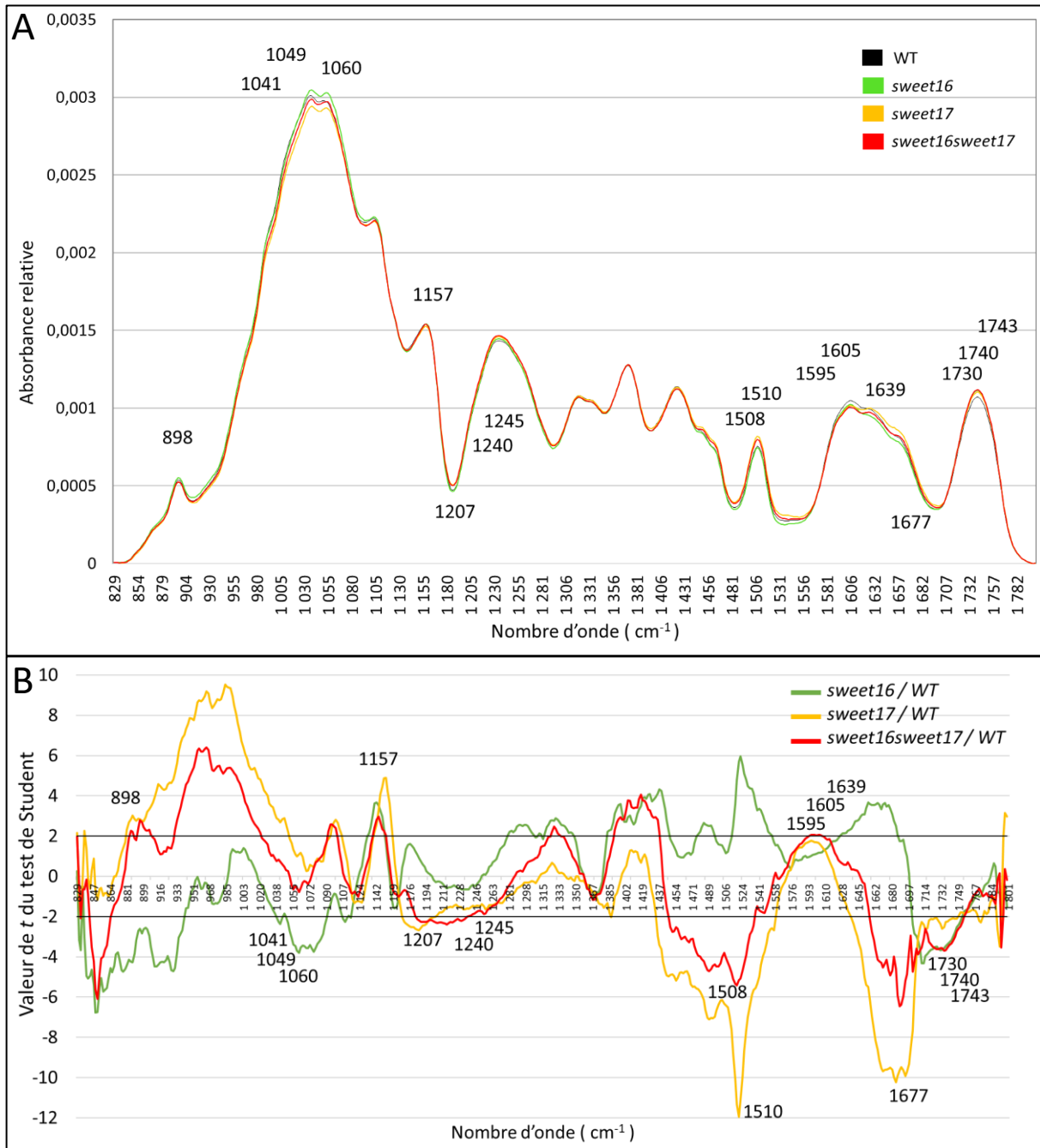
#### 3.2.1. Analyse de la composition pariétale

##### 3.2.1.1. Analyse de la composition pariétale des lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEET16* et/ou *SWEET17*

La composition pariétale des cellules du xylème des lignées de type sauvage, des lignées simplement et doublement mutées dans l'expression des gènes *SWEET16* et/ou *SWEET17* a été analysée par spectroscopie FTIR lors de mon stage Master 2. Un test  $t$  de Student a été réalisé entre les mutants et le génotype de référence afin d'évaluer les nombres d'ondes pour lesquelles on observe une différence significative entre les plantes sauvages et les lignées mutées. Cette analyse statistique permet de comparer deux à deux les différences d'absorbances observées entre les génotypes. Ainsi une valeur de  $t > 2$  ou une valeur de  $t < -2$  correspond à une différence significative entre deux génotypes (Mouille et al., 2003). La Figure 14 présente les spectres moyens d'absorbances compris entre  $830\text{ cm}^{-1}$  et  $1800\text{ cm}^{-1}$  pour chaque génotype (Figure 58A) et valeurs de  $t$  du test de Student pour chaque nombre d'onde entre les données du WT et celles des mutants (Figure 58B). L'analyse des spectres moyens permet d'observer des différences en terme d'intensité des absorbances entre le type sauvage et les différents mutants notamment pour les nombres d'ondes suivants :  $898\text{ cm}^{-1}$ ,  $1041\text{ cm}^{-1}$ ,  $1049\text{ cm}^{-1}$ ,  $1060\text{ cm}^{-1}$ ,  $1510\text{ cm}^{-1}$ ,  $1595\text{ cm}^{-1}$ ,  $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1740\text{ cm}^{-1}$  et  $1743\text{ cm}^{-1}$  (Figure 58A).

Afin d'évaluer si les différences d'absorbances observées entre les génotypes sont significatives, j'ai réalisé un test  $t$  de Student permettant de comparer les valeurs d'absorbances entre deux génotypes. Les valeurs de  $t$  obtenues après la comparaison du WT et *swt16* (en vert), WT et *swt17* (en jaune), WT et *swt16swt17* (en rouge) sont présentées dans la Figure 58B. Les valeurs de  $t$  supérieures à 2 correspondent à une absorbance réduite par rapport au génotype de référence (le WT choisi pour cette analyse) et les valeurs de  $t$  inférieures à -2 correspondent à une absorbance augmentée par rapport au WT (Figure 58B).

### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 2



**Figure 58** : Analyse de la composition pariétale des lignées WT, *sweet16*, *sweet17*, *sweet16wt17*. Spectre moyen d'absorbance des quatre génotypes en fonction du nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) (A) et Représentation graphique des valeurs de *t* de Student obtenues lors de la comparaison des absorbances des lignées mutantes avec le WT à chaque nombre d'onde (B). Les valeurs de *t* (axe des ordonnées) ont été reportées pour chaque nombre d'onde (axe de abscisses). Les valeurs de *t* > 2 et *t* < -2 indiquent une différence significative entre la lignée mutée et le WT. Les mesures ont été effectuées sur n = 8 plantes par génotype et sur tous les pôles vasculaires des plantes (n ≥ 8 pôles vasculaires par plante) (D'après mon rapport de stage de Master 2).

➤ Polysaccharides de parois

Les mutants *swt16*, *swt17* et *swt16swt17* ont des absorbances significativement différentes du WT aux nombres d'ondes 898 $\text{cm}^{-1}$ , 1041  $\text{cm}^{-1}$ , 1049  $\text{cm}^{-1}$  et 1060  $\text{cm}^{-1}$ . Ces nombres d'ondes ont été décrites comme étant caractéristiques des liaisons anomériques de polymère de  $\beta$ -glucanes (898  $\text{cm}^{-1}$ ) retrouvées dans la cellulose (Kacurakova et al., 2002) ou dans les hémicelluloses (Gorzsas et al., 2011) ou des xyloglucanes (1041  $\text{cm}^{-1}$ , 1049  $\text{cm}^{-1}$  et 1060  $\text{cm}^{-1}$ ) (McCann et al. 1992). De plus, l'analyse des spectres moyens (Figure 58A) et les valeurs de  $t$  (Figure 58B) montrent que ces composés sont accumulés chez le simple mutant *swt16* tandis qu'ils sont réduits chez *swt17* et *swt16swt17*. Pour les trois lignées mutantes, les valeurs de  $t$  sont également supérieures à 2 ou inférieures à -2 aux nombres d'ondes caractéristiques des groupements COOH des pectines acides (1639  $\text{cm}^{-1}$  et 1677  $\text{cm}^{-1}$ ). Ainsi, les parois du simple mutant *swt16* contiendraient moins de pectines acides que le sauvage, tandis que les parois du xylème des lignées *swt17* et *swt16swt17* en contiendraient plus que les parois du xylème du type sauvage. De plus, les trois mutants comparés au WT présentent des valeurs de  $t$  inférieures à -2 aux nombres d'ondes suivants : 1730  $\text{cm}^{-1}$ , 1740  $\text{cm}^{-1}$ , 1743  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 58B). Ces nombres d'ondes sont caractéristiques des groupements acétyl (1730  $\text{cm}^{-1}$ ), des groupements carboxyl estérifiés (1740  $\text{cm}^{-1}$ ) ou des groupements carbonyle (1743  $\text{cm}^{-1}$ ) associés aux hémicelluloses (Kacurakova et al., 2002, Moheby et al., 2010). Enfin, uniquement chez le double mutant *swt16swt17* des différences significatives sont observées aux nombres d'ondes suivants : 1230  $\text{cm}^{-1}$ , 1240  $\text{cm}^{-1}$  et 1245  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques de liaisons C-O et C=O présentes dans les pectines de type rhamnogalacturonane I et rhamnogalacturonane II ou pouvant correspondre aux fractions O-acétyl des polymères pariétaux (Kačuráková et al., 2002 ; Moheby, 2010).

➤ Lignines

Le simple mutant *swt16* comparé au WT a une valeur de  $t$  supérieure à 2 aux nombres d'ondes 1320  $\text{cm}^{-1}$  et 1329  $\text{cm}^{-1}$  tandis que les deux autres mutants ont des valeurs comprises entre -2 et 2 (Figure 58B). Ces nombres d'ondes sont caractéristiques des liaisons C-O et du groupement syringyl contenues dans les lignines de type-S (Faix et al., 1991). De plus, les mutants *swt17* et *swt16swt17* présentent des différences significatives avec le génotype sauvage aux nombres d'ondes 1207  $\text{cm}^{-1}$ , 1508  $\text{cm}^{-1}$ , 1510  $\text{cm}^{-1}$  et 1595  $\text{cm}^{-1}$ . Ces nombres d'ondes sont associés préférentiellement aux lignines, notamment des lignines de type G (Faix et al., 1991). Ainsi, les parois des cellules du xylème de ces lignées présenteraient en plus d'une modification dans la composition des polysaccharides de parois, une modification des contenus en lignine.

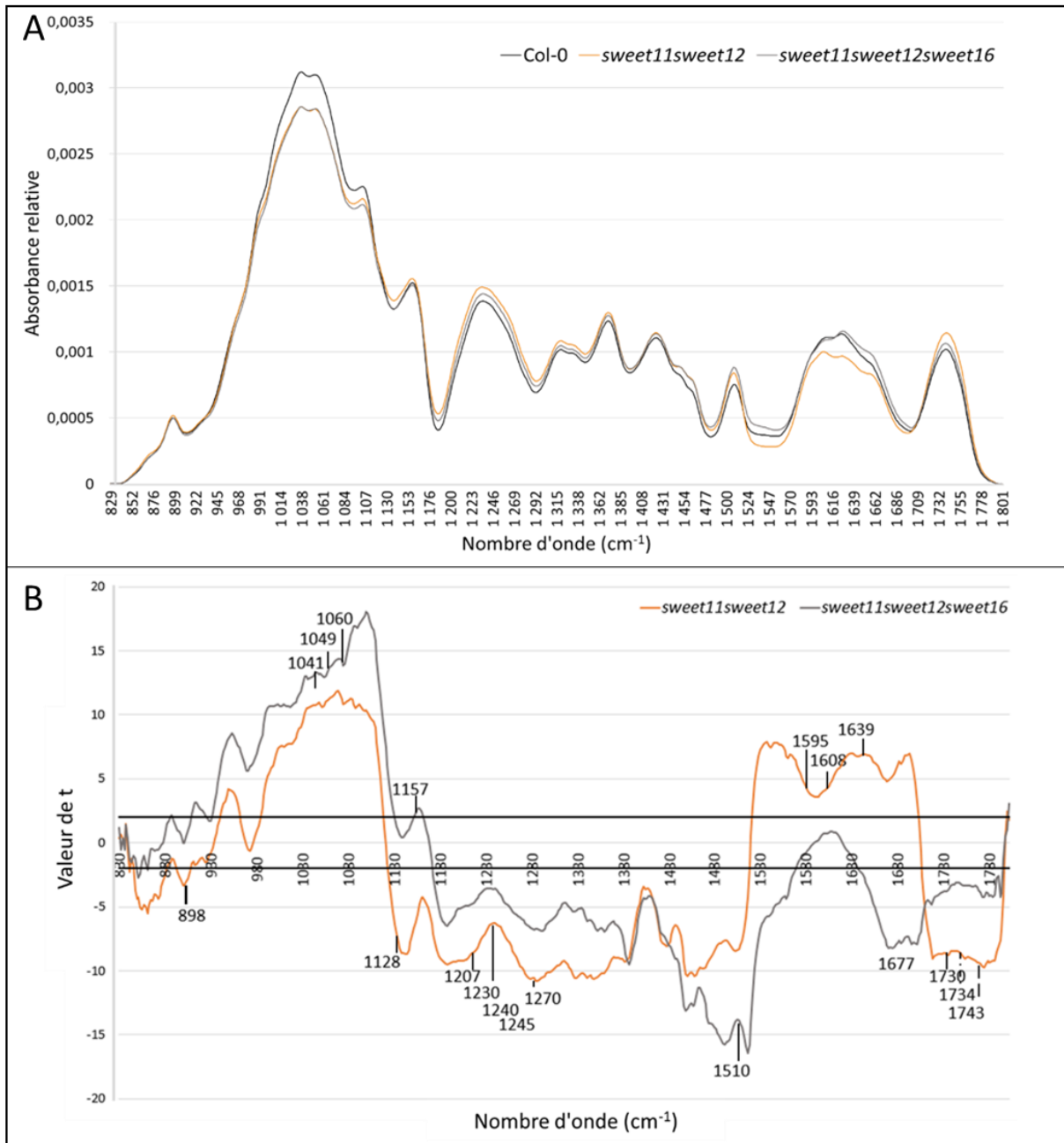
#### 3.2.1.2. Analyse de la composition pariétale des lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEET11*, *SWEET12* et *SWEET16*

Afin d'analyser plus finement l'implication du gène *SWEET16* dans la composition pariétale des vaisseaux et des fibres du xylème, une analyse FTIR a également été réalisée pour comparer les lignées sauvage, *swt11swt12*, et *swt11swt12swt16* lors de mon stage de Master 2. J'ai repris et approfondi l'analyse de ces résultats au cours de ma thèse (Figure 59).

On constate que les courbes de valeurs de  $t$  des deux génotypes (comparé au WT) en fonction du nombre d'onde ont des profils sensiblement similaires. En effet, on remarque que les valeurs de  $t$  des comparaisons des deux génotypes sont supérieures à 2 pour les nombres d'ondes précédemment décrits  $1041\text{ cm}^{-1}$ ,  $1049\text{ cm}^{-1}$  et  $1060\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux groupements CO, CC ou OCH des celluloses (Kacurakova et al., 2002). A l'inverse, les valeurs de  $t$  des comparaisons des mutants avec le WT sont inférieures à -2 aux nombres d'ondes caractéristiques des lignines ( $1207\text{ cm}^{-1}$ ,  $1508\text{ cm}^{-1}$ ,  $1510\text{ cm}^{-1}$  et  $1595\text{ cm}^{-1}$ ), des pectines ( $1230\text{ cm}^{-1}$ ,  $1240\text{ cm}^{-1}$  et  $1245\text{ cm}^{-1}$ ) et des hémicelluloses ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1740\text{ cm}^{-1}$ ,  $1743\text{ cm}^{-1}$ ) indiquant une diminution de ces composés dans la paroi des vaisseaux et des fibres du xylème du double et du triple mutant comparé au WT. Ainsi les modifications de la composition de la paroi du triple mutant sont très similaires à celles observées chez le double mutant *swt11swt12*.

#### 3.2.1.3 Analyse de la composition pariétale des lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEET11*, *SWEET12* et *SWEET17*

Afin d'évaluer la contribution du gène *SWEET17* dans la composition pariétale des cellules de xylème, une analyse des lignées WT, *swt17*, *swt11swt12swt17* et du quadruple mutant a été réalisée en spectroscopie FTIR durant ma thèse. L'analyse du simple mutant *swt17* a été utilisé comme contrôle afin de vérifier les résultats obtenus lors de mon stage de Master 2.



**Figure 59** : Analyse de la composition de la paroi de *swt11swt12* et *swt11sw12swt16*

Spectre moyen d'absorbance des quatre génotypes en fonction du nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) (A) et Représentation graphique des valeurs de *t* de Student obtenues lors de la comparaison des absorbances des lignées mutantes avec le WT à chaque nombre d'onde (B). Les valeurs de *t* (axe des ordonnées) ont été reportées pour chaque nombre d'onde (axe de abscisses). Les valeurs de *t* > 2 et *t* < -2 indiquent une différence significative entre la lignée mutée et le WT. Les mesures ont été effectuées sur n = 8 plantes par génotype et sur tous les pôles vasculaires des plantes (n ≥ 8 pôles vasculaires par plante) (D'après mon rapport de stage de Master 2).



### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 2

On remarque sur la Figure 60A des différences d'absorbance entre les spectres moyens des quatre génotypes. Visuellement, les différences les plus notables se trouvent chez le quadruple mutant (en jaune), notamment aux nombres d'onde comprises entre  $1524\text{ cm}^{-1}$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$  où l'on retrouve une absorbance relative largement supérieure à celles des trois autres génotypes. Afin, d'évaluer si ces différences sont significatives entre les lignées mutées et le WT, un test  $t$  de Student a été effectué à chaque nombre d'onde entre un mutant *swt* et le WT (Figure 60B).

On remarque tout d'abord que les valeurs de  $t$  issues de la comparaison entre le quadruple mutant et le WT (en jaune) sont très largement supérieures à 2 ou inférieures à -2 avec des valeurs de  $t$  allant jusqu'à 8 ou -19 montrant ainsi que les différences observées sont extrêmement significatives (Figure 60B). Afin de ne pas être influencé visuellement par les fluctuations importantes du quadruple mutant, une figure représentant les comparaisons du simple mutant *swt17* avec le WT et celles du triple mutant *swt11swt12swt17* avec le WT est présentée en annexe (Figure S3).

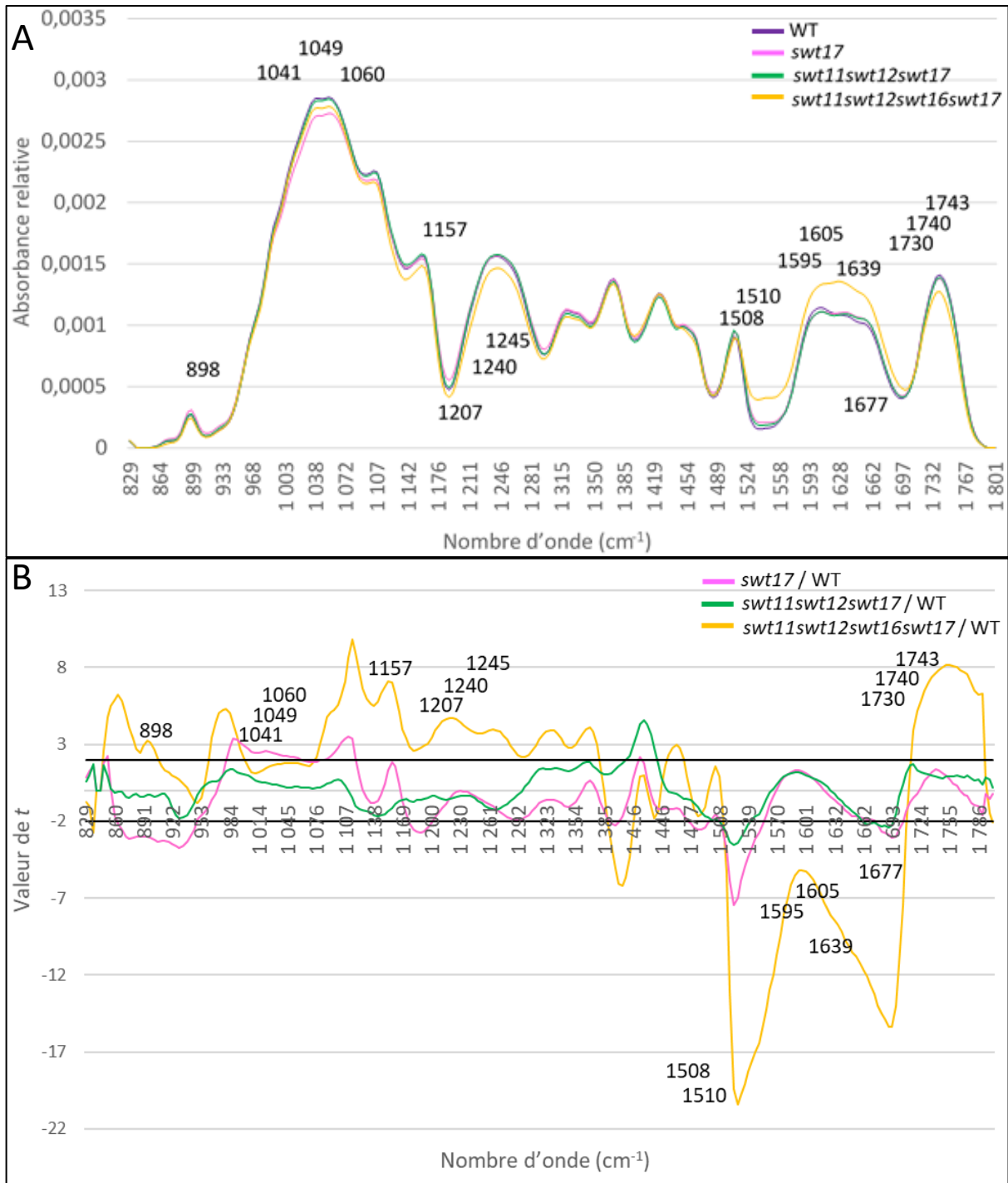
On constate que la valeur de  $t$  issue de la comparaison entre le simple mutant *swt17* et le WT (en rose) est inférieure à -2 aux nombres d'ondes comprises entre  $860\text{ cm}^{-1}$  et  $950\text{ cm}^{-1}$ , la plupart caractéristiques de composés celluloseux, et aux nombres d'ondes comprises entre  $1477\text{ cm}^{-1}$  et  $1550\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques de certains composés de la lignine (Faix et al., 1991). Ces résultats montrent une accumulation de certains composés appartenant à la lignine et aux hémicelluloses, comme observé lors des analyses réalisées dans le cadre de mon stage de Master 2. La valeur de  $t$  est quant à elle supérieure à 2 aux nombres d'ondes compris entre  $980\text{ cm}^{-1}$  et  $1060\text{ cm}^{-1}$  (Figure 60B). Ces nombres d'ondes ont été décrits comme étant caractéristiques des xyloglucanes qui sont des hémicelluloses ( $1041\text{ cm}^{-1}$ ,  $1049\text{ cm}^{-1}$  et  $1060\text{ cm}^{-1}$ ) (McCann et al. 1992). La valeur de  $t$  calculée lors de la comparaison entre le triple mutant *swt11swt12swt17* et le WT est compris entre 2 et -2 pour beaucoup de nombres d'ondes qui ne sont donc pas significativement différentes entre les deux génotypes (Figure 60B). Cependant, on note des différences significatives entre le WT et le triple mutant avec une valeur de  $t$  supérieure à 2 ou inférieure à -2 à certains nombres d'ondes caractéristiques des lignines de type-G :  $1508\text{ cm}^{-1}$ ,  $1510\text{ cm}^{-1}$  et  $1595\text{ cm}^{-1}$  (Faix et al., 1991) ou des nombres d'ondes compris entre  $1400\text{ cm}^{-1}$  et  $1450\text{ cm}^{-1}$ .

Les plus fortes modifications de la composition de la paroi ont été mesurés lors de la comparaison entre le type sauvage et le quadruple mutant (Figure 60A et B). En effet, on remarque que la comparaison entre le WT et le quadruple mutant présente une valeur de  $t$

supérieure à 2 ou inférieure à -2 pour la plupart des nombres d'ondes (Figure 60B). Les nombres d'ondes caractéristiques des liaisons anomériques de polymère de  $\beta$ -glucanes (898  $\text{cm}^{-1}$ ) retrouvées dans la cellulose (Kacurakova et al., 2002) ou dans les hémicelluloses (Gorzsas et al., 2011) ou des xyloglucanes (1041  $\text{cm}^{-1}$ , 1049  $\text{cm}^{-1}$  et 1060  $\text{cm}^{-1}$ ) (McCann et al. 1992) sont réduites chez le quadruple mutant comparé au WT avec une valeur de  $t$  supérieure à 2. De la même manière, les nombres d'ondes 1320  $\text{cm}^{-1}$  et 1329  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques des liaisons C-O et du groupement syringyl contenues dans les lignines de type-S (Faix et al., 1991), les nombres d'ondes 1207  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques des lignines de type-G (Faix et al., 1991) ont des valeurs de  $t$  supérieure à 2.

Enfin, les nombres d'ondes à 1157  $\text{cm}^{-1}$ , 1230  $\text{cm}^{-1}$ , 1240  $\text{cm}^{-1}$  et 1245  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques de liaisons C-O et C=O retrouvés dans les pectines de type rhamnogalacturonane I et rhamnogalacturonane II ou les fractions O-acetyl des polymères pariétaux (Kačuráková et al., 2002 ; Moheby, 2010) et celles correspondant aux groupements acétyl (1730  $\text{cm}^{-1}$ ), aux groupements carboxyl estérifiés (1740  $\text{cm}^{-1}$ ) ou aux groupements carbonyle (1743  $\text{cm}^{-1}$ ) associés aux hémicelluloses (Kacurakova et al., 2002, Moheby et al., 2010) ont également une valeur de  $t$  supérieure à 2 correspondant à une réduction de ces composés chez le quadruple mutant (Figure 60A). A l'inverse, les nombres d'ondes 1508  $\text{cm}^{-1}$ , 1510  $\text{cm}^{-1}$  et 1595  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux liaisons retrouvées dans certaines lignines de type G (Faix et al., 1991) et celles caractéristiques des groupements COOH des pectines acides (1639  $\text{cm}^{-1}$  et 1677  $\text{cm}^{-1}$ ) ont une valeur de  $t$  largement inférieure à -2 (Figure 60B) et une absorbance pouvant être jusqu'à 1,5 fois supérieure à celle du WT (Figure 60A).

Sur la base de ces résultats, on peut donc en conclure que contrairement à la mutation du gène *SWEET16*, la mutation du gène *SWEET17* entraîne des modifications de la composition pariétale des cellules du xylème. Enfin l'analyse du quadruple mutant a mis en évidence des modifications profondes de la composition de la paroi avec une réduction de certains polysaccharides de parois tels que certaines hémicelluloses, des polymères de  $\beta$ -glucanes associées aux celluloses et les lignines de type-S. A l'inverse, les pectines acides et les lignines de type-G sont majoritairement accumulées dans les parois des cellules conductrices de la hampe florale.



**Figure 60** : Analyse de la composition pariétale des lignées WT, *swt17*, *swt11swt12wt17* et *swt11swt12swt16swt17*

Spectre moyen d'absorbance des quatre génotypes en fonction du nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) (A) et Représentation graphique des valeurs de *t* de Student obtenues lors de la comparaison des absorbances des lignées mutantes avec le WT à chaque nombre d'onde (B). Les valeurs de *t* (axe des ordonnées) ont été reportées pour chaque nombre d'onde (axe de abscisses). Les valeurs de *t* > 2 et *t* < -2 indiquent une différence significative entre la lignée mutée et le WT. Les mesures ont été effectuées sur n = 4 plantes par génotype et sur tous les pôles vasculaires des plantes (n ≥ 8 pôles vasculaires par plante).

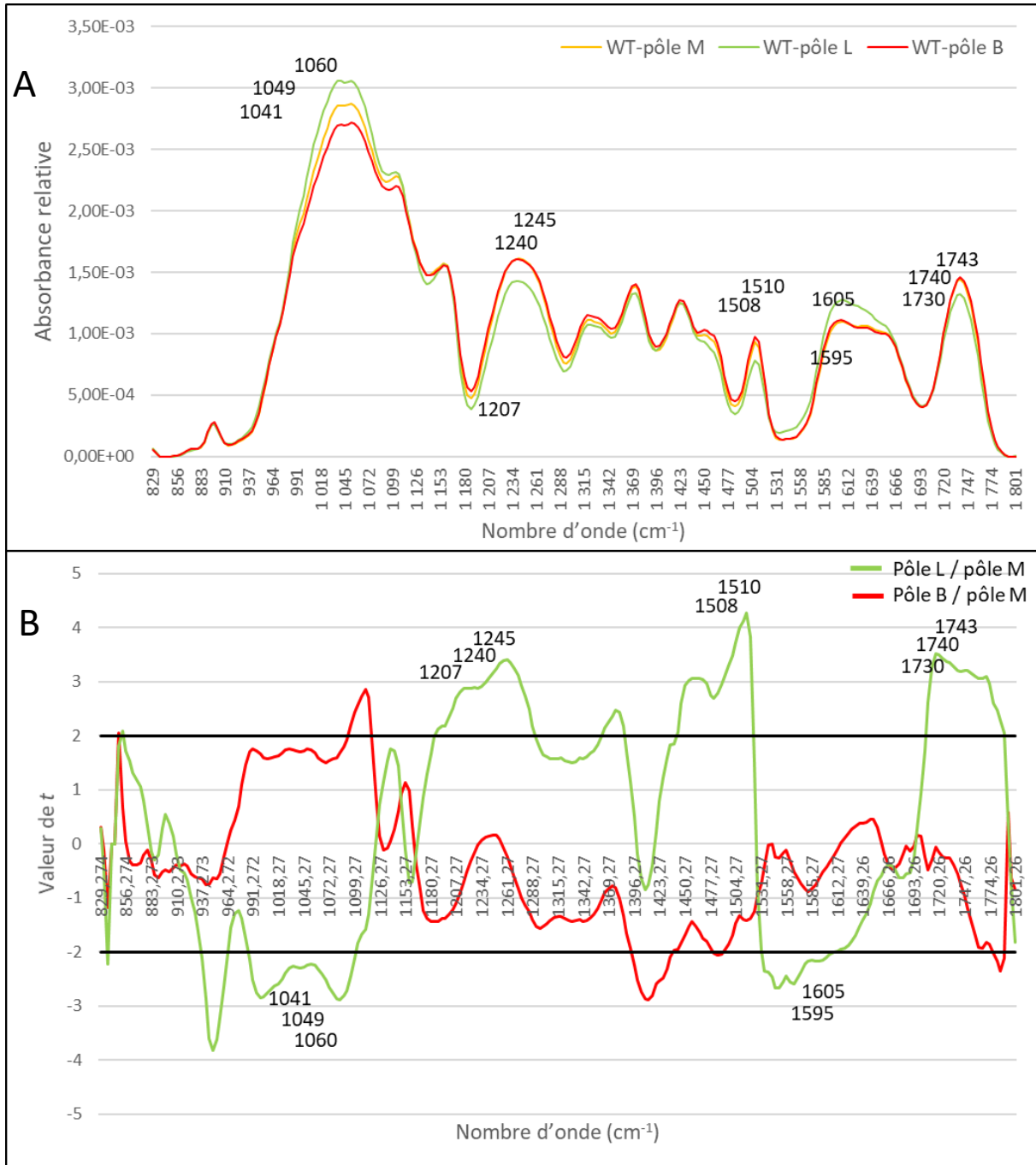
#### 1.1. Composition pariétale des différents types de pôles vasculaires dans la hampe florale

Les analyses décrites ci-dessus ont mis en évidence des modifications de la composition pariétale des vaisseaux et des fibres de xylème chez les mutants *sweet*. Ces analyses ont été réalisées sur tous les pôles vasculaires retrouvés dans les sections basales de la hampe florale. Compte tenu de la localisation variable des promoteurs des gènes *SWEET* dans les pôles vasculaires de la hampe florale (Figures 3, 4, 5 et 6), j'ai analysé la composition pariétale des cellules de xylème dans les différents types de pôles vasculaires de la hampe florale. J'ai réalisé ces analyses sur des plantes de type sauvage et sur le quadruple mutant qui présente les modifications les plus fortes.

##### 1.1.1. Analyse de la composition de la paroi des vaisseaux et des fibres du xylème en fonction du type de pôle vasculaire chez le génotype sauvage

J'ai tout d'abord analysé la composition des parois des cellules de xylème en fonction du type de pôle vasculaire chez une plante sauvage. Les résultats des spectres moyens et des valeurs de  $t$  du test de Student sont présentés sur la Figure 61.

On remarque tout d'abord que les pôles L en vert ont une valeur de  $t$  supérieure à 2 ou inférieure à -2 à de nombreux d'ondes alors que les pôles B en rouge ont une valeur de  $t$  majoritairement comprise entre -2 et 2 c'est-à-dire qu'ils ne présentent pas de différences significatives par rapport aux pôles de type-M utilisé ici comme référence (Figure 61B). Ce résultat montre que les cellules des pôles de type-B ont une composition pariétale proche des cellules contenues dans les pôles M alors que la composition des parois de pôles de type-L présente de nombreuses différences significatives par rapport aux pôles de type-M. Ainsi des absorbances significativement différentes entre les pôles de type-M et de type-L aux nombres d'ondes comprises entre 937  $\text{cm}^{-1}$  et 964  $\text{cm}^{-1}$  ; entre 980  $\text{cm}^{-1}$  et 1100  $\text{cm}^{-1}$  avec une valeur de  $t$  inférieure à -2 pour ces nombres d'ondes sont observées (Figure 61B). Certains de ces nombres d'ondes sont caractéristiques de xyloglucanes (920  $\text{cm}^{-1}$  (Lahlali et al., 2015) 941  $\text{cm}^{-1}$ , 945  $\text{cm}^{-1}$ , (Kumar et al., 2015) 1041  $\text{cm}^{-1}$ , 1049  $\text{cm}^{-1}$  et 1060  $\text{cm}^{-1}$  (McCann et al. 1992), aux rhamnogalacturonanes (902  $\text{cm}^{-1}$ , 916  $\text{cm}^{-1}$ , 951  $\text{cm}^{-1}$ , 989  $\text{cm}^{-1}$ , 1043  $\text{cm}^{-1}$  (Kacurakova et al., 2000) ou à des composés cellulosiques (900  $\text{cm}^{-1}$ , 990  $\text{cm}^{-1}$ , 1040  $\text{cm}^{-1}$ , 1060  $\text{cm}^{-1}$  (Carpita et al., 2001 ; Brown et al., 2005 ; Rubio-Diaz et al., 2012). De plus, l'analyse des spectres moyens (Figure 17A) et les valeurs de  $t$  (Figure 61B) montrent que ces composés sont accumulés chez les pôles L.



**Figure 61 : Analyse de la composition pariétale des cellules du xylème en fonction du type de pôles vasculaires chez les plantes sauvages**

Spectre moyen d'absorbance des trois types de pôles en fonction du nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) (A). Représentation graphique des valeurs de *t* de Student obtenues lors de la comparaison des absorbances des pôles de type-B et des pôles de type-L comparé avec les pôles de type-M à chaque nombre d'onde (B). Les valeurs de *t* (axe des ordonnées) ont été reportées pour chaque nombre d'onde (axe de abscisses). Les valeurs de *t* > 2 et *t* < -2 indiquent une différence significative entre le pôle de type-B ou L et le pôle de type-M. Les analyses ont été effectuées sur 57 spectres acquis sur les pôles de type-M, 97 spectres sur les pôles de type-L et 159 spectres sur les pôles de type-B (n = 3 plantes par génotype).

De plus, les cellules des pôles L présentent des différences significatives avec les pôles M aux nombres d'ondes  $1207\text{ cm}^{-1}$ ,  $1508\text{ cm}^{-1}$  et  $1510\text{ cm}^{-1}$  avec une valeur de  $t$  supérieure à 2 (Figure 61B). Ces nombres d'ondes sont associés préférentiellement aux lignines, notamment des lignines de type G (Faix et al., 1991). Ainsi, les parois des cellules du xylème des pôles L contiendraient moins de lignine de type G que celles des pôles M. A l'inverse, l'absorbance des pôles L est plus importante que celle des pôles M aux nombres d'ondes  $1595\text{ cm}^{-1}$ ,  $1598\text{ cm}^{-1}$  et  $1605\text{ cm}^{-1}$  (Faix et al., 1991, Emandi et al., 2010, Matos et al., 2013) qui correspondent à d'autres vibrations liées aux lignines.

#### 1.1.2. Analyse de la composition de la paroi des cellules du xylème en fonction du type de pôle cribro-vasculaire chez le quadruple mutant

Une analyse par type de pôle a également été réalisée chez le quadruple mutant en comparant pour chaque type de pôle la composition pariétale du quadruple mutant en fonction du sauvage (Figure 62). Pour simplifier l'analyse des graphiques, j'ai représenté les différences significatives par des astérisque (\*) (Figure 62B, D et F). On remarque ainsi des différences communes aux trois types de pôles vasculaires, et d'autres spécifiques à certains types de pôles. De plus, les parois des cellules de xylème des pôles de type-L connectés aux feuilles caulines sont celles qui présentent le plus de différences (Figure 62C et D) tandis que les parois des cellules des pôles de type-M sont celles qui en présentent le moins (Figure 62A et B).

##### ➤ Différences communes aux trois types de pôles cribro-vasculaires

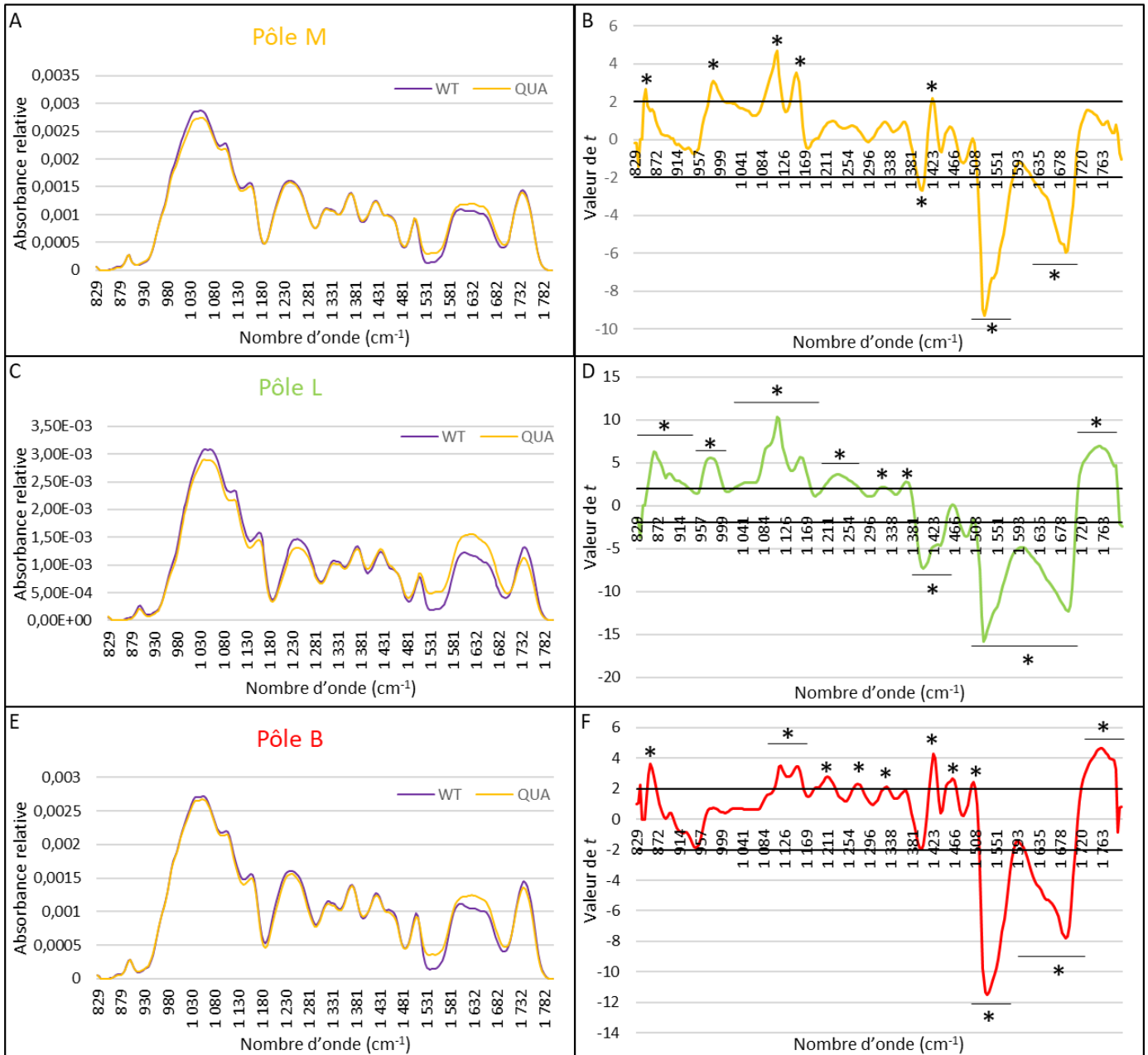
Parmi les différences observées entre les parois des vaisseaux et des fibres du quadruple mutant et celles des plantes de type sauvage, certaines sont communes aux trois types de pôles. Parmi les nombres d'ondes pour lesquels la valeur de  $t$  test supérieure à 2 on retrouve les nombres d'ondes caractéristiques de la lignine à  $858\text{ cm}^{-1}$  (Faix et al., 1991) et ceux caractéristiques des polysaccharides de parois tels que la cellulose ( $1089\text{ cm}^{-1}$ ,  $1097\text{ cm}^{-1}$ ,  $1109\text{ cm}^{-1}$  et  $1117\text{ cm}^{-1}$  (Carpita et al., 2001, Brown et al., 2005, Rubio-Diaz et al., 2012, Lahlali et al., 2015) ou les xyloglucanes ( $1100\text{ cm}^{-1}$ ). Ces composés pariétaux sont réduits chez le quadruple mutant comparé au WT dans les trois types de pôles. A l'inverse, certains composés caractéristiques des lignines sont accumulés chez le quadruple mutant. En effet la valeur de  $t$  est inférieure à -2 pour les nombres d'ondes caractéristiques des liaisons contenues dans les cycles aromatiques des lignines ( $1505\text{ cm}^{-1}$  et  $1508\text{ cm}^{-1}$ , Sibout et al., 2005, Emandi et al., 2010, Matos et al., 2013) ou caractéristiques des liaisons C=C des phénylpropanes contenues dans les lignines de type-G ( $1510\text{ cm}^{-1}$ ,  $1516\text{ cm}^{-1}$ , Faix et al., 1991, Emandi et al., 2010) et des

cycles phénoliques ( $1630\text{ cm}^{-1}$ , Séné et al., 1994, Carpita et al., 2001). De plus, les acides féruliques liés aux pectines probablement sous forme d'éthers ( $1517\text{ cm}^{-1}$ ,  $1520\text{ cm}^{-1}$ , Kacurakova et al., 1999) ou les carboxylates ( $1554\text{ cm}^{-1}$ , Mouille et al., 2006) sont accumulés chez le quadruple mutant dans les trois types de pôles. De la même manière, les xylanes ( $1663\text{ cm}^{-1}$ , Karucakova 1999) ou les pectines et protéines retrouvés dans la paroi sont également accumulés. En effet, les liaisons N-H contenus dans les amines ( $1612\text{ cm}^{-1}$ ,  $1634\text{ cm}^{-1}$ ,  $1656\text{ cm}^{-1}$ ,  $1674\text{ cm}^{-1}$ ,  $1680\text{ cm}^{-1}$ ,  $1696\text{ cm}^{-1}$ , Mazurek et al., 2013, Lahlali et al., 2015) ou les pectines estérifiées à  $1700\text{ cm}^{-1}$  (Kacurakova et al., 2002) sont également accumulés chez le quadruple mutant dans les trois types de pôles.

#### ➤ Différences spécifiques à certains types de pôles vasculaires

Comme décrit précédemment, la composition des parois des cellules des pôles de type-L sont celles pour lesquelles les différences observées entre le quadruple mutant et le WT sont les plus nombreuses et les plus importantes en termes d'intensité des absorbances (Figure 61). En effet, presque la totalité des nombres d'ondes ont une valeur de  $t$  supérieure à 2 ou inférieure à -2. De façon intéressante, certaines de ces modifications sont spécifiques du type de pôle cribro-vasculaire analysé. Parmi les nombres d'ondes pour lesquels on observe des différences entre les pôles, les nombres d'ondes relatives à cellulose ( $986\text{ cm}^{-1}$ ,  $990\text{ cm}^{-1}$ , et  $999\text{ cm}^{-1}$  (Gorzsas et al., 2011, Lahlali et al., 2015) ont une valeur de  $t$  supérieure à 2 pour les pôles M et L. Ainsi nous observons une diminution de l'absorbance des nombres d'ondes relatives à la cellulose spécifiquement dans les pôles de type-M et L. Les nombres d'ondes caractéristiques des liaisons C=O des acides galacturoniques des pectines ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1742\text{ cm}^{-1}$ ; Synytsya et al., 2003, Fellah et al. 2009) ou caractéristiques des groupements acétyl des hémicelluloses ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ,  $1743\text{ cm}^{-1}$ , Mohéby et al., 2010) ou des groupements carboxyliques des pectines estérifiés ( $1734\text{ cm}^{-1}$ , Mazurek et al., 2013) ont une valeur de  $t$  supérieure à 2 dans les parois des cellules du xylème des pôles L et B mais ces différences ne sont pas significatives dans celles des pôles M. Ainsi une diminution globale du contenu en hémicelluloses dans les pôles de type-B et L est observée. Enfin, certaines modifications sont significatives des parois du xylème des pôles de type-L. C'est le cas des nombres d'ondes à  $1595\text{ cm}^{-1}$  et  $1598\text{ cm}^{-1}$  qui sont caractéristiques des liaisons C-H contenues dans les lignines (Matos et al., 2013) et des nombres d'ondes à  $1593\text{ cm}^{-1}$ ,  $1597\text{ cm}^{-1}$  qui sont caractéristiques des liaisons C=O des acides carboxyliques des hémicelluloses (Moheby et al., 2010). Ainsi la paroi des cellules de xylème des pôles de type-L accumule plus de lignines et ont présentent des modifications dans l'acétylation des hémicelluloses.





**Figure 62 : Analyse de la composition pariétale des cellules de xylème du quadruple mutant en fonction du type de pôles cribro-vasculaires**

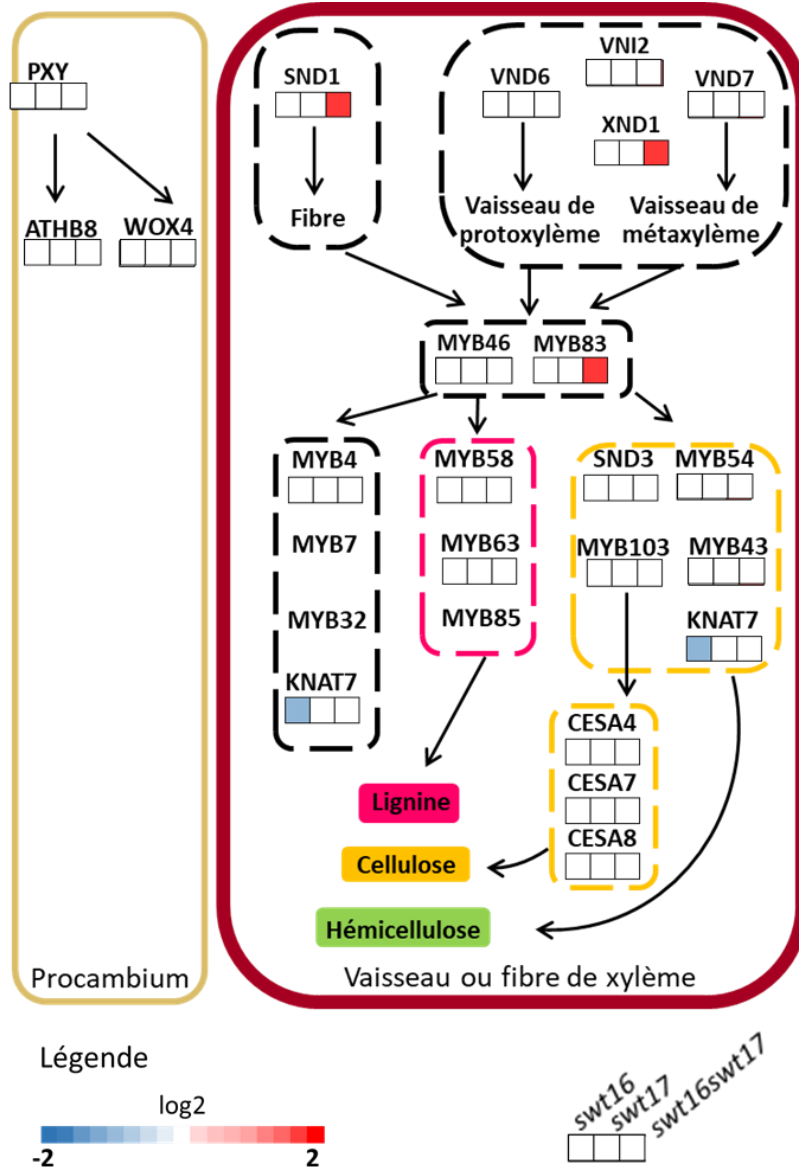
Spectres moyens d'absorbance du WT et du quadruple mutant dans les pôles de type-M (A), de type-L (C) et de type-B (E) en fonction du nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ). Représentations graphiques des valeurs de  $t$  de Student obtenues lors de la comparaison des absorbances entre le quadruple mutant et le type sauvage pour les pôles de type-M (B), de type-L (D) et de type-B (F). Les valeurs de  $t > 2$  et  $t < -2$  indiquent une différence significative entre la lignée mutée et le WT et sont représentés par une \* sur les graphiques. Les analyses ont été effectuées sur 57/83 spectres acquis sur les pôles de type-M, 97/115 spectres sur les pôles de type-L et 159/83 spectres sur les pôles de type-B du WT et quadruple mutant respectivement ( $n = 3$  plantes par géotype).

#### 1.1. Analyse de l'expression des gènes codant des facteurs de transcriptions impliqués dans le développement des vaisseaux et des fibres du xylème

La Figure 63 présente les principaux facteurs de transcriptions impliqués dans les étapes de développement des vaisseaux et des fibres du xylème. Un carré rouge représente une surexpression du gène d'intérêt chez le mutant en comparaison avec le type sauvage, tandis qu'un carré bleu représente une diminution de l'expression du gène chez le mutant comparé au WT. Chaque carré correspond à la comparaison entre le type sauvage et le simple mutant *swt16*, *swt17* et le double mutant *swt16swt17*.

Aucune modification de l'expression des gènes impliqués dans la maintenance du procambium (*PXY*, *ATHB8* et *WOX4*) n'a été mesurée dans aucun des génotypes analysés (Figure 63). Concernant le double mutant, des modifications de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement des fibres et des vaisseaux ont été mesurées (Figure 63). Ainsi une surexpression significative de l'expression de *SND1* impliqué dans le développement des fibres est mesurée chez le double mutant. De plus une surexpression de l'expression des facteurs de transcription *MYB46* et *MYB83*, qui sont des cibles de *SND1* et qui jouent un rôle central dans la mise en place des composés de la paroi secondaire des cellules de xylème, est également mesurée chez le double mutant. L'expression de certaines cibles de *MYB46* et *MYB83* a également été analysée. Parmi ces cibles seule l'expression de *MYB54* est surexprimée chez le double mutant (Figure 63). Ce facteur de transcription a été décrit comme un potentiel régulateur de la biosynthèse de cellulose (Zheng et al., 2019). Par contre aucune modification de l'expression des gènes codant pour les celluloses synthases responsables de la biosynthèse de cellulose dans les parois secondaires (*CESA4*, 7 et 8) n'a été mesurée (Figure 63). Il est également à noter que l'expression du gène codant pour le facteur de transcription *KNAT7*, qui est un régulateur positif de la formation de la paroi secondaire dans la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* (Wang et al., 2019) est diminuée uniquement chez le simple mutant *swt16* (Figure 63). Enfin, l'expression des gènes *VNI2* et *XND1* est également surexprimé chez le double mutant. Le facteur de transcription *VNI2* est un régulateur négatif de l'expression des *VND* et est donc impliqué dans la formation des vaisseaux de xylème (Yamaguchi et al., 2010) alors que le facteur de transcription *XND1* est un régulateur négatif de la biosynthèse de la paroi secondaire des vaisseaux de xylème (Zhao et al., 2008). L'expression des gènes *MYB54*, *MYB46*, *MYB83*, *SND1*, *VNI2*, *VND6* et *VND7* a également été quantifié par qPCR chez le double mutant *swt11swt12* et le quadruple mutant (Figure S6). Les analyses statistiques n'ont

mis en évidence aucune différence significative entre ces génotypes et le type sauvage montrant ainsi que les différences observées sont spécifiques du double mutant *swt16swt17*.



**Figure 63 :** Variations de l'expression des gènes impliqués dans la maintenance du procambium et le développement des vaisseaux et des fibres du xylème

Représentation schématisque des principaux facteurs de transcription impliqués dans le développement des vaisseaux et des fibres du xylème. Les mesures d'expression de gènes par qPCR sont représentées sous forme de carte des chaleurs sous chaque facteur de transcription correspondant à une surexpression (en rouge) ou une diminution (en bleu) de l'expression de gènes du mutant *swt* comparé au WT et en blanc une différence non significative. Chaque carré représente la valeur du Log2 des ratios des médianes entre le type sauvage et une lignée mutée ( $n = 4$  pour chaque génotype). Test statistique de type *t* test de Student avec  $P < 0,05$ .

### III. Discussion

#### 1. Importance du transport facilité des sucres entre les cellules de parenchyme, les fibres et les vaisseaux au cours du développement des cellules de xylème

Le développement des vaisseaux et des fibres de xylème regroupe les étapes d'accroissement cellulaire, de mort cellulaire programmée et du fort épaississement des parois secondaire (Schuetz et al., 2012). Dans la littérature, le domaine d'expression de *SWEET11* et *SWEET12* a été localisé dans les cellules de parenchyme phloémien, dans les cellules de parenchyme xylémien et dans les fibres de xylème (Chen et al., 2012, Le Hir et al., 2015). Cependant, l'analyse des lignées *pSWEET:GUS*, réalisée dans ce chapitre, a mis en évidence que la localisation des gènes *SWEETs* dans le système vasculaire de la hampe florale est en fait plus complexe que ce qui a été décrit précédemment. Ainsi, dans nos conditions de culture, *pSWEET11:GUS* est uniquement localisé dans les cellules de xylème et son domaine d'expression varie en fonction du stade de développement de la hampe florale, du type de pôle vasculaire et du type cellulaire. Il est exprimé uniquement dans quelques cellules de petite taille accolées aux vaisseaux et à la pointe du xylème et sous le bouton floral. A la base de la hampe florale, il est uniquement retrouvé dans une à deux petites cellules accolées aux vaisseaux correspondant probablement à des fibres. De plus, après une croissance dans une chambre de culture, le simple mutant *swt11* possède moins de vaisseaux par pôle de xylème et la surface occupée par un pôle est de taille réduite. Ces résultats confirment ceux précédemment publiés et qui avaient été obtenus alors que les plantes avaient été cultivées en serre (Le Hir et al., 2015). Les phénotypes observés sont donc répétables quel que soit les conditions de culture. Sur la base de ces résultats, il semblerait que l'expression de *SWEET11* dans les fibres impacte spécifiquement le développement et la croissance des vaisseaux de xylème. Ainsi les fibres agiraient en « bon voisin » (good neighbor cell hypothesis) en produisant et transportant les précurseurs aux cellules voisines. Dans la littérature, cette hypothèse a été démontrée dans le cas des échanges de monolignols, précurseurs des lignines, entre les fibres de xylème et les vaisseaux (Smith et al., 2017). Ainsi, les fibres seraient également impliquées dans la production et dans le transport de monolignols dans les vaisseaux voisins et serait également autonomes et incorporeraient leurs propres monolignols dans leurs parois secondaires (Smith et al., 2017). Un mécanisme similaire a également été mis en évidence entre les cellules de parenchyme xylémien et les vaisseaux en cours de formation (Smith et al., 2017).

Dans les travaux précédents, l'expression de *SWEET12* a été observée dans les cellules de phloème et de xylème mais aucun phénotype de développement du système vasculaire n'a été décrit (Le Hir et al., 2015). Les résultats obtenus dans ce chapitre confirment ces précédentes observations et mettent également en évidence une présence de *SWEET12* dans tous les pôles cribro-vasculaires avec une plus forte présence de *SWEET12* dans les pôles cribro-vasculaires de type-L qui assurent la connexion entre la hampe florale et la veine principale de la feuille cauline sous-jacente (Park et al., 2015). Ainsi, le nombre variable de cellules de parenchymes dans lequel s'exprime le promoteur de *SWEET12* pourrait traduire d'une variabilité des échanges de sucres en fonction du type de pôles vasculaires. Il a été montré que les cellules de parenchymes permettraient de stocker de nombreux solutés dans leurs vacuoles (McGaughey et al., 2016), de charger ou de décharger les solutés dans les cellules voisines (De Boer & Volkov, 2003), de maintenir la capacité de transport des vaisseaux de xylème (Morris et al., 2016) et de subvenir aux besoins de composés tels que l' $H_2O_2$  ou les monolignols nécessaires à la formation des lignines dans les vaisseaux adjacents (Barcelo, 2005, Smith et al., 2017). Ainsi, le transport facilité de sucres médié par *SWEET12* dans les cellules de parenchyme xylémien des pôles connectant les feuilles interrogent sur les échanges de sucres entre ces organes. A ce stade de développement, les feuilles caulines sont actives photosynthétiquement et contribuent pour une large proportion au carbone qui sera utilisé par les fleurs et les siliques (Earley et al., 2009). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que *SWEET12* participent aux processus de chargement et/ou déchargement des sucres (selon le gradient de concentration) transportés entre les feuilles caulines et la hampe florale. Cependant, son expression dans les cellules de xylème met en évidence un rôle important dans les échanges de sucres entre les cellules de parenchyme et les vaisseaux de xylème. Il a été décrit que dans un entre-nœud, les sucres, notamment le saccharose, s'accumule et est stocké dans les cellules matures dans la partie apicale de l'entre-nœud (Grof et al., 2013). Il existerait donc un gradient de sucres dans un entre-nœud (McGaughey et al., 2016). Le long de ce gradient développemental, il y a une transition entre la synthèse des parois primaires et le dépôt des parois secondaires épaissies. Le saccharose non utilisé pour la croissance est accumulé dans les cellules de parenchymes qui entourent le système vasculaire (Glasziou and Gayler, 1972 ; Hoffmann- Thoma et al., 1996 ; Rae et al., 2005) ou dans l'apoplasme (Tarpley et al., 2007). Les transporteurs plasmémiques *SWEET11* et particulièrement *SWEET12* permettraient donc de réguler les quantités de sucres entre les cellules de parenchymes xylémien, l'apoplasme et les vaisseaux ou les fibres.

Chez les arbres, il a été décrit que le diamètre de la tige peut varier de manière réversible avec les fluctuations de transpiration foliaire et le puisement de l'eau dans le sol depuis les racines (Steppe et Lemeur, 2004) mais également de manière irréversible lorsque les quantités d'eau ou de sucres nécessaires au maintien de la turgescence ou à l'incorporation dans les parois cellulaires ne sont pas réunis (Zweifel et al., 2006). La croissance radiale de la tige est donc soumise au transport de l'eau et des sucres (De Schepper et Steppe, 2010). Dans ce chapitre nous avons montré une réduction de la croissance radiale chez les simples mutants *swt11* et *swt12* ainsi que chez le double mutant *swt11swt12* suggérant que, chez *Arabidopsis thaliana*, une perturbation des échanges de sucres entraîne également un défaut dans la croissance radiale de la hampe florale. Ce défaut s'accompagne également d'une réduction de la taille des tissus et de la surface des cellules de xylème (Figure 8, Le Hir et al., 2015). Cependant cette réduction de la taille des cellules est proportionnelle à la réduction de la surface de la section de la hampe florale (Figure 8). Ce résultat pourrait suggérer que les mutations des gènes *SWEET11* et *SWEET12* entraînent également un problème de croissance globale à l'échelle de la plante. Chez le sorgho ou la canne à sucre, le volume de la hampe florale et la concentration en saccharose augmente avec la taille de la cellule (Slewinski, 2012 ; Patrick et al., 2013). Des cellules plus larges permettraient d'améliorer la force de puit en augmentant la surface d'échange disponible pour le transport de saccharose. De plus, l'augmentation du volume cellulaire permettrait d'augmenter la capacité individuelle d'accumulation de plus grandes quantités de saccharose dans les vacuoles des cellules de parenchymes et également la quantité de biomasse par la production d'une plus grande quantité de paroi ligno-cellulosique (McGaughey et al., 2016).

Il a précédemment été montré que la lignée *swt11swt12* présente un défaut de composition pariétale dans les cellules de xylème (Le Hir et al. 2015). Les analyses effectuées ici confirment ces résultats. De plus, les analyses de composition pariétale des cellules de xylème et des cellules du phloème ont mis en évidence que la mutation des gènes *SWEET11* et *SWEET12* entraîne d'une part une modification de la composition en hémicellulose dans les parois des cellules du phloème (Dinant et al., 2019), d'autre part une modification de la composition en hémicelluloses et en cellulose à l'interface entre deux vaisseaux. Malgré ces modifications de paroi, les mutants *sweet*, ne présentent pas de phénotype de collapse de vaisseaux de xylème comme décrit chez les lignées mutées dans l'expression des gènes *CesA8*, *CesA7* ou *CesA4* (Turner et Somerville, 1997) ou les mutants des gènes *FRK* (Stein et al., 2014). Les modifications observées chez le double mutant *swt11swt12* sont donc plus subtiles ne sont pas la résultante d'une modification de l'expression des gènes codant pour les facteurs de

transcription impliqués dans la régulation des gènes de la voie de biosynthèse de la cellulose, des hémicelluloses ou de la lignine. Par contre, la réduction concomitante de cellulose et d'hémicelluloses pourrait s'expliquer par le fait que les xyloglucanes et les microfibrilles de cellulose interagissent entre eux (Scheller et Ulvkvov, 2010). De plus il a été décrit que les fragments de xyloglucanes peuvent agir comme molécule signal stimulant les expansines ou d'autres protéines apoplastiques qui pourraient moduler le réseau de cellulose-xyloglucane dans les parois (McDougall et Fry, 1990). La biosynthèse de cellulose est également couplée à la biosynthèse des lignines (Weng et al., 2008). En effet, une réduction de la production des lignines est accompagnée d'une augmentation de la biosynthèse de cellulose (Chabannes et al., 2001, Li et al., 2007). A l'inverse, chez le double mutant *sweet11sweet12* on observe une réduction de cellulose et une augmentation de lignines. A présent la question est de savoir si les défauts observés sont liés au transport du saccharose, du glucose ou du fructose ou alors à d'autres précurseurs de la synthèse des polysaccharides pariétaux. Il a en effet été précédemment montré que certains transporteurs SWEET transportent également du mannose et du galactose qui sont des précurseurs de la synthèse des polysaccharides pariétaux (Chen et al., 2010). Dans ce chapitre, nous avons testé par la complémentation fonctionnelle chez la levure *EBYWV4000* (Figure 10), le transport de l'arabinose, du galactose, du mannose et du xylose par SWEET11 et SWEET12. Aucun de ces sucres n'est transporté par SWEET11 et SWEET12, suggérant que c'est effectivement une modification du transport de saccharose, de glucose et de fructose qui est à l'origine des défauts de composition de la paroi observés.

L'activité des transporteurs SWEET11 et/ou SWEET12 traduirait donc l'existence de gradient de saccharose, de glucose et de fructose entre les cellules de parenchymes de xylème, les fibres et /ou les vaisseaux et qui serait nécessaire au développement du système vasculaire et à la composition de la paroi secondaire.

## **2. Importance de l'homéostasie des sucres dans le développement des vaisseaux et des fibres de xylème**

### *2.1. Importance de SWEET17 dans la composition pariétale des vaisseaux et des fibres*

Il a été précédemment décrit que l'expression de *SWEET16* et *SWEET17* codant pour les transporteurs tonoplastiques de sucres sont tous deux localisés dans les cellules de parenchyme de xylème (Chardon et al., 2013, Klemens et al., 2013). Dans nos conditions de culture, nous



avons également montré que l'expression du promoteur de *SWEET17* est également observée dans les vaisseaux de métaxylème proche du procambium, ce qui correspondent aux vaisseaux en cours de maturation dans lesquels la vacuole est encore présente (Schuetz et al., 2013) et où l'épaississement des parois cellulaires a débuté (Hall et Ellis, 2013). L'analyse de la taille des cellules de xylème du simple mutant *sweet17* n'a révélé aucun phénotype concernant le développement du xylème. En revanche, l'analyse de la composition pariétale du simple mutant *sweet17*, du double mutant *sweet16sweet17* et du triple mutant *sweet11sweet12sweet17* ont mis en évidence l'importance du gène *SWEET17* dans la composition pariétale des fibres et des vaisseaux de xylème. Ainsi, une réduction de composés celluloseux et une augmentation de lignine dans les fibres et les vaisseaux de xylème est observée. Compte tenu du fait que *SWEET17* transporte exclusivement du fructose (Chardon et al., 2013), ces résultats mettent en évidence l'importance de l'homéostasie du fructose dans les cellules de parenchymes de xylème dans la mise en place des parois secondaires des cellules de xylème. Ces résultats sont en faveur d'un rôle des parenchymes xylémiens comme « fournisseur » de sucres pour les vaisseaux en cours de maturation. A l'inverse, l'absence d'expression du promoteur de *SWEET17* dans une zone en élancement où il n'y a pas encore d'épaississement des parois secondaires (Hall et Ellis, 2013) suggère également un rôle de *SWEET17* dans l'épaississement des parois secondaires dans les vaisseaux en cours de maturation. Sur la base de ces résultats on pourrait donc suggérer que les vaisseaux de xylème sont autonomes concernant la production de précurseurs de polysaccharides de parois dans les premières étapes de leur développement puis deviennent dépendants des cellules de parenchyme xylémien après la dégradation de la vacuole.

#### 2.2. Importance de *SWEET16* dans la division cellulaire

Le domaine d'expression de *SWEET16* a été décrit principalement dans les cellules de parenchyme xylémien de la hampe florale (Klemens et al., 2013). Dans ce Chapitre, nous avons montré que, dans nos conditions de culture, ce domaine d'expression est en fait plus large et qu'il varie en fonction du stade de développement de la hampe florale. Cependant de façon constante, l'expression de *SWEET16* a été observée dans les cellules de procambium et/ou dans les cellules précurseurs du côté du xylème. A notre connaissance, c'est le seul exemple de localisation d'un transporteur de sucres dans ce type cellulaire, bien que l'existence d'une plus forte concentration de glucose et de fructose ait été décrit dans le cambium par rapport au phloème chez le peuplier (Roach et al., 2017). La diminution du nombre total de cellules dans un pôle de xylème mesurée chez le simple mutant *swt16* est en accord avec un rôle de ce

transporteur dans le cambium. Ainsi l'homéostasie des sucres au sein des cellules du procambium serait importante afin de soutenir l'activité de division de ces cellules. Pour aller plus loin sur ce point il serait intéressant de comptabiliser le nombre de cellules procambiales par pôle de xylème mais également de d'observer le phénotype du simple mutant *swt16* au moment de la mise en place de la croissance secondaire de la hampe florale.

#### 2.3. Rôle du maintien de l'homéostasie des sucres dans la formation de la paroi secondaire

Chez le peuplier, une forte augmentation de la concentration en glucose et fructose est observée au cours de la formation de la paroi secondaire (Roach et al., 2017). Au cours de cette étape du développement des vaisseaux de xylème, un réseau complexe de facteurs de transcription est actif afin de réguler l'expression des gènes de la biosynthèse des composés pariétaux (Hussey et al., 2013). Dans ce chapitre, l'analyse du double mutant *swt16swt17* a permis de mieux comprendre le rôle de l'homéostasie des sucres au cours de cette étape. En effet, les 2 gènes sont exprimés ensemble uniquement dans les cellules de xylème au moment de la formation de la paroi secondaire. Ainsi, chez le double mutant, nous avons observé différents phénotypes qui pouvaient être la conséquence soit de la mutation dans *SWEET16* (problème de division cellulaire) soit de la mutation dans *SWEET17* (composition de la paroi). Concernant la composition de la paroi, le double mutant *swt16swt17* a un phénotype plus proche de celui du simple mutant *swt17*. De plus, le double mutant *swt16swt17* présente une dérégulation forte de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la formation de la paroi secondaire. Ainsi la déstabilisation des gradients de sucres entre le cytosol et la vacuole, médiée par l'action conjointe de *SWEET16* et *SWEET17*, engendrerait une perturbation de l'expression de ces gènes. Dans ce contexte, les sucres pourraient avoir un rôle de molécule signal comme cela a précédemment été décrit (Li et Sheen, 2016). Afin d'aller plus loin sur ce point il serait intéressant de quantifier l'expression des gènes marqueurs de la signalisation comme l'enzyme Hexokinase 1 et de la protéine G RGS1 (Trusov et al., 2016) afin d'évaluer si la signalisation des sucres est effectivement perturbée chez ce mutant.

Enfin l'analyse phénotypique du quadruple mutant a montré que globalement il présente le même phénotype que le double mutant *swt11swt12* à l'exception de la proportion de système vasculaire par rapport à la surface de la hampe florale où il présente le même phénotype que le double mutant *swt16swt17*. Ainsi, il semblerait donc que les gènes *SWEET16* et *SWEET17* soient plus importants pour le développement et la croissance des cellules de xylème que les gènes *SWEET11* et *SWEET12*.

#### IV. Conclusion et perspectives

Grâce à l'analyse des simples, doubles, triples mutant et du quadruple mutant et en se basant sur la description fine de leur domaine d'expression, nous avons pu suggérer un rôle individuel pour certains des transporteurs SWEETs. Ainsi SWEET11 aurait un rôle plus spécifique dans le transport des sucres entre les fibres et les vaisseaux en formation. Le transporteur SWEET16 aurait plutôt un rôle dans la division cellulaire des cellules de procambium et le transporteur SWEET17 serait largement impliqué dans le maintien de l'homéostasie des sucres au moment de la formation de la paroi secondaire des vaisseaux. Cependant, afin d'aller plus loin dans ces hypothèses il serait intéressant d'observer la restauration ou non de ces phénotypes dans des lignées complémentées pour l'expression de ces gènes. De plus l'utilisation de promoteur cellule-spécifique tels que ceux des gènes *PRX47* et *PRX64* codant pour des peroxydases exprimés respectivement dans les cellules de parenchyme xylémien et dans les fibres de la hampe florale (Smith et al., 2017) pourrait également être utilisés et permettre le mieux comprendre le rôle de chacun des transporteurs SWEETs dans le développement du xylème.

#### V. Publication associée

Article scientifique publié dans *Journal of Experimental Botany*

#### **Synchrotron FTIR and Raman spectroscopy provide unique spectral fingerprints for Arabidopsis floral stem vascular tissues**

S. Dinant, N. Wolff, F. De Marco, F. Vilaine, L. Gissot, E. Aubry, C. Sandt<sup>2</sup>, C. Bellini, and R. Le Hir

RESEARCH PAPER

# Synchrotron FTIR and Raman spectroscopy provide unique spectral fingerprints for *Arabidopsis* floral stem vascular tissues

S. Dinant<sup>1,\*</sup>, N. Wolff<sup>1</sup>, F. De Marco<sup>1,\*</sup>, F. Vilaine<sup>1</sup>, L. Gissot<sup>1</sup>, E. Aubry<sup>1</sup>, C. Sandt<sup>2,\*</sup>, C. Bellini<sup>1,3,\*</sup> and R. Le Hir<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France

<sup>2</sup> Synchrotron SOLEIL, Ligne SMIS, L'Orme des Merisiers, 91192 Gif sur Yvette, France

<sup>3</sup> Umeå Plant Science Centre, Department of Plant Physiology, Umeå University, 90183 Umeå, Sweden

\* Correspondence: [rozenn.le-hir@inra.fr](mailto:rozenn.le-hir@inra.fr)

Received 12 June 2018; Editorial decision 30 October 2018; Accepted 26 October 2018

Editor: Rüdiger Simon, Heinrich Heine University, Germany

## Abstract

Cell walls are highly complex structures that are modified during plant growth and development. For example, the development of phloem and xylem vascular cells, which participate in the transport of sugars and water as well as providing support, can be influenced by cell-specific wall composition. Here, we used synchrotron radiation-based Fourier-transform infrared (SR-FTIR) and Raman spectroscopy to analyse the cell wall composition of floral stem vascular tissues of wild-type *Arabidopsis* and the double-mutant *sweet11-1 sweet12-1*, which has impaired sugar transport. The SR-FTIR spectra showed that in addition to modified xylem cell wall composition, phloem cell walls in the double-mutant line were characterized by modified hemicellulose composition. Combining Raman spectroscopy with a classification and regression tree (CART) method identified combinations of Raman shifts that could distinguish xylem vessels and fibers. In addition, the disruption of the *SWEET11* and *SWEET12* genes impacted on xylem wall composition in a cell-specific manner, with changes in hemicelluloses and cellulose observed at the xylem vessel interface. These results suggest that the facilitated transport of sugars by transporters that exist between vascular parenchyma cells and conducting cells is important in ensuring correct phloem and xylem cell wall composition.

**Keywords:** *Arabidopsis*, CART method, cell wall, floral stem, FTIR, multivariate analysis, phloem, Raman spectroscopy, synchrotron radiation, xylem.

## Introduction

The presence of a polysaccharide-rich frame is an important feature of plant cells. The primary cell wall, composed mainly of insoluble (cellulose and hemicelluloses) and soluble polysaccharides (pectins), is deposited when plant cells are growing. Once the cells stop growing, the primary cell wall is reinforced by a secondary cell wall (SCW), which is composed mainly of cellulose, hemicelluloses, and lignin. To facilitate their specialized function in structural support and water transportation, the xylem vessels and fibers have a relatively thick SCW.

Production of the SCW in plant cells is of interest because it constitutes the major component of plant biomass and it has the potential to be used as a raw material for food, clothing, and energy. The model plant *Arabidopsis thaliana* can be used to study the SCW in cells of vascular bundles within the floral stem (Strabala and MacMillan, 2013). Anatomically, the vascular bundles are composed of phloem and xylem tissues and represent a central hub through which most biological compounds are transmitted to their site of use. Phloem tissue—composed

of phloem parenchyma cells, companion cells, and sieve elements (SEs)—is involved in the transport of multiple compounds such as sugars, amino acids, proteins, and mRNA (Le Hir *et al.*, 2008; Zhang and Turgeon, 2018). A thickening of the phloem SE cell wall has been reported in Arabidopsis, and it has been suggested that this cell wall is composed of pectic polysaccharides (Freshour *et al.*, 1996). On the other hand, mature xylem tissue—responsible for structural support as well as the transportation of water and solutes—is composed of xylem tracheary elements (xylem vessels), xylary fibers, and xylem parenchyma cells (Schuetz *et al.*, 2013), and is characterized by the presence of thick SCWs. Recent studies have used high-throughput immunolabelling of the major cell-wall glycan epitopes to group floral stem tissues according to their cell wall composition, and the results have revealed a tissue-specific pattern for these glycans (Hall *et al.*, 2013). However, we still lack detailed information about cell wall composition at the cellular level. Among the tools that can provide spatial resolution at such a level, approaches utilizing vibrational microspectroscopy possess several strong advantages.

Vibrational spectroscopy techniques, for example Fourier-transformed infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy, have been used extensively in plant research to determine the cell wall composition in an organ-specific manner (Largo-Gosens *et al.*, 2014). These complementary techniques offer many advantages, among which are good spatial resolution, non-destruction of the samples, and good cost efficiency. They are also state-of-art techniques for studying the plant lignocellulosic biomass (i.e. biosynthesis, degradation, and valorization), which is of increasing interest due to its important roles for humans and animals (i.e. food, energy, clothing, building material) (Gierlinger, 2018). Classically, FTIR microspectroscopy uses a thermal source to identify differences in the cell wall composition between wild-types and mutants of various plant species with a spatial resolution of approximately 30–50  $\mu\text{m}$  (Sibout *et al.*, 2005; Lefebvre *et al.*, 2011; Le Hir *et al.*, 2015). The coupling of a focal-plane array (FPA) detector to a conventional FTIR microscope allows researchers to obtain structural information at the cellular level (Gorzás *et al.*, 2011; Öhman *et al.*, 2013). Another powerful modification is the use of a synchrotron radiation-based source (SR-FTIR), which enables the collection of IR spectra at higher spatial resolution (i.e. cellular level) by use of light that is at least 100 times brighter than that of a thermal source. However, this technique has seen limited use in the field of plant biology (Vijayan *et al.*, 2015). In addition to FTIR, Raman microspectroscopy is also commonly used to study plant cell wall composition (Gierlinger *et al.*, 2012; Gierlinger, 2018), including that of xylem cell types, for example in Arabidopsis (Prats Mateu *et al.*, 2016), *Cucumis sativus* (Zeise *et al.*, 2018), *Malus* sp. (Horbens *et al.*, 2014), *Populus* sp. (De Meester *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2018), *Picea* sp. (Agarwal, 2006; Hänninen *et al.*, 2011), and *Pinus* sp. (Hänninen *et al.*, 2011). To a lesser extent, the combined use of both techniques (i.e. FTIR and Raman microspectroscopy) has been shown to be efficient and complementary in studying the xylem cell wall composition in tree species such as poplar (Özparpucu *et al.*, 2017, 2018) and *Pinus radiata* (Zhang *et al.*, 2017).

Only a few studies have investigated the composition of cell walls in the floral stem of the plant model species Arabidopsis (Schmidt *et al.*, 2010; Prats Mateu *et al.*, 2016) despite the important physiological role of this organ. The floral stem, which supports the flowers and the fruit, is also a major contributor to lifetime carbon gain (Earley *et al.*, 2009), representing 40% of a plant's total biomass. The precise characterization of the cell wall composition of different vascular cell types within the floral stem is necessary to better understand cell wall complexity within such tissues.

In addition to the identification of differences in plant cell wall composition at the tissue and cell levels, there are many unanswered questions regarding the modalities of sugar allocation, which directly influence the supply of carbohydrate skeletons required for SCW formation. We have previously focused on identifying the carbohydrate components underlying xylem SCW formation in Arabidopsis. By using conventional FTIR microspectroscopy, we have identified cell wall modifications in the xylem of an Arabidopsis double-mutant that is defective in the expression of the genes encoding the sugar facilitators *SWEET11* and *SWEET12* (Le Hir *et al.*, 2015). Both genes encode proteins that transport sugars (sucrose, glucose, or fructose) along the concentration gradient (Chen *et al.*, 2012; Le Hir *et al.*, 2015) and, as such, their disruption modifies cellulose and xylan acetylation in xylem cell walls within the floral stem (Le Hir *et al.*, 2015). In the latter study, the FTIR spectra were acquired over a  $30 \times 30\text{-}\mu\text{m}$  target zone that encompassed different cell types. Moreover, the use of conventional FTIR on 'dry-fixed' floral stem sections did not allow the acquisition of spectra describing the phloem tissue due to complete shrinkage of this tissue when the floral stem section is dry. As *SWEET11* and *SWEET12* are expressed in both the phloem and xylem, spectral data at the cellular level are needed to better understand how modifications of sugar homeostasis influence the cell wall composition of various cell types (Chen *et al.*, 2012; Le Hir *et al.*, 2015).

In the present work, we used SR-FTIR and Raman microspectroscopy in combination with a classification and regression tree (CART)-based method to analyse spectra collected for phloem and xylem tissues from Arabidopsis floral stem sections of wild-type and *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant plants. Overall, we show that SR-FTIR can be used successfully to analyse spectra acquired from phloem tissue, and that changes in *SWEET11* and *SWEET12* expression affect phloem cell wall composition. In addition, the application of the CART method on Raman spectra shows that xylem vessels and fibers can be distinguished by a combination of cellulose and hemicellulose Raman shifts. Finally, our results suggest that facilitated sugar transport modifications in xylem parenchyma cells lead to cell-specific defects.

## Materials and methods

### *Plant material and growth conditions*

Arabidopsis wild-type Col-0 and *sweet11-1 sweet12-1* (Le Hir *et al.*, 2015) double-mutant were grown in soil in a greenhouse for 5 weeks under long-day conditions (16-h photoperiod and  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity) at 22/15 °C (day/night) with 65% relative humidity. After 5 weeks of growth, the mean floral stem height was 25 cm for both genotypes. The



first 5 cm of the basal part of the floral stems were collected, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections with a thickness of 10  $\mu\text{m}$  were deposited onto BaF<sub>2</sub> windows and paraffin was removed using Histo-Clear (National Diagnostics, Atlanta, GA). For SR-FTIR and RAMAN spectroscopy, four xylem/phloem poles from four plants representing each genotype were analysed. Spectra were acquired on fully developed xylem vessels and fibers localized in the middle of the vascular bundle. The experimental scheme is summarized in Fig. 1.

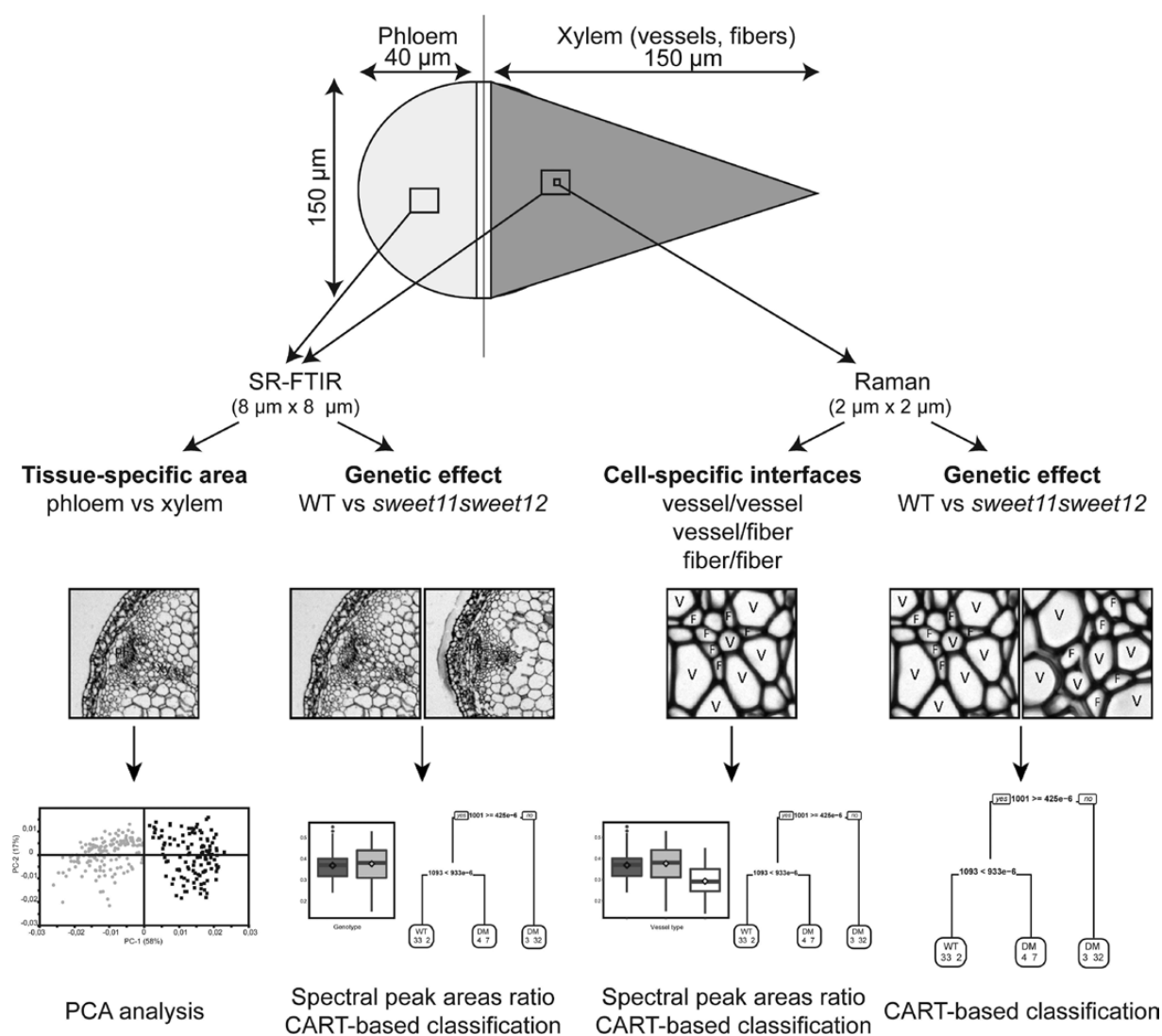
#### Synchrotron radiation-based FTIR microspectroscopy (SR-FTIR)

Infrared spectra were recorded with a synchrotron source to provide better spatial resolution due to superior brightness (SOLEIL, SMIS beamline, Gif sur Yvette, France). The transmission spectra were collected on a NICOLET 5700 FT-IR spectrometer coupled to a Continuum XL microscope (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) equipped with a 32 $\times$  NA 0.65 objective as described in Guillon *et al.* (2011). All spectra were obtained in confocal mode to eliminate diffraction from surrounding cells using a double-path single-masking aperture size of 8  $\times$  8  $\mu\text{m}$

(Supplementary Fig. S1B at JXB online). The spectra were collected over the 1800–800  $\text{cm}^{-1}$  infrared range at a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  with 256 co-added scans for the background and sample spectra.

#### Raman microspectroscopy

The Raman spectra were recorded using a DXR Raman Instrument (ThermoFisher Scientific). Raman measurements were performed in a closed environment using a stabilized 532 nm laser as described in Zimmermann *et al.* (2015). A 100 $\times$  NA 0.90 objective was used for focusing and collecting inelastically scattered Raman light, and allowed a spatial resolution of 2  $\times$  2  $\mu\text{m}$  to be obtained (Supplementary Fig. S1C). The acquisition points were set as the cell walls between xylem vessels (VV), between xylem vessels and fibers (VF), and between xylem fibers (FF). In total, the cell walls of 92 vessels and 126 fibers were analysed in the floral stems of the wild-type while the cell walls of 115 vessels and 123 fibers were analysed in the double-mutant line. The system was operated in 25  $\mu\text{m}$  aperture mode, which provided a spectral resolution of 2–4  $\text{cm}^{-1}$ . In order to decrease xylem cell wall autofluorescence, the



**Fig. 1.** Workflow for the analysis of the Arabidopsis floral stem vascular system by synchrotron radiation-based Fourier-transformed infrared spectroscopy (SR-FTIR) and Raman spectroscopy. Schematic representation of a floral stem vascular bundle showing the phloem and the xylem and the size of the acquisition zone for the analysis. SR-FTIR was used to obtain tissue-specific signatures by PCA analysis of the spectra acquired on phloem and xylem cell walls of the wild-type (WT) plants. In addition, the genetic effect was assessed using SR-FTIR by analysing spectra from the WT and the double-mutant with spectral peak areas ratios and classification and regression tree (CART)-based classification. Raman microspectroscopy was then used to obtain cell-specific interface signatures of the different xylem cell types and to assess the genetic effect in the double-mutant by spectral peak area ratios and CART-based classification. F, fiber; Ph, phloem; V, vessel; Xy, xylem.

samples were photobleached for 2 min before each acquisition. Sample spectra were acquired over an exposure time of  $6 \times 10$  s using 512 scans (the same number of scans were also performed for the background).

#### Preprocessing of SR-FTIR and Raman spectra

Infrared spectra with extreme absorbance values (i.e. values less than 0.1 or above 1) were removed from the datasets so that saturation effects and errors due to holes in the tissue sections could be avoided. Comparisons between tissues or genotypes were performed on baseline-corrected and area-normalized spectra. For Raman microspectroscopy, the spectra of different xylem cell types were smoothed by the Savitsky–Golay algorithm (3rd order polynomial and nine-point filter). The spectra were then baseline-corrected by subtracting a linear baseline between 350–3500  $\text{cm}^{-1}$  and area-normalized. Both SR-FTIR and Raman spectra were preprocessed using the Unscrambler software (The Unscrambler, CAMO Process AS, Oslo, Norway).

#### Univariate analysis of the SR-FTIR and Raman spectra

Peak area measurements were performed on baseline-corrected and area-normalized FTIR spectra in the OMNIC 9.2.41 and TQ Analyst EZ 9.2.34 software (ThermoFisher Scientific). In both cases, the baseline between the peak start and end marker was computer generated. The following peaks were measured for the SR-FTIR spectra: 930–1180  $\text{cm}^{-1}$  for cellulose; 1695–1770  $\text{cm}^{-1}$  for hemicellulose; and 1475–1520  $\text{cm}^{-1}$  for lignin. Average spectra and boxplot representations were generated in R software ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) using the HyperSpec and Ggplot2 packages, respectively (<http://hyperspec.r-forge.r-project.org/>; Wickham, 2009). Peak areas and their ratios were first checked for normality (Shapiro–Wilk test) and homoscedasticity (Levene test). Since neither of these criteria were fulfilled, an approximate (Monte Carlo) Fisher–Pitman permutation test was performed (non-parametric one-way ANOVA). Then, a pairwise comparison test, including the calculation of an adjusted *P*-value by the False Discovery Rate (FDR) method, was applied to assess the significance of observed differences. Statistical analysis was performed using the ‘coin’, and ‘RVAideMemoire’ packages (Hothorn *et al.*, 2008; <https://cran.r-project.org/web/packages/RVAideMemoire/>) in R software.

#### Multivariate statistical analyses of SR-FTIR and Raman spectra

Preprocessed and mean-centered spectra were first subjected to principal component analysis (PCA), which was carried out with three to seven principal components (PC) using the NIPALS algorithm, and full cross-validation was applied. Outliers identified using the Hotelling T2 method (95% multivariate confidence interval) and the residual versus leverage plot were removed from the dataset. Since the SR-FTIR and Raman techniques produce large dataset and variables are highly correlated, a variable selection algorithm (CovSel) was applied prior to the classification and regression tree (CART) technique. The CovSel algorithm enables variable selection based on global covariance across all the responses (Roger *et al.*, 2011). In addition, the CART technique can be used to select the variables that are most important in discriminating two factors (Berk, 2016). The CART models were built using the ChemFlow interface within Galaxy (<https://chemproject.org/wakka.php?wiki=ChemFlow>). In order to obtain models taking into account the variability among the cell wall compositions, we choose not to modify the default parameters even if the CART models could be improved by removing variables, forcing splits and splitting on linear combinations of variables (Vayssières *et al.*, 2000). The CART-based model was first set up on a calibration dataset (representing 80% of the total spectra) and then validated on a validation dataset (representing 20% of the total spectra). A confusion table was then produced to validate the model. Model performance was evaluated using the following parameters:

$$\text{Accuracy} = \frac{\sum(\text{true positive} + \text{true negative})}{\sum \text{total population}}$$

$$\text{specificity} = \frac{\sum \text{true positive}}{\sum(\text{true positive} + \text{false negative})}$$

$$\text{sensitivity} = \frac{\sum \text{true negative}}{\sum(\text{true negative} + \text{false positive})}$$

$$\text{predictive positive value} = \frac{\sum \text{true positive}}{\sum(\text{true positive} + \text{false positive})}$$

$$\text{and negative predictive value} = \frac{\sum \text{true negative}}{\sum(\text{true negative} + \text{false negative})}$$

In the comparison of the two genotypes, the true positive and true negative represent the number of wild-type or *sweet11-1 sweet12-1* spectra that were correctly classified by the model. The false positive and false negative represent the number of wild-type or *sweet11-1 sweet12-1* spectra that were incorrectly classified by the mode.

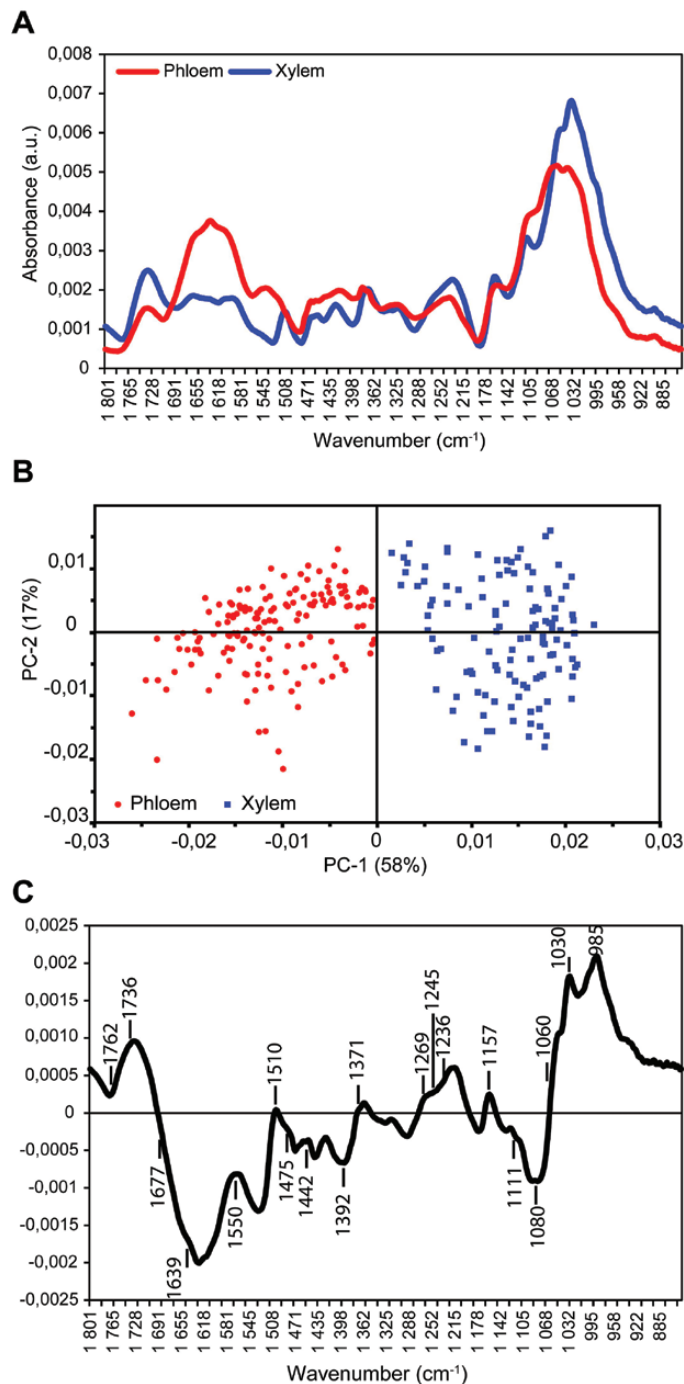
## Results and discussion

### SR-FTIR allows the identification of unique spectral fingerprints for the floral stem vascular tissues

In the Arabidopsis floral stem, vascular tissues are organized as a series of bundles that are connected by the interfascicular cambium (Supplementary Fig. S1A). In each bundle, specialized conducting cells are subjected to high pressures as the facilitate sap flow, with hydrostatic pressure reaching upwards of 30 atmospheres in the sieve elements (Sjölund, 1997) while the xylem vessels are characterized by negative pressure. Cell-specific cell wall composition is a crucial part of conferring resistance to such pressure. A majority of previous research has focused on determining xylem cell wall composition, while phloem tissue has received limited attention.

By harnessing the spatial resolution provided by synchrotron light ( $8 \times 8 \mu\text{m}$  acquisition zone), we acquired spectra for phloem and xylem tissues of the Arabidopsis wild-type floral stem (Fig. 1 and Supplementary S1A). The spectra were baseline-corrected, area-normalized, and the mean spectrum for each tissue was calculated and plotted (Fig. 2A). Principal component analysis (PCA) was used to identify potential spectral fingerprints of the vascular tissues, with the first two components explaining 54% and 8% of the total variance (Fig. 2B). Component 1 clearly discriminated the phloem and xylem IR spectra. The loading plot of PC1 revealed that the xylem cell walls were characterized by a set of bands corresponding to guaiacyl ring breathing with carbonyl stretching (1269  $\text{cm}^{-1}$ ) (Kubo and Kadla, 2005), –C–H– deformation in the guaiacyl ring with –C–O– deformation in the primary alcohol (1030  $\text{cm}^{-1}$ ) (Kubo and Kadla, 2005), and –C–C– linkage of G-condensed units (1060  $\text{cm}^{-1}$ ). This suggested that the xylem cell walls were mainly composed of G-type lignin (Fig. 2C and Table 1), and this was in agreement with previous observations from Arabidopsis that showed that G-type lignin is responsible for the extra-thickening of the xylem vessel cell wall





**Fig. 2.** Principal component analysis (PCA) of infrared spectra obtained from phloem and xylem cells of Arabidopsis wild-type floral stems. (A) Average spectra for wild-type phloem and xylem tissues obtained by synchrotron radiation-based Fourier-transformed infrared spectroscopy (SR-FITR) microscopy. Spectra were baseline-corrected and area-normalized in the range of 1800–850  $\text{cm}^{-1}$ . (B) Comparison of phloem and xylem cell wall composition by multivariate analysis. Spectra from xylem and phloem cell walls are compared based on PC1 and PC2 from the PCA, and the plot shows that the cell wall spectral signatures can be differentiated. (C) The corresponding loading plot of the PC1 axis.

(Schuetz *et al.*, 2013). In addition, the loading plot highlighted several wavenumbers (1045, 1369, 1230–1235, 1743, 1245, 1735–1740  $\text{cm}^{-1}$ ) that are related to hemicellulose enrichment in xylem cell walls, as has been previously reported for the

Arabidopsis floral stem (Table 1; Sibout *et al.*, 2005; Öhman *et al.*, 2013). However, some of these bands may partly overlap with the lignin bands (1236, 1371 and 1736  $\text{cm}^{-1}$ ) (Faix, 1991; Özpapurcu *et al.*, 2018).

Interestingly, wavenumbers associated with pectic polysaccharides (1245 and 1762  $\text{cm}^{-1}$ ) were also found to be more descriptive of the xylem than of the phloem cell walls (Fig. 2C and Table 1), even though pectins are not an abundant component of SCWs. However, pectin methylesterification appears to be a prerequisite for the lignin modification that occurs during SCW deposition in xylem cells (Pelloux *et al.*, 2007). In addition, several Arabidopsis mutants that are deficient in various pectins have been shown to present defects in SCW formation (Persson *et al.*, 2007; Lefebvre *et al.*, 2011).

With respect to the phloem cell wall composition, the loading plot of PC1 showed numerous wavenumbers related to pectic polysaccharides, cellulose, and hemicelluloses (Fig. 2C and Table 1). For instance, the bands at 1639  $\text{cm}^{-1}$  and 1677  $\text{cm}^{-1}$  are characteristic of the  $-\text{COOH}-$  group of acidic pectins present in the primary cell wall (Mouille *et al.*, 2006), while wavenumbers at 1111, 1157, and 1550  $\text{cm}^{-1}$  describe cellulose polymers (Table 1). In addition, wavenumbers at 1442  $\text{cm}^{-1}$  and 1475  $\text{cm}^{-1}$  were unique for phloem cell walls. The 1442  $\text{cm}^{-1}$  band has been previously reported to describe the hypocotyl primary cell wall of a cellulose-deficient mutant, but the functional group that it represents still needs to be verified (Mouille *et al.*, 2003). Overall, these results suggested that the cell wall composition of phloem tissue, including phloem parenchyma cells, companion cells, and sieve elements, is more closely related to primary cell wall composition even though cell wall thickening is commonly observed in sieve elements (Esau and Cheadle, 1958). The nature of this thickening has not yet been completely clarified, but the current evidence favors a pectin-based composition (Freshour *et al.*, 1996; Torode *et al.*, 2018). The marker IR bands we identified in our tissue samples support these findings. Based on the role of SEs in transporting phloem sap, it was initially surprising that pectins, which have been traditionally related to cellular expansion, can be found in a tissue that experiences high pressure during sap flow. The recent characterization of an antibody against branched pectic galactan that specifically binds to the cell walls of SEs has led to the suggestion that the role of pectin in these cell walls could be the maintenance of elastic properties required for withstanding high turgor pressure (Torode *et al.*, 2018). In addition, the application of atomic force microscopy (AFM) has shown that the mechanical properties of phloem SE cell walls differ from those of cells from the surrounding tissue and display a higher elasticity (Johnson, 2018; Torode *et al.*, 2018). The recent development of nano-IR techniques that combine AFM and synchrotron IR light (Pereira *et al.*, 2018) will provide further possibilities for exploring the cell wall heterogeneity that exists among different vascular cell types. Furthermore, the implementation of microfluidic infrared spectroscopy to study plant samples in a liquid environment represents important progress (Devaux *et al.*, 2018), especially in studying plant tissues that are no longer accessible after the dehydration process that is usually required for IR analysis, such as the phloem tissue.

**Table 1.** Assignment of the infrared wavenumbers found to differentiate xylem and phloem tissues of the wild-type *Arabidopsis floral stem*

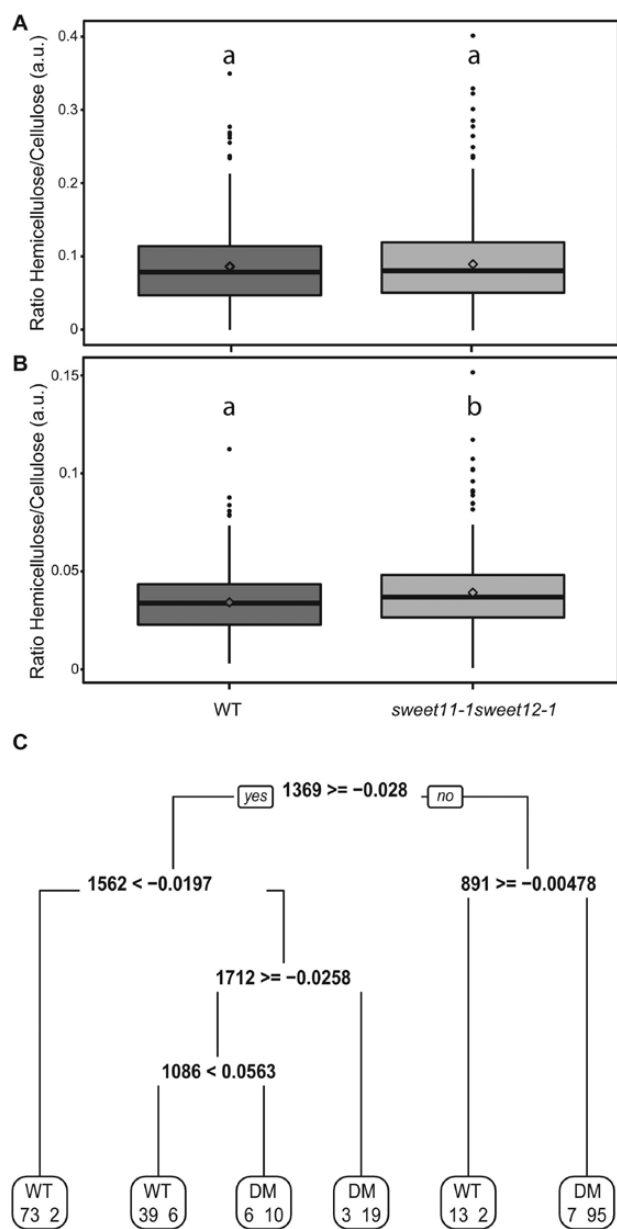
Tissue	FTIR wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Assignment	Polymer	
Xylem	1510	G-type lignin (Faix, 1991)	Lignin	
	1595	G-type lignin (Faix, 1991)	Lignin	
	1269	Guaiacyl ring breathing with carbonyl stretching (Kubo and Kadla, 2005)	Lignin	
	1030	C-H deformation in guaiacyl with C-O deformation in the primary alcohol (Kubo and Kadla, 2005)	Lignin	
	1060	C-C linkage of G condensed unit (Sibout <i>et al.</i> , 2005)	Lignin	
	1045	C-O-C contribution of xylan (Brown <i>et al.</i> , 2009)	Hemicellulose	
	1369	Deformation of the C-H linkages in the methyl group of O-acetyl moieties (Mohebbi, 2010)	Hemicellulose	
	1230–1235	C=O/C-O linkages stretching vibrations (Mohebbi, 2010)	Hemicellulose	
	1743	Stretching of the free carbonyl group (Owen and Thomas, 1989)	Hemicellulose	
	1245	C-O stretch (Faix, 1991)	Hemicellulose	
	1735–1740	C=O stretching in glucuronic acid (xylan) (Marchessault, 1962; Marchessault and Liang, 1962)	Hemicellulose	
	1762	Esterified pectins (Kačuráková <i>et al.</i> , 2002)	Pectins	
	Phloem	1639	COOH group (Mouille <i>et al.</i> , 2006)	Acidic pectins
		1677	COOH group (Mouille <i>et al.</i> , 2006)	Acidic pectins
1157		C-O-C linkages of cellulose (Kačuráková <i>et al.</i> , 2002)	Cellulose	
1442		To be assigned (Mouille <i>et al.</i> , 2003)	Related to primary cell wall	
1111		In plane ring stretching (Bekiaris <i>et al.</i> , 2015)	Cellulose	
1712		C=O stretch (Kačuráková <i>et al.</i> , 2002)	Pectins	
978		Xylan-type polysaccharides (Brown <i>et al.</i> , 2005)	Hemicellulose	
958		Sugar ring vibrations (Kačuráková <i>et al.</i> , 2002)	Pectins	
1475		To be assigned	To be assigned	
1550		Carboxylates (Mouille <i>et al.</i> , 2006)	Cellulose	
1774		To be assigned	Esterified pectins	

### Phloem cell wall composition is impaired in the double-mutant *sweet11-1 sweet12-1*

In addition to its presence in the xylem, *SWEET11* and *SWEET12* expression has also been detected in phloem tissue, with the signal arising from the phloem parenchyma cells (Chen *et al.*, 2012; Le Hir *et al.*, 2015). Using conventional FTIR, we previously showed that the double-mutant *sweet11-1 sweet12-1* has defects in xylem SCW composition (Le Hir *et al.*, 2015); however, the spatial resolution did not allow us to analyse the walls of small phloem cells. In this present study, we took advantage of the higher spatial resolution provided by SR-FTIR to determine whether we could confirm the modifications previously observed in the xylem cell walls and whether it was possible to analyse the walls of the phloem cells. Thus, phloem and xylem IR spectra were recorded from the floral stem of the *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant and compared to spectra acquired from the wild-type (Fig. 1). The mean spectra for wild-type and double-mutant tissues were compared after baseline-correction and area-normalization over the 1800–850 cm<sup>-1</sup> range (Supplementary Fig. S2A, E). Next, the areas under the cellulose (C–O and C–C stretching) (930–1180 cm<sup>-1</sup>), the hemicellulose (1695–1770 cm<sup>-1</sup>), and/or lignin (1475–1520 cm<sup>-1</sup>) peaks, together with their respective ratios, were measured (Fig. 3, Supplementary Fig. S2B–D, F, G). A significant decrease in the lignin peak area of the xylem tissue was measured between the genotypes (Supplementary Fig. S2D), while significant increases in the cellulose and the hemicelluloses peak areas were observed in xylem cell walls in the double-mutant compared to the wild-type (Supplementary Fig. S2B, C). The phloem tissue analysis showed

that there was no significant difference in cellulose between the two genotypes (Supplementary Fig. S2F), while the peak area for hemicelluloses in the double-mutant was significantly greater than that of the wild-type (Supplementary Fig. S2G). More precisely, while the xylem cell walls of both genotypes showed similar cellulose/hemicellulose ratios (Fig. 3A), the phloem cell walls of the double-mutant demonstrated a disequilibrium in the ratio (Fig. 3B). Thus, the results showed that in addition to affecting xylem cell wall composition, mutations in both the *SWEET11* and *SWEET12* genes also affected the phloem cell wall composition. Whilst additional experiments need to be performed to strengthen this conclusion, our results are enough to suggest that these mutations seem to only affect the hemicellulose composition of phloem cell walls.

In order to further identify wavenumbers that could be specifically associated with the *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant, we applied a CART analysis procedure. For this, our original dataset was split into calibration (80% of the total dataset) and validation (20% of the total dataset) datasets, after which the CovSel algorithm was applied to the calibration dataset to identify the 10 wavenumbers with maximum covariance (Roger *et al.*, 2011). The CART tree resulting from the analysis showed that, out of the 10 selected, only five IR wavenumbers—at 891, 1086, 1369, 1562, and 1712 cm<sup>-1</sup>—could be used to distinguish between the wild-type and *sweet11-1 sweet12-1* phloem spectra (Fig. 3C). To evaluate the performance of this analysis, the CART model obtained from the calibration dataset was used as an input and applied on the validation dataset. The results for both genotypes for the model calibration (after 10-fold cross-validation) and validation datasets are summarized in Table 2.



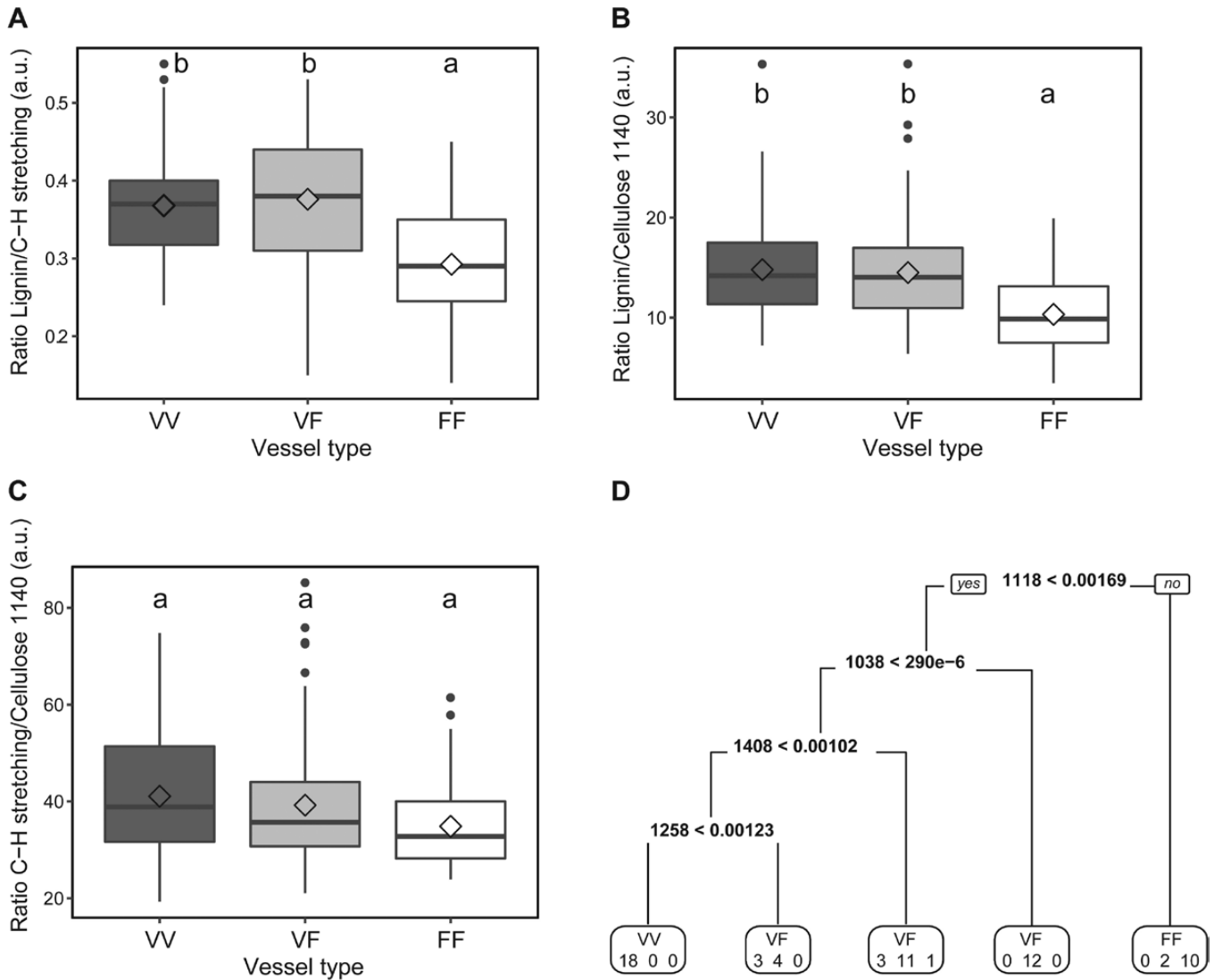
**Fig. 3.** Comparative analysis of synchrotron radiation-based Fourier-transformed infrared spectroscopy (SR-FTIR) spectra for xylem and phloem of Arabidopsis wild-type (WT) and the *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant (DM). Box-plot representation of the hemicellulose/cellulose ratio of (A) the xylem and (B) the phloem spectra. For the xylem, the box-and-whisker plots represent values from 521 and 494 individual spectra of WT and *sweet11-1 sweet12-1* plants, respectively. For the phloem, the plots represent values from 314 and 311 individual spectra of WT and *sweet11-1 sweet12-1* plants, respectively. The diamonds represent mean values, lines represent median values, the tops and bottoms of the boxes represent the first and third quartiles, respectively, and the ends of the whiskers represent maximum and minimum data points. Black dots are outliers. Different letters indicate significant differences as determined by an approximate Fisher–Pitman permutation test and a pairwise comparison test ( $P < 0.05$ ). a.u., arbitrary unit. (C) Classification tree as generated by the classification and regression tree (CART) method after 10-fold cross-validation of the calibration dataset model, which was built using the 850–1800  $\text{cm}^{-1}$  range of phloem spectra. The binary classification tree is composed of five classifiers and six terminal subgroups. The decision-making process involves the evaluation of if-then rules of each node from top to bottom, which eventually reaches a terminal node with the designated class outcome. The numbers in each terminal subgroup represent numbers of either WT or DM spectra.

**Table 2.** Classification results for using FTIR wavenumbers to predict which genotype a phloem tissue sample represents, with the model calibration dataset (80% of total dataset) using a 10-fold cross-validation method, and the validation dataset (20% of total dataset) using a CART-based algorithm

Calibration model (after 10-fold cross-validation)	Prediction		Accuracy 90.5%
	Wild-type	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	
Wild-type	125	10	PPV 92.6%
<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	16	124	NPV 88.6%
	Sensitivity	Specificity	
	88.6%	92.5%	
Validation model	Prediction		Accuracy 80.9%
	wild-type	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	
Wild-type	24	8	PPV 75%
<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	5	31	NPV 86.1%
	Sensitivity	Specificity	
	82.7%	79.5%	

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

When applied on the calibration dataset, the CART model correctly classified 88.6% of the wild-type spectra (specificity) and 92.5% (sensitivity) of the double-mutant spectra. When applied on the validation dataset, the model correctly classified 82.7% (specificity) and 79.5% (sensitivity) of the wild-type and double-mutant spectra, respectively. Moreover, the predictive positive value (PPV) of the validation model was calculated to be 75%, which meant that most of the identified wild-type spectra were not false positives (Table 2), whilst the negative predictive value (NPV) of the model was determined to be 86.1%, which meant that a majority of the identified *sweet11-1 sweet12-1* spectra were not false positives (Table 2). Overall, the CART model was able to accurately predict 80.8% of the spectra present in the validation dataset (Table 2). Thus, the CART model produced using the calibration dataset could discriminate between the genotypes based only on the analysis of five major FTIR wavenumbers. Among these marker wavenumbers, the one at 891  $\text{cm}^{-1}$  can be linked to the cellulose fingerprint region (Kačuráková *et al.*, 2002) while the 1086  $\text{cm}^{-1}$  and 1369  $\text{cm}^{-1}$  wavenumbers can be assigned to hemicelluloses (Robin *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005). In addition, the 1712  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber could be related to carboxylic acid residues found in polygalacturonic acid (Pawar *et al.*, 2013). The remaining wavenumber, 1562  $\text{cm}^{-1}$ , still needs to be assigned to a cell wall compound. Interestingly, using conventional FTIR technique, we previously found that the 1369  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber can differentiate wild-type xylem cell walls from those of the *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant (Le Hir *et al.*, 2015). This wavenumber is related to the deformation of C–H linkages in the methyl group of O-acetyl moieties and could thus represent differences in xylan acetylation (Mohebbi, 2010). Therefore, the present results suggest that modifications in sugar homeostasis in plant vascular tissues predominantly



**Fig. 4.** Raman spectra analysis of the different xylem cell types in *Arabidopsis* wild-type plants. (A–C) Box-plots of (A) the lignin/C-H stretching band ratio, (B) the lignin/C-O and C-C bond stretching ratio, and (C) the C-H stretching band/C-O and C-C bond stretching ratio in secondary cell walls between different xylem cell types. The box-and-whisker plots represent values from 51, 139, and 119 individual spectra of cell walls between vessel–vessel (VV), vessel–fiber (VF), and fiber–fiber (FF), respectively. The diamonds represent mean values, lines represent median values, the tops and bottoms of the boxes represent the first and third quartiles, respectively, and the ends of the whiskers represent maximum and minimum data points. Black dots are outliers. Different letters above the boxes indicate significant differences as determined by an approximate Fisher–Pitman permutation test and a pairwise comparison test ( $P < 0.05$ ). a.u., arbitrary unit. (D) Classification tree as generated by the classification and regression tree (CART) method after 10-fold cross-validation of the calibration dataset model, which was built using the 1000–1800  $\text{cm}^{-1}$  range from the Raman spectra of different xylem cell types. The binary classification tree is composed of four classifiers and five terminal subgroups. The decision-making process involves the evaluation of if-then rules of each node from top to bottom, which eventually reaches a terminal node with the designated class outcome. The numbers in each terminal subgroup stand for the number of VV, VF, or FF spectra.

influence the cellulose and/or xylan composition of cell walls regardless of cell type.

We have previously postulated that the maintenance of sugar homeostasis among the xylem parenchyma cells and xylem vessels/fibers influences the production of a normal cell wall (Le Hir *et al.*, 2015). Here, we showed that it also constitutes a limiting step for the formation of phloem cell walls. Since *SWEET11* and *SWEET12* are expressed in the phloem and xylem parenchyma cells and participate in sugar influx or efflux across the plasma membrane (Chen *et al.*, 2012; Le Hir *et al.*, 2015), our data suggest that *SWEET11* and *SWEET12* might also be important for cell wall formation in vascular parenchyma cells. Interestingly, recent research has found vascular

parenchyma cells to be crucial in the supply of monolignols to developing xylem vessels (Smith *et al.*, 2017). Therefore, it can be postulated that movement of sugar (sucrose and/or hexoses) across a gradient, mediated by *SWEET11* and/or *SWEET12*, could also occur between vascular parenchyma cells and other developing vascular cells to drive cell wall formation.

*Identification of new Raman shift markers that describe the composition of cell walls between different xylem cell types in the wild-type Arabidopsis floral stem*

Xylem SCW formation constitutes a large pool of the total biomass of the plant. For instance, the xylem vessels and fibers



are surrounded by a thick SCW that is 80% cellulose and hemicelluloses and 20% lignin (Marriott *et al.*, 2016). When the Arabidopsis floral stem is considered at the cellular level, xylem vessels and fibers demonstrate heterogeneous cell wall composition due to differences in the lignin monomer(s) with which the cell wall is enriched (Schuetz *et al.*, 2013). Unfortunately, we still lack a complete description of the polysaccharide composition of xylem vessel and fiber cell walls. We took advantage of the spatial resolution provided by Raman microspectroscopy to precisely characterize the composition of cell walls between xylem vessels (VV), between xylem vessels and xylem fibers (VF), and between xylem fibers (FF) in the Arabidopsis wild-type floral stem (Figs 1, 4, Supplementary Figs S1C, S3).

The mean Raman spectra for the various xylem cell types showed that fiber cell wall composition differed in comparison to that of the other two cell types (Supplementary Fig. S3A). To test whether these differences were statistically significant, we calculated ratios of spectral peaks areas from already-known Raman shift markers, namely from 2775 to 3125  $\text{cm}^{-1}$  (the composite C-H stretching bands comprising cellulose and hemicelluloses), from 1550 to 1700  $\text{cm}^{-1}$  (lignin Raman shift), and from 1080 to 1140  $\text{cm}^{-1}$  (C-O and C-C bond stretches of cellulose) (Schmidt *et al.*, 2010; Agarwal, 2014) (Fig. 4). Based on these measurements, the VV and VF cell walls in wild-type Arabidopsis plants could not be distinguished statistically (Fig. 4A–C). However, the ratio of lignin to C-H bonds as well as the ratio of lignin to C-O bonds could significantly discriminate the cell walls between xylem fibers (FF) from those between xylem vessels (VV) and xylem vessels and fibers (VF) (Fig. 4A, B). There were no significant differences in the ratio of C-H bonds to C-O bonds between the cell types (Fig. 4C). Therefore, the observed differences between cell walls between VV, VF, and FF could mainly be attributed to a lower intensity of the aromatic stretching vibration (1598  $\text{cm}^{-1}$ ) in the cell walls between xylem fibers (Supplementary Fig. S3A) (Özparpucu *et al.*, 2017).

To further identify Raman shifts associated with different xylem cell types, a CART-based classification method was applied on the 1000–1800  $\text{cm}^{-1}$  Raman shift range, which includes the predominant constituents of the xylem cell wall (Prats Mateu *et al.*, 2016; Özparpucu *et al.*, 2017). The CART model was built on the calibration dataset (80% of the total dataset), without a variable selection step, and the resulting classification tree showed that only four Raman shifts were sufficient to distinguish the three different cell wall types (Fig. 4D). The overall accuracy of the model produced from the calibration dataset was 85.9%, with good prediction values (PPV) of 100%, 77.7%, and 83.3% for the VV, VF, and FF groups, respectively (Table 3). This model was then applied to the validation dataset (20% of the total dataset) and showed an accuracy value of 80%, which is close to that of the calibration dataset. Even though the predictive sensitivity for spectra between adjacent xylem vessels (VV) was low, with only 50% of spectra correctly classified, the PPVs for VF and FF spectra (87.5 and 100%, respectively) were good (Table 3). Therefore, our CART model can be used to distinguish VF and FF spectra, but the results should be interpreted with caution in the case of VV spectra. Nevertheless, our data showed that the 1038, 1118, 1408, and 1258  $\text{cm}^{-1}$  Raman shifts can be used to discriminate most of the different xylem

**Table 3.** Classification results for using Raman shifts to predict different xylem cell types, with the model calibration dataset (80% of the total dataset) using a 10-fold cross-validation method, and the validation dataset (20% of the total dataset) using a CART-based algorithm

	Raman prediction			Accuracy 85.9%
	VV	VF	FF	
Calibration model	VV 18	0	0	PPV/NPV 100%/86.9%
(after 10-fold cross-validation)	VF 6	27	1	PPV/NPV 77.7%/90%
	FF 0	2	10	PPV/NPV 83.3%/98%
	Sensitivity/ Specificity	Sensitivity/ Specificity	Sensitivity/ Specificity	
	0.75/0.869	0.931/0.72	0.90/0.962	
	Raman prediction			Accuracy 80%
	VV	VF	FF	
Validation model	VV 4	4	0	PPV/NPV 50%/84.6%
	VF 0	14	2	PPV/NPV 87.5%/71.4%
	FF 0	0	6	PPV/NPV 100%/91.6%
	Sensitivity/ Specificity	Sensitivity/ Specificity	Sensitivity/ Specificity	
	100%/84.6%	77.7%/83.3%	75%/100%	

For the calculation of the different parameters, one cell type was compared to the two others. FF, cell wall between two xylem fibers; VF, cell wall between xylem vessel and fiber; VV, cell wall between two xylem vessels; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

cell wall types in wild-type Arabidopsis plants. Interestingly, the band around 1038  $\text{cm}^{-1}$  has been reported to describe C-O stretching of mannan oligosaccharides (Maru *et al.*, 2015) while the Raman shift around 1256  $\text{cm}^{-1}$  has been linked to hemicelluloses (Gierlinger *et al.*, 2008). The bands at 1121  $\text{cm}^{-1}$  [symmetric  $\nu(\text{COC})$  glycosidic bond] and 1408  $\text{cm}^{-1}$  [ $\delta(\text{CH}_2)$  region] have also been assigned to cellulose (Edwards *et al.*, 1997; Chylińska *et al.*, 2014).

Earlier studies in Arabidopsis have clearly established that the cell walls of xylem interfascicular fibers and xylem vessels differ in terms of their lignin monomer composition (Schuetz *et al.*, 2013). In addition, results from poplar have suggested that the cell wall composition of xylem fibers is an intermediate between that of the interfascicular fibers and the vessels (Gorzsás *et al.*, 2011). Time-of-flight secondary ion mass spectrometry has previously been applied to measure differences in the syringyl/guaiacyl ratio between xylem fibers and vessels in *Populus* (Tolbert *et al.*, 2016). Our present work shows that a combination of Raman shifts assigned to cellulose and hemicelluloses can also distinguish xylem cell types. This is in agreement with previous research, as the immunolabelling of mannan epitopes (LM10 and LM11 antibodies) in the Arabidopsis floral stem revealed a higher signal intensity in xylem fibers than in vessels (Kim and Daniel, 2012). This could suggest that these compounds are more important for mechanical support than for water conduction (Kim and Daniel, 2012).

*Disruption of SWEET11 and SWEET12 expression differentially affects the cell wall composition of different xylem cell types*

To further understand how modifications in facilitated sugar transport influence xylem SCW formation, we acquired Raman spectra for different xylem cell types from the *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant (Fig. 1). As described above, CART-based classifications were built to compare the different xylem cell types from both genotypes. For each cell type (VV, VF, or FF), the original dataset was split into calibration dataset and validation datasets, after which the CovSel algorithm was applied on the calibration dataset to select the 10 Raman shifts showing maximum covariance. The CART models were then built on the calibration datasets and later applied on the validation datasets (Tables 4–6). The resulting CART tree classifications are shown in Fig. 5. For cell walls between adjacent xylem vessels, two Raman shifts, 1001  $\text{cm}^{-1}$  and 1093  $\text{cm}^{-1}$ , were sufficient to differentiate the wild-type and double-mutant spectra (Fig. 5A). Interestingly, these two Raman shifts have been shown to be associated with cellulose compounds (Gierlinger and Schwanninger, 2007; Özpırcu *et al.*, 2017). The model performance was estimated for both calibration and validation datasets (Table 4), which demonstrated that it could accurately discriminate spectra from both genotypes since the overall accuracy, sensitivity, specificity, PPV, and NPV calculated for the validation dataset were between 76% and 90% (Table 4).

Data obtained from the CART model produced using Raman spectra acquired for the walls between xylem vessels and fibers (VF spectra) showed that seven Raman shifts—at 1093, 1134, 1296, 1372, 1606, 1618, and 1743  $\text{cm}^{-1}$ —could be used to discriminate the genotypes (Fig. 5B). The 1093  $\text{cm}^{-1}$  shift appeared

**Table 4.** Classification results for using Raman shifts to predict which genotype is represented by cell walls between xylem vessels, with the model calibration dataset (80% of total dataset) using a 10-fold cross-validation method, and the validation dataset (20% of total dataset) using a CART-based algorithm

		Raman prediction		Accuracy
		Wild-type	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	88.9%
Calibration model (after 10-fold cross-validation)	Wild-type	33	2	PPV 94.3%
	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	7	39	NPV 84.8%
		Sensitivity	Specificity	
		82.5%	95.1%	
		Raman prediction		Accuracy
		Wild-type	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	84.2%
Validation model	Wild-type	10	1	PPV 90.9%
	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	2	6	NPV 75%
		Sensitivity	Specificity	
		83.3%	85.7%	

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

three times and the 1296  $\text{cm}^{-1}$  and 1743  $\text{cm}^{-1}$  shifts appeared twice in the CART tree, suggesting that these three shifts were most important in discriminating the two genotypes (Fig. 5B). From previous studies, the 1093  $\text{cm}^{-1}$  and 1372  $\text{cm}^{-1}$  shifts are

**Table 5.** Classification results for using Raman shifts to predict which genotype is represented by cell walls between a xylem vessel and fiber, with the model calibration dataset (80% of total dataset) using a 10-fold cross-validation method, and the validation dataset (20% of total dataset) using a CART-based algorithm

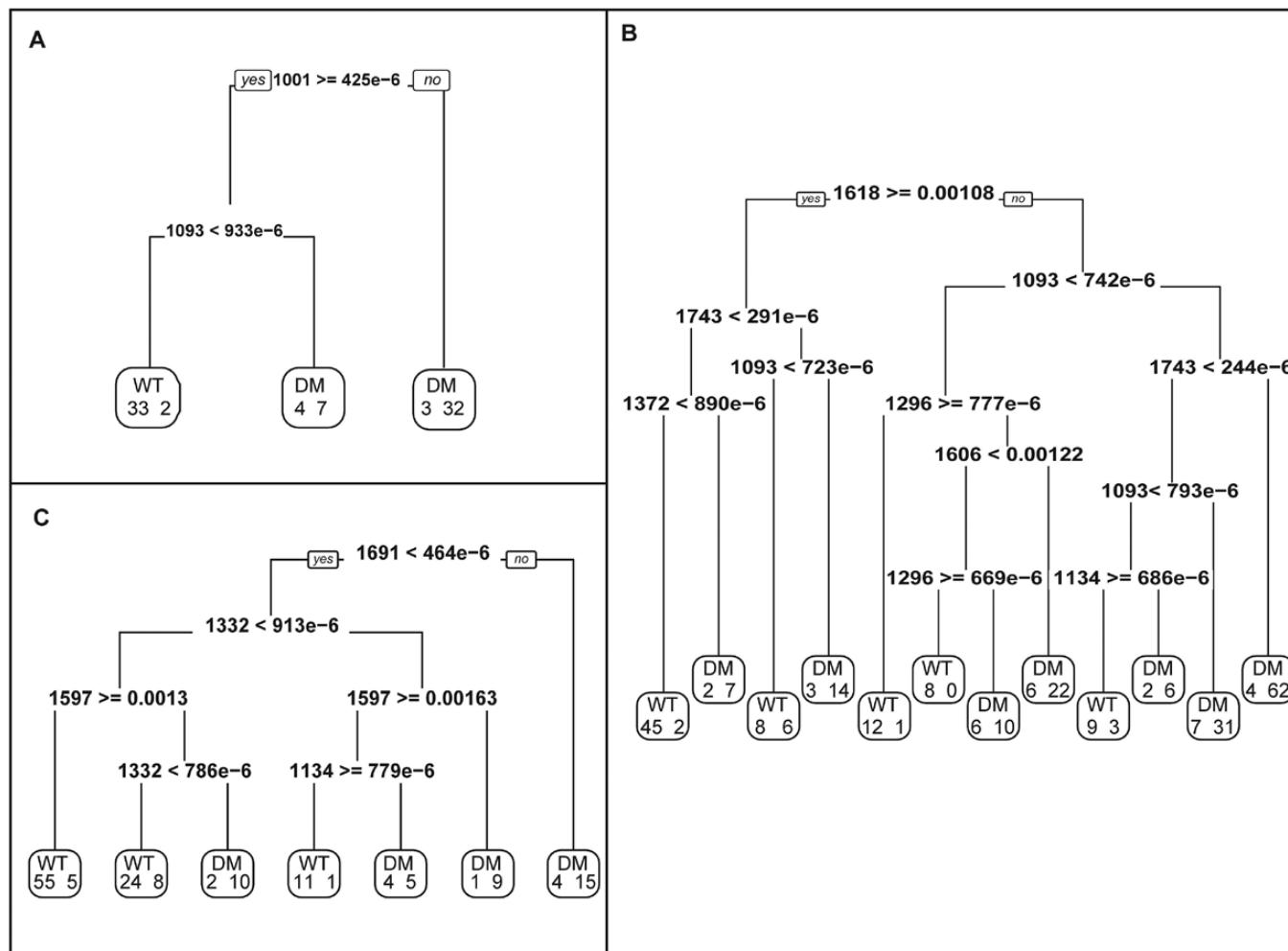
		Raman prediction		Accuracy
		Wild-type	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	84.8%
Calibration model (after 10-fold cross-validation)	Wild-type	82	12	PPV 87.2%
	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	30	152	NPV 83.5%
		Sensitivity	Specificity	
		73.2%	92.7%	
		Raman prediction		Accuracy
		Wild-type	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	88.4%
Validation model	Wild-type	17	6	PPV 73.9%
	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	2	44	NPV 95.6%
		Sensitivity	Specificity	
		89.5%	88%	

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

**Table 6.** Classification results for using Raman shifts to predict which genotype is represented by cell walls between xylem fibers, with the model calibration dataset (80% of total dataset) using a 10-fold cross-validation method, and the validation dataset (20% of total dataset) using a CART-based algorithm

		Raman prediction		Accuracy
		Wild-type	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	83.8%
Calibration model (after 10-fold cross-validation)	Wild-type	90	14	PPV 86.5%
	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	11	39	NPV 78%
		Sensitivity	Specificity	
		89.1%	73.6%	
		Raman prediction		Accuracy
		Wild-type	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	73.7%
Validation model	Wild-type	14	3	PPV 82.3%
	<i>sweet11-1</i> <i>sweet12-1</i>	7	14	NPV 66.7%
		Sensitivity	Specificity	
		66.7%	82.3%	

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.



**Fig. 5.** Classification and regression tree (CART) grouping of xylem Raman spectra for Arabidopsis wild-type (WT) and *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant (DM) plants. The classification trees were generated by the CART method after 10-fold cross-validation of the calibration dataset model, which was built using the 1800–1000  $\text{cm}^{-1}$  range from the Raman spectra of cell walls between two xylem vessels (A), between a xylem vessel and a fiber (B), and between two xylem fibers (C). The decision-making process involves the evaluation of if-then rules of each node from top to bottom, which eventually reaches a terminal node with the designated class outcome. The numbers in each terminal subgroup stand for the number of either WT or DM spectra.

related to cellulose (Chylinska *et al.*, 2014; Özparpucu *et al.*, 2017), while the 1743  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to the  $\nu(\text{C}=\text{O})$  ester in pectins or hemicellulose compounds (Chylinska *et al.*, 2014). The 1606  $\text{cm}^{-1}$  and 1618  $\text{cm}^{-1}$  shifts have been reported to describe lignin bands (Prats Mateu *et al.*, 2016). The performance of the model produced from VF spectra (for both calibration and validation datasets) was similar to the model reported above.

Finally, the CART tree built using the spectra acquired for the walls between adjacent xylem fibers (FF spectra) showed that four Raman shifts could be used to discriminate between the wild-type and double-mutant spectra. These shifts occurred at 1134, 1332, 1597, and 1691  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 5C), and were combined differently to distinguish the genotypes. The 1332  $\text{cm}^{-1}$  and 1597  $\text{cm}^{-1}$  shifts were used twice in the classification trees, suggesting that both of them were important in differentiating the wild-type and double-mutant xylem fiber cell walls (Fig. 5C). Interestingly, both bands are related to lignin compounds (1332  $\text{cm}^{-1}$ , aliphatic O-H bending; 1597  $\text{cm}^{-1}$ , aromatic-ring stretching) (Özparpucu *et al.*, 2017). The different descriptors for the models built from the calibration and validation datasets ranged from 67% to 89%, suggesting that

the models can be used to distinguish the xylem fiber cell wall compositions of the two genotypes studied (Table 6).

To summarize, it seemed that Raman shifts that discriminated cell walls between xylem vessels of the two genotypes were related to polysaccharides while the cell walls between xylem vessel/fibers and between adjacent fibers of the two genotypes could be discriminated using both lignin and polysaccharides shifts. The application of a CART-based analysis enabled us to identify new Raman shifts that could be used to better characterize the double-mutant in a cell-specific manner. Interestingly, our previous analysis of the xylem cell walls of the *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant did not reveal modifications in lignin composition (Le Hir *et al.*, 2015). Whilst further experiments to confirm these results, these discrepancies can be explained by the application of Raman microspectroscopy, which provides a spatial resolution of  $2 \times 2 \mu\text{m}$  and therefore makes it possible to investigate individual cell types. This level of precision suggests that the differences observed between the wild-type and the *sweet11-1 sweet12-1* double-mutant could depend on the type of xylem cell being analysed.



## Conclusions

Synchrotron radiation FTIR and Raman spectroscopy are powerful tools for studying the composition of cell walls in plants both at the tissue and cellular level. Here, the application of SR-FTIR allowed us to picture the composition of phloem tissue in the floral stem of *Arabidopsis*. Furthermore, CART-based classification, calculated using the Raman spectra acquired for different xylem cell types, also identified spectral wavenumbers that could be used to discriminate xylem cell types based on their cellulose and hemicellulose composition. We used both techniques to analyse the phenotype of the double-mutant *sweet11-1 sweet12-1*, which is not a cell wall biosynthesis mutant but instead is deficient in the expression of two sugar facilitators that exist in vascular parenchyma cells. We therefore did not expect to find any major variations in the cell wall composition. However, with both techniques we observed small but significant differences between the genotypes at the tissue and cell level, which support the use of SR-FTIR and Raman spectroscopy to study fine variations of the cell wall composition that may be missed when analysing a greater acquisition zone with conventional FTIR, as described in our previous experiments (Le Hir *et al.*, 2015). In addition, the research approach presented here offers the possibility of studying changes in cell wall polysaccharide composition at the cellular level and could be applied to examining how nutrient transport affects cell wall formation in the vascular tissue of both herbaceous and ligneous species. Furthermore, this approach provides the potential for studying mutants affected in lignin biosynthesis and structure in the different xylem cell types, including, for example, comparisons between xylary fibers and interfascicular fibers.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Fig. S1. Illustration of the different spatial resolutions offered by vibrational spectroscopy techniques.

Fig. S2. Comparison of SR-FTIR peak areas of cellulose, hemicelluloses, and lignin between xylem or phloem tissues from wild-type and *sweet11-1sweet12-1* plants.

Fig. S3. Average Raman spectra for the different xylem cell types in the wild-type and *sweet11-1 sweet12-1* plants.

## Acknowledgements

We thank Bruno Letarnec for his assistance in the greenhouse. The research was supported by the SOLEIL, the French national synchrotron facility (project no. 20150210). This work benefitted from a French State grant (LabEx Saclay Plant Sciences-SPS, ref. ANR-10-LABX-0040-SPS), managed by the French National Research Agency under an 'Investments for the Future' program (ref. ANR-11-IDEX-0003-02). The authors declare no competing financial interests. The ChemFlow interface was supported by the Agropolis Foundation under the reference ID-1401-005 through the 'Investissements d'Avenir' program (Labex Agro: ANR-10-LABX-0001-01).

## References

Agarwal UP. 2006. Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). *Planta* **224**, 1141–1153.

Agarwal UP. 2014. 1064 nm FT-Raman spectroscopy for investigations of plant cell walls and other biomass materials. *Frontiers in Plant Science* **5**, 490.

Bekiaris G, Lindedam J, Peltre C, Decker SR, Turner GB, Magid J, Bruun S. 2015. Rapid estimation of sugar release from winter wheat straw during bioethanol production using FTIR-photoacoustic spectroscopy. *Biotechnology for Biofuels* **8**, 85.

Berk RA. 2016. *Statistical learning from a regression perspective*. Cham, Switzerland: Springer Nature.

Brown DM, Zeef LA, Ellis J, Goodacre R, Turner SR. 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *The Plant Cell* **17**, 2281–2295.

Brown DM, Zhang Z, Stephens E, Dupree P, Turner SR. 2009. Characterization of IRX10 and IRX10-like reveals an essential role in glucuronoxylan biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **57**, 732–746.

Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207–211.

Chylińska M, Szymańska-Chargot M, Zdunek A. 2014. Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy. *Plant Methods* **10**, 14.

De Meester B, de Vries L, Özparpucu M, *et al.* 2018. Vessel-specific reintroduction of CINNAMOYL-COA REDUCTASE1 (CCR1) in dwarfed *ccr1* mutants restores vessel and xylary fiber integrity and increases biomass. *Plant Physiology* **176**, 611–633.

Devaux MF, Jamme F, André W, Bouchet B, Alvarado C, Durand S, Robert P, Saulnier L, Bonnin E, Guillon F. 2018. Synchrotron time-lapse imaging of lignocellulosic biomass hydrolysis: tracking enzyme localization by protein autofluorescence and biochemical modification of cell walls by microfluidic infrared microspectroscopy. *Frontiers in Plant Science* **9**, 200.

Earley EJ, Inglad B, Winkler J, Tonsor SJ. 2009. Inflorescences contribute more than rosettes to lifetime carbon gain in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **96**, 786–792.

Edwards HG, Farwell DW, Webster D. 1997. FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **53**, 2383–2392.

Esau K, Cheadle VI. 1958. Wall thickening in sieve elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **44**, 546–553.

Faix O. 1991. Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* **45**, 21–28.

Freshour G, Clay RP, Fuller MS, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG. 1996. Developmental and tissue-specific structural alterations of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology* **110**, 1413–1429.

Gierlinger N. 2018. New insights into plant cell walls by vibrational microspectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* **53**, 517–551.

Gierlinger N, Keplinger T, Harrington M. 2012. Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy. *Nature Protocols* **7**, 1694–1708.

Gierlinger N, Sapei L, Paris O. 2008. Insights into the chemical composition of *Equisetum hyemale* by high resolution Raman imaging. *Planta* **227**, 969–980.

Gierlinger N, Schwanninger M. 2007. The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research. *Spectroscopy* **21**, 69–89.

Gorzsás A, Stenlund H, Persson P, Trygg J, Sundberg B. 2011. Cell-specific chemotyping and multivariate imaging by combined FT-IR microspectroscopy and orthogonal projections to latent structures (OPLS) analysis reveals the chemical landscape of secondary xylem. *The Plant Journal* **66**, 903–914.

Guillon F, Bouchet B, Jamme F, Robert P, Quémener B, Barron C, Larré C, Dumas P, Saulnier L. 2011. *Brachypodium distachyon* grain: characterization of endosperm cell walls. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1001–1015.

Hall HC, Cheung J, Ellis BE. 2013. Immunoprofiling reveals unique cell-specific patterns of wall epitopes in the expanding *Arabidopsis* stem. *The Plant Journal* **74**, 134–147.

Hänninen T, Konturi E, Vuorinen T. 2011. Distribution of lignin and its coniferyl alcohol and coniferyl aldehyde groups in *Picea abies* and *Pinus sylvestris* as observed by Raman imaging. *Phytochemistry* **72**, 1889–1895.

Horbens M, Feldner A, Höfer M, Neinhuis C. 2014. Ontogenetic tissue modification in *Malus* fruit peduncles: the role of sclereids. *Annals of Botany* **113**, 105–118.

- Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, Zeileis A. 2008. Implementing a class of permutation tests: the coin package. *Journal of Statistical Software* **28**, 1–23.
- Jin K, Liu X, Wang K, Jiang Z, Tian G, Yang S, Shang L, Ma J. 2018. Imaging the dynamic deposition of cell wall polymer in xylem and phloem in *Populus × euramericana*. *Planta* **248**, 849–858.
- Johnson KL. 2018. Sugar coating the phloem sieve element wall. *Plant Physiology* **176**, 1408–1409.
- Kačuráková M, Smith AC, Gidley MJ, Wilson RH. 2002. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **337**, 1145–1153.
- Kim JS, Daniel G. 2012. Immunolocalization of hemicelluloses in *Arabidopsis thaliana* stem. Part I: temporal and spatial distribution of xylans. *Planta* **236**, 1275–1288.
- Kubo S, Kadla JF. 2005. Hydrogen bonding in lignin: a Fourier transform infrared model compound study. *Biomacromolecules* **6**, 2815–2821.
- Largo-Gosens A, Hernández-Altamirano M, García-Calvo L, Alonso-Simón A, Alvarez J, Acebes JL. 2014. Fourier transform mid infrared spectroscopy applications for monitoring the structural plasticity of plant cell walls. *Frontiers in Plant Science* **5**, 303.
- Le Hir R, Beneteau J, Bellini C, Vilaine F, Dinant S. 2008. Gene expression profiling: keys for investigating phloem functions. *Trends in Plant Science* **13**, 273–280.
- Le Hir R, Spinner L, Klemens PA, et al. 2015. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **8**, 1687–1690.
- Lefebvre V, Fortabat MN, Ducamp A, North HM, Maia-Grondard A, Trouverie J, Boursiac Y, Mouille G, Durand-Tardif M. 2011. ESKIMO1 disruption in *Arabidopsis* alters vascular tissue and impairs water transport. *PLoS ONE* **6**, e16645.
- Marchessault R. 1962. Application of infra-red spectroscopy to cellulose and wood polysaccharides. *Pure Applied Chemistry* **5**, 107–129.
- Marchessault R, Liang C. 1962. The infrared spectra of crystalline polysaccharides VIII. Xylans. *Journal of Polymer Science* **59**, 357–378.
- Marriott PE, Gómez LD, McQueen-Mason SJ. 2016. Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytologist* **209**, 1366–1381.
- Maru V, Hewale S, Mantri H, Ranade V. 2015. Partial purification and characterization of mannan oligosaccharides from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **4**, 705–711.
- Mohebbi B. 2010. Application of ATR infrared spectroscopy in wood acetylation. *Journal of Agricultural Science and Technology* **10**, 253–259.
- Mouille G, Robin S, Lecomte M, Pagant S, Höfte H. 2003. Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *The Plant Journal* **35**, 393–404.
- Mouille G, Witucka-Wall H, Bruyant MP, Loudet O, Pelletier S, Rihouey C, Lerouxel O, Lerouge P, Höfte H, Pauly M. 2006. Quantitative trait loci analysis of primary cell wall composition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**, 1035–1044.
- Öhman D, Demedts B, Kumar M, Gerber L, Gorzsás A, Goeminne G, Hedenström M, Ellis B, Boerjan W, Sundberg B. 2013. MYB103 is required for FERULATE-5-HYDROXYLASE expression and syringyl lignin biosynthesis in *Arabidopsis* stems. *The Plant Journal* **73**, 63–76.
- Owen NL, Thomas DW. 1989. Infrared studies of 'hard' and 'soft' woods. *Applied Spectroscopy* **43**, 451–455.
- Özparpucu M, Gierlinger N, Burgert I, Van Acker R, Vanholme R, Boerjan W, Pilate G, Déjardin A, Rüggeberg M. 2018. The effect of altered lignin composition on mechanical properties of CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (CAD) deficient poplars. *Planta* **247**, 887–897.
- Özparpucu M, Rüggeberg M, Gierlinger N, Cesarino I, Vanholme R, Boerjan W, Burgert I. 2017. Unravelling the impact of lignin on cell wall mechanics: a comprehensive study on young poplar trees downregulated for CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (CAD). *The Plant Journal* **91**, 480–490.
- Pawar PM, Koutaniemi S, Tenkanen M, Mellerowicz EJ. 2013. Acetylation of woody lignocellulose: significance and regulation. *Frontiers in Plant Science* **4**, 118.
- Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ. 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* **12**, 267–277.
- Pereira L, Flores-Borges D, Bittencourt P, Mayer J, Kiyota E, Araújo P, Jansen S, Freitas R, Oliveira R, Mazzafera P. 2018. Infrared nanospectroscopy reveals the chemical nature of pit membranes in water-conducting cells of the plant xylem. *Plant Physiology* **177**, 1629–1638.
- Persson S, Caffall KH, Freshour G, Hilley MT, Bauer S, Poindexter P, Hahn MG, Mohnen D, Somerville C. 2007. The *Arabidopsis irregular xylem8* mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *The Plant Cell* **19**, 237–255.
- Prats Mateu B, Hauser MT, Heredia A, Gierlinger N. 2016. Waterproofing in *Arabidopsis*: following phenolics and lipids in situ by confocal Raman microscopy. *Frontiers in Chemistry* **4**, 10.
- Robin S, Lecomte M, Höfte H, Mouille G. 2003. A procedure for the clustering of cell wall mutants in the model plant *Arabidopsis* based on Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Journal of Applied Statistics* **30**, 669–681.
- Roger JM, Palagos B, Bertrand D, Fernandez-Ahumada E. 2011. CovSel: variable selection for highly multivariate and multi-response calibration. Application to IR spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2**, 216–223.
- Schmidt M, Schwartzberg AM, Carroll A, Chaibang A, Adams PD, Schuck PJ. 2010. Raman imaging of cell wall polymers in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **395**, 521–523.
- Schuetz M, Smith R, Ellis B. 2013. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of Experimental Botany* **64**, 11–31.
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapiere C, Jouanin L, Séguin A. 2005. CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 2059–2076.
- Sjölund RD. 1997. The phloem sieve element: a river runs through it. *The Plant Cell* **9**, 1137–1146.
- Smith RA, Schuetz M, Karlen SD, Bird D, Tokunaga N, Sato Y, Mansfield SD, Ralph J, Samuels AL. 2017. Defining the diverse cell populations contributing to lignification in *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Physiology* **174**, 1028–1036.
- Strabala TJ, MacMillan CP. 2013. The *Arabidopsis* wood model—the case for the inflorescence stem. *Plant Science* **210**, 193–205.
- Tolbert AK, Ma T, Kalluri UC, Ragauskas AJ. 2016. Determining the syringyl/guaiacyl lignin ratio in the vessel and fiber cell walls of transgenic *Populus* plants. *Energy and Fuels* **30**, 5716–5720.
- Torode TA, O'Neill R, Marcus SE, et al. 2018. Branched pectic galactan in phloem-sieve-element cell walls: implications for cell mechanics. *Plant Physiology* **176**, 1547–1558.
- Vayssières MP, Plant RE, Allen-Diaz BH. 2000. Classification trees: an alternative non-parametric approach for predicting species distributions. *Journal of Vegetation Science* **11**, 679–694.
- Vijayan P, Willick IR, Lahlali R, Karunakaran C, Tanino KK. 2015. Synchrotron radiation sheds fresh light on plant research: the use of powerful techniques to probe structure and composition of plants. *Plant & Cell Physiology* **56**, 1252–1263.
- Wickham H. 2009. ggplot2. *Elegant graphics for data analysis*. Cham, Switzerland: Springer Nature.
- Zeise I, Heiner Z, Holz S, Joester M, Büttner C, Kneipp J. 2018. Raman imaging of plant cell walls in sections of *Cucumis sativus*. *Plants* **7**, 1–16.
- Zhang C, Turgeon R. 2018. Mechanisms of phloem loading. *Current Opinion in Plant Biology* **43**, 71–75.
- Zhang M, Lapiere C, Nouxman NL, Nieuwoudt MK, Smith BG, Chavan RR, McArdle BH, Harris PJ. 2017. Location and characterization of lignin in tracheid cell walls of radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) compression woods. *Plant Physiology and Biochemistry* **118**, 187–198.
- Zimmermann B, Bağcıoğlu M, Sandt C, Kohler A. 2015. Vibrational microspectroscopy enables chemical characterization of single pollen grains as well as comparative analysis of plant species based on pollen ultrastructure. *Planta* **242**, 1237–1250.

---

# CHAPITRE 3

---

Rôle du transport facilité des sucres dans la  
réponse des plantes à des modifications de  
l'environnement



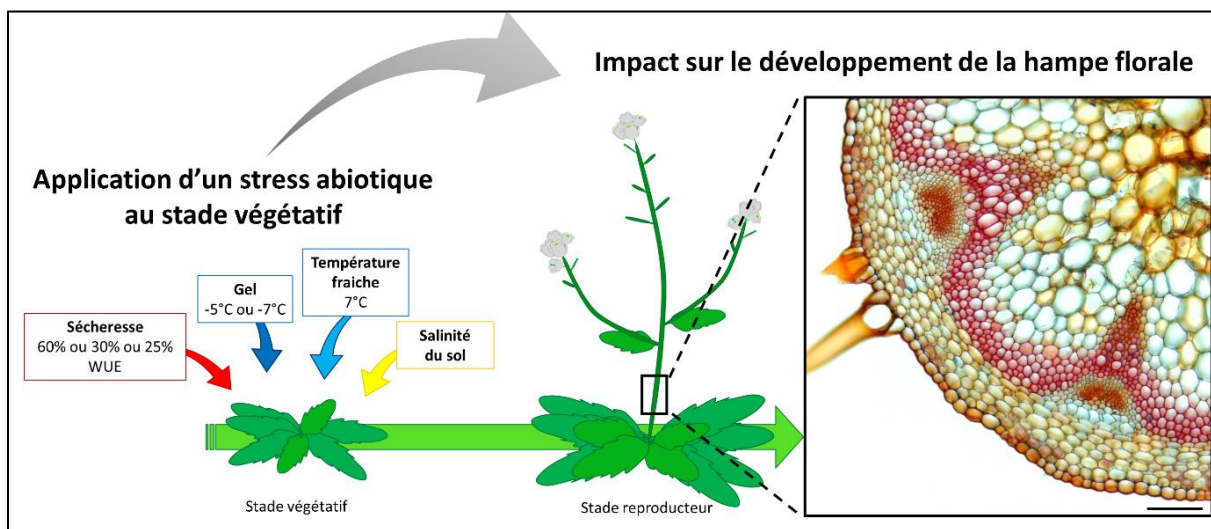
#### I. Introduction

Face aux modifications climatiques que connaît le monde actuel, une meilleure compréhension de la réponse des plantes aux changements environnementaux est cruciale. En effet, le réchauffement climatique entraîne des fluctuations importantes telles que l'accentuation des périodes de sécheresse dans certaines régions du monde ou l'engorgement des sols dans d'autres, des variations de températures importantes, une salinisation des sols ou encore une élévation de la concentration en CO<sub>2</sub> dans l'air environnant. Ces variations environnementales influencent la croissance et le développement des plantes (Lemoine et al., 2013) et impactent ainsi la production agricole (Phukan et al., 2018). De nombreuses études se sont concentrées sur l'impact des contraintes environnementales sur la croissance et le développement des plantes, en focalisant les recherches sur les mécanismes moléculaires sous-jacents aux stratégies mises en place par les plantes. Dans ce chapitre, les mutants *sweet* ont été analysés dans différentes conditions induisant une contrainte osmotique. Dans la littérature, la réponse à la contrainte osmotique a été analysée après différents traitements mettant en jeu (1) une sécheresse des sols qui entraîne une diminution de l'eau puisée par les racines, (2) de fortes concentrations en sels dans le sol ou (3) des températures basses qui impactent la physiologie de la plante (Verslues et al., 2006 ; Krasensky et Jonak, 2012). En cas de contrainte osmotique, il a été montré une réduction de la croissance foliaire, ayant pour but de limiter la perte en eau par évapotranspiration (Boyer, 1970), et de la croissance racinaire (Durand et al., 2018). On observe une réduction de la division cellulaire (Tardieu et al., 2000) et une rigidification des parois cellulaires empêchant l'élongation cellulaire (Cosgrove, 2005). Afin de résister à ces différents stress, les plantes modifient l'homéostasie des sucres (Pommerrenig et al., 2018). Ainsi une accumulation de sucres et une modification du transport des sucres ont été observées en conditions de sécheresse (Rolland et al., 2006 ; Durand et al., 2018) ou en réponse à des températures fraîches (pour revue Yamada et al., 2018). Les sucres permettraient ainsi de réguler la pression osmotique en jouant un rôle d'osmoprotectant et permettraient également de lutter contre la production délétère des espèces réactives de l'oxygène (Yamada et al., 2018 ; Pommerrenig et al., 2018). Chez *Arabidopsis thaliana*, certains membres de la famille de transporteurs SWEET sont impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (Klemens et al., 2013 ; Chandran et al., 2015 ; Le Hir et al., 2015 ; Phukan et al., 2018 ; Wang et al., 2018 ; Zhou et al., 2018a ; Zhou et al., 2018b). Cependant, les mécanismes mis en place par la plante dépendent du type de stress, de son intensité, sa fréquence, sa durée et surtout du stade de développement de la plante auquel il survient. Peu



d'études ont été réalisées concernant les effets d'un stress, appliqué pendant la phase végétative ou la phase reproductive, sur le développement du système vasculaire dans la hampe florale (Sellami et al., 2019a ; Sellami et al., 2019b).

Dans le cadre de cette partie, nous nous sommes concentrés sur l'impact d'une contrainte osmotique, appliquée à un stade de développement végétatif, sur le développement de la hampe florale (Figure 64). Dans ce chapitre, la première partie aborde l'impact des températures basses (i.e. gel et température fraîche), à un stade végétatif, sur le développement des plantes pour lesquelles le transport des sucres est perturbé dans le système vasculaire. La seconde partie présente les travaux réalisés dans l'équipe sur l'application d'un stress salin et auxquels j'ai été associée en tant que co-auteur dans une publication. Enfin, la dernière partie présente les résultats obtenus concernant le développement de la rosette des différents mutants *sweet* en situation de contrainte sécheresse. Ce chapitre devrait permettre de mieux appréhender, en situation de contrainte osmotique appliquée à un stade végétatif, le rôle des échanges de sucres et les conséquences de leur perturbation sur le développement de la rosette et de la hampe florale. (Figure 64).



**Figure 64 :** Représentation schématique des différents types de contraintes environnementales explorées dans ce chapitre

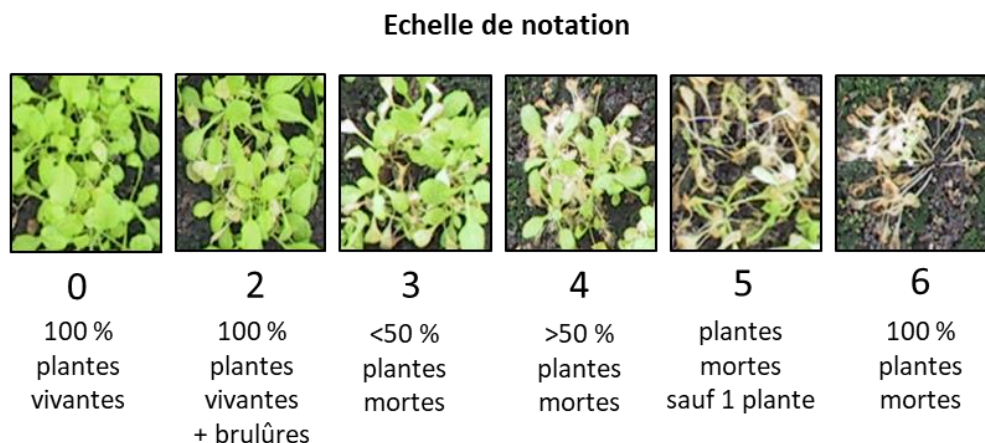


## II. Résultats

### 1. Réponse des mutants *sweets* face à des contraintes de températures

#### 1.1. Etude de la tolérance au gel

Il a été précédemment décrit dans l'équipe que le double mutant *swt11swt12* présentait une meilleure résistance à une condition de gel à  $-5^{\circ}\text{C}$  (Le Hir et al., 2015). Dans cette partie, nous avons voulu confirmer ce résultat par une autre technique et étendre l'analyse au double mutant *swt16swt17*, aux triples mutants et au quadruple mutant. Ainsi, deux conditions de stress gel ont été testées :  $-5^{\circ}\text{C}$  et  $-7^{\circ}\text{C}$ , en collaboration avec Carine Géry et Evelyne Téoulé de l'équipe Variabilité et Tolérance aux stress abiotiques de l'IJPB selon le protocole publié par l'équipe (McKhann et al., 2008). Les graines ont été vernalisées puis semées en poquets en serre avant d'être transférées pour une acclimatation à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant une semaine puis transférées à  $-5^{\circ}\text{C}$  ou  $-7^{\circ}\text{C}$  durant deux jours. Des photographies des poquets ont été réalisées après leur transfert en serre, une semaine après l'application du stress et une échelle de notation a été établie afin d'évaluer l'impact de l'application d'un stress gel sur les différentes lignées (Mac Khann et al., 2015 ; Figure 2). L'échelle s'étend de 0 à 6 et permet de quantifier les dommages causés par le stress. En effet, lorsque 100% des plantes sont vivantes la note est de 0, lorsqu'elles sont toutes vivantes mais que l'on remarque des chloroses ou brûlures sur certaines feuilles la note est de 2. Lorsque moins de 50% des plantes sont mortes la note est de 3 alors lorsque plus de la moitié des plantes sont mortes, la note est de 4. Enfin, lorsqu'il ne reste qu'une plante vivante, la note est de 5 et lorsque toutes les plantes sont mortes la note est de 6 (Figure 65).



**Figure 65:** Echelle de notation des lésions causées par l'application d'une période de gel à  $-5^{\circ}\text{C}$  ou  $-7^{\circ}\text{C}$  durant deux jours au stade végétatif

(D'après Mac Khann et al., 2015)

**Tableau IV : Représentation des notes moyennes obtenues pour chaque génotype après deux jours passés à -5°C**

Pour chaque culture, entre 5 et 6 poquets sont notés pour chaque génotype. Le comportement de chaque génotype a été testé au moins sur 4 cultures indépendantes. D’après Mac Khann et al. (2015), un génotype est considéré significativement différent du type sauvage si la différence de notation entre les deux génotypes est au moins supérieure à 1 (casse colorée en vert). NT : non testé

Génotype	Culture n°1	Culture n°2	Culture n°3	Culture n°4	Culture n°5	Culture n°6	Culture n°7	Culture n°8
WT	2,5	3,3	2,3	2,3	3,3	2,8	3,2	4
<i>swt11swt12</i>	0,8	2	NT	NT	2,8	1,8	2,2	3
<i>swt16swt17</i>	NT	NT	2,5	3,5	2	2	2,8	2,5
<i>swt11swt12swt16</i>	NT	1,8	NT	NT	2,3	0,3	2	4
<i>swt11swt12swt17</i>	NT	NT	NT	NT	2	1	2	3,3
<i>swt11swt12swt16swt17</i>	NT	NT	NT	NT	3,3	1	2,3	3,7

Chez les plantes de type sauvage, la notation moyenne varie entre 2 et 3 (sauf pour la culture n°8), à savoir entre quelques brûlures sur les feuilles (notation 2) ou certaines plantes mortes (<50% de plantes mortes, notations 3). L’écotype Col-0 utilisé ici est en effet considéré comme plutôt résistant à une période de gel. Le comportement du double mutant *swt11swt12* a été testé sur 6 cultures différentes et les résultats confirment pour 5 cultures que le double mutant *swt11swt12* est plus résistant que le type sauvage à une période de gel à -5°C (Tableau IV). La réponse du double mutant *swt16swt17* est plus complexe puisqu’une meilleure résistance à -5°C est observée pour 2 cultures sur 6, aucun effet pour 3 cultures sur 6 et une moins bonne résistance dans le cas d’une seule culture (Tableau IV). Les triples mutants et le quadruple mutant sont globalement plus résistants que le type sauvage dans 3 cultures sur 4 (Tableau IV).

Se basant sur cette meilleure résistance de certains génotypes, nous avons également testé le comportement de ces lignées à un gel de -7°C sur les plantes sauvages, les doubles, les triples et le quadruple mutant (Tableau V).

**Tableau V : Représentation des notes moyennes obtenues pour chaque génotype après deux jours passés à -7°C**

Pour chaque culture, 6 poquets sont notés pour chaque génotype. D’après Mac Khann et al. (2015), un génotype est considéré significativement différent du type sauvage si la différence de notation entre les deux génotypes est au moins supérieure à 1 (casse colorée en vert).

Génotype	Culture n°7	Culture n°8
WT	3,7	4
<i>swt11swt12</i>	2,8	3
<i>swt16swt17</i>	3,7	2,5
<i>swt11swt12swt16</i>	3,8	4
<i>swt11swt12swt17</i>	2,9	3,3
<i>swt11swt12swt16swt17</i>	3,2	3,7

Chez les plantes de type sauvage, les dégâts observés après une période de gel à -7°C sont plus importants qu’à -5°C puisque la moyenne des notes est proche de 4, c’est à dire que plus de 50% des plantes sont mortes (Figure 65). Néanmoins, le double mutant *swt11swt12* reste plus résistant également à une période de gel à -7°C (Tableau V). Concernant les autres génotypes, les résultats sont variables d’une culture à l’autre et donc doivent être répétés afin d’identifier ou non une meilleure résistance (Tableau V).

## **1.2. Etude de la tolérance aux températures fraîches**

### **1.2.1. Mise au point expérimentale**

Les études réalisées en réponse à une période de gel ont mis en évidence que le double mutant *sweet11sweet12*, les triples mutants et le quadruple mutant ont une meilleure tolérance au stress gel à -5°C et/ou à -7°C alors que le double mutant *swt16swt17* n’est globalement pas différent du sauvage (Tableaux 1 et 2). Cependant les conditions expérimentales utilisées pour évaluer la réponse des mutants à une période de gel ne permettent pas d’analyser la croissance et le développement de la hampe florale. Nous avons donc décidé de tester un autre dispositif expérimental permettant d’évaluer, non pas l’effet d’une période de gel, mais l’effet d’une

période de température fraîche (i.e. 7°C) sur la croissance et le développement de la hampe florale. En effet, en conditions naturelles de croissance, les végétaux peuvent être soumis au printemps à des températures basses pendant plusieurs jours alors que la majorité d'entre eux sont encore au stade végétatif. La question de l'impact de ces températures fraîches sur le développement reproducteur ultérieur se pose. C'est cette question que nous avons voulu aborder dans cette partie.

Ainsi, nous avons analysé des plantes sauvages, les doubles mutants *swt11swt12* et *swt16swt17* et le quadruple mutant qui ont été soumis à trois conditions de culture :

(1) La première condition appelée « Contrôle » correspond à une condition de culture où les plantes ont été cultivées à 22°C depuis le semis des graines jusqu'au prélèvement du matériel végétal.

(2) La seconde condition ; appelée « Stress » ; correspond à l'application d'une période de température de 7°C durant une semaine pendant le développement végétatif (du 14<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour). Avant et après cette semaine, les plantes ont été cultivées à 22°C. Cette condition mime donc les conditions climatiques des mois d'avril ces dernières années avec une semaine avoisinant 7°C encadrée par des périodes à 22°C.

(3) Enfin, dans la troisième condition appelée « Développement », les plantes sont cultivées à 22°C jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour de croissance puis transférées à 7°C jusqu'au prélèvement des échantillons.

Ces conditions devraient permettre d'évaluer l'impact de cette température fraîche sur le développement végétatif et reproducteur.

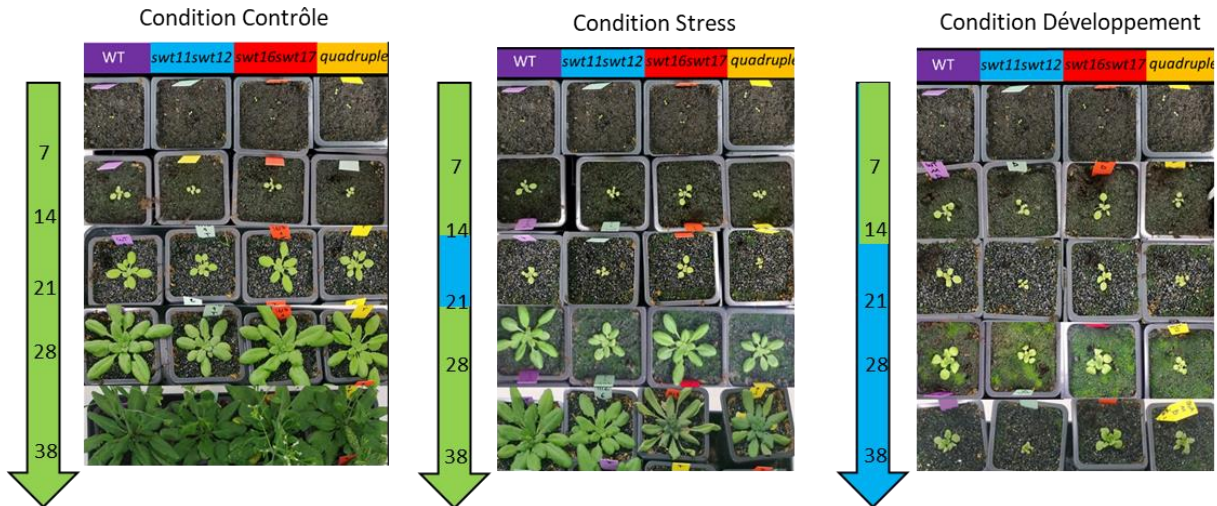
#### 1.2.2. Impact de l'application d'un stress 7°C durant la période végétative sur la croissance de la rosette et le développement de la hampe florale

##### 1.2.2.1. Impact sur la croissance de la rosette et la croissance radiale de la hampe florale

La Figure 3 présente les photographies du développement végétatif de chaque génotype en condition « contrôle », en condition « stress » avec l'application d'un stress 7°C de 14 à 21 jours, et en condition « développement » avec l'application d'un stress 7°C du 14<sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de l'expérimentation à savoir le jour de prélèvement des échantillons. On

### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 3

remarque que l'application d'une température de 7°C entre le 14<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour de croissance entraîne un retard de croissance de la rosette (Figure 66). En conditions normales de culture, l'émergence du bouton floral est observée au 28<sup>ème</sup> jour de culture. Un décalage de floraison a été observé pour les conditions « Stress » et « Développement » avec, respectivement, une émergence du bouton floral au 35<sup>ème</sup> jour et au 87<sup>ème</sup> jour de culture.



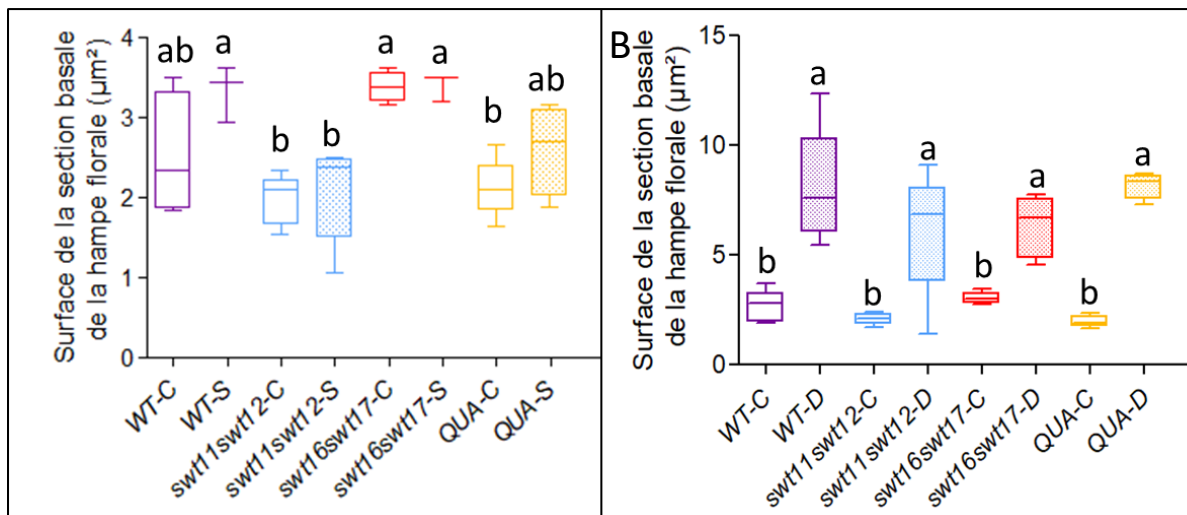
**Figure 66 : Développement de la rosette des différents génotypes dans les trois conditions de croissance**

Photographies du développement végétatif des lignées sauvage (WT en violet), *sweet11sweet12* (*swt11swt12* en bleu), *sweet16sweet17* (*swt16swt17* en rouge) et *sweet11sweet12sweet16sweet17* (*quadruple* en jaune) au cours du temps (du 7<sup>ème</sup> au 38<sup>ème</sup> jour de croissance). Dans la condition « Contrôle » le développement des plantes a eu lieu à 22°C (en vert). Dans la condition « Stress » les plantes ont été soumises à une semaine de croissance à 7°C (en bleu). Dans la condition « Développement » les plantes ont été majoritairement cultivées à 7°C (en bleu).

Dans cette expérience, j'ai reçu l'aide de l'assistante ingénieur de l'équipe Beate Hoffmann qui a effectué la majorité des mesures présentées dans cette partie. Il est important de noter que, pour tous les génotypes, des hampes florales de taille identique (17-20cm) ont été prélevées. Les résultats présentés ici concernent des plantes issues de 2 cultures différentes ayant chacune leur condition « Contrôle ».

### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 3

La Figure 67 présente la surface de la section basale de la hampe des plantes dans les conditions « Contrôle », « Stress » et « Développement ». Dans la condition « Contrôle », aucune différence significative n'est observée entre les différents génotypes concernant la surface de la section basale de la hampe florale (Figure 67A et 67B). Après une semaine de croissance à 7°C pendant la phase végétative, la croissance radiale de la hampe florale du type sauvage ainsi que des mutants *sweet* n'est pas affectée (Figure 67A). Dans la condition « Développement » dans laquelle la majorité du développement de la plante a lieu à 7°C, on mesure une augmentation significative de la surface radiale de la hampe chez le type sauvage ainsi que chez les mutants *sweet* (Figure 67B). Cette augmentation est de l'ordre de 3 fois pour le type sauvage et le double mutant *sweet11sweet12*, de 2.1 fois pour le double mutant *sweet16sweet17*, et de 4.2 fois pour le quadruple mutant (Figure 67B).



**Figure 67 : Effet d'une période de croissance à 7°C sur le développement de la hampe florale chez les différents génotypes**

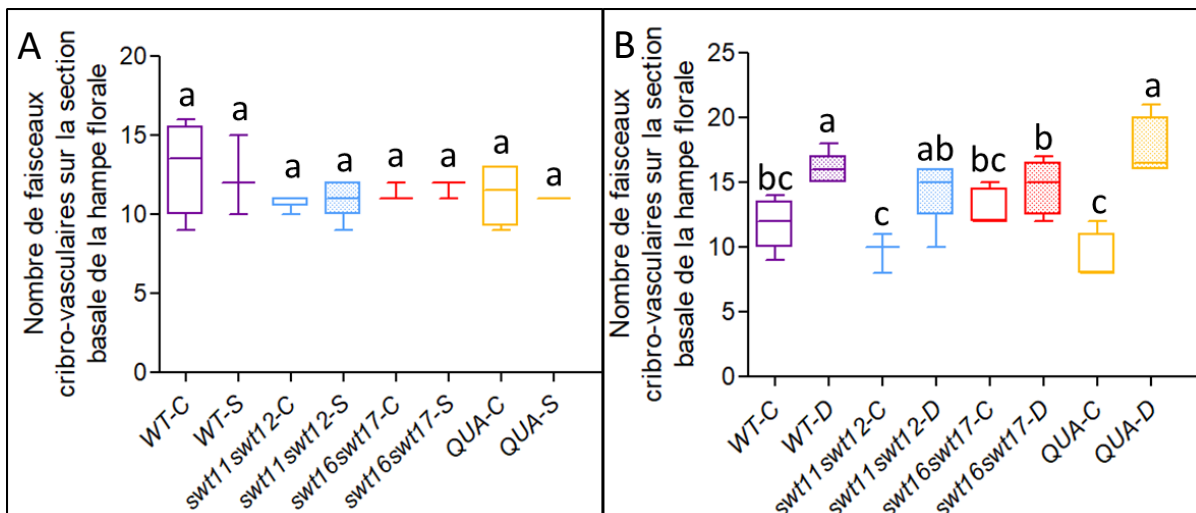
Représentation graphique sous forme de boîtes à moustaches de la surface moyenne de la section basale de la hampe florale ( $\mu\text{m}^2$ ) du WT, des doubles mutants *swt11swt12*, *swt16swt17* et du quadruple mutant en condition « Contrôle » (noté C) et condition « Stress » (noté S) (A). Comparaison entre la condition « Contrôle » et la condition « Développement » (noté D) (B). Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey afin de comparer l'ensemble des facteurs (génotype et condition de culture). Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 4$ ).



1.2.2 Impact sur le développement du système vasculaire de la hampe florale

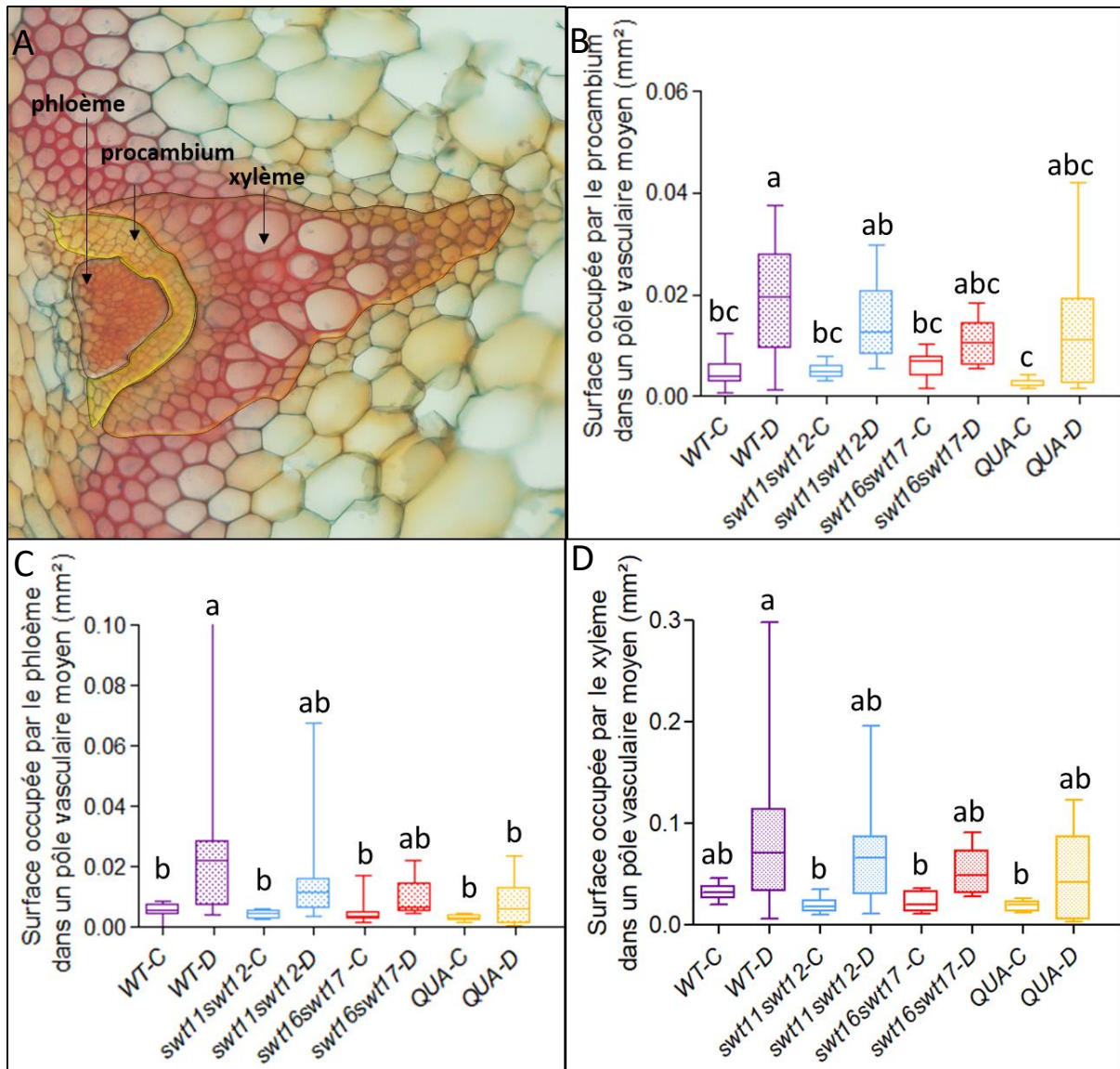
L'impact sur le développement du système vasculaire de la hampe florale de l'application d'une température de 7°C durant le stade végétatif a également été évalué en comptant le nombre de faisceaux cribro-vasculaires par section basale de hampe florale (Figure 68) ainsi qu'en mesurant l'aire occupée par le phloème, le procambium et le xylème (Figure 69).

Le nombre moyen de pôles cribro-vasculaires est identique quels que soient le génotype et la condition analysés (Figure 68A). En revanche, une augmentation significative du nombre de pôles chez le type sauvage entre les conditions « Contrôle » et « Développement » est observée (Figure 68B). Cette augmentation est également observée chez le double mutant *swt11swt12* et le quadruple mutant mais pas chez le double mutant *swt16swt17* (Figure 68B).



**Figure 68 : Impact d'une période de croissance à 7°C sur le développement de la hampe florale chez les différents génotypes**

Représentation graphique sous forme de boîtes à moustaches du nombre moyen de faisceaux cribro-vasculaires contenus dans une section basale de la hampe florale ( $\mu\text{m}^2$ ) du WT, des doubles mutants *swt11swt12*, *swt16swt17* et du quadruple mutant en condition « Contrôle » (noté C) et condition « Stress » (noté S) (A) et en condition « Contrôle » (noté C) et en condition « Développement » (noté D) (B). Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey afin de comparer l'ensemble des facteurs (génotype et condition de culture). Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n \geq 4$ ).



**Figure 69:** Impact d'une période de croissance à 7°C sur le développement du phloème, du procambium et du xylème de la hampe florale chez les différents génotypes

Photographie d'un faisceau cribro-vasculaire indiquant les surfaces mesurées (A). Représentation graphique des résultats sous forme de boîtes à moustache avec les mesures des surfaces du procambium (B), du phloème (C) et du xylème (D) dans un faisceau cribro-vasculaire moyen. Test statistique par analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey afin de comparer l'ensemble des facteurs (génotype et condition de culture). Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ( $P < 0.05$ ,  $n = 10-18$  pôles provenant de 3 plantes).

Afin d'approfondir les résultats concernant le phénotype observé dans la condition « Développement », des mesures de surfaces de tissus vasculaires ont été effectuées sur les différents génotypes (Figure 69).

Dans la condition « Contrôle » aucune différence significative de la surface occupée par le procambium n'a été observée entre les différents génotypes (Figure 69). Chez le type sauvage, une croissance prolongée à 7°C (condition « Développement ») induit une augmentation significative de la surface occupée par le procambium qui est cohérente avec l'augmentation de la surface de la hampe florale mesurée précédemment. Cependant cette augmentation n'est pas observée de façon significative chez les lignées mutées dans l'expression des *SWEETs* (Figure 69B).

La surface occupée par le phloème est identique chez tous les génotypes en condition « contrôle ». (Figure 69C). Chez le type sauvage une augmentation significative de la surface occupée par le phloème est mesurée dans la condition « Développement ». En revanche, aucune différence de ce type n'a été observée chez les doubles mutants et le quadruple mutant (Figure 69C). Enfin, les mesures de la surface occupée par le xylème ne varient pas quels que soient le génotype et la condition analysés (Figure 69D).

L'analyse des résultats de cette partie est encore en cours mais au vu de ces premières observations, il serait intéressant, afin de mieux appréhender les conséquences d'une modification du transport facilité des sucres sur la réponse de la plante à une croissance prolongée à 7°C, de calculer la proportion occupée par l'ensemble des tissus vasculaires dans la surface radiale de la hampe.

## 2. Réponse d'*Arabidopsis thaliana* à une forte salinité du sol

Dans l'équipe, des travaux ont également été réalisés sur l'impact d'une forte concentration en sel du sol sur le développement et la croissance de la hampe florale chez *Arabidopsis thaliana*. Ces travaux ont été conduits dans le cadre de la thèse de Sahar Sellami sous la direction du Dr. Sylvie Dinant. Ces travaux ont fait l'objet de 2 publications dont une à laquelle j'ai été associée en tant que co-auteur. La publication est disponible à la fin de ce chapitre.

### 2.1. Résumé de la publication scientifique

L'adaptation des plantes aux stress abiotiques fait intervenir des processus développementaux et physiologiques. Cependant, les mécanismes adaptatifs impliqués dans la réponse à une forte salinité des sols durant la croissance reproductive sont à ce jour peu connus. Afin d'étudier l'impact d'une forte salinité sur la croissance de la plante au stade reproducteur, la plante halophyte *Thellungiella salsuginea* et trois accessions d'*Arabidopsis thaliana* connues pour leur tolérance ou leur sensibilité au stress salin ont été étudiées. De nombreux paramètres quantitatifs associés à la croissance de la hampe florale et à la quantité de sucre contenus dans cet organe ont été choisis. Les mesures ont été effectuées sur des plantes soumises à un stress salin, avec ou sans acclimatation, appliqué au cours de la phase reproductive. Les résultats obtenus montrent que la croissance de la hampe florale de *Thellungiella salsuginea* n'est pas affectée par le stress salin. A l'inverse, l'application d'un stress salin entraîne des perturbations morphologiques et physiologiques chez les trois accessions d'*Arabidopsis thaliana*, avec une variabilité naturelle dans l'effet du stress salin sur la croissance, le contenu en sucres et l'anatomie de la hampe florale. En réponse à de fortes concentrations en sel, un phénotype *irx* (*irregular xylem vessel*) de vaisseaux collapsés a été observé, indépendamment de la tolérance des différentes accessions au stress salin. En revanche, le diamètre des vaisseaux les plus larges est réduit chez les accessions les plus tolérantes. La hauteur de la hampe florale, le taux de croissance, le ratio hexoses/saccharose et le ratio phloème/xylème ont également été impactés. Les résultats présentés dans cet article ont mis en évidence que de nombreux paramètres quantitatifs de la tolérance au stress salin sont associés au contrôle de la croissance de la hampe florale et à l'ajustement du ratio phloème sur xylème.

#### 2.2. Contribution personnelle

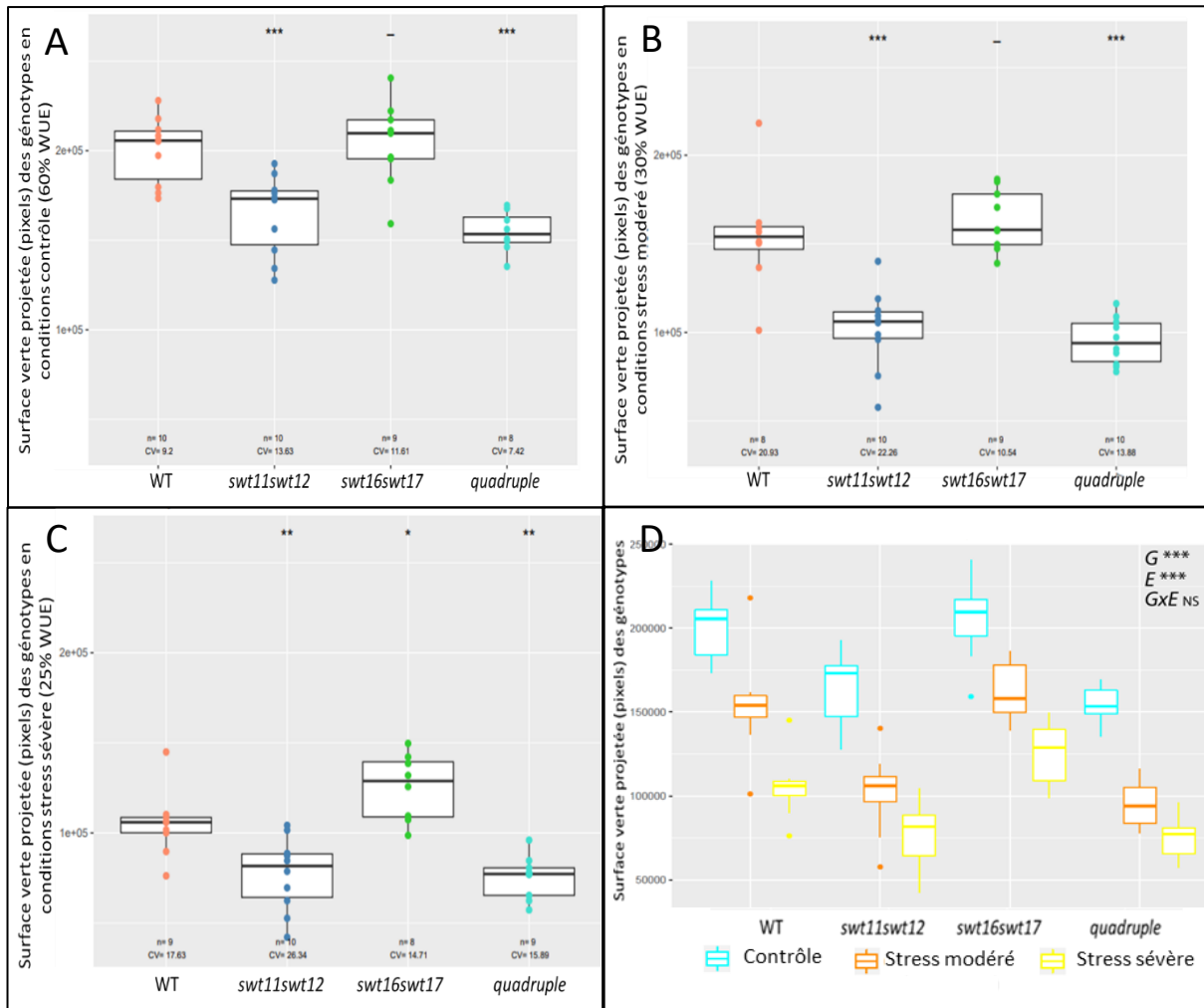
Dans le cadre de cet article scientifique, j'ai contribué à générer les sections basales de hampe florale des différentes accessions dans les différentes conditions environnementales qui ont été analysées par la suite. De plus, compte tenu de l'expertise acquise durant ma thèse concernant les méthodes d'analyse du système vasculaire et l'analyse de ce type de résultats, j'ai également participé à la discussion scientifique concernant les modifications de phénotype observées au niveau du système vasculaires chez les différentes accessions.

#### 3. Réponse des mutants *sweets* face à la sécheresse

Afin d'évaluer si une perturbation de l'allocation carbonée dans le système vasculaire impacte le développement des plantes en conditions de stress hydrique, une analyse phénotypique des plantes sauvages, des doubles mutants et du quadruple mutant a été réalisée grâce au phénoscope présent sur la plateforme de l'Observatoire du Végétal en collaboration avec Olivier Loudet, Elodie Gilbault et Zeyun Xue de l'équipe Variabilité et Tolérance aux stress abiotiques à l'IJPB. Les plantes, cultivées en jours courts, ont été soumises à trois conditions de croissance : (1) une condition « contrôle » pour laquelle le contenu en eau de la motte est de 60% SWC (Soil Water Content), (2) une condition « stress modéré » pour laquelle le contenu en eau de la motte est de 30% SWC et (3) une condition « stress sévère » pour laquelle le contenu en eau de la motte est de 25% SWC. En effet, le dispositif du phénoscope permet d'ajuster le contenu en eau très précisément pour chaque motte individuelle. Dans cette expérience les plantes ont été cultivées en conditions de jours courts et c'est la croissance de la rosette, des plantes de type sauvage, des doubles mutants *swt11swt12*, *swt16swt17* et du quadruple mutant *swt11swt12swt16swt17*, qui a été quantifiée grâce à la mesure des surfaces vertes projetées au cours du temps.

##### 3.1. Impact de la sécheresse sur la croissance de la rosette

Une cinétique de croissance a été réalisée en mesurant la surface verte projetée de la rosette du 1<sup>er</sup> jour après semis jusqu'au 23<sup>ème</sup> jour, jour de prélèvement du matériel végétal. Un test statistique de type ANOVA et un post-test de Tukey ont été réalisés sur ce jeu de données afin de comparer les phénotypes des lignées dans chacune des conditions. Les résultats présentés ci-dessous correspondent aux mesures de surface verte projetée le 23<sup>ème</sup> jour de croissance (Figure 70).



**Figure 70** : Impact d'un stress hydrique sur la surface verte projetée chez les différents génotypes

Représentation graphique sous forme de boîtes à moustaches des surfaces vertes projetées au 23<sup>ème</sup> jour de croissance des plantes de type sauvage (WT), des doubles mutants *swt11swt12* et *swt16swt17* et du quadruple mutant en condition « contrôle » (A), en condition de « stress modéré » (B) et en condition de « stress sévère » (C). Sur les panels (A), (B) et (C), le test statistique est une ANOVA à un facteur par rapport au type sauvage (\*\*\*  $P < 0.001$  ; \*\*  $P < 0.01$  ; \*  $P < 0.05$  ; - = NS; n= nombre de plante ; CV = coefficient de variations). Surface verte projetée des génotypes en fonction de la condition de croissance (D). Le test statistique est une ANOVA à deux facteurs dont le résultat est présenté en haut à droite du graphe avec G pour Génotype, E pour Environnement et GxE pour l'interaction entre Génotype x Environnement.



Dans la condition « Contrôle », les surfaces vertes projetées du double mutant *swt11swt12* et du quadruple mutant sont significativement plus petites que celles du type sauvage dans chaque condition de culture (Figure 70A, B et C). Ce résultat est en accord avec ceux précédemment obtenus sur des plantes cultivées en jours longs (cf Chapitre 1). La surface verte projetée du double *swt16swt17* est quant à elle différente de celle du type sauvage uniquement dans la condition « stress sévère » (Figure 70A, B et C). Si l'on compare les mesures réalisées dans les différentes conditions de croissance, on observe que plus le stress hydrique est sévère et plus la surface verte projetée des plantes de type sauvage diminue (Figure 70D). La même tendance est également observée chez les lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEETS* (Figure 70D). Ainsi le résultat de l'ANOVA à deux facteurs montre l'existence d'un effet significatif pour le génotype, l'environnement mais pas pour l'interaction entre le génotype de l'environnement (Figure 70D).

#### 3.2. Impact de la sécheresse sur le métabolisme de la rosette

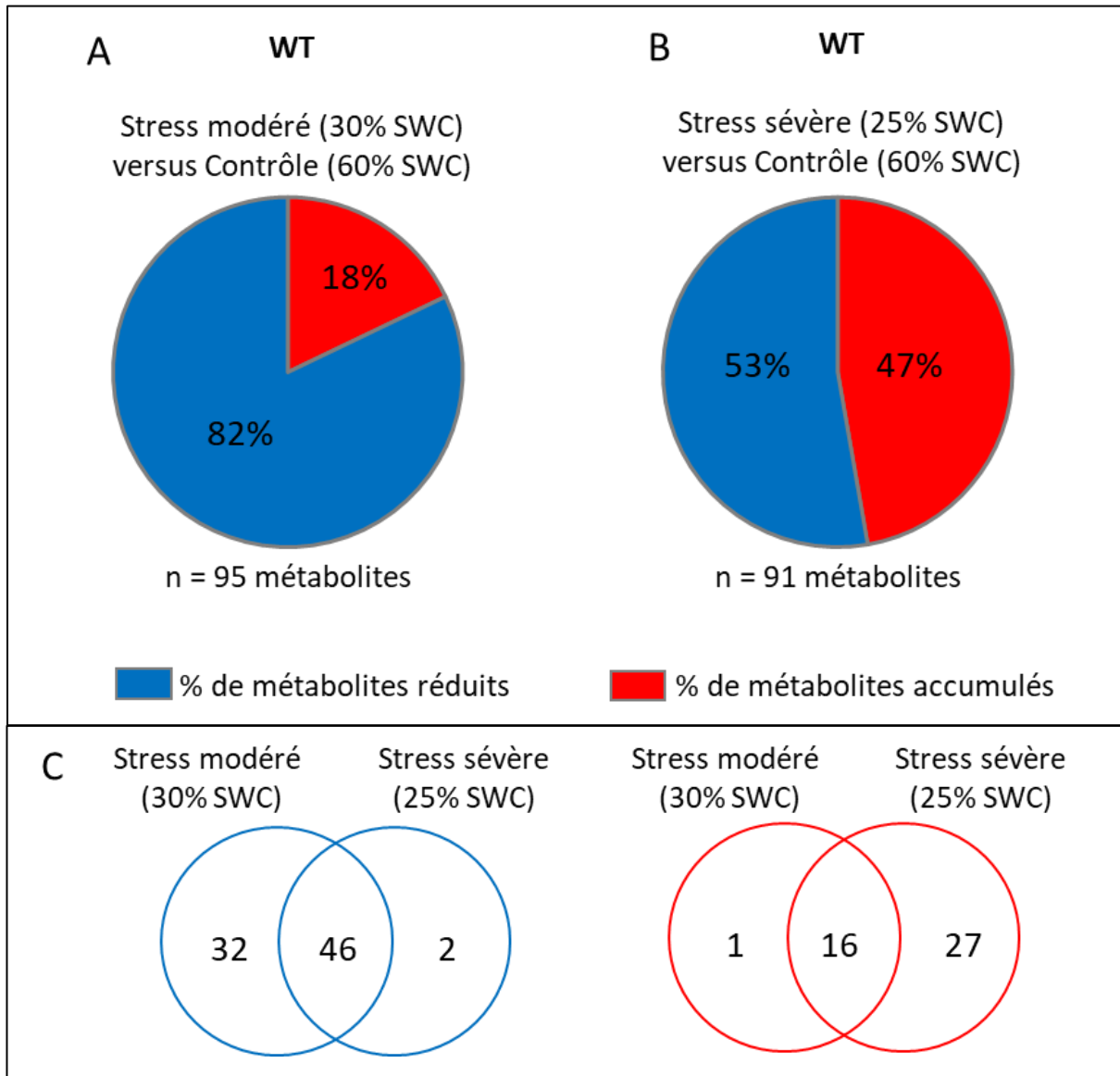
Une analyse métabolomique a ensuite été réalisée, en collaboration avec Gilles Clément de la plateforme de Chimie/Métabolisme de l'Observatoire du végétal (IJPB), sur les rosettes des plantes de type sauvage (WT), des doubles mutants *swt11swt12* et *swt16swt17* ainsi que du quadruple mutant dans les trois conditions de culture. Contrairement à l'analyse effectuée dans le cadre du Chapitre 1, cette analyse a permis de quantifier de façon absolue le contenu des différents métabolites. L'analyse de ce jeu de données est conséquente et n'est donc pas encore finalisée, mais dans le cadre de ce manuscrit de thèse j'ai choisi de concentrer mon analyse sur la comparaison entre les rosettes de type sauvage et celle du quadruple mutant dans les différentes conditions de culture.

#### 3.2.1 Impact d'un stress hydrique modéré et d'un stress hydrique sévère sur le métabolisme de la rosette des plantes de type sauvage

Afin d'évaluer l'effet d'un stress hydrique sur le métabolisme de la rosette de plantes sauvages, j'ai comparé les données métabolomiques obtenues dans la condition « contrôle » avec celles obtenues dans les conditions de « stress modéré » et « stress sévère ». J'ai ensuite réalisé un test *t* de Student sur les moyennes des quantités de chaque métabolite identifié (soit un total de 220 métabolites). Seuls les métabolites significativement accumulés ou réduits ont été ensuite analysés.

La Figure 71 présente le pourcentage de métabolites accumulés ou réduits en condition de stress modéré (Figure 71A) ou de stress sévère (Figure 71B) comparé à la condition contrôle chez une plante de type sauvage. Parmi les 220 métabolites identifiés, 95 métabolites sont présents en quantité significativement différente en condition de stress modéré contre 91 en condition de stress sévère soit 43% et 41% par rapport au nombre total de métabolites. On remarque qu'en condition de stress modéré, le contenu pour 82% des métabolites est réduit alors que le contenu pour 18% des métabolites est augmenté (Figure 71A). Dans le cas d'un stress sévère une accumulation de 47% de métabolites et une réduction de 53% de métabolites sont observés. Il semblerait donc que, bien que le nombre total de métabolites pour lesquels les différences sont significatives soit quasiment identique entre les deux conditions, un stress modéré et un stress sévère entraîne des perturbations métaboliques différentes.

Afin d'analyser plus finement ces différences, j'ai comptabilisé le nombre de métabolites réduits (cercles bleus) ou accumulés (cercles rouges) par condition environnementale. Certains métabolites sont spécifiquement accumulés ou réduits dans une condition et d'autres sont communs aux deux conditions de stress (Figure 71C). On remarque que parmi les 82% de métabolites réduits en condition de stress modéré, 32 métabolites sont spécifiquement réduits dans cette condition et 46 le sont dans les deux conditions. De façon intéressante, parmi les 53% de métabolites réduits en conditions de stress sévère, seulement 2 métabolites sont spécifiquement réduits dans cette condition. A l'inverse, parmi les 18% de métabolites accumulés en conditions de stress, seul 1 métabolite l'est uniquement dans cette condition alors que 16 métabolites le sont dans les deux conditions. En cas de stress sévère, 47% de métabolites sont accumulés dont 27 métabolites uniquement dans cette condition (Figure 71C).



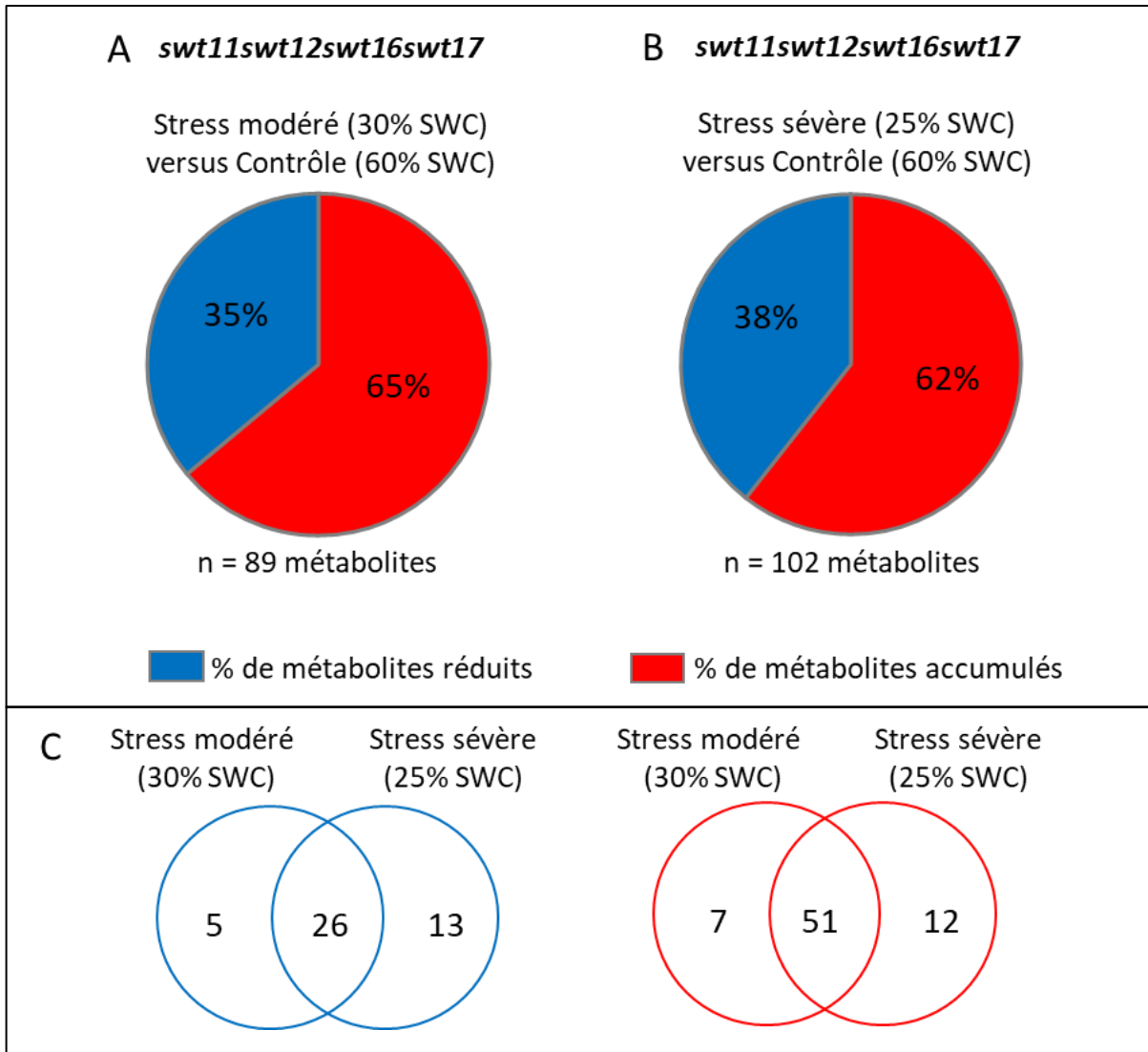
**Figure 71 : Modifications métabolomiques de la rosette des plantes de type sauvage soumises à un stress hydrique**

Les diagrammes en secteurs présentent le le pourcentage de métabolites significativement accumulés ou réduits dans la comparaison entre les conditions « contrôle » et « stress modéré » (A) ou entre les conditions « contrôle » et « stress sévère » (B). Diagramme de Venn du nombre de métabolites réduits (en bleu) et du nombre de métabolites accumulés (en rouge) entre les deux conditions de stress (C). Dans chaque cercle, le nombre indique les métabolites dont le contenu est spécifiquement modifié dans la condition analysée. Le nombre présent à l'intersection des deux cercles indique le nombre de métabolites communs entre les deux conditions.

#### 3.2.2 Impact d'un stress hydrique modéré et d'un stress hydrique sévère sur le métabolisme de la rosette du quadruple mutant

J'ai également analysé le comportement du quadruple mutant en condition de stress hydrique (Figure 72). On remarque que parmi les 220 métabolites identifiés, les contenus de 89 métabolites sont significativement différents entre les conditions « contrôle » et « stress modéré » soit 40,5% de la totalité des métabolites identifiés (Figure 72A). De plus, 102 métabolites le sont en condition de stress sévère comparée à la condition « contrôle » soit un pourcentage de 46% (Figure 72B). Parmi les métabolites pour lesquels on observe des différences significatives entre la condition de « stress modéré » et la condition « contrôle », 65% sont accumulés en condition de « stress modéré » contre 35% réduits (Figure 72A). En condition de « stress sévère », les proportions sont sensiblement identiques avec 62% de métabolites accumulés contre 38% réduits (Figure 72B).

Si on compare les différences observées chez une plante sauvage et un quadruple mutant, on constate que globalement le même pourcentage de métabolites est impacté par un stress hydrique mais les proportions de métabolites accumulés ou réduits sont très différentes. En effet, chez une plante sauvage, la majorité des métabolites impactés par un stress hydrique modéré sont réduits (82%, Figure 71) alors que chez le quadruple mutant, plus de deux tiers sont accumulés (65%, Figure 72A). De plus, chez une plante sauvage, un stress hydrique sévère entraîne une accumulation de 47% des métabolites impactés (contre 18% en condition de stress modéré), alors que chez le quadruple mutant, ces proportions sont sensiblement similaires entre les deux conditions de stress. Parmi les métabolites réduits en condition de stress (modéré ou sévère), 26 d'entre eux le sont dans les deux conditions de stress, alors que 5 d'entre eux sont uniquement réduits en condition de stress modéré contre 13 en condition de stress sévère (Figure 72C). Concernant le nombre de métabolites accumulés, 51 d'entre eux sont retrouvés accumulés dans les deux conditions de stress alors que 7 d'entre eux le sont spécifiquement en condition de stress modéré et 12 en condition de stress sévère.



**Figure 72 : Modifications du métabolome de la rosette du quadruple mutant soumise à un stress hydrique**

Les diagrammes en secteurs présentent le pourcentage de métabolites significativement accumulés ou réduits dans la comparaison entre les conditions « contrôle » et « stress modéré » (A) ou entre les conditions « contrôle » et « stress sévère » (B). Diagramme de Venn du nombre de métabolites réduits (en bleu) et du nombre de métabolites accumulés (en rouge) entre les deux conditions de stress (C). Dans chaque cercle, le nombre indique les métabolites dont le contenu est spécifiquement modifié dans la condition analysée. Le nombre présent à l'intersection des deux cercles indique le nombre de métabolites variant de façon similaire dans les deux conditions.

#### 3.2.3 Identification des métabolites impliqués dans la réponse au stress hydrique chez le WT et le quadruple mutant

Afin de comparer et mieux visualiser les modifications métaboliques engendrées par un stress hydrique chez le WT et chez le quadruple mutant, j'ai replacé les métabolites identifiés par l'analyse réalisée dans les paragraphes 3.2.1 et 3.2.2 sur un schéma regroupant les grandes voies métaboliques d'une cellule végétale (Figure 73).

##### ➤ La glycolyse

On observe une accumulation significative de saccharose chez le type sauvage uniquement en situation de stress sévère alors qu'une accumulation de saccharose est observée chez le quadruple mutant en condition de stress hydrique modéré et sévère. Chez le quadruple mutant une accumulation de glucose et de fructose en situation de stress modéré est également mesurée (Figure 73). On observe également une réduction des sucres phosphates chez les deux génotypes dans les deux conditions de stress hydrique. En revanche la quantité de pyruvate n'est pas impactée lorsque les plantes sont soumises à une réduction en eau du sol.

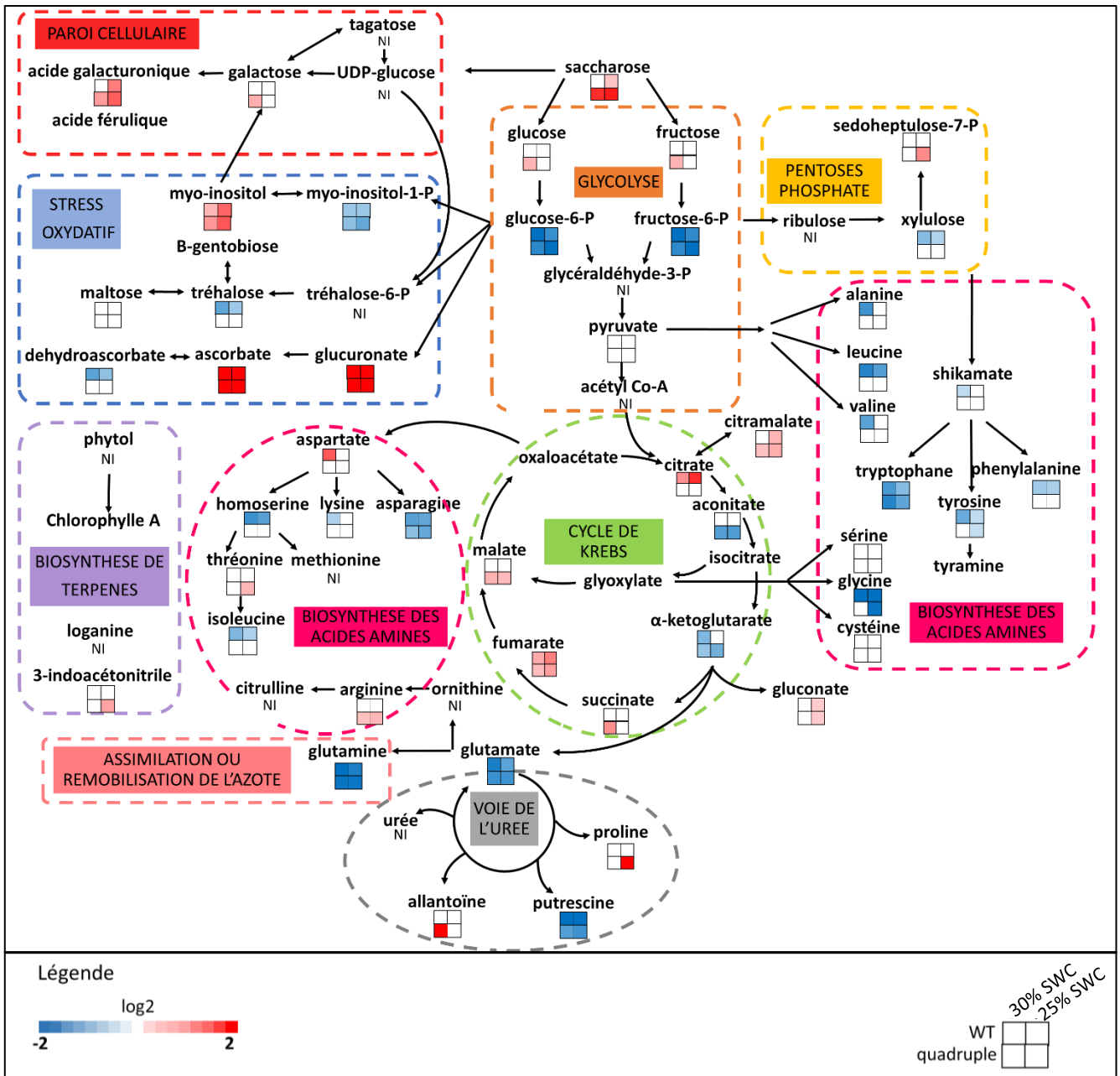
##### ➤ Voie des pentoses phosphate

Une réduction du contenu en xylulose est observée chez le type sauvage quelle que soit l'intensité du stress alors qu'aucune modification pour ce métabolite n'est mesurée chez le quadruple mutant. Le sédoheptulose-7-phosphate n'est quant à lui pas impacté chez le type sauvage quelle que soit l'intensité du stress et chez le quadruple mutant en condition de stress modéré. En revanche, il est accumulé chez le quadruple mutant en condition de stress sévère (Figure 73).

##### ➤ Voie de biosynthèse des polysaccharides de paroi

Concernant les sucres intermédiaires de la voie de biosynthèse des polysaccharides de paroi, on observe une accumulation de galactose uniquement chez le quadruple mutant en condition de stress modéré. De plus, on observe une accumulation de l'acide galacturonique et de l'acide glucuronique (glucuronate) en condition de stress hydrique modéré et sévère chez le type sauvage ainsi que chez le quadruple mutant. (Figure 73).





**Figure 73 : Variations des contenus en métabolites en réponse un stress hydrique chez le type sauvage et le quadruple mutant**

Représentation schématique des principales voies de biosynthèse du métabolisme primaire dans une cellule végétale. Les résultats des analyses métabolomiques sont représentés sous forme de carte des chaleurs sous chaque métabolite correspondant à une accumulation (en rouge) ou une réduction (en bleu) du métabolite chez un génotype (WT ou quadruple mutant) en condition de stress (sévère ou modéré) comparé au génotype en condition contrôle. Les différences non significatives sont représentées en blanc. Chaque carré représente la valeur du Log2 des ratios des médianes entre la condition « contrôle » et la condition « stress modéré » ou « stress sévère » pour chaque génotype.

#### ➤ Le cycle de Krebs

Chez le type sauvage, le citrate, le citramalate et le fumarate sont accumulés lors d'un stress hydrique modéré et/ou sévère. A l'inverse, l' $\alpha$ -kétoglutarate est diminué en condition de stress modéré chez le WT. Concernant le quadruple mutant, on observe de nombreuses modifications des contenus en acides organiques du cycle de Krebs en conditions de stress hydrique. L'aconitate et l' $\alpha$ -kétoglutarate sont retrouvés en quantité réduites quelle que soit l'intensité du stress tandis que le gluconate, le succinate, le fumarate et le malate sont accumulés en conditions de stress hydrique chez le quadruple mutant (Figure 73).

#### ➤ Cycle de l'Urée

Le métabolite  $\alpha$ -kétoglutarate impliqué dans le cycle de Krebs est également un précurseur de la biosynthèse de glutamate, un acide aminé essentiel dans la voie de l'urée. Le glutamate et la putrescine sont retrouvés en quantités réduites dans la rosette du WT et du quadruple mutant quelle que soit l'intensité du stress hydrique. En situation de stress, l'accumulation de proline constitue un marqueur majeur de la réponse de la plante (Rana et al., 2017). Dans cette expérience, aucune variation du contenu en proline n'a été mesurée chez le type sauvage en réponse au stress à cause d'un problème technique lié à la stabilité du dérivé de proline lors de cette expérience. On remarque également que, contrairement aux résultats de l'analyse métabolique de la hampe florale présentés dans le Chapitre 1, le contenu de la majorité des acides aminés est réduit chez le WT et le quadruple mutant quelle que soit l'intensité du stress hydrique. Ainsi, seul l'aspartate est accumulé chez le WT alors que l'arginine et la thréonine sont accumulés chez le quadruple mutant.

#### ➤ Métabolites impliqués dans le stress oxydatif

Le contenu en métabolites impliqués dans le stress oxydatif est également impacté par l'application d'un stress hydrique. Le type sauvage est le plus impacté avec une réduction du déhydroascorbate, du tréhalose et du myo-inositol-1-phosphate et une accumulation de glucuronate, un intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'ascorbate. On mesure également une accumulation d'ascorbate et de myo-inositol quelle que soit l'intensité de stress. De la même manière, le quadruple mutant accumule du glucuronate, de l'ascorbate et du myo-inositol alors que l'intermédiaire de la voie de biosynthèse du myo-inositol, le myo-inositol-1-phosphate, est réduit en conditions de stress hydrique.

#### ➤ Voie de biosynthèse des terpènes

Parmi les terpènes représentés sur ce schéma, seul le 3-indoacétonitrile est accumulé chez le quadruple mutant en condition de stress sévère. Les autres métabolites secondaires n'ont pas pu être identifiés en GC-MS.

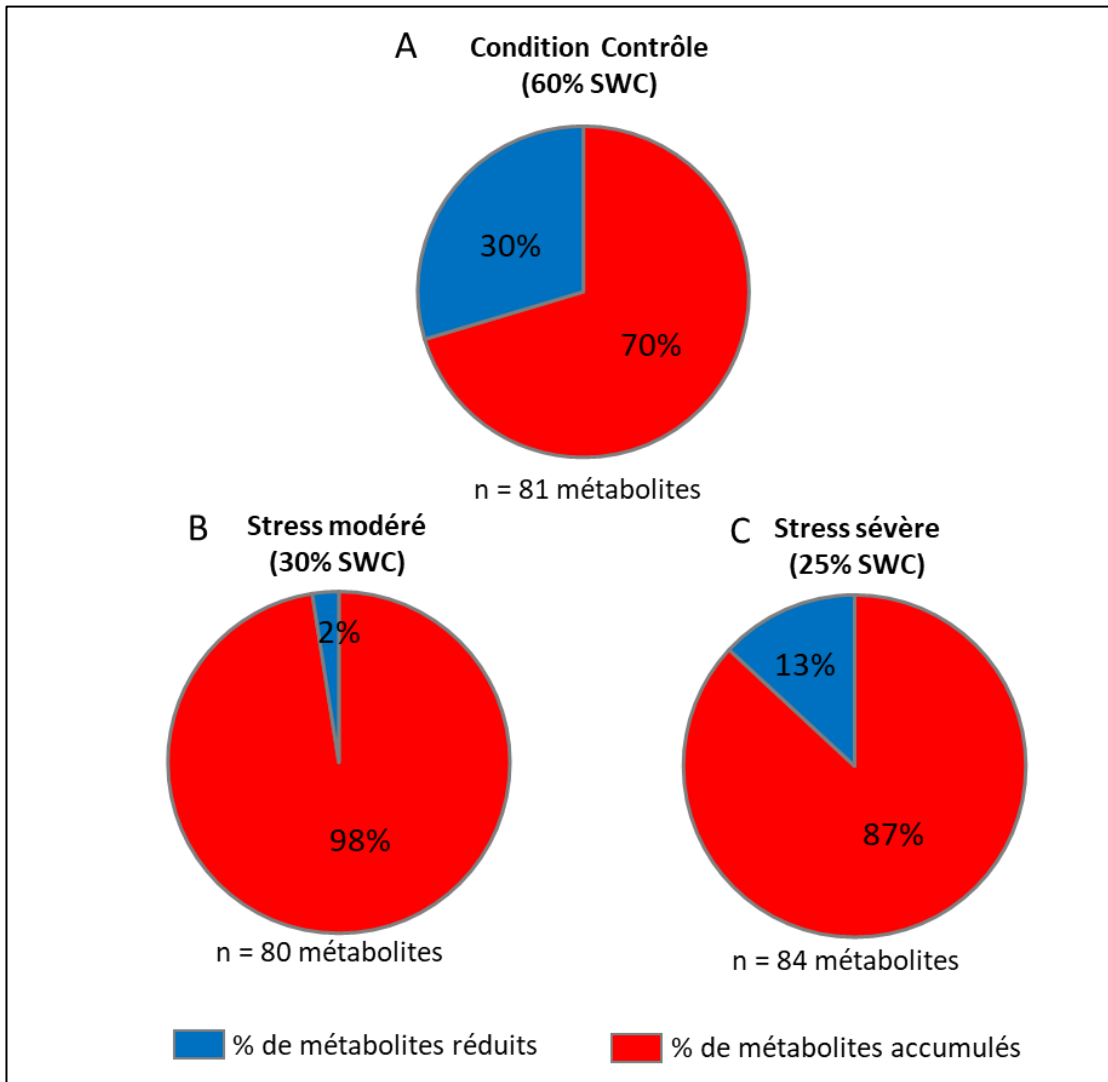
On peut donc en conclure que les modifications métaboliques observées dépendent non seulement de l'intensité du stress mais également du génotype analysé. Parmi les métabolites communs répondant de la même façon à un stress hydrique chez les deux génotypes, on retiendra notamment, les métabolites liés au stress oxydatif dont la quantité augmente et plusieurs acides aminés dont la quantité diminue (glutamine glutamate, asparagine, tryptophane). Afin d'évaluer l'implication des gènes *SWEETs* dans la réponse de la plante à une réduction en eau du sol, une seconde analyse statistique a été réalisée afin de comparer les deux génotypes pour chaque condition de culture.

#### 3.2.4 Identification des métabolites impliqués dans la réponse à une réduction du contenu en eau du sol chez le quadruple mutant

Compte tenu des résultats précédemment décrits, on remarque qu'un stress hydrique modéré et un stress sévère n'impacte pas de la même manière une plante sauvage et le quadruple mutant. Cependant, ces comparaisons ne permettaient pas d'évaluer l'impact de la mutation des gènes *SWEETs* sur la réponse de la plante à une réduction du contenu en eau du sol. Pour aborder cette question, j'ai comparé les données métabolomiques obtenues chez le quadruple mutant à celles du type sauvage pour chaque condition de croissance (i.e. contrôle, stress modéré et stress sévère). La Figure 74 présente les proportions de métabolites accumulés et de métabolites diminués du quadruple mutant comparé au sauvage pour chaque condition (contrôle, stress modéré et stress sévère). On remarque qu'en condition contrôle, parmi les 220 métabolites identifiés 80 métabolites sont significativement différemment représentés dans les deux génotypes (soit plus de 36%) et sont donc impactés par la mutation des gènes *SWEET*. Parmi ces métabolites, 70% sont accumulés alors que 30% sont réduits (Figure 74A).

### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 3

En condition de stress hydrique modéré et sévère, il y a sensiblement le même nombre de métabolites impactés avec 81 en condition de stress modéré et 84 en condition de stress sévère. Des différences sont, en revanche, observées quant aux proportions de métabolites accumulés et réduits. Ainsi, en condition de stress hydrique modéré, seuls 2% des métabolites sont réduits tandis que 98% des métabolites sont accumulés. En condition de stress hydrique sévère, 87% sont accumulés contre seulement 13% réduits (Figure 74A et B).

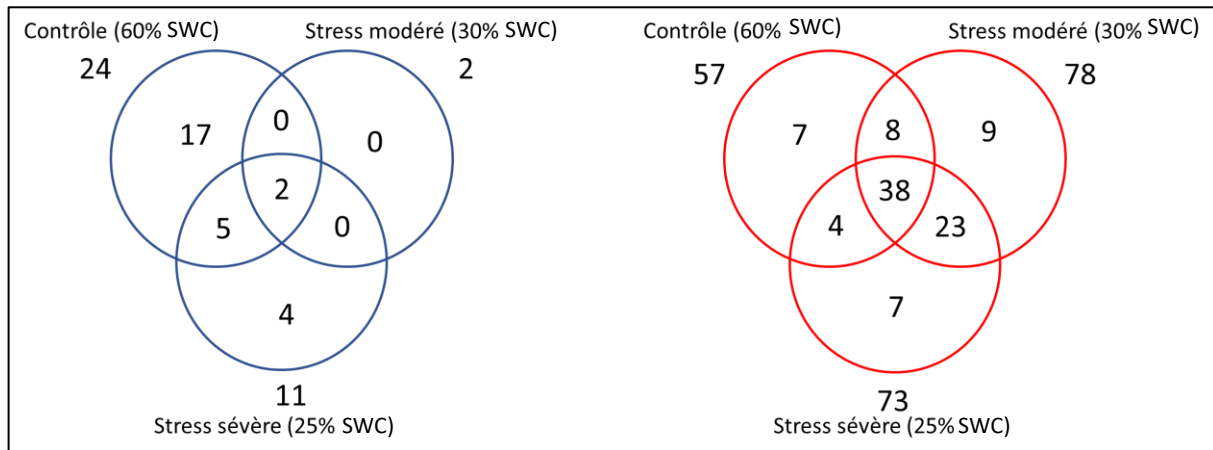


**Figure 74 :** Comparaison des modifications du métabolome de la rosette entre le type sauvage et le quadruple mutant dans chaque condition de culture

Les diagrammes en secteurs représentent le pourcentage du nombre de métabolites accumulés et réduits parmi les métabolites pour lesquels la valeur de  $t$  du test de Student est inférieure à 0,05. Comparaison entre le quadruple mutant et le WT dans la condition « Contrôle » (A) ; dans la condition « stress modéré » (B) et dans la condition « stress sévère » (C). Le nombre total de métabolites dont le contenu est significativement différent est présenté en dessous de chaque diagramme en secteurs.

### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 3

Parmi les métabolites dont le contenu est réduit chez le quadruple mutant, 24 métabolites sont réduits en condition contrôle, seulement 2 le sont en condition de stress modéré et 11 le sont en condition de stress sévère (Figure 75). On remarque également que seulement 2 métabolites sont communs aux trois conditions de cultures ; il s'agit de l'anhydroglucose et de l'urate. De plus, 17 métabolites sont spécifiquement réduits dans la condition « contrôle » chez le quadruple mutant par rapport au type sauvage mais ne sont pas impactés par un stress hydrique modéré ou sévère. Enfin, 4 métabolites sont spécifiquement réduits en condition de stress hydrique modéré ou sévère. Enfin, 4 métabolites sont spécifiquement réduits en condition de stress hydrique sévère : deux acides gras l'acide linoléique, l'acide linoléique, et le maltotriose et la spermidine. La spermidine a été précédemment décrit pour contribuer notamment à la tolérance à la sécheresse et au stress salin (Shi et al., 2014).



**Figure 75 : Répartition des métabolites accumulés de façon significativement différente entre le type sauvage et le quadruple mutant pour chaque condition de culture**

Diagramme de Venn du nombre de métabolites réduits (en bleu) ou accumulés (en rouge) en condition contrôle (cercle en haut à gauche), en condition de stress modéré (cercle en haut à droite) et en condition de stress sévère (cercle en bas centré). Les chiffres à l'extérieur des cercles représentent le nombre total de métabolites réduits (diagramme de droite en bleu) ou accumulés (diagramme de gauche en rouge) par condition de croissance. Les chiffres à l'intérieur des cercles représentent les nombres de métabolites réduits ou accumulés dans une seule condition, dans deux conditions ou dans les trois conditions.

### III. RESULTATS ET DISCUSSION – CHAPITRE 3

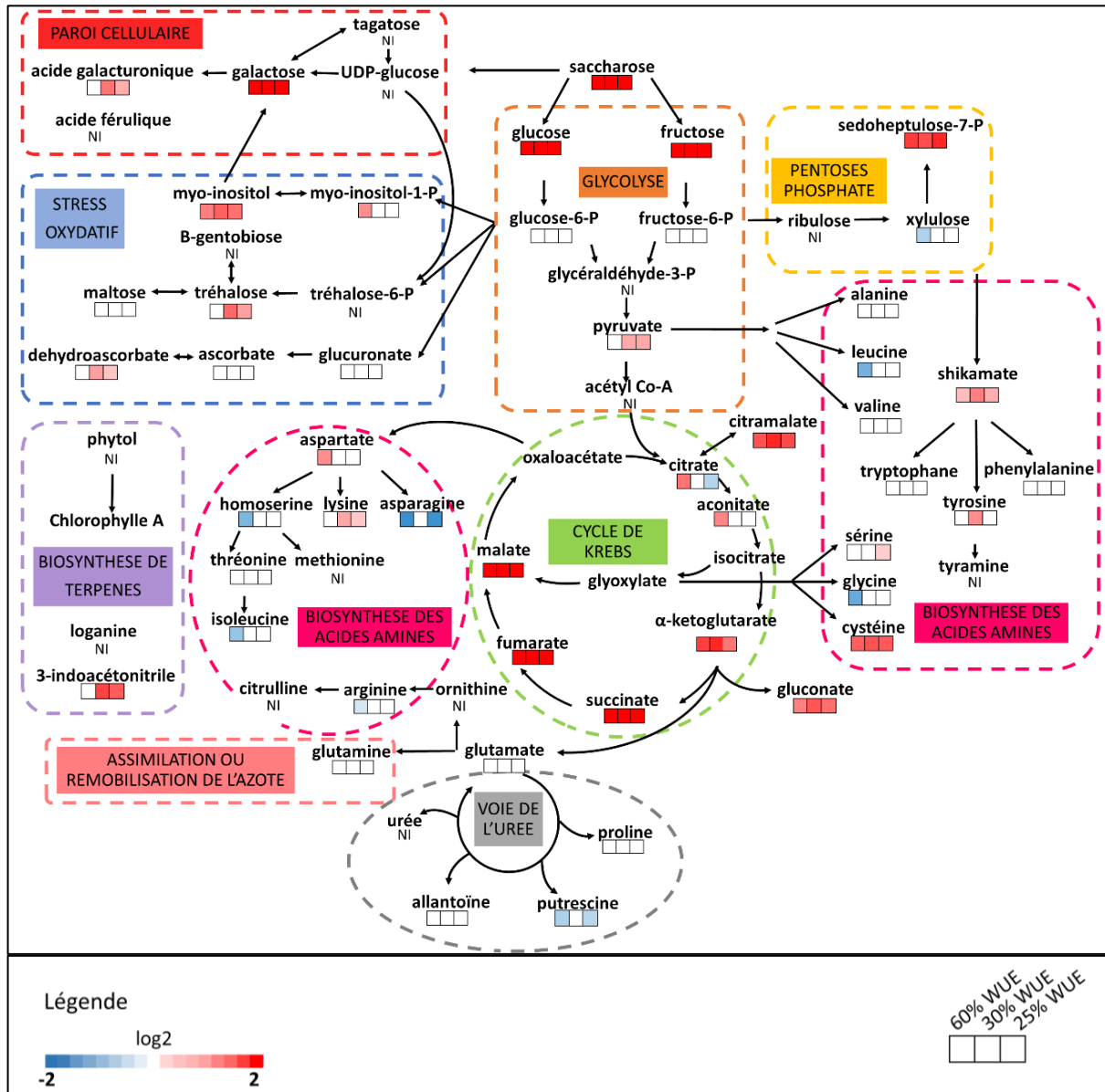
Concernant les métabolites accumulés, 57 le sont en conditions contrôle, 78 en condition de stress modéré et 73 en condition de stress sévère (Figure 75). 38 métabolites sont communs aux trois conditions. De plus, 8 métabolites sont communs à la condition contrôle et la condition de stress modéré alors que seulement 4 le sont entre la condition contrôle et la condition de stress sévère. Enfin, 23 métabolites sont communs aux deux conditions de stress. De façon intéressante, 9 métabolites sont spécifiquement accumulés chez le mutant en conditions de stress modéré et 7 en conditions de stress sévère.

La Figure 76 présente les voies métaboliques principales ainsi que les variations du contenu en métabolites entre le type sauvage et le quadruple mutant pour chaque condition de culture. On remarque tout d'abord une forte accumulation de sucres (saccharose, glucose, fructose, galactose, et sedoheptulose-7-P) chez le quadruple mutant dans les trois conditions de croissance. De la même manière, les acides organiques impliqués dans le cycle de Krebs (citramalate,  $\alpha$ -kéto-glutarate, gluconate, succinate, fumarate, et malate) sont fortement accumulés dans la rosette du quadruple mutant dans les trois conditions. Le citrate est quant à lui accumulé en condition contrôle mais réduit en condition de stress sévère (Figure 76).

Certains métabolites sont impactés chez le quadruple mutant uniquement en conditions de stress hydrique. En effet, l'acide galacturonique, le 3-indoacétonitrile, la lysine sont accumulés en condition de stress hydrique modéré et sévère. La tyrosine est quant à elle uniquement accumulée en condition de stress modéré alors que la sérine ne l'est qu'en condition de stress sévère. Enfin, le contenu en citrate est réduit en condition de stress sévère alors qu'il est accumulé chez le quadruple mutant en condition contrôle.

D'autres métabolites ne sont pas différemment accumulés chez le WT et le mutant quelles que soient les conditions environnementales. Il s'agit des métabolites issus de la biosynthèse de l'urée (allantoïne, proline), impliqués dans la biosynthèse d'acides aminés (alanine, valine, tryptophane, phénylalanine, thréonine) et dans la remobilisation ou l'assimilation de l'azote (glutamate et glutamine), ou enfin dans les processus de stress oxydatif (glucuronate, ascorbate, maltose) (Figure 76). Enfin, certains ne sont accumulés ou réduits que dans la condition contrôle tel que le xylulose, de nombreux acides aminés (leucine, glycine, arginine, isoleucine, homosérine, aspartate) ou le myo-inositol-1-P.





**Figure 76 :** Variations du contenu en métabolites en réponse un stress hydrique entre le type sauvage et le quadruple mutant

Représentation schématique des principales voies de biosynthèse du métabolisme primaire dans une cellule végétale. Les analyses métabolomiques sont représentées sous forme de carte des chaleurs sous chaque métabolite correspondant à une accumulation (en rouge) ou une réduction (en bleu) du métabolite entre le type sauvage et le quadruple mutant pour chaque condition de culture (contrôle, stress modéré et stress sévère). Les métabolites sans différence significative dans leur contenu sont représentés en blanc. Chaque carré représente la valeur du Log2 des ratios des médianes entre le type sauvage et le quadruple pour chaque condition de culture.

#### III. Discussion

Les végétaux sont soumis à de nombreuses contraintes environnementales telles que des variations de température, des variations de contenu en eau dans le sol (sécheresse ou engorgement des sols), des modifications de salinité des sols ou encore une élévation de la concentration en dioxyde de carbone dans l'air (Le Gall et al., 2015). Ces contraintes abiotiques influencent la croissance et le développement des plantes (Lemoine et al., 2013). Dans le cadre de ce chapitre, trois types de contrainte osmotique ont été étudiés chez les plantes de type sauvage et les lignées mutées dans l'expression des gènes *SWEETs*, qui présentent une perturbation des échanges de sucres dans le système vasculaire. Ainsi ces lignées ont été soumises à des températures négatives (-5°C et -7°C), à une température fraîche (7°C) et à une réduction du contenu en eau du sol (modérée et sévère). Ces analyses ont permis de mieux comprendre; (1) l'impact d'un stress hydrique sur le métabolisme de la plante, (2) l'impact d'une perturbation des gradients de sucres dans la réponse des plantes aux stress abiotiques et enfin (3) l'impact d'une température fraîche appliquée lors du stade végétatif sur le développement de la hampe florale en cas de perturbation ou non des échanges de sucres.

##### 1. Réponse des plantes face à une réduction prolongée en eau du sol

La sécheresse est la contrainte majeure rencontrée par les plantes au cours de leur croissance. Cette contrainte impacte la survie des végétaux et la productivité des plantes des grandes cultures à l'échelle mondiale. Chez *Arabidopsis thaliana*, bien que la réponse métabolique à une déshydratation soit plutôt bien décrite, les données concernant la réponse métabolique à une réduction de contenu en eau du sol restent limitées (Fabregas et Fernie, 2019). Lors d'un arrêt de l'arrosage des plantes pendant 6 jours consécutifs, une accumulation globale de sucres et d'acides aminés est observée (Fabregas et al., 2018). Les résultats obtenus ici, chez le type sauvage, montrent effectivement une accumulation de saccharose uniquement lorsque la plante est soumise à un stress de 25 % SWC mais une réduction importante du contenu en acides aminés. Ces différences pourraient être dues non seulement à la durée du stress appliqué mais également à son intensité. La comparaison avec les données publiées est difficile car dans les travaux décrits dans la littérature l'arrosage est complètement supprimé pendant plusieurs jours alors que dans nos conditions, le contenu en eau du sol est seulement fortement diminué. De plus l'utilisation du phénoscope permet à la plante de croître avec un contenu en eau du sol réduit pendant au moins 15 jours. Ainsi, les modifications métaboliques

observées dans nos conditions de culture reflètent le comportement des plantes en réponse à une contrainte hydrique prolongée.

Il est également décrit que les effets négatifs d'une contrainte de type sécheresse peuvent être partiellement dus à une diminution de l'absorption des minéraux dont l'azote (Zhang et al., 2018). Ainsi, une des composantes d'un stress hydrique pourrait être assimilable à une carence en azote et donc produire les mêmes conséquences métaboliques. Dans le cadre du dispositif expérimental développé sur la plateforme du phénoscope une compensation de la nutrition azotée est mise en place, limitant ainsi les problèmes de disponibilité en azote. Cependant, nos résultats montrent un contenu réduit pour la majorité des acides aminés (sauf pour l'aspartate), ce qui est en accord avec une diminution de l'absorption de l'azote dans ces plantes. Nous montrons également une augmentation globale des contenus en acides organiques ce qui sous-entend un défaut dans le fonctionnement du cycle de Krebs lié à un défaut d'absorption et/ou d'assimilation de l'azote. Cependant, des études précédentes chez l'orge et le colza montrent qu'en situation de carence azotée, bien qu'une diminution du contenu en acides aminés soit mesurée, aucune augmentation des contenus en acides organiques n'est observée (Avila-Ospina et al. 2017 ; Clément et al., 2017). La réponse de la plante à une contrainte en eau prolongée serait donc partiellement expliquée par une réponse de type « carence azotée ». Les modifications du fonctionnement du cycle de Krebs pourraient, quant à elles, refléter la réponse de la plante au stress osmotique engendré par la contrainte hydrique.

Parmi les voies métaboliques modifiées en situation de stress hydrique, une accumulation de composés impliqués dans la réponse à un stress oxydatif est communément observée (Koffler et al., 2014). Nos résultats montrent, effectivement, une accumulation importante de myo-inositol et de glucuronate, qui sont des intermédiaires de la biosynthèse d'ascorbate (Akram et al., 2017) dans les plantes de type sauvage soumises à un stress modéré et sévère.

## **2. Impact d'une perturbation du gradient des sucres sur la réponse des plantes aux stress abiotiques**

Le transport de sucres à longue et à courte distance joue également un rôle important dans la réponse des plantes face à un stress abiotique (Lemoine et al., 2013 ; Pommerrenig et al., 2018). Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, la dérégulation de l'expression des gènes *SWEET* induit, notamment, une meilleure résistance aux températures négatives (Klemens et al., 2013 ; Le Hir et al., 2015). Dans ce chapitre, nous confirmons par une autre technique une meilleure

résistance du double mutant *swt11swt12* à une période de gel à  $-5^{\circ}\text{C}$  mais également à  $-7^{\circ}\text{C}$ . De façon intéressante, le quadruple mutant est également plus résistant à  $-5^{\circ}\text{C}$  mais pas à  $-7^{\circ}\text{C}$  suggérant que l'ajout des mutations de *SWEET16* et *SWEET17* contrecarre l'effet positif dû à la suppression de l'expression de *SWEET11* et *SWEET12*. Compte tenu des résultats précédemment obtenus, il a été suggéré que cette meilleure résistance face aux températures négatives soit liée à l'accumulation de sucres dans les feuilles du double mutant *swt11swt12* (Chen et al., 2012 ; Le Hir et al., 2015). En effet, en condition de stress, les sucres sont impliqués dans les réponses au stress oxydatif (Hoekstra et al. 2001, Hengherr et al. 2008) et sont utilisés par les molécules réactives de l'oxygène pour leurs liaisons HO-C-H (Morelli et al., 2003). Ainsi, l'augmentation de la concentration en sucres dans une cellule en condition de stress sécheresse permettrait de réguler l'accumulation des molécules réactives de l'oxygène (Schieber et Chandel 2014). Au sein du système vasculaire, les échanges latéraux d'eau et de solutés organiques et inorganiques permettent d'assurer l'ajustement des besoins en eau et la coordination des flux de sèves en conditions de stress (Dinant, 2008 ; Aubry et al., 2019). Dans ce contexte, l'accumulation de sucres dans les parenchymes vasculaires pourrait participer à ces ajustements osmotiques comme cela a été décrit chez les arbres dans lors des problèmes de cavitation et d'embolie (Nardini et al., 2011). Dans le cadre de nos résultats, cette hypothèse semble vérifiée en réponse à une période de gel mais pas en réponse à un stress de type sécheresse. Ainsi, l'accumulation de sucres observée chez le quadruple mutant en réponse à un stress hydrique ne constitue ni un avantage ni un désavantage puisque la diminution de la croissance de la rosette est identique pour tous les génotypes. Chez *Arabidopsis thaliana*, le contrôle de l'homéostasie des sucres au sein du système vasculaire semble donc jouer un rôle plus important dans la réponse au gel qu'en réponse à un stress hydrique.

### **3. Impact d'une température fraîche sur le développement de la hampe florale en cas de perturbation ou non des échanges de sucres**

Chez *Arabidopsis thaliana*, il est connu depuis longtemps que la transition entre les stades végétatif et reproducteur est contrôlée par des changements environnementaux dont la température ambiante (Reeves et Coupland, 2000 ; Samach et Wigge, 2005). Cependant, l'effet d'une température fraîche sur la croissance et le développement de la hampe florale a été peu étudié (Antoun et Ouellet, 2013) contrairement à son effet sur l'anatomie du système vasculaire des feuilles chez différents écotypes d'*Arabidopsis thaliana* (Adams III et al., 2016 ; Stewart et al., 2016 ; Stewart et al., 2017). Ainsi, chez l'écotype Col-0, une plasticité de l'anatomie du

système vasculaire des feuilles a été mise en évidence lorsque les plantes sont cultivées à 8°C (Stewart et al., 2017). En effet, les feuilles présentent une plus grande capacité photosynthétique associée à un plus grand nombre de cellules phloémiennes (Stewart et al., 2017). Dans nos conditions de culture, les effets les plus prononcés sur le développement de la hampe florale ont été observés lorsque la croissance de la plante a eu lieu majoritairement à 7°C. Ainsi, cette condition induit un décalage de la floraison, une surface radiale plus grande de la hampe associée avec un nombre plus grand de faisceaux cribro-vasculaires, une augmentation de la surface du procambium et du phloème. Nos résultats sont donc cohérents avec les travaux précédents et suggèrent que les plantes de type sauvage pourraient également présenter une plasticité de l'anatomie du système vasculaire au niveau de la hampe florale afin d'accroître la capacité photosynthétique et ainsi pouvoir assurer la production de graines malgré les conditions défavorables de croissance.

De façon intéressante, la réponse des mutants *sweet* n'est pas similaire à celle du type sauvage concernant l'effet promoteur d'une température fraîche à 7°C sur la surface du procambium et du phloème. La localisation de l'expression des promoteurs des gènes *SWEETs* n'a pas été observée à 7°C mais en conditions normales de croissance. Cette expression est observée dans les cellules de parenchyme vasculaire de la hampe florale mais également des feuilles (Chen et al., 2012 ; Chardon et al., 2013 ; Klemens et al., 2013 ; Le Hir et al., 2015 ; Cayla et al., 2019). Ainsi, le transport facilité des sucres dans le système vasculaire de la hampe florale et des feuilles (intercellulaire et intracellulaire) semble important pour la réponse de la plante aux températures basses. Cependant des expériences complémentaires doivent être effectuées pour approfondir la connaissance du rôle des transporteurs *SWEETs* dans cette réponse. Notamment, des dosages de sucres solubles et d'amidon ainsi que des quantifications de l'expression de différents gènes marqueurs doivent être réalisés sur le même matériel que celui utilisé pour l'analyse anatomique.

Enfin il est important de noter que la diminution de la surface de la hampe florale observée chez les mutants *sweet* au cours des cultures analysées dans le Chapitre 2 n'a pas été observée dans le cadre des expériences présentées dans ce chapitre. Pour la culture à 7°C, les plantes ont été cultivées dans un phytotron équipé de LED alors que les plantes utilisées pour les mesures anatomiques ont été cultivées dans une chambre de culture équipée de tubes néons. Il a précédemment été montré que le phénotype du double mutant *swt11swt12* dépend de l'intensité lumineuse (Chen et al., 2012). Dans notre cas, l'intensité de la lumière était équivalente entre le phytotron et la chambre de culture, il semble donc que cette disparité des phénotypes soit

plutôt due à une différence dans la qualité de la lumière. Il est généralement admis que les tubes néons produisent une lumière hétérogène alors que les LED présentent une distribution homogène des longueurs d'ondes qui sont enrichies dans les régions rouge et bleu de la lumière (Annunziata et al., 2017). Dans le futur, il serait donc intéressant d'approfondir la relation entre le transport facilité des sucres médié par les transporteurs SWEETs et la qualité lumière.

#### IV. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre plusieurs points intéressants ont été soulevés sur la base des résultats produits, bien que certains résultats doivent être confirmés et/ou leur analyse approfondie. Notamment la différence de réponse du quadruple mutant entre le stress hydrique et la contrainte au gel suggère une contribution différente du transport facilité des sucres dans la réponse à différents types de stress osmotiques. L'analyse des contenus en sucres solubles, en amidon et en acides aminés totaux qui va être réalisée sur les échantillons de hampe florale des plantes cultivées à 7°C devrait permettre de mieux comprendre cette contribution. Il serait également intéressant d'approfondir l'analyse du métabolome obtenu chez le type sauvage entre les conditions 30% et 25% afin de comprendre dans quelle mesure les mécanismes mis en jeu dépendent de la sévérité du stress hydrique. Enfin, la mise au point d'un phénoscope compatible avec le développement d'une hampe florale et la production de graines serait un enjeu important pour mieux évaluer le rôle des échanges de sucres dans l'adaptation de la plante aux modifications de l'environnement.

#### V. Publication associée

Article publié dans le journal *plants*

##### **Arabidopsis Natural Accessions Display Adaptations in Inflorescence Growth and Vascular Anatomy to Withstand High Salinity during Reproductive Growth**

S. Sellami, R. Le Hir, M. R. Thorpe, E. Aubry, N. Wolff, F. Vilaine, F. Brini and S. Dinant



Article

# *Arabidopsis* Natural Accessions Display Adaptations in Inflorescence Growth and Vascular Anatomy to Withstand High Salinity during Reproductive Growth

Sahar Sellami <sup>1,2</sup>, Rozenn Le Hir <sup>1</sup> , Michael R. Thorpe <sup>3</sup>, Emilie Aubry <sup>1</sup>, Nelly Wolff <sup>1</sup>, Françoise Vilaine <sup>1</sup>, Faïçal Brini <sup>2</sup> and Sylvie Dinant <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France; sahar.sellami@inra.fr (S.S.); rozenn.le-hir@inra.fr (R.L.H.); Emilia.Aubry@inra.fr (E.A.); nellywolff8@gmail.com (N.W.); francoise.vilaine@inra.fr (F.V.)
- <sup>2</sup> Biotechnology and Plant Improvement Laboratory, Center of Biotechnology of Sfax, (CBS)/University of Sfax, 3018 Sfax, Tunisia; faical.brini@cbs.rnrt.tn
- <sup>3</sup> Plant Science Division, Research School of Biology, The Australian National University, Canberra, ACT 0200, Australia; michael.thorpe@anu.edu.au

Received: 15 February 2019; Accepted: 5 March 2019; Published: 11 March 2019



**Abstract:** Plant responses to abiotic stresses entail adaptive processes that integrate both physiological and developmental cues. However, the adaptive traits that are involved in the responses to a high soil salinity during reproductive growth are still poorly studied. To identify new clues, we studied the halophyte, *Thellungiella salsuginea*, and three *Arabidopsis* accessions, known as tolerant or salt-sensitive. We focused on the quantitative traits associated with the stem growth, sugar content, and anatomy of the plants subjected to the salt treatment, with and without a three-day acclimation, applied during the reproductive stage. The stem growth of *Thellungiella salsuginea* was not affected by the salt stress. By contrast, salt affected all of the *Arabidopsis* accessions, with a natural variation in the effect of the salt on growth, sugar content, and stem anatomy. In response to the high salinity, irregular xylem vessels were observed, independently of the accession's tolerance to salt treatment, while the diameter of the largest xylem vessels was reduced in the tolerant accessions. The stem height, growth rate, hexoses-to-sucrose ratio, and phloem-to-xylem ratio also varied, in association with both the genotype and its tolerance to salt stress. Our findings indicate that several quantitative traits for salt tolerance are associated with the control of inflorescence growth and the adjustment of the phloem-to-xylem ratio.

**Keywords:** salt stress; carbon allocation; inflorescence; vascular tissues; transport; phloem; xylem; hydraulic conductivity; irregular xylem vessels; irx

## 1. Introduction

Salinity is one of the major environmental abiotic constraints limiting crop productivity. The salinization of arable soils first occurs because of seawater incursions and sea winds. It can also result from the accumulation of soluble salts arising from high rates of evaporation, or from excessive irrigation when a high water table or slow drainage lead to the secondary salinization of arable lands. Deforestation for extensive cropping has also been shown to cause a rising of the saline water table. Depending on the weather and on agricultural practices, plants can therefore face a high salinity at different stages of their development. Responses in the seedling and vegetative stages have been described in detail for many plant species, including *Arabidopsis* [1,2], and several reports

suggested that in their early vegetative stages, plants are particularly susceptible [1]. In contrast, the reproductive stage's responses have not yet been evaluated as extensively.

The response to high salinity follows two-phases, as follows: first, a rapid osmotic phase, followed by a secondary ionic phase due to the toxic effect of the accumulation of  $\text{Na}^+$  ions [2]. These combined effects can severely alter the growth of the glycophytic species, although less so in halophytic species. Plants employ many strategies to survive these two phases of salt stress, to maintain their homeostasis, and tolerate ion toxicity. These strategies rely on the major transcriptional reprogramming of the expression of the genes involved in the tolerance to osmotic stress, in the accumulation of  $\text{Na}^+$  ions, in the excessive accumulation of reactive oxygen species, and in the increased accumulation of compatible solutes [3–6]. Epigenetic chromatin modifications are also involved [7]. The uptake, translocation, storage, or exclusion of  $\text{Na}^+$  also changes [8]. There is a reduced translocation of  $\text{Na}^+$  ions towards the shoot via the xylem [2,9], and  $\text{Na}^+$  ions can be sequestered at a cell level in the roots and shoots by accumulation in the vacuole [8,10]. A general consequence of salt stress in the shoot is the decrease of the stomatal aperture, which in turn impairs carbon fixation and sugar allocation to the roots [2,9,11].

The accumulation of compatible solutes is a key feature for salt tolerance [2], with soluble sugars such as sucrose commonly accumulating [2,12]. Sugars can act as osmolytes to maintain cell turgor under increased water stress, and also lead to changes in the metabolism that protect the membranes and proteins from stress damage. These functions are intrinsically linked to the metabolic role of sugars for promoting faster growth to face stresses, by triggering developmental processes and fueling primary metabolism [13]. In glycophytic *Arabidopsis*, a natural variability has been shown during the vegetative stage in response to a high salinity, indicating that different adaptive processes are responsible for the tolerance [14–18]. Comparative metabolomic studies with the halophyte *Thellungiella salsuginea* (salt cress), a close relative of *Arabidopsis*, indicated a higher osmo-compatibility of *Thellungiella* metabolome [19], suggesting that this halophyte species is metabolically primed for osmoprotective strategies [12,20].

In taller plants, the stem acts as a buffer to provide water, ions, and nutrients when their uptake and utilization are not equal, as well as housing the xylem and phloem pathways for their longitudinal transport. Both transport processes can be altered by osmotic stresses, including drought and high salinity [11]. Recent studies further established that recovery after a prolonged drought depends on the stem concentration of the soluble carbohydrates [21,22]. It was also shown for *Arabidopsis* that the growth of the inflorescence can be affected by the temperature [23], as well as by a high salinity, associated with modifications of the lignin content and oxidative stress in the stem [24].

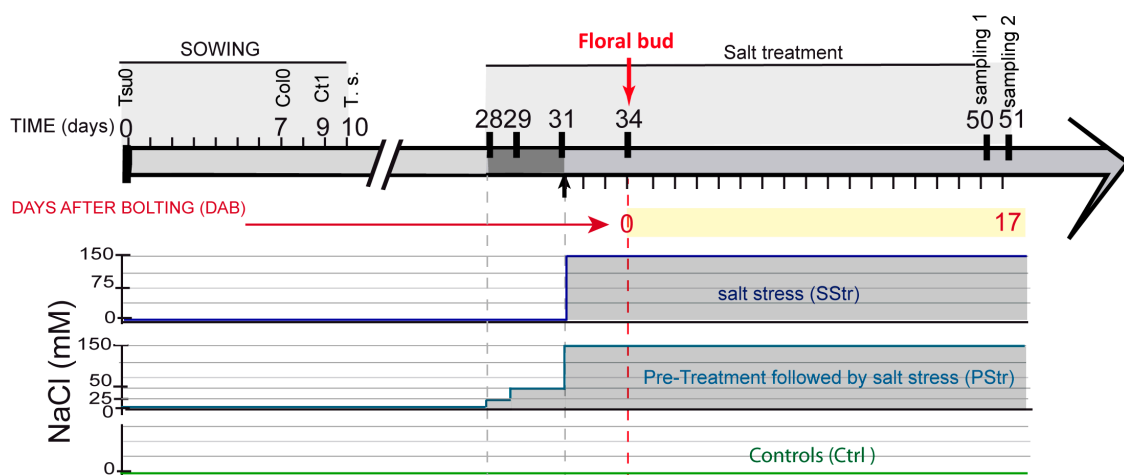
In *Arabidopsis*, major transitions occur during the development of the floral stem [25,26]. Although many studies of *Arabidopsis* physiology and nutrition have studied the vegetative stages, it is worth noting that the inflorescence stems can contribute more than the rosette to the lifetime carbon gain [27,28], and promote seed production directly [29]. Nevertheless, the growth of the inflorescence stem can be reduced and even stopped by the abiotic stresses that occur during its formation. For example, a drought treatment applied just after the onset of flowering can cause an early arrest of floral development, leading to sterility [30].

The aim of this study was to evaluate the response of several *Arabidopsis* accessions to high salinity during their reproductive stage, in order to explore the relationships between salt tolerance, sugar content, and the anatomy of the vascular tissues. *Arabidopsis* represents a glycophytic model species for exploring natural variation. For comparison, we included the halophyte species *Thellungiella salsuginea* in our analysis. The overall work provides clues on how stem growth and stem anatomy can contribute to the adaptation to salt stress.

## 2. Results

### 2.1. Experimental Scheme for Studying the Tolerance to High Salinity during the Reproductive Stage

For the analysis of the tolerance to salt treatment during the reproductive stage, the halophyte *Thellungiella salsuginea* (salt cress) and three *Arabidopsis* accessions, Columbia-0 (Col0), Catania-1 (Ct1), and Tsushima-0 (Tsu0), were studied. The salt cress was chosen because of its well-known tolerance to abiotic stress, including salt treatment [20]. The *Arabidopsis* accessions Tsu0 and Ct1 were chosen based on their tolerance to high salinity at vegetative stages [15,16], while Col0 is considered as a salt sensitive accession [18]. The salt treatment was done by watering with 150 mM NaCl, which is sufficient to induce a stress response on the salt tolerant *Thellungiella* plants, without provoking the death of the *Arabidopsis* plants [19,31]. In order to allow the plants to form a floral stem under a high salinity, we designed a scheme that enabled the entire development of the floral stem under stress (Figure 1). Briefly, the plants were allowed to grow under normal conditions during rosette growth. Three days before bolting would occur, defined by the emergence of the floral bud, one third of the plants continued under normal conditions (control plants—Ctrl), whereas another third of the plants were watered with a solution containing 150 mM of NaCl (salt stress—SStr). The final third of the plants were submitted to the same salt treatment, but, in the preceding three days, they were subjected to a progressive increase in salt stress (pretreatment before stress—PStr).

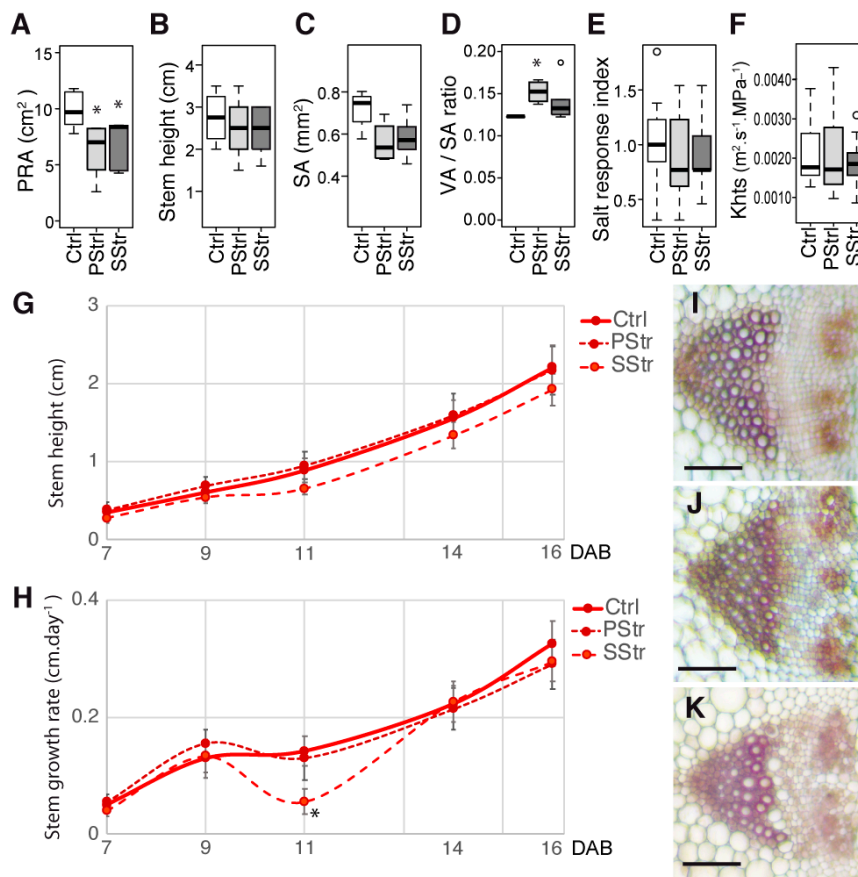


**Figure 1.** Design of the experimentation. Staggered sowing of the genotypes, with Tsushima-0 (Tsu0) sown at day 0, then Columbia-0 (Col0), Catania-1 (Ct1), and *Thellungiella salsuginea* (T.s.) sown 7, 9, and 10 days later, respectively, so as to synchronize bolting. Application of the salt treatment started three days before the floral bud appearance. The pretreatment phase (i.e., acclimation) of 150 mM of salt treatment preceded the beginning by three days. Sampling of the rosette and floral stem for the measurement of the fresh weight and dry weight was done at 16 days after bolting (DAB). Sampling of the main floral stem for anatomic studies and sugar quantifications was done at 17 DAB. Measurements of the stem height were done from 7 DAB to 16 DAB.

### 2.2. Growth of *Thellungiella salsuginea* under High Salinity during the Reproductive Stage

For the halophyte *Thellungiella salsuginea*, we observed an effect of the high salinity on the projected rosette area (Figure 2A), both in the PStr and SStr plants, but not on the stem length at 17 days after bolting (DAB) (Figure 2B), even though both the stem section area (Figure 2C) and the proportion of vascular tissue area per stem section area (Figure 2D) were affected in the salt-treated plants. It is worth noting that in these conditions, the stem growth was slow, its height reaching two to three cm at 16 DAB. A salt response index (SRI) of the stem was calculated, by dividing the mean stem growth rate of the plants grown under salt treatment by the growth rate in the normal conditions (equivalent to the osmotic tolerance index reported in the literature [32]). In the Ctrl and salt-treated

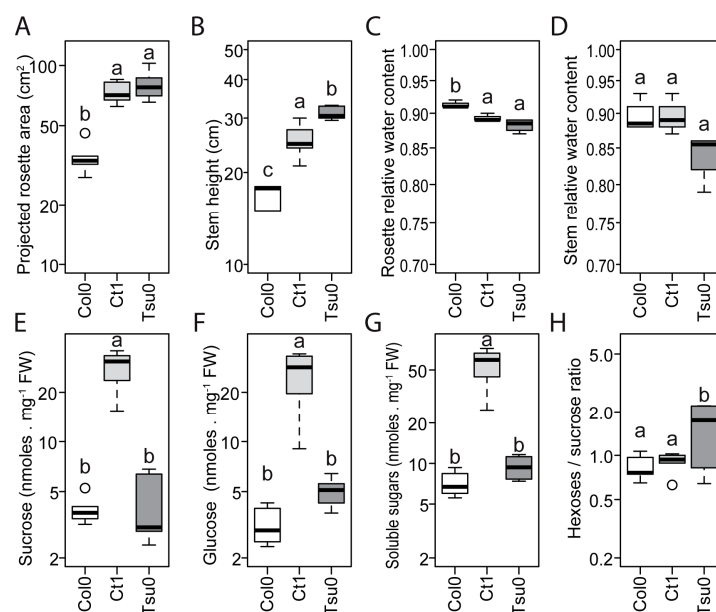
plants, the stem growth was not affected under the salt treatment, which resulted in a salt response index close to 1 (Figure 2E). We also looked in the xylem for whether the salt treatment had an effect on the xylem vessels. We observed no differences in the dimensions of the vessels of the salt-treated plants, compared to the Ctrl plants, with a mean diameter of the largest vessels being approximately  $8 \mu\text{m}$  ( $7.8 \mu\text{m} \pm 1.6$ ,  $n = 51$ ), and, consequently, having no effect on the theoretical hydraulic specific conductivity that we deduced from the mean diameter (Figure 2F), with an average predicted value of  $0.002 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$  ( $+/- 0.0007$ ,  $n = 60$ ). No differences were observed in the stem height from 7 to 16 DAB in the salt-treated plants compared to the Ctrl plants (Figure 2G). The growth rate of the stem remained unchanged, except at 11 DAB for the SStr plants, for which we observed a temporary, slight reduction (Figure 2H). Finally, the organization of the vascular bundles was similar in all three of the conditions (Figure 2I–K).



**Figure 2.** Responses of *Thellungiella salsauginea* to high salinity during the reproductive stage. Growth and anatomy of the stem of the control (Ctrl), salt stress (SStr), and pretreatment before stress (PStr) plants. In (A–F), the box and whisker plots show the distribution of the biological replicates. The black lines inside represent the medians; the top and bottom ends of the boxes represent the first and third quartiles, respectively; and the whisker extremities represent the maximum and minimum data points. (A) Projected rosette area at 17 DAB ( $n = 5-6$ ). (B) Stem height at 17 DAB ( $n = 5-6$ ). (C) Stem section area (SA) ratio at 17 DAB ( $n = 4-5$ ). (D) Total vascular bundles area per section (VA)/stem section area (SA) ratio at 17 DAB ( $n = 4-5$ ). (E) Salt response index at 16 DAB ( $n = 9-12$ ). (F) Stem theoretical hydraulic specific conductivity (Khts) ratio at 17 DAB ( $n = 3-6$ ). (G,H) Stem height and growth rate from 7 to 16 DAB. The curves represent for each time point the mean  $\pm$  standard error (SE) ( $n = 9-12$ ). (I,J,K) Details of the stem vascular bundles of the Ctrl plants (I), PStr plants (J), and SStr plants (K). Bar =  $50 \mu\text{m}$ . Star (\*) on the curves indicates a  $p < 0.05$  with a t-test.

### 2.3. Natural Variation in the Floral Stem Growth and in Sugar Content in Control Conditions

In the control conditions, the projected rosette area and stem height of the *Arabidopsis* accessions differed (Figure 3A,B). The relative water content of the rosette, but not of the stem, was also significantly different between the different accessions (Figure 3C,D). The relative water content was significantly higher in the Col0 than in Ct1 and Tsu0 plants. The fructose content was low for all of the three genotypes (data not shown), while the sucrose and glucose contents differed between the accessions (Figure 3E,F,G). The total soluble sugar content (fructose, glucose, and sucrose) was higher in the Ct1 plants than in the other accessions (Figure 3G). We also observed a variation in the hexoses-to-sucrose ratio (Figure 3H), with a hexoses-to-sucrose ratio higher in the Tsu0 plants. These data indicate diversity in the growth of the vegetative and reproductive organs, and in their sugar accumulation. Broad diversity in the sugar content of the rosette of the *Arabidopsis* accessions has been reported in a broad range of conditions [33,34], but so far, not for the stem.



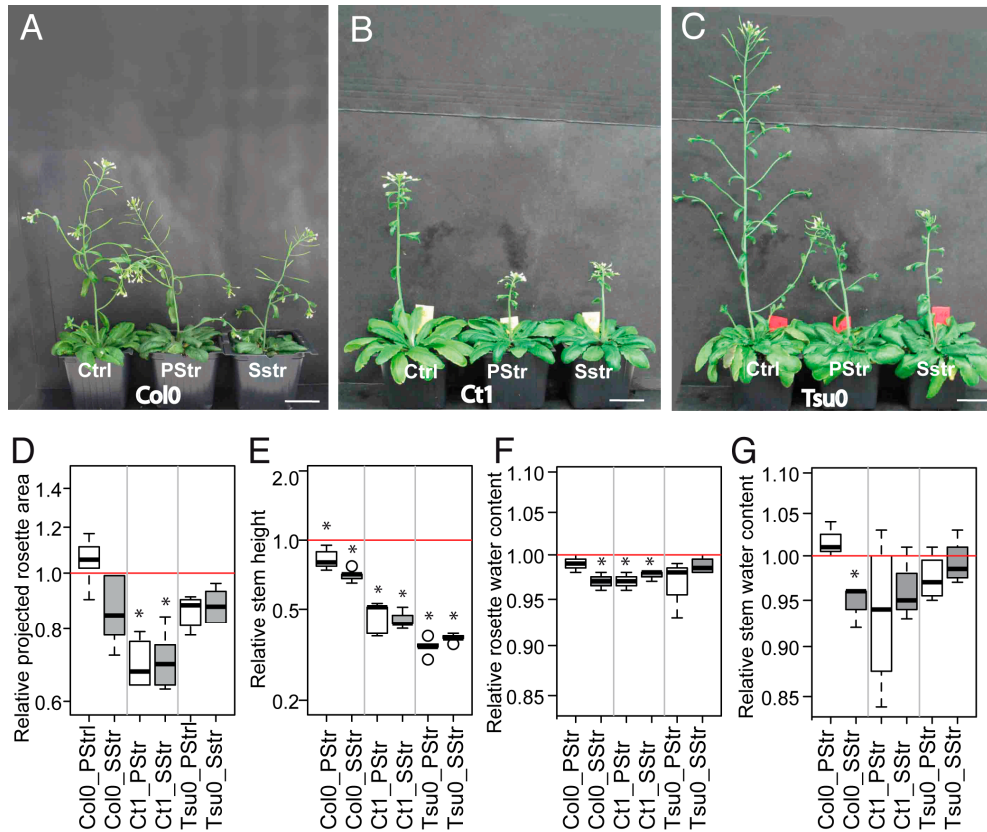
**Figure 3.** Natural variation in the size and sugar content of the Ctrl *Arabidopsis* plants. (A–H) The box and whisker plots represent the distribution of the biological replicates (see Figure 2 for details) with in (A) the projected rosette area ( $n = 5–6$ ), (B) stem height ( $n > 9$ ), (C) rosette relative water content ( $n = 4$ ), (D) stem relative water content ( $n = 4$ ), (E) sucrose content, (F) glucose content, (G) total soluble sugar content (i.e., sucrose, glucose, and fructose), and (H) and hexoses-to-sucrose ratio ((E–H):  $n = 5–6$ ). All of the data were obtained at 17 DAB, except for the rosette and stem relative water content that were measured at 16 DAB. Different letters indicate significant differences among the accessions determined using a one-way analysis of variance (ANOVA), combined with a Tukey's comparison post-test ( $p < 0.05$ ).

### 2.4. Diversity in the Arabidopsis Floral Stem Growth and Sugar Content in Response to High Salinity

When applying a salt stress during the reproductive stage, we observed an effect on the growth of both the rosette and the floral stem (Figure 4A–C), with a magnitude that depended on the accession. The projected rosette area (PRA) was smaller in the salt-treated Ct1 plants compared with the control Ct1 plants, in contrast to the rosette of Col0 and Tsu0 accessions, for which only a tendency for a smaller PRA was measured (Figure 4D). The stem was shorter in the salt-treated plants than in the Ctrl plants for all three accessions (Figure 4E). But the effects of the salt-treatment, with or without a pre-treatment, were much more pronounced at 16 DAB for the Ct1 and Tsu0 plants (50% and 65% shorter, respectively) than for the Col0 plants (30% shorter). We also observed some variations in the water content of the rosette and stem of the salt-treated plants compared with the Ctrl plants (Figure 4F,G). Regarding



pre-treatment, comparing the SStr and PStr plants (Figure 4A–G), we observed no difference in either the growth or water content of any accession, except for the water content in the rosette and stem of the Col0 plants. Overall, these data indicate larger effects on the stem growth of the two tolerant accessions of Ct1 and Tsu0.

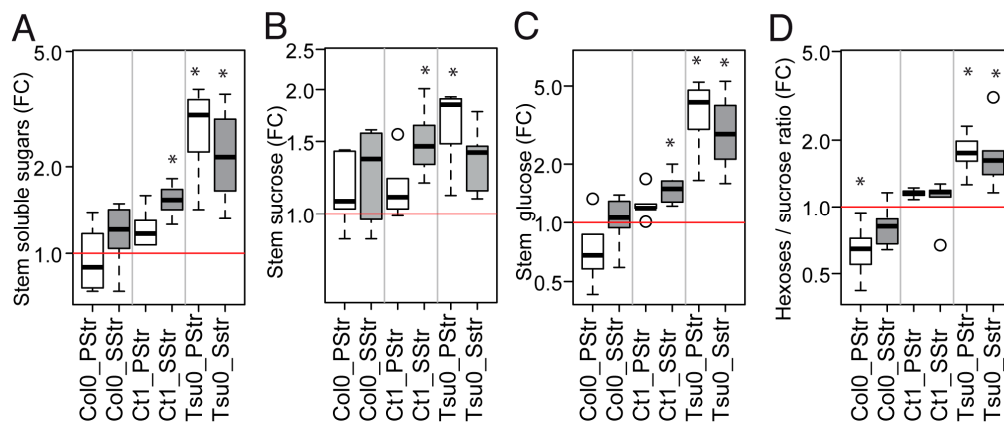


**Figure 4.** Physiological responses to salt treatment in *Arabidopsis* accessions. (A–C) Plant growth at 17 DAB under Ctrl, PStr, and SStr treatments, for the Col0 (A), Ct1 (B), and Tsu0 (C) plants. Scale bar = 2.5 cm. (D–G) The box and whisker plots represent the distribution of the biological replicates (see Figure 2 for details) within the (D) fold-changes in the projected rosette area at 17 DAB ( $n = 5–6$ ), (E) the fold-changes in the stem height at 17 DAB ( $n > 6$ ), (F) the fold-changes in rosette water content at 16 DAB ( $n = 4$ ), and (G) the fold-changes in the stem water content at 16 DAB ( $n = 4$ ). The fold changes were determined using the values that were normalized to the mean of control plants of the same accession. Red lines indicate the relative control means (= 1). Stars denote significant differences of treatments compared to the control plants (\*  $p < 0.05$ ,  $n \geq 5$ ). White bars—PStr plants. Grey bars—SStr plants.

Because the total soluble sugars content of the stem under normal conditions depended on accession (Figure 3E–H), we also analyzed the sugar content in the stem of the salt-treated plants (Figure 5). Significant fold-changes in the sugars content were observed in response to high salinity, depending on the accession (Figure 5A–D). Overall, the total soluble sugar content tended to be higher in the salt-treated plants than in the Ctrl plants, with the highest accumulation in Tsu0, with a five-fold change in the total soluble sugars and a three-fold change in the glucose content (Figure 5A,C). Interestingly, the hexoses-to-sucrose ratio was higher in the Tsu0 salt-treated plants than in the Ctrl plants. It was significantly lower in the PStr Col0 plants compared with the Ctrl plants. The ratio in the Ct1 salt-treated plants was similar to the one observed in the Ctrl plants (Figure 5D). Thus, the reduction in the stem growth under a high salinity was associated with variations in the sugar content, and contrasted values in the hexoses-to-sucrose ratio. This ratio has sometimes been considered as a proxy for a plant’s physiological and developmental status toward biomass production



versus storage, with low ratios being associated with a high demand for cell division or expansion, and high ratios being associated with storage [35]. The differences in the accumulation of sugars in the stem could reflect the differences in its capacity to fix and/or export sugars at the stage of sampling.



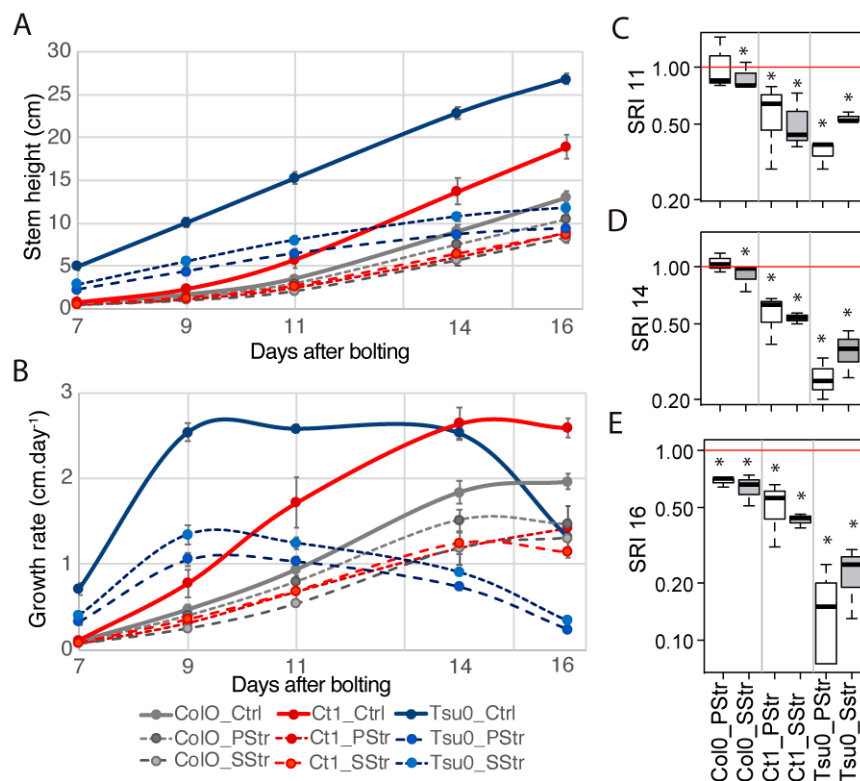
**Figure 5.** The natural variation of the response of the sugar content to salt treatment. Fold changes in the stem sugar contents in the PStr and SStr plants at 17 DAB. (A–D) The box and whisker plots represent the distribution of the biological replicates (see Figure 2 for details) with in (A) the fold changes in total soluble sugars, (B) the fold changes in sucrose, (C) the fold changes in glucose, and (D) the fold changes in hexoses-to-sucrose ratio ( $n = 5–6$ ). FC—fold changes. Stars denote the significant differences of the treatments compared to the control plants ( $* p < 0.05, n \geq 5$ ). White bars—PStr plants. Grey bars—SStr plants.

Our data showed higher hexoses-to-sucrose ratios in the salt-treated Tsu0 plants, which could indicate a higher capacity to store soluble sugars at this developmental stage, while the lower ratio observed in the PStr Col0 plants could indicate higher demands for cell division or elongation. Whether this would also reflect the differences in the overall development of the inflorescence in the three accessions, and the faster or slower transitions from sink-to-source is not known. This prompted us to examine in more detail the stem growth kinetics of the three *Arabidopsis* accessions.

### 2.5. Responses to High Salinity and Kinetics in the Stem Growth

The stem height and its growth rate were examined from 7 to 16 DAB (Figure 6A,B). The growth rate of the Ctrl plants was smaller in Col0 compared with Ct1 and Tsu0 (Figure 6B). The growth rate of Col0 was not impacted much by the salt stress. In the Ct1 plants, in which the overall growth rate was higher than in the Col0 plants, the rate was slightly reduced under salt treatment from 7 to 16 DAB. Both in the Ctrl and salt-treated Col0 and Ct1 plants, this rate reached a plateau after 14 DAB. In Tsu0, the slope of the growth rate curve was different both in the Ctrl and salt-treated plants from the one observed in the two other accessions. It was characterized by higher rates at early time points, and then a plateau from 9 to 14 DAB, followed by a decline, both in the Ctrl and salt-treated Tsu0 plants.

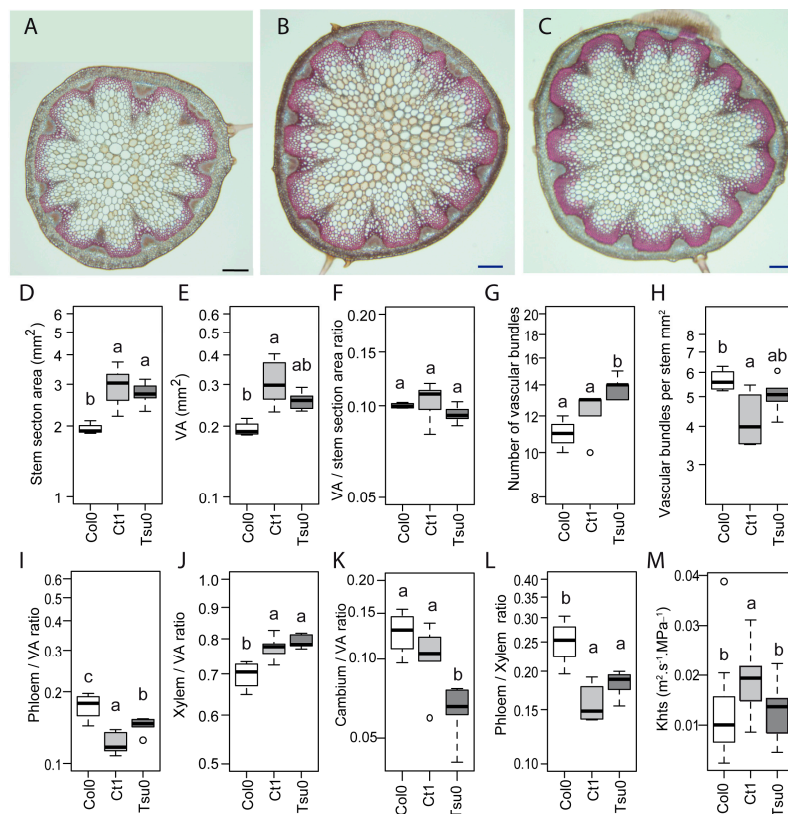
We then calculated the salt response index (SRI) at 11, 14, and 16 DAB (Figure 6C–E). Until 14 DAB, high salinity had little effect on Col0, whose SRI was close to 1 for the salt-treated plants. For Ct1 and Tsu0, whose stems grew faster during the two first weeks, we observed a smaller SRI at 11, 14, and 16 DAB. The SRI values in the salt-treated plants decreased with time (Figure 6C–E), with the smaller indexes being observed in the salt-treated Tsu0 plants.



**Figure 6.** Stem growth in response to high salinity in *Arabidopsis*. Growth of the stem for the Ctrl, PStr, and SStr plants. The height of the stem was recorded at 7, 9, 11, 14, and 16 DAB. (A) The height of the stem and (B) the stem daily growth rate. The curves represent the mean  $\pm$  SE ( $n = 9$ – $18$ ) for each time point. (C–E) The box and whisker plots represent the distribution of the biological replicates (see Figure 2 for details). (C–E) Salt response index (SRI) of the main stem at 11 (C), 14 (D), and 16 DAB (E). Stars denote significant differences of the treatments compared to the control plants ( $* p < 0.05$ ,  $n \geq 9$ ). In white—PStr plants. In grey—SStr plant.

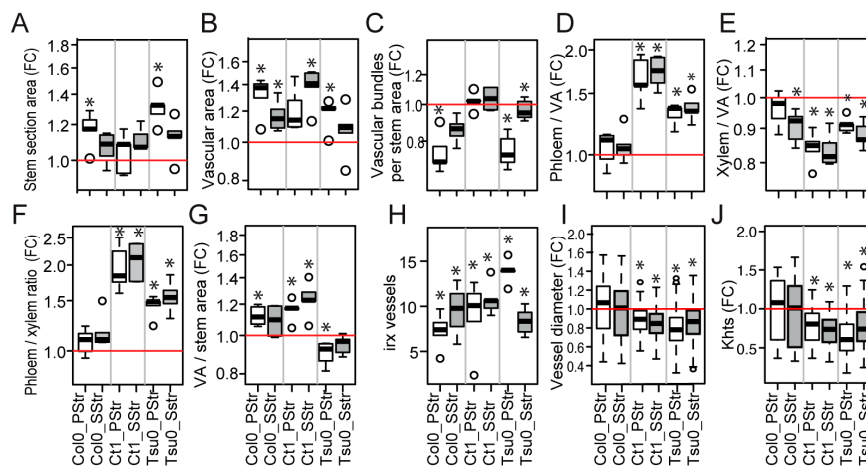
## 2.6. Natural Variation in the Anatomy of the Stem in Normal and High Salinity Conditions

To identify the additional clues explaining the different responses observed in the susceptible and tolerant accessions to a high salinity, we also analyzed the anatomy of the stem, looking at the stem sections sampled at the base of the stem. In the Ctrl plants, the area of the stem section was smaller in Col0 compared with Ct1 and Tsu0 (Figure 7A–C), with a smaller area of the vascular tissues (VA) (Figure 7D,E). However, the vascular area-to-stem area ratio remained similar in all three accessions (Figure 7F). Some variability was observed in the number of vascular bundles and in the number of vascular bundles per stem section area (Figure 7G,H). Finally, we observed a variability in the proportions of the phloem, xylem, and cambium areas in the vascular tissues (Figure 7I–L). The lumen area of the largest xylem vessels of each vascular bundle per stem section were measured in order to determine their diameter (D). Significantly higher D values were observed in the Ct1 plants compared with the Col0 and Tsu0 plants ( $18 \mu\text{m} \pm 5$ , in Col0 ( $\pm\text{SD}$ ,  $n = 177$ ),  $23.9 \mu\text{m} \pm 4$  in Ct1 ( $\pm\text{SD}$ ,  $n = 296$ ), and  $19.2 \mu\text{m} \pm 4$  in Tsu0 ( $\pm\text{SD}$ ,  $n = 320$ )). As a result, the theoretical hydraulic specific conductivity of the stem was higher in the Ctrl Ct1 plants compared with the Col0 and Tsu0 plants, with the average values ranging from  $0.01$  to  $0.02 \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{MPa}^{-1}$  (Figure 7M).



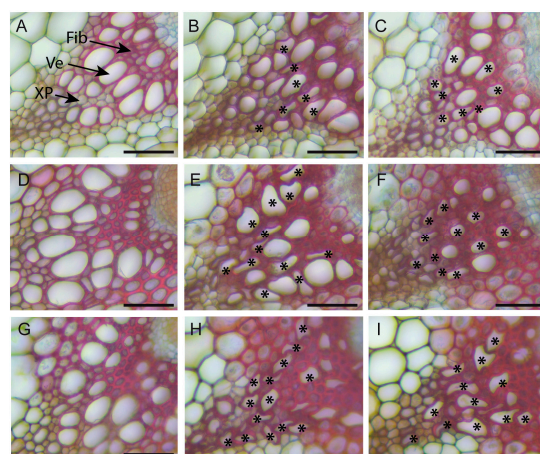
**Figure 7.** Natural variation of the anatomy in the stem of *Arabidopsis* plants at 17 DAB. (A–C) Representative stem sections of the Col0 (A), Ct1 (B) and Tsu0 (C) plants, with counterstaining with Safranin O and Alcian Blue. Bars = 200  $\mu$ m. (D–M) The box and whisker plots represent the distribution of the biological replicates (see Figure 2 for details), for the stem section area (D), vascular area per stem section (VA) (E), vascular area/stem section area ratio (F), number of vascular bundles per section (G), number of vascular bundles per stem section area (H), phloem area/vascular area ratio (I), xylem area/vascular area ratio (J), cambium area/vascular area ratio (K), phloem area/xylem area ratio (L), and theoretical specific hydraulic conductivity (Khts) (M). Different letters indicate significant differences among accessions determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) combined with Tukey's comparison post-test ( $p < 0.05$ ,  $n = 4-6$ , except for Khts, with  $n > 45$ ).

The same anatomic traits were analyzed in the salt-treated plants. Slight variations were observed in the stem section area (Figure 8A) and in the vascular area per stem section (Figure 8B). The number of vascular bundles per section area also showed slight variations both in the PStr Col0 plants and the PStr and SStr Tsu0 plants, compared with their respective Ctrl plants (Figure 8C). But the most significant effects were the higher proportions of phloem and the lower proportions of xylem in the vascular tissues in the salt-treated Ct1 and Tsu0 plants compared with the control plants (Figure 8D–F). Variations in the proportion of the vascular areas per stem section were also observed (Figure 8G). The diameters of the largest vessels and theoretical hydraulic specific conductivity that were calculated from the lumen area of the largest vessels were smaller in the salt-treated plants compared with the controls in the two tolerant accessions, Ct1 and Tsu0, (Figure 8I,J), while in Col0 plants, the high salinity had no effect on the D and Khts, compared with the Ctrl plants.



**Figure 8.** Natural variation in the *Arabidopsis* stem anatomy in response to a high salinity at 17 DAB. (A–I) The box and whisker plots represent the distribution of the biological replicates (see Figure 2 for details), within the (A) fold changes in the stem section areas, (B) the fold changes in the total vascular areas per stem section (VA), (C) the fold changes in the number of vascular poles per stem section surface unit, (D) the fold changes in the total phloem area/VA ratio per stem section, (E) the fold changes in the total xylem area/VA ratio per stem section, (G) the fold changes in the phloem area-to-xylem-area ratio, (G) the fold changes in the VA per surface unit of the stem section, (H) the number of irregular xylem (irx) vessels per vascular bundle, (I) the fold changes in the xylem vessel lumen area (J), and the fold changes in theoretical hydraulic specific conductivity. In grey—SStr plants. In white—PStr plants. FC—fold changes. Stars denote significant differences of salt treatment compared to the control condition (\*  $p < 0.05$ ,  $n = 4–6$ , except for the irx vessels and Khts values, with  $n > 36$ ).

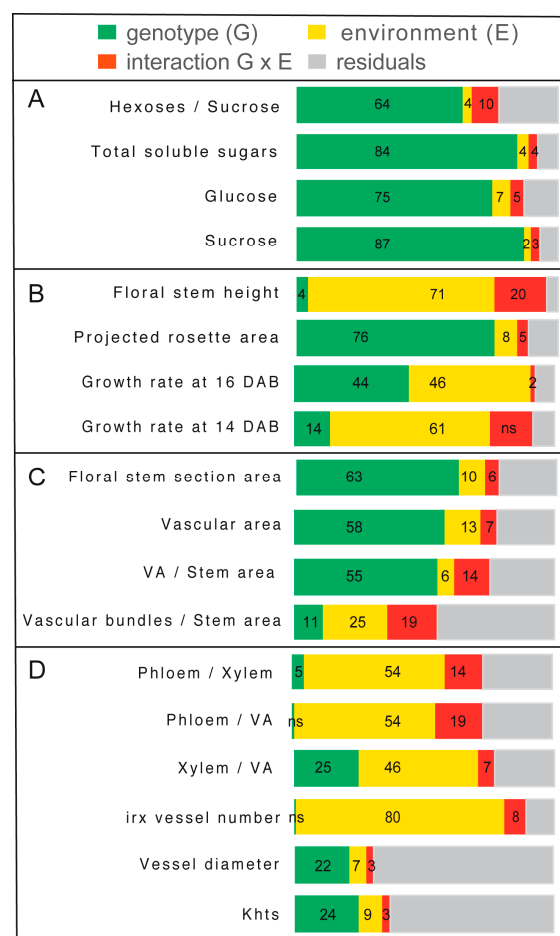
A number of irregular xylem vessels were observed in the salt-treated plants, although they were not observed in the Ctrl plants (Figure 9), with less marked cell deformations in the salt-treated Col0 compared with Ct1 and Tsu0. These irregular xylem cells correspond to a phenotype known as “irregular xylem” (irx), found in a range of mutants deficient in secondary cell wall formation [36]. Under a high salinity, irx cells were observed both in the tolerant and susceptible *Arabidopsis* accessions, questioning the role of this trait in its adaptation to salt stress. No irx cells were observed in *Thellungiella* under our high salinity conditions.



**Figure 9.** Observation of irregular xylem vessels under high salinity in the stem of *Arabidopsis*. Details of the xylem cells in the vascular bundles of Ctrl, PStr, and SStr plants at 17 DAB, observed in the stem section after staining with Safranin O and Alcian Blue. (A,D,G) Ctrl Plants, (B,E,H) PStr plants, (C,F,I), and SStr plants for Col0 (A–C), Ct1 (D–F), and Tsu0 (G–I). Stars (\*) indicate irx vessels. Ve—vessel. Fib—xylem fiber. XP—xylem parenchyma cell. Bars = 50 μm.

### 2.7. Contrasted Responses of the Traits Related to Sugar Homeostasis and Anatomy in the Stem

The analyses of the variance of the different traits measured in response to the salt treatment confirmed both a significant genotypic effect and an effect of the salt environment (Figure 10). We observed predominant genotype effects on the stem sugar content, rosette growth, and stem section areas (Figure 10A–C), while the environment effects were predominant on the stem height and growth rate (Figure 10B,D). The largest genotypic effects were associated with the sucrose content in the stem (87% of variance), and the largest environmental effects were associated with the stem height (71% of variance) and occurrence of irx vessels (80% of variance). Several traits showed a significant effect of the interaction genotype  $\times$  environment, including the stem height (20% of variance), the proportion of phloem within the vascular tissues (19%), and the number of vascular bundles per stem section (19%). For the two traits associated with water transport (i.e., diameter of the largest vessels and theoretical hydraulic specific conductivity, i.e. Khts), we observed an effect of the genotype, but minor effects of the environment or of the interaction genotype  $\times$  environment.



**Figure 10.** Analysis of variance of the traits measured during the reproductive stage, showing the effects associated with the genotype (G), the environment (E), and the interaction of genotype  $\times$  environment (G $\times$ E) within the overall variations. VA—total vascular area per stem section. irx—number of irregular xylem cells per xylem section. Khts—theoretical hydraulic specific conductivity. For more details on the data, see the legends of Figures 3, 4 and 6. For each trait, the bars represent the sum of the squares associated with each factor, shown as proportions. The percentages of factors showing significant effects ( $p < 0.05$ ) are indicated directly in the graph (ns for not significant effects). (A) Traits relative to the stem sugar content. (B) Growth traits of the rosette and stem. (C) Stem anatomic traits. (D) Traits relative to the stem vascular tissues.



### 3. Discussion

In this study, we focused on the effects of high salinity during the reproductive stage, with an emphasis on the response in the floral stem. This approach aimed at examining the effects of the salt treatment on both the sugar content in the stem and the anatomy of the vascular tissues within the stem. The *Arabidopsis* floral stem plays an important role in carbon allocation. In addition, it is an interesting model to follow the effect of the stress on the development of the vascular tissues. By examining the natural variation of these responses between accessions, we aimed to identify the traits that developed in the accessions adapted to high salinity.

In the three *Arabidopsis* accessions chosen for this study, which included both susceptible and tolerant accessions, a natural variability was observed in the sugar content, hexoses-to-sucrose ratio (Figure 3), anatomy of the stem and vasculature (Figure 7), and growth kinetics of the control plants (Figure 6). Despite this broad natural variation, *Arabidopsis*, like other herbaceous species, is generally described as a ruderal. Ruderal species reproduce quickly and use their nutritional resources for the optimal production and dispersal of seeds. By contrast, *Thellungiella* spp, which have a slow growth rate, are typical of “stress tolerator” species, according to the Grime’s classification [37]. When applying the salt treatment during the reproductive stage of *Thellungiella*, the stem growth was not impacted much by the 150 mM NaCl treatment (Figure 2). In contrast, we observed significant effects of salinity on the stem growth of the *Arabidopsis* accessions (Figures 4 and 6), with a larger stem growth reduction in the two tolerant accessions, Tsu0 and then Ct1, while they had stronger growth in the control conditions. There were also major differences in the stem growth kinetics of the three accessions, with a variability in their growth rates (Figures 6 and 10). Because of the strong effect of the interaction genotype per environment in explaining the variability of the stem height, this quantitative trait appears to be adaptive in *Arabidopsis* (Figure 10).

Our findings also indirectly indicate that the extent of the stem growth reduction is not determined by the rosette biomass at the beginning of the salt treatment. Nor was it associated with the extent of the rosette growth reduction during the treatment (Figure 8). Thus, the strategy of the *Arabidopsis* tolerant accessions to cope with high salinity may be that the fitness, for example seed production, is improved by reducing the stem growth, while accumulating more sugars (Figure 5), a hypothesis that could be explored using the same experimental design set up for this work. Alternatively, another strategy to maintain seed production may primarily be to promote high vigor during the vegetative phase.

The vascular tissues in the stem are the main pathways for water and nutrient supply to the fruits. So far, few studies have explored the natural variation in the anatomy of the vascular tissues, and even less attention has been focused on any natural variation in response to biotic or abiotic stresses. Earlier studies only explored the xylem-to-phloem ratio in the hypocotyl under standard conditions [38], and the root anatomy in relation to the hydraulic parameters, with or without salt stress [15]. Here, under a high salinity, we observed a natural variation in the total areas of the stem section and vascular tissues (Figure 8), however most of the variability was explained by a genotypic effect (Figure 10), and our data provided no evidence that these changes were adaptive. In contrast, we found diversity among the accessions in the phloem-to-xylem ratio (Figure 8). This quantitative trait showed a strong effect of the genotype x environment interaction (Figure 10). The Ct1 and Tsu0 tolerant accessions displayed a lower proportion of xylem tissue per vascular bundle, and a higher proportion of phloem tissue per vascular bundle, in stress vs. control conditions (Figure 10). A major effect of the interaction (nearly 20% of the variance) was also found for the proportion of phloem within the vascular tissues (phloem-to-VA ratio) (Figure 10). Such changes potentially affect the nutrient long-distance transport capacity by maintaining carbon allocation via the phloem, while counteracting the water deficit and osmotic stress due to the salt.

Previous reports have shown a reduction of the xylem water transport in glycophytic plants under a high salinity. This was related to the changes in the root conductivity in cucumber, rice, and *Arabidopsis* [15,39,40]; the lumen areas of the stem vessels in poplar [41,42]; and the hydraulic conductivity in *Eucalyptus* [43]. In the *Arabidopsis* stem, we observed smaller lumen areas (A) and



diameters (D) of the main vessels in the xylem (Figure 8), associated with smaller predicted values of the theoretical hydraulic conductivity (Khts) of the tolerant accessions Ct1 and Tsu0 under a high salinity (Figure 8). Interestingly, the lumen areas and diameters of the largest vessels and the predicted Khts values for *Thellungiella salsuginea*, both in the control conditions and in response to salt treatment (Figure 2), were much smaller than the ones observed in the *Arabidopsis* accessions, supporting the hypothesis that a reduction of Khts in the stem is an adaptive process. Differences in the stem anatomy and its predicted hydraulic profile could thus contribute to the variability in salt tolerance and provide clues about the adaptive processes. Another underlying issue is the relationship between the various traits analyzed in the stem and the traits associated with root anatomy and hydraulics, which should be further explored.

We also observed deformations of the xylem vessels in the stem of the three *Arabidopsis* accessions under high salinity that correspond to an irregular xylem (*irx*) phenotype, while none were observed in *Thellungiella salsuginea* (Figures 2 and 9). Similar collapsed and deformed xylem vessels have been described in *irx Arabidopsis* mutants, and are indicative of defects in the secondary cell wall formation [36]. We do not know whether the *irx* phenotype observed in response to salt treatment is associated with defects in the xylan, lignin, or cellulose deposits in the vessel's cell walls, as shown in many *irx* mutants [36]. Nevertheless, a recent transcriptomic study of the salt response of the inflorescence of the Col0 accession showed a transcriptional reprogramming of the genes involved in lignin biosynthesis, leading to a lower lignin content in the stem in response to the salt treatment [24]. The secondary cell wall defects observed under a high salinity in the stem and their contribution to salt tolerance should therefore be further investigated.

In *Arabidopsis*, the differences in the stem growth rate and vasculature anatomy under salt stress raise the question of whether sugar homeostasis in the stem is regulated. We indeed observed a natural variation in the stem sugar content and hexoses-to-sucrose ratios, both in the control conditions and in response to salt stress (Figures 3 and 5). This latter quantitative trait showed significant genotype  $\times$  environment interaction effects (Figure 10), suggesting that it may contribute to adaptive processes. Variations in the sugar content of the rosette are well known [33,34]. However few studies analyzed the sugar status in the floral stem, despite its major contribution to the plant's lifetime carbon gain, and its importance for overall plant fitness [27,29]. Further studies are now required on the association between these traits and the regulation of the expression of genes involved in sugar transport and homeostasis.

In conclusion, by describing a significant genetic variation of several traits related to the stem anatomy, this study provides a basis for the future quantitative genetic analyses of the physiological and anatomical traits of the stem involved in tolerance to osmotic stresses.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant Material and Growth Conditions

*Arabidopsis thaliana* accessions Columbia-0 (Col0), Catania-1 (Ct1), and Tsushima-0 (Tsu0), and the halophyte *Thellungiella salsuginea* were obtained from the Versailles Stock Center. The seeds were surface sterilized then sown in soil and grown in a growth chamber with a long-day photoperiod ( $150 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 65% humidity, 16 h light at 21 °C/8 h dark at 17 °C). To synchronize the floral bud appearance, Col0, Ct1, and *Thellungiella salsuginea* were sown 7, 9, and 10 days, respectively, after the sowing of Tsu0 (Figure 1). The plants were watered three times per week by immersion in standard nutrient solution for four hours (10 mM nitrate, 2.75 mM potassium, 0.5 mM calcium, 0.7 mM chloride, and 0.25 mM phosphate) [44].

### 4.2. Salt Treatment and Pretreatment (Acclimation)

For the salt treatment, the plants were watered three days before the onset of floral bud by immersion in a nutrient solution containing 150 mM NaCl, for 6 h, in order to obtain the full imbibition

of soil. The plants were then watered three times per week for 19 days with the salt nutrient solution. For acclimation, the plants were submitted to progressive pre-treatment of 25 mM for three days, and 50 mM NaCl for two days, before the beginning of the 150 mM salt stress (Figure 1).

#### 4.3. Growth and Physiological Parameters

The plant growth was recorded daily after the beginning of the acclimation and salt stress. The projected rosette area was measured daily from the pictures taken from day 1 to day 13 after the beginning of acclimation, and were analyzed using ImageJ Software (<https://imagej.nih.gov/ij/>), with five to six replicates per genotype and per condition. The height of the main floral stem was measured every two or three days from 5 to 16 DAB, with at least nine replicates per genotype and per condition. The daily growth rate of the floral stem (plotted at the end of the interval on Figures 2 and 6) was determined as the increase in height between two time points, divided by the number of the days of the interval. The salt response index (SRI) was calculated by dividing the stem growth rate of the PStr or SStr plants, by the mean stem growth rate of the Ctrl plants (equivalent of the osmotic tolerance index described by Rajendran and colleagues [32]). The destructive measures of the fresh weight (FW) and dry weight (DW) of the rosette and floral stem were made at 16 DAB, with four replicates per genotype and per condition. The relative water content was calculated as the ratio  $(FW - DW)/FW$ .

#### 4.4. Carbohydrate Content

The fully expanded rosette leaves and floral stem, without lateral stems, siliques, flowers, and cauline leaves, were harvested at 17 DAB, eight hours after the beginning of the light period, and were frozen in liquid nitrogen before grinding. The soluble sugars were extracted from 50 mg of frozen powder, by two successive additions of 80% ethanol, for 2 h in ice. The supernatants after centrifugation were separated from the residual solid material, evaporated with a speed-vac, and re-suspended in water [45]. The sucrose and hexose levels were determined using an enzymatic sucrose/D-glucose/D-fructose kit (R-Biopharm, Darmstadt, Germany). For each genotype, five to six biological replicates were analyzed per condition.

#### 4.5. Anatomy of Stem Sections

The floral stems harvested at 17 DAB for the analysis for the carbohydrate content were used for anatomic studies. The first cm of the basal part of the main floral stem was collected and embedded in 8% low-melting agarose. For each genotype, four to six biological replicates were analyzed per condition. The transverse sections (50  $\mu\text{m}$  thick) were cut on a Vibratome MM France, and were stored in 70% ethanol at 4 °C until use. For the imaging, the sections were colored for 20 s with Safranin O–Alcian Blue staining [46]. The observations were done by Zeiss Stereo Microscopy using a color camera and transmitted light. Using ImageJ Software, the following parameters were measured: the area of the stem cross section, number of vascular bundles, and total area of the vascular bundles. For each vascular bundle, the total areas of the phloem, xylem, and cambium were measured. For each xylem pole, the number of irregular xylem cells was determined with the cells counter function of the “Analyze” plugin of ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), with at least four to five biological replicates per genotype and condition, one section per biological replicate, and the irx cells determined for at least nine poles per section.

#### 4.6. Stem Theoretical Hydraulic Specific Conductivity

The theoretical hydraulic specific conductivity (Khts) was predicted from the Hagen–Poiseuille equation, using the following dimensions of the largest vessels [47]: for each individual vascular bundle in each stem section, the lumen area (A) of three to four xylem vessels was measured. The circle diameter (D) of each vessel was deduced from A, as  $D = (2\sqrt{A/\pi})$  [48]. Then, the Khts was determined as  $\Sigma(\pi D^4/128\eta)/\Sigma A$ , where  $\eta$  is the water viscosity coefficient at 20 °C (1.0016 mPa/s) and D is the circle diameter [47]. For each genotype, four to six biological replicates were analyzed per condition,

and for each section, at least nine poles per section were analyzed, except for *Thellungiella*, for which three to four poles were analyzed.

#### 4.7. Statistical Analyses

The statistical analyses were performed using a two-way ANOVA combined with a Tukey's comparison post-test, using R statistical software, version 3.3.2 (<http://www.r-project.org>). A *p*-value of <0.05 was considered significant.

**Author Contributions:** S.S. and S.D. contributed to the conceptualization of the work; S.S. and R.L.H. contributed to the methodology; S.S. and S.D. contributed to the formal analysis, S.S., E.A., and N.W. contributed to the investigation; F.V., R.L.H., and N.W. contributed to the resources; the writing and editing was done by S.D., M.R.T., and R.L.H.; S.D., R.L.H., and S.S. contributed to the visualization; and S.D. and F.B. supervised the work. The project administration was carried out by S.D., and both F.B. and S.D. contributed to the funding acquisition.

**Funding:** S.S. received the support of the Sousse University and the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research, and a grant from the Doctorate School of Agronomy and Environment from the Higher Institute for Agronomy of Chott-Mariem at Sousse (Tunisia). The IJPB benefits from the support of the LabEx Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS).

**Acknowledgments:** We thank the Imaging and Cytology platform of the Plant Observatory (IJPB Institute, INRA Versailles-Grignon, France) for the light microscopy observations; Laurence Bill, Joel Talbotec, and Bruno Letarnec for their help in the greenhouse experiments; and Catherine Bellini and Evelyne Téoulé for their stimulating discussions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Parihar, P.; Singh, S.; Singh, R. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 4056–4075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Munns, R.; Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 651–681. [[CrossRef](#)]
- Huang, G.T.; Ma, S.L.; Bai, L.P.; Zhang, L.; Ma, H.; Jia, P.; Liu, J.; Zhong, M.; Guo, Z.F. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 969–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Golldack, D.; Lüking, I.; Yang, O. Plant tolerance to drought and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep.* **2011**, *30*, 1383–1391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Golldack, D.; Li, C.; Mohan, H.; Probst, N. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Singh, M.; Kumar, J.; Singh, S.; Singh, V.; Prasad, S. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: A review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* **2015**, *14*, 407–426. [[CrossRef](#)]
- Deinlein, U.; Stephan, A.B.; Horie, T.; Luo, W.; Xu, G.; Schroeder, J.I. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci.* **2014**, *19*, 371–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Plett, D.C.; Møller, I.S. Na<sup>+</sup> transport in glycophytic plants: What we know and would like to know. *Plant. Cell Environ.* **2010**, *33*, 612–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Roy, S.J.; Negrão, S.; Tester, M. Salt resistant crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *26*, 115–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Almeida, D.M.; Margarida Oliveira, M.; Saibo, N.J.M. Regulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> homeostasis in plants: Towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Genet. Mol. Biol.* **2017**, *40*, 326–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lemoine, R.; La Camera, S.; Atanassova, R.; Dédaldéchamp, F.; Allario, T.; Pourtau, N.; Bonnemain, J.-L.; Laloi, M.; Coutos-Thévenot, P.; Maurousset, L.; et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Krasensky, J.; Jonak, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 1593–1608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Koch, K.E. Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 235–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Wang, Y.; Yang, L.; Zheng, Z.; Grumet, R.; Loescher, W.; Zhu, J.-K.; Yang, P.; Hu, Y.; Chan, Z. Transcriptomic and Physiological Variations of Three Arabidopsis Ecotypes in Response to Salt Stress. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69036. [[CrossRef](#)]
15. Sutka, M.; Li, G.; Boudet, J.; Boursiac, Y.; Doumas, P.; Maurel, C. Natural variation of root hydraulics in Arabidopsis grown in normal and salt-stressed conditions. *Plant Physiol.* **2011**, *155*, 1264–1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Julkowska, M.M.; Klei, K.; Fokkens, L.; Haring, M.A.; Schranz, M.E.; Testerink, C. Natural variation in rosette size under salt stress conditions corresponds to developmental differences between Arabidopsis accessions and allelic variation in the LRR-KISS gene. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 2127–2138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Quesada, V.; García-Martínez, S.; Piqueras, P.; Ponce, M.R.; Micol, J.L. Genetic architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 951–963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Katori, T.; Ikeda, A.; Iuchi, S.; Kobayashi, M.; Shinozaki, K.; Maehashi, K.; Sakata, Y.; Tanaka, S.; Taji, T. Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of Arabidopsis thaliana accessions. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 1125–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Lugin, R.; Niogret, M.F.; Leport, L.; Guégan, J.P.; Larher, F.R.; Savouré, A.; Kopka, J.; Bouchereau, A. Metabolome and water homeostasis analysis of Thellungiella salsuginea suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant J.* **2010**, *64*, 215–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bartels, D.; Dinakar, C. Balancing salinity stress responses in halophytes and non-halophytes: A comparison between Thellungiella and Arabidopsis thaliana. *Funct. Plant Biol.* **2013**, *40*, 819–831. [[CrossRef](#)]
21. Savi, T.; Casolo, V.; Luglio, J.; Bertuzia, S.; Trifilo', P.; Lo Gullo, M.A.; Nardinia, A. Species-specific reversal of stem xylem embolism after a prolonged drought correlates to endpoint concentration of soluble sugars. *Plant Physiol. Biochem. J.* **2016**, *106*, 198–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Trifilo, P.; Casolo, V.; Raimondo, F.; Petrusa, E.; Boscutti, F.; Lo Gullo, M.A.; Nardini, A. Effects of prolonged drought on stem non-structural carbohydrates content and post-drought hydraulic recovery in *Laurus nobilis* L.: The possible link between carbon starvation and hydraulic failure. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *120*, 232–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Antoun, M.; Ouellet, F. Growth temperature affects inflorescence architecture in Arabidopsis. *Botany* **2013**, *91*, 642–651. [[CrossRef](#)]
24. Shafi, A.; Chauhan, R.; Gill, T.; Swarnkar, M.; Sreenivasulu, Y.; Kumar, S.; Kumar, N.; Shankar, R.; Ahuja, P.; Singh, A. Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in Arabidopsis under salt stress. *Plant Mol. Biol.* **2015**, *87*, 615–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sanchez, P.; Nehlin, L.; Greb, T. From thin to thick: Major transitions during stem development. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 113–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Altamura, M.M.; Possenti, M.; Matteucci, A.; Baima, S.; Ruberti, I.; Morelli, G. Development of the vascular system in the inflorescence stem of Arabidopsis. *New Phytol.* **2001**, *151*, 381–389. [[CrossRef](#)]
27. Earley, E.J.; Inghand, B.; Winkler, J.; Tonsor, S.J. Inflorescences contribute more than rosettes to lifetime carbon gain in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* **2009**, *96*, 786–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Leonardos, E.D.; Rauf, S.A.; Weraduwage, S.M.; Marillia, E.F.; Taylor, D.C.; Micallef, B.J.; Grodzinski, B. Photosynthetic capacity of the inflorescence is a major contributor to daily-C-gain and the responsiveness of growth to elevated CO<sub>2</sub> in Arabidopsis thaliana with repressed expression of mitochondrial-pyruvate-dehydrogenase-kinase. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *107*, 84–97. [[CrossRef](#)]
29. Gnan, S.; Marsh, T.; Kover, P.X. Inflorescence photosynthetic contribution to fitness releases Arabidopsis thaliana plants from trade-off constraints on early flowering. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Su, Z.; Ma, X.; Guo, H.; Sukiran, N.L.; Guo, B.; Assmann, S.M.; Ma, H. Flower development under drought stress: Morphological and transcriptomic analyses reveal acute responses and long-term acclimation in Arabidopsis. *Plant Cell* **2013**, *25*, 3785–3807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. M'rah, S.; Ouerghi, Z.; Eymery, F.; Rey, P.; Hajji, M.; Grignon, C.; Lachaâl, M. Efficiency of biochemical protection against toxic effects of accumulated salt differentiates Thellungiella halophila from Arabidopsis thaliana. *J. Plant Physiol.* **2007**, *164*, 375–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rajendran, K.; Tester, M.; Roy, S.J. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32*, 237–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sulpice, R.; Nikoloski, Z.; Tschoep, H.; Antonio, C.; Kleessen, S.; Larhlmi, A.; Selbig, J.; Ishihara, H.; Gibon, Y.; Fernie, A.R.; et al. Impact of the carbon and nitrogen supply on relationships and connectivity between

- metabolism and biomass in a broad panel of Arabidopsis accessions. *Plant Physiol.* **2013**, *162*, 347–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sulpice, R.; Trenkamp, S.; Steinfath, M.; Usadel, B.; Gibon, Y.; Witucka-Wall, H.; Pyl, E.; Tschoep, H.; Steinhauser, C.; Guenther, M.; et al. Network analysis of enzyme activities and metabolite levels and their relationship to biomass in a large panel of Arabidopsis accessions. *Plant Cell* **2010**, *22*, 2872–2893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  35. Wobus, U.; Weber, H. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem* **1999**, *380*, 937–944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  36. Hao, Z.; Mohnen, D. A review of xylan and lignin biosynthesis: Foundation for studying Arabidopsis irregular xylem mutants with pleiotropic phenotypes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 212–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  37. Grime, J.P. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *Am. Nat.* **1977**, *111*, 1169–1194. [[CrossRef](#)]
  38. Sibout, R.; Plantegenet, S.; Hardtke, C.S. Flowering as a condition for xylem expansion in Arabidopsis hypocotyl and root. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 458–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  39. Meng, D.; Fricke, W. Changes in root hydraulic conductivity facilitate the overall hydraulic response of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars to salt and osmotic stress. *Plant Physiol. Biochem.* **2017**, *113*, 64–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  40. Qian, Z.J.; Song, J.J.; Chaumont, F.; Ye, Q. Differential responses of plasma membrane aquaporins in mediating water transport of cucumber seedlings under osmotic and salt stresses. *Plant Cell Environ.* **2015**, *38*, 461–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  41. Junghans, U.; Polle, A.; DÜchting, P.; Weiler, E.; Kuhlman, B.; Gruber, F.; Teichmann, T. Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant. Cell Environ.* **2006**, *29*, 1519–1531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  42. Escalante-Pérez, M.; Lautner, S.; Nehls, U.; Selle, A.; Teuber, M.; Schnitzler, J.P.; Teichmann, T.; Fayyaz, P.; Hartung, W.; Polle, A.; et al. Salt stress affects xylem differentiation of grey poplar (*Populus × canescens*). *Planta* **2009**, *229*, 299–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  43. Zubrinich, T.M.; Loveys, B.; Gallasch, S.; Seekamp, J.V.; Tyerman, S.D. Tolerance of salinized floodplain condition in a naturally occurring Eucalyptus hybrid related to lowered plant water potential. *Tree Physiol.* **2000**, *20*, 953–963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  44. Lemaître, T.; Gaufichon, L.; Boutet-Mercey, S.; Christ, A.; Masclaux-Daubresse, C. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in Arabidopsis thaliana Wassileskija accession. *Plant Cell Physiol.* **2008**, *49*, 1056–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  45. Le Hir, R.; Spinner, L.; Klemens, P.A.W.; Chakraborti, D.; de Marco, F.; Vilaine, F.; Wolff, N.; Lemoine, R.; Porcheron, B.; Géry, C.; et al. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in Arabidopsis. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 1687–1690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  46. Tolivia, D.; Tolivia, J. Fasga: A new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *J. Microsc.* **1987**, *148*, 113–117. [[CrossRef](#)]
  47. Tixier, A.; Cochard, H.; Badel, E.; Dusotoit-Coucaud, A.; Jansen, S.; Herbette, S. Arabidopsis thaliana as a model species for xylem hydraulics: Does size matter? *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 2295–2305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  48. Christman, M.A.; Sperry, J.S. Single-vessel flow measurements indicate scalariform perforation plates confer higher flow resistance than previously estimated. *Plant Cell Environ.* **2010**, *33*, 431–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



---

## IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---





### **1. Rôle des transporteurs SWEETs dans le développement, la croissance et la physiologie de la hampe florale**

Chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, la hampe florale est un organe central puisqu'elle porte les inflorescences latérales, les siliques et les fleurs et permet ainsi la distribution des éléments nutritifs dans tous les organes de la plante et notamment lors de la production des graines. La hampe florale est considérée comme un organe puit au moment de son émergence, car sa croissance requière un fort apport énergétique (Denay et al., 2017; Lejeune et al., 1993). Au cours de sa croissance, cet organe devient une source importante puisqu'il produit jusqu'à 50% de sucres issus de la photosynthèse dont une large proportion sera utilisée par les fleurs et les siliques (Earley et al., 2009) et constitue jusqu'à 60 % de la biomasse totale produite par la plante (Durand et al., 2018; Ohmae et al., 2013; Sugita et al., 2016).

La complexité des domaines d'expression des gènes *SWEET* observée au cours du développement de la hampe et en fonction des différents types de pôles cribro-vasculaires ainsi que la caractérisation phénotypique des mutant *sweet*, réalisée au cours de cette thèse, suggère des rôles spécifiques de ces transporteurs à l'échelle de la plante entière. Ainsi, les échanges de sucres entre les cellules du système vasculaire, médiés par SWEET11 et SWEET12 joueraient un rôle plus important que les échanges de sucres entre le cytosol et la vacuole, médiés par SWEET16 et SWEET17 dans la croissance de la hampe florale. Notamment, nos résultats mettent en évidence un rôle des transporteurs SWEET11 et SWEET12 dans la régulation de la balance C/N de la plante notamment au moment de la transition florale ainsi qu'au moment de la remobilisation de l'azote vers les graines. Ainsi l'analyse du mutant *swt11swt12* constitue un outil intéressant pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du ratio C/N. Dans une perspective proche, une analyse de la distribution de radioisotopes  $^{14}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  dans les différents organes au cours du développement de la plante devrait permettre de mieux évaluer la contribution de la hampe florale dans l'allocation du carbone et de l'azote à l'échelle de la plante.

Nos résultats ont également montré que le promoteur de *SWEET12* s'exprime dans toutes les cellules de parenchymes des pôles de xylème de type-L. Selon la classification établie par Park et al. (2015), les pôles de type-L connectent la hampe florale et les feuilles caulinaires. Ces résultats suggèrent donc un rôle de SWEET12 dans l'allocation des sucres entre ces 2 organes au niveau du xylème. Cependant l'analyse du simple mutant *swt12* n'a pas permis de mettre en

évidence de phénotype sur les paramètres analysés. Ainsi, la question de savoir dans quelle mesure le transport facilité des sucres entre les feuilles caulinaires et la hampe florale impacte la croissance et le développement chez *Arabidopsis thaliana* se pose. Chez les arbres, où les cellules de parenchymes constituent une part importante du volume du xylème (Holbrook and Zwieniecki, 2005; Spicer, 2014), il a été montré que les cellules de parenchymes permettent de subvenir aux besoins des cellules voisines grâce notamment au stockage de sucres solubles, d'amidon et/ou de lipides (Bucci et al., 2003; De Boer and Volkov, 2003; Salleo et al., 2004; Secchi and Zwieniecki, 2011; Secchi et al., 2017; Spicer, 2014). De plus les cellules de parenchyme xylémiens auraient également un rôle majeur en réponse à des stress abiotiques (Ménard and Pesquet, 2015). Ainsi, il serait peut-être intéressant d'analyser plus spécifiquement le phénotype du simple mutant *swt12* dans des conditions de stress comme ceux testés dans cette thèse.

## **2. Rôles des transporteurs SWEETs dans le développement des vaisseaux**

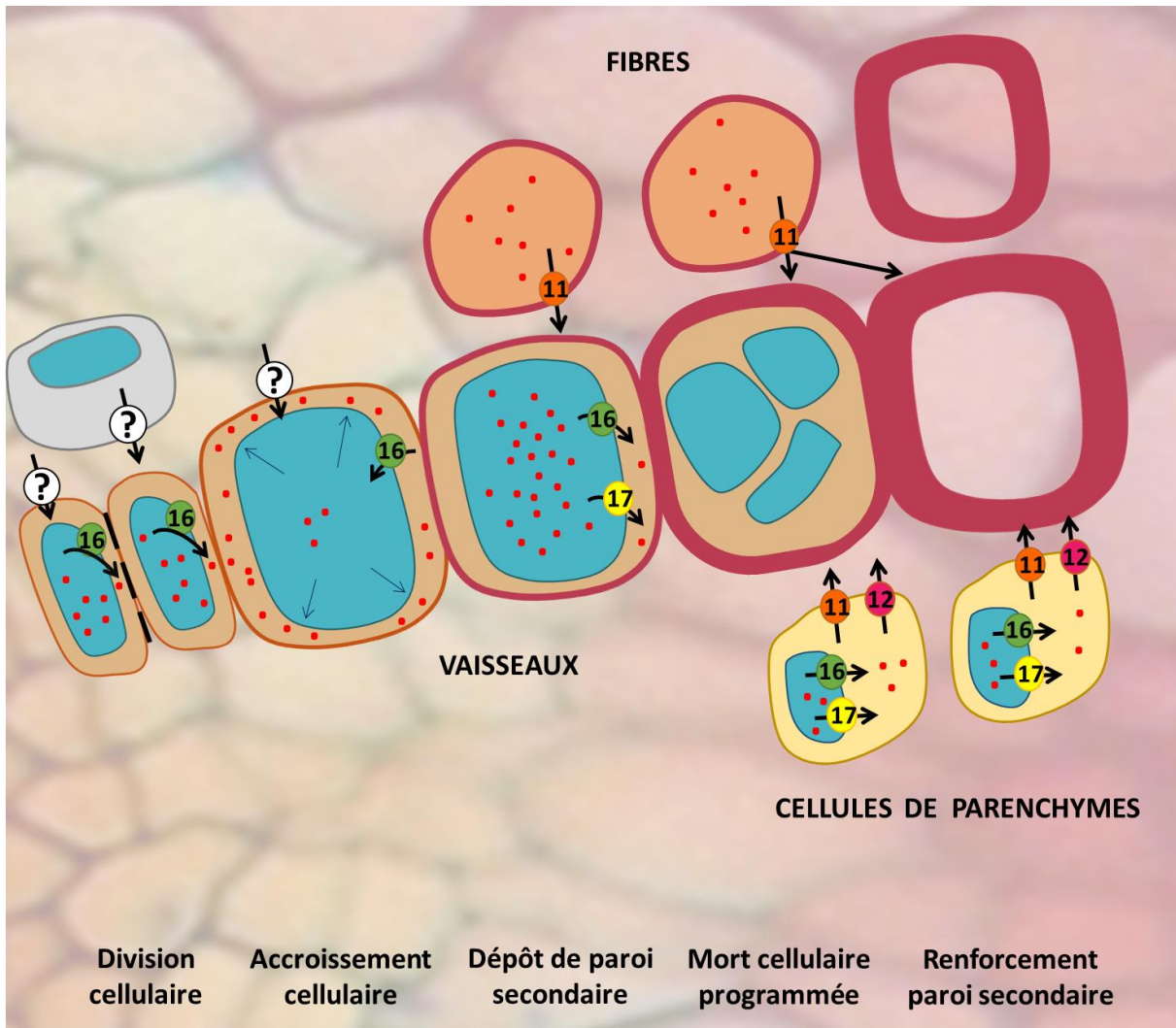
A l'échelle du tissu, les résultats obtenus dans cette thèse mettent également en évidence un rôle des transporteurs SWEETs dans le développement des vaisseaux et des fibres (taille et composition de la paroi). Sur la base de ces résultats, le modèle présenté dans la Figure 77 peut être proposé.

Selon ce modèle, le transporteur SWEET16 contribuerait à l'export de saccharose, de glucose et/ou de fructose vers le cytosol dans les cellules procambiales et les initiales du xylème afin de produire l'énergie nécessaire aux processus de division cellulaire et au début de l'expansion cellulaire. Afin d'assurer la poursuite de l'expansion cellulaire, qui est particulièrement importante chez les vaisseaux de xylème puisque ce sont les cellules les plus grandes chez les végétaux (Cosgrove, 2005), une augmentation du volume des cellules via l'augmentation du volume de la vacuole, est nécessaire. Dans la littérature, il a été décrit que cette augmentation du volume de la vacuole est dépendante du transport d'eau et de sucres (Arend and Fromm, 2003; Beauvoit et al., 2014). Sur la base de nos résultats, nous proposons donc qu'au cours des premières d'expansion cellulaire des cellules de xylème, SWEET16 participerait à l'import de sucres dans la vacuole afin d'assurer l'expansion des vaisseaux de xylème (Figure XX). Après la fin de l'expansion cellulaire, le dépôt de la paroi secondaire débute (Schuetz et al., 2012). Dans ce contexte et sur la base de nos résultats, nous suggérons que les sucres précédemment accumulés dans la vacuole seraient remobilisés vers le cytosol

#### IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

par l'action des transporteurs SWEET16 et SWEET17. Les sucres ainsi libérés dans le cytosol seraient utilisés comme précurseurs pour la synthèse des polysaccharides de parois. Notamment la spécificité de transport de SWEET17 pour le fructose, pose la question d'un rôle central de ce sucre dans la formation de la paroi secondaire du xylème. Bien que le lien entre le métabolisme du fructose et la formation de la paroi secondaire n'ait pas été spécifiquement étudié, un rôle des fructokinases, qui permettent la phosphorylation du fructose avant sa métabolisation par la cellule a été proposé (Granot et al., 2014; Stein et al., 2017). En complément, un transport de sucres entre les fibres et les vaisseaux en développement pourrait également intervenir par l'action de SWEET11 (Figure XX). A un stade de développement plus tardif, après la dégradation de la vacuole, la formation de la paroi secondaire se poursuit et la lignification des vaisseaux a lieu (Schuetz et al., 2012). Du fait de l'absence de la vacuole, les vaisseaux ne pourraient plus être autonomes quant aux ressources carbonées et devraient donc dépendre des cellules voisines. Un mécanisme de ce type a été mis en évidence concernant le transport des monolignols (Smith et al., 2013; Smith et al., 2017). Ainsi, les monolignols synthétisés dans les fibres de xylème et les cellules de parenchyme xylémiens seraient transportés via l'action de transporteurs de type ABC dans les vaisseaux en maturation afin de permettre la formation de la paroi secondaire. De plus les mêmes auteurs ont montré que contrairement aux vaisseaux dont la lignification est complètement dépendante des cellules environnantes (fibres et parenchyme xylémien), les fibres sont, quant à elles, autonomes pour leur lignification (Smith et al., 2017). Nos résultats permettent de suggérer un mécanisme similaire dans le cas du transport des sucres solubles (Figure XX). Ainsi les transporteurs SWEET11 et/ou SWEET12 assureraient le transport des sucres des fibres (SWEET11) et des parenchymes xylémiens (SWEET11 et SWEET12) vers les vaisseaux en cours de maturation. L'expression de *SWEET16* et *SWEET17* dans les cellules de parenchyme xylémien pourrait permettre de maintenir l'homéostasie des sucres dans ce type cellulaire.

Afin d'appuyer le modèle proposé ici, il serait intéressant de compléter les simples mutants *sweet* de façon cellule-spécifique par l'utilisation de promoteur uniquement exprimé dans les cellules de procambium (ex : *PXY* ou *WOX4*) (Etchells and Turner, 2010; Shi et al., 2019), des cellules de parenchyme xylémien (ex : *PRX47*) ou des fibres xylémiennes (ex : *PRX68*) (Smith et al., 2017).



**Figure 77 :** Modèle proposé pour le rôle des transporteurs SWEETs au cours de la différenciation du xylème chez *Arabidopsis thaliana*

Les différents stades de développement d'un vaisseau de xylème sont représentés avec la division cellulaire d'une cellule souche procambiale donnant naissance à une cellule précurseur de xylème. Cette cellule s'accroît et la paroi secondaire se dépose. La mort cellulaire programmée entraîne la destruction de tous les organites. Enfin, la paroi secondaire s'épaissie fortement pour donner naissance à un vaisseau mature capable de transporter l'eau à longue distance. Les transporteurs de sucres sont représentés par des ronds (orange, rose, vert, jaune ou blanc), les sucres sont présentés sous forme de petits ronds rouges, la vacuole est en bleue.

### 3. Sucres : nutriment ou signal ?

Les transporteurs SWEETs permettent le transport facilité des sucres, c'est-à-dire qu'ils transportent les sucres selon le gradient de concentration (Chen et al., 2010). Ainsi leur activité présuppose l'existence d'un gradient de sucres entre deux cellules ou deux compartiments sub-cellulaires. Cependant, la visualisation des gradients de sucres à l'échelle tissulaire constitue un challenge technique qui a été récemment traité par les travaux de Guendel et al. (2018) par l'utilisation d'une technique de spectroscopie vibrationnelle (FTIR). Cette technique a notamment été utilisée afin de comparer la distribution du saccharose dans l'hypocotyle entre des plantes de type sauvage et le double mutant *swt11swt12* et a permis de montrer une accumulation de saccharose dans les cellules cambiales et le xylème chez le double mutant *swt11swt12* comparé au type sauvage (Guendel et al., 2018). Outre le challenge technique que ces travaux représentent, les résultats obtenus illustrent la présence d'une perturbation du gradient de sucres entre les tissus chez le double mutant *swt11swt12*. Afin de compléter nos résultats il serait intéressant de voir si cette technique pourrait être adaptée à une analyse sur la hampe florale. Si c'est possible l'analyse de double mutant *swt16swt17* pourrait être particulièrement intéressant. En effet nos résultats ont montré que l'homéostasie des sucres est importante dans les étapes précoces du développement du xylème et qu'une perturbation de cette homéostasie induit des modifications transcriptionnelles des gènes impliqués dans la formation de la paroi secondaire. Dans ce contexte, la question d'un rôle des sucres en tant que nutriments et/ou de molécule signal se pose. En effet, outre un rôle connu dans le métabolisme général de la cellule (Lalonde et al., 2004), les sucres agissent également en tant que molécule signal (Li and Sheen, 2016). Cependant à ce jour, aucun récepteur de sucres n'a été décrit dans la littérature. La question d'un double rôle des protéines SWEETs en tant que transporteur et senseur de sucres, comme cela a été démontré pour le transcepteur de nitrate NRT1.1 (Bouguyon et al., 2015), se pose. Il se peut également que les sucres agissent au niveau transcriptionnel en régulant la transcription de facteurs de transcription impliqués dans le développement du système vasculaire via par exemple l'action des hexokinases (Cho et al., 2006). L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation des sucres pourrait permettre d'évaluer si celle-ci est modifiée dans les différents mutants *sweet*. De même l'analyse des lignées mutées dans l'expression des hexokinases ou des fructokinases avec les approches utilisées dans cette thèse pourrait permettre d'étudier le rôle entre le développement du xylème et la signalisation des sucres dans la hampe florale.



### 4. Perspectives à long terme

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons montré l'importance du transport facilité des sucres dans la croissance globale de la plante mais également dans le développement du xylème. Cependant, l'ensemble de cette étude a été réalisé alors que la hampe florale produit des tissus primaires, il serait donc intéressant de tester si des phénotypes similaires sont observés dans la hampe florale ou dans l'hypocotyle au cours de la croissance secondaire. De même, bien que le modèle *Arabidopsis thaliana* a été décrit comme proche de celui des arbres (Barra-Jiménez and Ragni, 2017), il serait intéressant d'évaluer l'effet de mutations dans les gènes *SWEET* chez des espèces ligneuses. D'ores et déjà une augmentation de l'expression de certains *SWEETs* a été identifiée dans le xylème au cours de la formation de la paroi secondaire chez le peuplier (Mahboubi and Niittylä, 2018). De plus, afin de mieux comprendre la relation entre le transport des sucres et le développement du xylème, il serait également intéressant de voir si des phénotypes similaires, à ceux observés chez les mutants *sweet*, sont observés sur des lignées mutées dans l'expression d'autres types de transporteurs de sucres (ex : SUC/SUT, TMT, STP).

---

V. REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

---



## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, W. W., Stewart, J. J., Cohu, C. M., Muller, O. and Demmig-Adams, B.** (2016). Habitat temperature and precipitation of *Arabidopsis thaliana* ecotypes determine the response of foliar vasculature, photosynthesis, and transpiration to growth temperature. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–18.
- Ainsworth, E. A. and Bush, D. R.** (2011). Carbohydrate export from the leaf: A highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol.* **155**, 64–69.
- Alet, A. I., Sanchez, D. H., Cuevas, J. C., del Valle, S., Altabella, T., Tiburcio, A. F., Marco, F., Ferrando, A., Espasandín, F. D., González, M. E., et al.** (2011). Putrescine accumulation in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines enhances tolerance to dehydration and freezing stress. *Plant Signal. Behav.* **6**, 278–286.
- Aloni, R.** (1987). Differentiation of vascular tissues. **38**, 179–204.
- Aloni, R. and Zimmermann, M. H.** (1983). The control of vessel size and density along the plant axis: A new hypothesis. *Differentiation* **24**, 203–208.
- Altamura, M. M., Possenti, M., Matteucci, A., Baima, S., Ruberti, I. and Morelli, G.** (2001). Development of the vascular system in the inflorescence stem of *Arabidopsis*. *New Phytol.* **151**, 381–389.
- Amor, Y., Haigler, C. H., Johnson, S., Wainscott, M. and Delmer, D. P.** (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9353–9357.
- Annunziata, M. G., Apelt, F., Carillo, P., Krause, U., Feil, R., Mengin, V., Lauxmann, M. A., Köhl, K., Nikoloski, Z., Stitt, M., et al.** (2017). Getting back to nature: A reality check for experiments in controlled environments. *J. Exp. Bot.* **68**, 4463–4477.
- Antoun, M. and Ouellet, F.** (2013). Growth temperature affects inflorescence architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Botany-Botanique* **91**, 642–651.
- Arend, M. and Fromm, J.** (2003). Ultrastructural changes in cambial cell derivatives during xylem differentiation in poplar. *Plant Biol.* **5**, 255–264.
- Aubry, E., Dinant, S., Vilaine, F., Bellini, C. and Le Hir, R.** (2019). Lateral transport of organic and inorganic solutes. *Plants* **8**, 1–25.
- Avila-Ospina, L., Clément, G. and Masclaux-Daubresse, C.** (2017). Metabolite profiling for leaf senescence in barley reveals decreases in amino acids and glycolysis intermediates. *Agronomy* **7**,.
- Ayre, B. G.** (2011). Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Mol. Plant* **4**, 377–394.
- Baker, R. F., Leach, K. A. and Braun, D. M.** (2012). SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Mol. Plant* **5**, 766–768.
- Barcelo, R. A.** (2005). Xylem parenchyma cells deliver the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta* **220**, 747–756.
- Baroja-Fernandez, E., Munoz, F. J., Li, J., Bahaji, A., Almagro, G., Montero, M., Etxeberria, E., Hidalgo, M., Sesma, M. T. and Pozueta-Romero, J.** (2012). Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* *Arabidopsis* mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 321–326.
- Barra-Jiménez, A. and Ragni, L.** (2017). Secondary development in the stem: when *Arabidopsis* and trees are closer than it seems. *Curr. Opin. Plant Biol.* **35**, 145–151.
- Barratt, D. H. P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J. E., Feil, R., Simpson, C., Maule, A. J. and Smith, A. M.** (2009). Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 13124–13129.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Basson, P. W. and Bierhorst, D. W.** (1967). An Analysis of Differential lateral Growth in the Stem of *Bauhinia surinamensis*. *Bull. Torrey Bot. Club* **94**, 404.
- Bauby, H., Divol, F., Truernit, E., Grandjean, O. and Palauqui, J. C.** (2007). Protophloem differentiation in early *Arabidopsis thaliana* development. *Plant Cell Physiol.* **48**, 97–109.
- Beauvoit, B. P., Colombie, S., Monier, A., Andrieu, M.-H., Biais, B., Benard, C., Cheniclet, C., Dieuaide-Noubhani, M., Nazaret, C., Mazat, J.-P., et al.** (2014). Model-Assisted Analysis of Sugar Metabolism throughout Tomato Fruit Development Reveals Enzyme and Carrier Properties in Relation to Vacuole Expansion. *Plant Cell* **26**, 3224–3242.
- Bennett, E. J., Roberts, J. A. and Wagstaff, C.** (2011). The role of the pod in seed development: Strategies for manipulating yield. *New Phytol.* **190**, 838–853.
- Benschop, J. J., Millenaar, F. F., Smeets, M. E., Van Zanten, M., Voesenek, L. A. C. J. and Peeters, A. J. M.** (2007). Abscisic acid antagonizes ethylene-induced hyponastic growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **143**, 1013–1023.
- Bergmeyer, H. V and Bernt, E.** (1974). Sucrose. In *Methods of enzymatic analysis* (ed. Bergmeyer, H. V), pp. 1176–1179. New York: Academic Press.
- Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., Benková, E., Mähönen, A. P. and Helariutta, Y.** (2011). A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Curr. Biol.* **21**, 917–926.
- Blob, B., Heo, J. ok and Helariutta, Y.** (2018). Phloem differentiation: an integrative model for cell specification. *J. Plant Res.* **131**, 31–36.
- Bohner, A., Kojima, S., Hajirezaei, M., Melzer, M. and Von Wirén, N.** (2015). Urea retranslocation from senescing *Arabidopsis* leaves is promoted by DUR3-mediated urea retrieval from leaf apoplast. *Plant J.* **81**, 377–387.
- Bollhöner, B., Zhang, B., Stael, S., Denancé, N., Overmyer, K., Goffner, D., Van Breusegem, F. and Tuominen, H.** (2013). Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements. *New Phytol.* **200**, 498–510.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mähönen, A. P., Hauser, M.-T. and Helariutta, Y.** (2003). APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 181–186.
- Bouguyon, E., Brun, F., Meynard, D., Kubeš, M., Pervent, M., Leran, S., Lacombe, B., Krouk, G., Guiderdoni, E., Zazimalová, E., et al.** (2015). Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transceptor NRT1.1. *Nat. Plants* **1**.
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J.** (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, *13*(7), 1499–1510.
- Brandes, A. F. D. N. and Barros, C. F.** (2008). Anatomia do lenho de oito espécies de lianas da família Leguminosae ocorrentes na Floresta Atlântica. *Acta Bot. Brasilica* **22**, 465–480.
- Brown, D. M., Zeef, L. A. H., Ellis, J., Goodacre, R. and Turner, S. R.** (2005). Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* **17**, 2281–2295.
- Bucci, S. J., Scholz, F. G., Goldstein, G., Meinzer, F. C. and Sternberg, L. D. S. L.** (2003). Dynamic changes in hydraulic conductivity in petioles of two savanna tree species: Factors and mechanisms contributing to the refilling of embolized vessels. *Plant, Cell Environ.* **26**, 1633–1645.
- Busse, J. S. and Evert, R. F.** (1999). Pattern of Differentiation of the First Vascular Elements in the Embryo and Seedling of *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Plant Sci.* **160**, 1–13.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Campbell, L. and Turner, S.** (2017). Regulation of vascular cell division. *J. Exp. Bot.* **68**, 27–43.
- Caño-Delgado, A., Lee, J. Y. and Demura, T.** (2010). Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 605–637.
- Cano-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J.-C., Nam, K. H., Li, J. and Chory, J.** (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development* **131**, 5341–5351.
- Carlquist, S.** (2015). Living cells in wood. 1. Absence, scarcity and histology of axial parenchyma as keys to function. *Bot. J. Linn. Soc.* **177**, 291–321.
- Carpita, N. C. and McCann, M. C.** (2015). Characterizing visible and invisible cell wall mutant phenotypes. *J. Exp. Bot.* **66**, 4146–4163.
- Carroll, A., Mansoori, N., Li, S., Lei, L., Vernhettes, S., Visser, R. G. F., Somerville, C., Gu, Y. and Trindade, L. M.** (2012). Complexes with mixed primary and secondary cellulose synthases are functional in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* **160**, 726–737.
- Cayla, T., Batailler, B., Le Hir, R., Revers, F., Anstead, J. A., Thompson, G. A., Grandjean, O. and Dinant, S.** (2015). Live Imaging of Companion Cells and Sieve Elements in Arabidopsis Leaves. *PLoS One* **10**, e0118122.
- Cayla, T., Le Hir, R. and Dinant, S.** (2019). Live-cell imaging of fluorescently-tagged phloem proteins with confocal microscopy. In *Phloem: Methods and Protocols* (ed. Johannes Liesche), p. In press. Springer.
- Chabannes, M., Barakate, A., Lapierre, C., Marita, J. M., Ralph, J., Pean, M., Danoun, S., Halpin, C., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A. M.** (2001). Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant J.* **28**, 257–270.
- Chaffey, N., Cholewa, E., Regan, S. and Sundberg, B.** (2002). Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiol. Plant.* **114**, 594–600.
- Chandran, D.** (2015). Co-option of developmentally regulated plant SWEET transporters for pathogen nutrition and abiotic stress tolerance. *IUBMB Life* **67**, 461–471.
- Chapotin, S. M., Razanameharizaka, J. H. and Holbrook, N. M.** (2006). Water relations of baobab trees (*Adansonia* spp. L.) during the rainy season: Does stem water buffer daily water deficits? *Plant, Cell Environ.* **29**, 1021–1032.
- Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P. A. W., Spinner, L., Clement, G., Chietera, G., L eran, S., Ferrand, M., Lacombe, B., et al.** (2013). Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **23**, 697–702.
- Chen, L. Q.** (2014). SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist*, 201(4)
- Chen, L.-Q., Cheung, L. S., Feng, L., Tanner, W. and Frommer, W. B.** (2015b). Transport of Sugars. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 865–894.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., et al.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527–532.
- Chen, L.-Q., Lin, I. W., Qu, X.-Q., Sosso, D., McFarlane, H. E., Londo o, A., Samuels, A. L. and Frommer, W. B.** (2015a). A Cascade of Sequentially Expressed Sucrose Transporters in the Seed Coat and Endosperm Provides Nutrition for the Arabidopsis Embryo. *Plant Cell* **27**, 607–619.



## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R. and Frommer, W. B.** (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* (80- ). **335**, 207–211.
- Cho, Y. H., Yoo, S. D. and Sheen, J.** (2006). Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. *Cell* **127**, 579–589.
- Clement, G., Moison, M., Soulay, F., Reisdorf-Cren, M. and Masclaux-Daubresse, C.** (2018). Metabolomics of laminae and midvein during leaf senescence and source-sink metabolite management in *Brassica napus* L. leaves. *J. Exp. Bot.* **69**, 891–903.
- Corbesier, L. and Coupland, G.** (2005). Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: Integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant, Cell Environ.* **28**, 54–66.
- Corbesier, L., Lejeune, P., & Bernier, G.** (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: Comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta*, 206(1)
- Coruzzi, G. M.** (2003). Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. *Arab. B.* **2**, e0010.
- Cosgrove, D. J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 850–861.
- Cronshaw, J.** (1981). Phloem structure and function. **32**, 465–484.
- De Boer, A. H. and Volkov, V.** (2003). Logistics of water and salt transport through the plant: Structure and functioning of the xylem. *Plant, Cell Environ.* **26**, 87–101.
- De Rybel, B., Adibi, M., Breda, A. S., Wendrich, J. R., Smit, M. E., Novák, O., Yamaguchi, N., Yoshida, S., Van Isterdael, G., Palovaara, J., et al.** (2014). Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in *Arabidopsis*. *Science* (80- ). **345**,.
- De Schepper, V. and Steppe, K.** (2011). Tree girdling responses simulated by a water and carbon transport model. *Ann. Bot.* **108**, 1147–1154.
- De Schepper, V., De Swaef, T., Bauweraerts, I. and Steppe, K.** (2013). Phloem transport: A review of mechanisms and controls. *J. Exp. Bot.* **64**, 4839–4850.
- Denay, G., Chahtane, H., Tichtinsky, G., & Parcy, F.** (2017). A flower is born: an update on *Arabidopsis* floral meristem formation. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 15–22.
- Dengler, N. G.** (2001). Regulation of vascular development. *J. Plant Growth Regul.* **20**, 1–13.
- Dengler, N. G.** (2006). The shoot apical meristem and development of vascular architecture. *Can. J. Bot.* **84**, 1660–1671.
- Dinant, S.** (2008). Phloem, transport between organs and long-distance signalling. *C. R. Biol.* **331**, 334–346.
- Dinant, S., Wolff, N., De Marco, F., Vilaine, F., Gissot, L., Aubry, E., Sandt, C., Bellini, C. and Le Hir, R.** (2019). Synchrotron FTIR and Raman spectroscopy provide unique spectral fingerprints for *Arabidopsis* floral stem vascular tissues. *J. Exp. Bot.* **70**, 871–884.
- Doidy, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L. and Wipf, D.** (2012). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci.* **17**, 413–422.
- Dresler, S., Wójciak-Kosior, M., Sowa, I., Strzemski, M., Sawicki, J., Kováčik, J. and Blicharski, T.** (2018). Effect of long-term strontium exposure on the content of phytoestrogens and allantoin in soybean. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–13.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Durand, M., Mainson, D., Porcheron, B., Maurousset, L., Lemoine, R. and Pourtau, N.** (2018). Carbon source–sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. *Planta* **247**, 587–611.
- Eames, A. J. and Macdaniels, L. H.** (1947). *An introduction to plant anatomy*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York and London.
- Earley, E. J., Inghand, B., Winkler, J. and Tonsor, S. J.** (2009). Inflorescences contribute more than rosettes to lifetime carbon gain in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* **96**, 786–792.
- Elwell, A. L., Gronwall, D. S., Miller, N. D., Spalding, E. P. and Durham Brooks, T. L.** (2011). Separating parental environment from seed size effects on next generation growth and development in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ.* **34**, 291–301.
- Emandi, A., Budrugaec, P., Emandi, I., Stanculescu, I. and Bugheanu, P.** (2010). The assesment of the decayed lime wood polymeric components by TG and FT-IR parameters correlation. *Int. J. Conserv. Sci.* **1**, 211–218.
- Emery, J. F., Floyd, S. K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N. P., Izhaki, A., Baum, S. F. and Bowman, J. L.** (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class IIIHD-ZIP and KANADI genes. *Curr. Biol.* **13**, 1768–1774.
- Eom, J. S., Chen, L.-Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, I. W., Qu, X.-Q., Braun, D. M. and Frommer, W. B.** (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**, 53–62.
- Esau, K.** (1965). *Plant anatomy*. John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney.
- Etchells, J. P. and Turner, S. R.** (2010). The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascularcell division. *Development* **137**, 767–774.
- Etchells, J. P., Provost, C. M., Mishr, L. and Turner, S. R.** (2013). WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Dev.* **140**, 2224–2234.
- Fàbregas, N. and Fernie, A. R.** (2019). The metabolic response to drought. *J. Exp. Bot.*
- Fàbregas, N., Formosa-Jordan, P., Confraria, A., Siligato, R., Alonso, J. M., Swarup, R., Bennett, M. J., Mähönen, A. P., Caño-Delgado, A. I. and Ibañes, M.** (2015). Auxin Influx Carriers Control Vascular Patterning and Xylem Differentiation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **11**, 1–26.
- Fàbregas, N., Lozano-Elena, F., Blasco-Escámez, D., Tohge, T., Martínez-Andújar, C., Albacete, A., Osorio, S., Bustamante, M., Riechmann, J. L., Nomura, T., et al.** (2018). Overexpression of the vascular brassinosteroid receptor BRL3 confers drought resistance without penalizing plant growth. *Nat. Commun.* **9**, 1–13.
- Faix, O.** (1991). Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforchung-International J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* **45**, 21–27.
- Fellah, A., Anjukandi, P., Waterland, M. R. and Williams, M. A. K.** (2009). Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. *Carbohydr. Polym.* **78**, 847–853.
- Figueroa, C. M. and Lunn, J. E.** (2016). A tale of two sugars: Trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiol.* **172**, 7–27.
- Fisher, K. and Turner, S.** (2007). PXY, a Receptor-like Kinase Essential for Maintaining Polarity during Plant Vascular-Tissue Development. *Curr. Biol.* **17**, 1061–1066.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fukuda, H.** (1992). Tracheary Element Formation as a Model System of Cell Differentiation. *Int. Rev. Cytol.* **136**, 289–332.
- Fukuda, H.** (1996). Xylogenesis: initiation, progression and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 299–325.
- Fukuda, H.** (1997). Tracheary element differentiation. *Plant Cell* **9**, 1147–1156.
- Furuta, K. M., Yadav, S. R., Lehesranta, S., Belevich, I., Miyashima, S., Heo, J., Vatén, A., Lindgren, O., De Rybel, B., Van Isterdael, G., et al.** (2014). Arabidopsis NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation. *Science* (80-. ). **345**, 933–938.
- Gälweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K.** (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* (80-. ). **282**, 2226–2230.
- Gebauer, P., Korn, M., Engelsdorf, T., Sonnewald, U., Koch, C. and Voll, L. M.** (2017). Sugar Accumulation in Leaves of Arabidopsis sweet11/sweet12 Double Mutants Enhances Priming of the Salicylic Acid-Mediated Defense Response. *Front. Plant Sci.* **8**, 1–13.
- Geiger, D. R. and Servaites, J. C.** (1994). Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 235–256.
- Gerber, L., Zhang, B., Roach, M., Rende, U., Gorzsás, A., Kumar, M., Burgert, I., Niittylä, T. and Sundberg, B.** (2014). Deficient sucrose synthase activity in developing wood does not specifically affect cellulose biosynthesis, but causes an overall decrease in cell wall polymers. *New Phytol.* **203**, 1220–1230.
- Glasziou, K. T. and Gayler, K. R.** (1972). Sugar Accumulation in Sugarcane. *Plant Physiol.* **49**, 912–913.
- Goldstein, B.** (1995). An analysis of the response to gut induction in the *C. elegans* embryo. *Development* **121**, 1227–1236.
- Gong, X., Liu, M., Zhang, L., Ruan, Y., Ding, R., Ji, Y., Zhang, N., Zhang, S., Farmer, J. and Wang, C.** (2015). Arabidopsis AtSUC2 and AtSUC4, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. *Physiol. Plant.* **153**, 119–136.
- Gorzsás, A., Stenlund, H., Persson, P., Trygg, J. and Sundberg, B.** (2011). Cell-specific chemotyping and multivariate imaging by combined FT-IR microspectroscopy and orthogonal projections to latent structures (OPLS) analysis reveals the chemical landscape of secondary xylem. *Plant J.* **66**, 903–914.
- Gottwald, J. R., Krysan, P. J., Young, J. C., Evert, R. F. and Sussman, M. R.** (2000). Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13979–13984.
- Gould, N., Thorpe, M. R., Pritchard, J., Christeller, J. T., Williams, L. E., Roeb, G., Schurr, U. and Minchin, P. E. H.** (2012). AtSUC2 has a role for sucrose retrieval along the phloem pathway: evidence from carbon-11 tracer studies. *Plant Sci. an Int. J. Exp. plant Biol.* **188**, 97.
- Granot, D., David-Schwartz, R. and Kelly, G.** (2013). Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Front. Plant Sci.* **4**, 1–17.
- Granot, D., Kelly, G., Stein, O. and David-Schwartz, R.** (2014). Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *J. Exp. Bot.* **65**, 809–819.
- Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warten Jr, J. D., Steffens, G. L., Flippen-Anderson, J. L. and Cook Jr, J. C.** (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroidal isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**, 216–217.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Guendel, A., Rolletschek, H., Wagner, S., Muszynska, A. and Borisjuk, L.** (2018). Micro imaging displays the sucrose landscape within and along its allocation pathways. *Plant Physiol.* **49**,.
- Guo, W. J., Nagy, R., Chen, H. Y., Pfrunder, S., Yu, Y. C., Santelia, D., ... Martinoia, E.** (2014). SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiology*, *164*(2), 777–789.
- Hafke, J. B., van Amerongen, J.-K., Kelling, F., Furch, A. C. U., Gaupels, F. and van Bel, A. J. E.** (2005). Thermodynamic battle for photosynthate acquisition between sieve tubes and adjoining parenchyma in transport phloem. *Plant Physiol.* **138**, 1527–37.
- Hajhashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J. M. C., Djalovic, I. and Siddique, K. H. M.** (2018). Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of stevia rebaudiana. *Front. Plant Sci.* **9**, 1–12.
- Hall, H. C., Cheung, J., & Ellis, B. E.** (2013). Immunoprofiling reveals unique cell-specific patterns of wall epitopes in the expanding Arabidopsis stem. *Plant Journal*, *74*(1), 134–147.
- Hamacher, T., Becker, J., Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal, B. and Boles, E.** (2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* **148**, 2783–2788.
- Handa, A. K., Fatima, T. and Mattoo, A. K.** (2018). Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Front. Chem.* **6**, 1–18.
- Hanzawa, Y.** (2000). ACAULIS5, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J.* **19**, 4248–4256.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T. and Komeda, Y.** (1997). ACL5: An Arabidopsis gene required for internodal elongation after flowering. *Plant J.* **12**, 863–874.
- Haritatos, E., Medville, R. and Turgeon, R.** (2000). Minor vein structure and sugar transport in Arabidopsis thaliana. *Planta* **211**, 105–111.
- Havé, M., Marmagne, A., Chardon, F. and Masclaux-Daubresse, C.** (2017). Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from Arabidopsis to crops. *J. Exp. Bot.* **68**, 2513–2529.
- Hengherr, S., Heyer, A. G., Köhler, H. R. and Schill, R. O.** (2008). Trehalose and anhydrobiosis in tardigrades - Evidence for divergence in responses to dehydration. *FEBS J.* **275**, 281–288.
- Heo, J. -o., Roszak, P., Furuta, K. M. and Helariutta, Y.** (2014). Phloem development: Current knowledge and future perspectives. *Am. J. Bot.* **101**, 1393–1402.
- Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araújo, W. L., & Braun, H. P.** (2015). Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant*, *8*(11), 1563–1579.
- Hincha, D. K.** (2003). Effects of calcium-induced aggregation on the physical stability of liposomes containing plant glycolipids. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1611**, 180–186.
- Hirakawa, Y., Kondo, Y. and Fukuda, H.** (2010). TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 2618–2629.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y. and Fukuda, H.** (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 15208–15213.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. and Buitink, J.** (2001). Mechanism of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**, 431–438.
- Hoffmann-Thoma, G., Hinkel, K., Nicolay, P. and Willenbrink, J.** (1996). Sucrose accumulation in sweet sorghum stem internodes in relation to growth. *Physiol. Plant.* **97**, 277–284.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Holbrook, N. M. and Zwieniecki, M. A.** (2005). *Vascular transport in plants*. (ed. Harold A. Mooney) Elsevier Academic Press.
- Hussey, S. G., Mizrachi, E., Creux, N. M. and Myburg, A. A.** (2013). Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Front. Plant Sci.* **4**, 1–21.
- Ibanes, M., Fabregas, N., Chory, J. and Cano-Delgado, A. I.** (2009). Brassinosteroid signaling and auxin transport are required to establish the periodic pattern of Arabidopsis shoot vascular bundles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 13630–13635.
- Jensen, K. H., Berg-Sørensen, K., Bruus, H., Holbrook, N. M., Liesche, J., Schulz, A., Zwieniecki, M. A. and Bohr, T.** (2016). Sap flow and sugar transport in plants. *Rev. Mod. Phys.* **88**.
- Julius, B. T., Leach, K. A., Tran, T. M., Mertz, R. A. and Braun, D. M.** (2017). Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. *Plant Cell Physiol.* **58**, 1442–1460.
- Kacuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N. and Ebringerová, A.** (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* **43**, 195–203.
- Kačuráková, M., Smith, A. C., Gidley, M. J. and Wilson, R. H.** (2002). Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **337**, 1145–1153.
- Kačuráková, M., Wellner, N., Ebringerová, A., Hromádková, Z., Wilson, R. H. and Belton, P. S.** (1999). Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocoll.* **13**, 35–41.
- Kalmbach, L. and Helariutta, Y.** (2019). Sieve plate pores in the phloem and the unknowns of their formation. *Plants* **8**, 1–13.
- Kang, J., Tang, J., Donnelly, P. and Dengler, N. G.** (2003). Primary vascular pattern and expression of ATHB-8 in shoots of Arabidopsis. *New Phytol.* **158**, 443–454.
- Kanno, Y., Oikawa, T., Chiba, Y., Ishimaru, Y., Shimizu, T., Sano, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Ueda, M. and Seo, M.** (2016). AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nat. Commun.* **7**, 1–11.
- Kempers, R. and Van Bel, A. J. E.** (1997). Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* **201**, 195–201.
- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W. and Cuypers, A.** (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: Extending the traditional concept. *Plant, Cell Environ.* **36**, 1242–1255.
- Kim, J. S. and Daniel, G.** (2012a). Immunolocalization of hemicelluloses in Arabidopsis thaliana stem. Part II: Mannan deposition is regulated by phase of development and its patterns of temporal and spatial distribution differ between cell types. *Planta* **236**, 1367–1379.
- Kim, J. S. and Daniel, G.** (2012b). Immunolocalization of hemicelluloses in Arabidopsis thaliana stem. Part I: Temporal and spatial distribution of xylans. *Planta* **236**, 1275–1288.
- Klee, H. and Estelle, M.** (1991). Approaches To Plant Hormone Biology. *Genet. Anal.*
- Klemens, P. A. W., Patzke, K., Deitmer, J., Spinner, L., Le Hir, R., Bellini, C., Bedu, M., Chardon, F., Krapp, A. and Neuhaus, H. E.** (2013). Overexpression of the Vacuolar Sugar Carrier AtSWEET16 Modifies Germination, Growth, and Stress Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **163**, 1338–1352.
- Klemens, P. A. W., Patzke, K., Trentmann, O., Poschet, G., Büttner, M., Schulz, A., Marten, I.,**



## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hedrich, R. and Neuhaus, H. E.** (2014). Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination. *New Phytol.* **202**, 188–197.
- Koch, K.** (2004). Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 235–246.
- Krasensky, J. and Jonak, C.** (2012). Drought , salt , and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exp. Bot.* **63**, 1593–1608.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H. and Demura, T.** (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* **19**, 1855–1860.
- Kubo, S. and Kadla, J. F.** (2005). Hydrogen bonding in lignin: a fourier transform infrared model compound study. *Biomacromolecules* **6**, 2815–2821.
- Kumar, M. and Turner, S.** (2015). Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms. *Phytochemistry* **112**, 91–99.
- Lahlali, R., Karunakaran, C., Wang, L., Willick, I., Schmidt, M., Liu, X., Borondics, F., Forseille, L., Fobert, P. R., Tanino, K., et al.** (2015). Synchrotron based phase contrast X-ray imaging combined with FTIR spectroscopy reveals structural and biomolecular differences in spikelets play a significant role in resistance to Fusarium in wheat. *BMC Plant Biol.* **15**,.
- Lalonde, S., Wipf, D. and Frommer, W. B.** (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 341–372.
- Lauxmann, M. A., Annunziata, M. G., Brunoud, G., Wahl, V., Koczut, A., Burgos, A., Olas, J. J., Maximova, E., Abel, C., Schlereth, A., et al.** (2016). Reproductive failure in *Arabidopsis thaliana* under transient carbohydrate limitation: Flowers and very young siliques are jettisoned and the meristem is maintained to allow successful resumption of reproductive growth. *Plant Cell Environ.* **39**, 745–767.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C.** (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, *4*(1), 112–166.
- Le Hir, R., & Bellini, C.** (2013). The plant-specific Dof transcription factors family: New players involved in vascular system development and functioning in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, *4*(MAY).
- Le Hir, R., Beneteau, J., Bellini, C., Vilaine, F., & Dinant, S.** (2008). Gene expression profiling: keys for investigating phloem functions. *Trends in Plant Science*, *13*(6), 273–280.
- Le Hir, R., Spinner, L., Klemens, P. A. W., Chakraborti, D., De Marco, F., Vilaine, F., Wolff, N., Lemoine, R., Porcheron, B., Géry, C., et al.** (2015). Disruption of the Sugar Transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 Affects Vascular Development and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **8**, 1687–1690.
- Lejeune, P., Bernier, G., Requier, M.-C. and Kinet, J.-M.** (1993). Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba*. *Planta* **190**, 71–74.
- Lemoine, R., Camera, S. La, Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.-L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., et al.** (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.*
- Leonardos, E. D., Rauf, S. A., Weraduwage, S. M., Marillia, E.-F., Taylor, D. C., Micallef, B. J. and Grodzinski, B.** (2014). *Photosynthetic capacity of the inflorescence is a major contributor to daily-C-gain and the responsiveness of growth to elevated CO2 in Arabidopsis thaliana with*



## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*repressed expression of mitochondrial-pyruvate-dehydrogenase-kinase*. Elsevier B.V.

- Lescano, C. I., Martini, C., González, C. A. and Desimone, M.** (2016). Allantoin accumulation mediated by allantoinase downregulation and transport by Ureide Permease 5 confers salt stress tolerance to Arabidopsis plants. *Plant Mol. Biol.* **91**, 581–595.
- Lev-Yadun, S.** (1994). Induction of sclereid differentiation in the pith of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *J. Exp. Bot.* **45**, 1845–1849.
- Li, L. and Sheen, J.** (2016). Dynamic and diverse sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **33**, 116–125.
- Li, Y., Shrestha, B. and Vertes, A.** (2007). Atmospheric pressure molecular imaging by infrared MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 523–532.
- Li, Z., Fernie, A. R., & Persson, S.** (2016). Transition of primary to secondary cell wall synthesis. *Science Bulletin*, *61*(11), 838–846.
- Lough, T. J. and Lucas, W. J.** (2006). Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 203–232.
- Lucas, W. J., Ding, B. and Van Der Schoot, C.** (1993). Plasmodesmata and supracellular nature of plants. *New Phytol.* **125**, 435–476.
- Lucas, W. J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S. R., Helariutta, Y., He, X. Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S. M., et al.** (2013). The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions. *J. Integr. Plant Biol.* **55**, 294–388.
- Ludewig, F. and Flügge, U.-I.** (2013). Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Front. Plant Sci.* **4**, 231.
- Mahboubi, A., & Niittylä, T.** (2018). Sucrose transport and carbon fluxes during wood formation. *Physiologia Plantarum*, *164*(1), 67–81.
- Mahboubi, A., Ratke, C., Gorzsás, A., Kumar, M., Mellerowicz, E. J. and Niittylä, T.** (2013). Aspen SUCROSE TRANSPORTER3 Allocates Carbon into Wood Fibers. *Plant Physiol.* **163**, 1729–1740.
- Marriott, P. E., Gómez, L. D. and Mcqueen-Mason, S. J.** (2016). Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytol.* **209**, 1366–1381.
- Matos, D. A., Whitney, I. P., Harrington, M. J. and Hazen, S. P.** (2013). Cell walls and the developmental anatomy of the Brachypodium distachyon stem internode. *PLoS One* **8**.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K. and Kakimoto, T.** (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20027–20031.
- Mazur, E., Kurczyńska, E. U. and Friml, J.** (2014). Cellular events during interfascicular cambium ontogenesis in inflorescence stems of Arabidopsis. *Protoplasma* **251**, 1125–1139.
- Mazurek, S., Mucciolo, A., Humbel, B. M. and Nawrath, C.** (2013). Transmission Fourier transform infrared microspectroscopy allows simultaneous assessment of cutin and cell-wall polysaccharides of Arabidopsis petals. *Plant J.* **74**, 880–891.
- McCann, M. C., Hammouri, M., Wilson, R., Belton, P. S. and Roberts, K.** (1992). Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Is a New Way to Look at Plant Cell Walls. *Plant Physiol.* **100**, 1940–1947.
- McConnell, J. R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. and Barton, M. K.** (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* **411**, 709–713.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- McDougall, G. J. and Fry, S. C.** (1990). Xyloglucan oligosaccharides promote growth and activate cellulase: Evidence for a role of cellulase in cell expansion. *Plant Physiol.* **93**, 1042–1048.
- McFarlane, H. E., Döring, A. and Persson, S.** (2014). The cell biology of cellulose synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 69–94.
- McGaughey, S. A., Osborn, H. L., Chen, L., Pegler, J. L., Tyerman, S. D., Furbank, R. T., Byrt, C. S. and Grof, C. P. L.** (2016). Roles of aquaporins in setaria viridis stem development and sugar storage. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–13.
- McKhann, H. I., Gery, C., Bérard, A., Lévêque, S., Zuther, E., Hinch, D. K., De Mita, S., Brunel, D. and Téoulé, E.** (2008). Natural variation in CBF gene sequence, gene expression and freezing tolerance in the Versailles core collection of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **8**, 105.
- Medeiros, J. S. and Ward, J. K.** (2013). Increasing atmospheric [CO<sub>2</sub>] from glacial to future concentrations affects drought tolerance via impacts on leaves, xylem and their integrated function. *New Phytol.* **199**, 738–748.
- Ménard, D., & Pesquet, E.** (2015). Cellular interactions during tracheary elements formation and function. *Current Opinion in Plant Biology*, **23**, 109–115.
- Mifflin, B. J. and Habash, D. Z.** (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* **53**, 979–987.
- Milne, R. J., Perroux, J. M., Rae, A. L., Reinders, A., Ward, J. M., Offler, C. E., Patrick, J. W. and Grof, C. P. L.** (2017). Sucrose Transporter Localization and Function in Phloem Unloading in Developing Stems. *Plant Physiol.* **173**, 1330–1341.
- Minchin, P. E. H. and Thorpe, M. R.** (1984). Apoplastic phloem unloading in the stem of bean. *J. Exp. Bot.* **35**, 538–550.
- Minchin, P. E. H. and Thorpe, M. R.** (1987). Measurement of unloading and reloading of photo-assimilate within the stem of bean. *J. Exp. Bot.* **38**, 211–220.
- Mizuno, H., Kasuga, S. and Kawahigashi, H.** (2016). The sorghum SWEET gene family: Stem sucrose accumulation as revealed through transcriptome profiling. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 1–12.
- Mohebbi, B.** (2008). Application of ATR infrared spectroscopy in wood acetylation. *J. Agric. Sci. Technol.* **10**, 253–259.
- Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S. and Höfte, H.** (2003). Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J.* **35**, 393–404.
- Mouille, G., Witucka-wall, H., Bruyant, M.-P., Loudet, O., Pelletier, S., Pauly, M., Rihouey, C., Lerouxel, O., Lerouge, P. and Höfte, H.** (2006). Quantitative Trait Loci Analysis of Primary Cell Wall Composition in *Arabidopsis* 1. *Plant Physiol.* **141**, 1035–1044.
- Muniz, L., Minguet, E. G., Singh, S. K., Pesquet, E., Vera-Sirera, F., Moreau-Courtois, C. L., Carbonell, J., Blazquez, M. A. and Tuominen, H.** (2008). ACAULIS5 controls *Arabidopsis* xylem specification through the prevention of premature cell death. *Development* **135**, 2573–2582.
- Nagawa, S., Sawa, S., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. and Fukuda, H.** (2006). Gene trapping in *Arabidopsis* reveals genes involved in vascular development. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1394–1405.
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N. A. and Ohtani, M.** (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front. Plant Sci.* **6**, 288.
- Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-**

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shinozaki, K.** (2000). Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.* **42**, 657–665.
- Nardini, A., Lo Gullo, M. A. and Salleo, S.** (2011). Refilling embolized xylem conduits: is it a matter of phloem unloading? *Plant Sci.* **180**, 604–611.
- Nelson, T. and Dengler, N. G.** (1997). Leaf Vascular Pattern Formation. *Plant Cell* **9**, 1121–1135.
- Niño-González, M., Novo-Uzal, E., Richardson, D. N., Barros, P. M. and Duque, P.** (2019). More Transporters, More Substrates: The Arabidopsis Major Facilitator Superfamily Revisited. *Mol. Plant* **12**, 1182–1202.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S.** (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* **147**, 1251–1263.
- Nourimand, M. and Todd, C. D.** (2016). Allantoin increases cadmium tolerance in Arabidopsis via activation of antioxidant mechanisms. *Plant Cell Physiol.* **57**, 2485–2496.
- Ohmae, Y., Hirose, A., Sugita, R., Tanoi, K. and Nakanishi, T. M.** (2013). Carbon-14 labelled sucrose transportation in an Arabidopsis thaliana using an imaging plate and real time imaging system. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **296**, 413–416.
- Park, J., Kim, H. K., Ryu, J., Ahn, S., Lee, S. J. and Hwang, I.** (2015). Functional water flow pathways and hydraulic regulation in the xylem network of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **56**, 520–531.
- Patrick, J. W.** (1997). PHLOEM UNLOADING: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 191–222.
- Patrick, J. W., Botha, F. C. and Birch, R. G.** (2013). Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnol. J.* **11**, 142–156.
- Paul, S., M.K., D., Baishy, P., Tamteke, A., Farooq, M., Barrowa, B., Sunkar, R. and Gogoi, N.** (2017). Effect of high temperature on yield associated parameters and vascular bundle development in five potato cultivars. *Sci. Hort. (Amsterdam)*. **225**, 134–140.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**,.
- Phukan, U. J., Jeena, G. S., Tripathi, V., & Shukla, R. K.** (2018). MaRAP2-4, a waterlogging-responsive ERF from Mentha, regulates bidirectional sugar transporter AtSWEET10 to modulate stress response in Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1)
- Pittman, J. K., Shigaki, T., Marshall, J. L., Morris, J. L., Cheng, N. H., & Hirschi, K. D.** (2004). Functional and regulatory analysis of the Arabidopsis thaliana CAX2 cation transporter. *Plant Molecular Biology*, 56(6), 959–971.
- Pommerrenig, B., Ludewig, F., Cvetkovic, J., Trentmann, O., Klemens, P. A. W. and Neuhaus, H. E.** (2018). In concert: Orchestrated changes in carbohydrate homeostasis are critical for plant abiotic stress tolerance. *Plant Cell Physiol.* **59**, 1290–1299.
- Pouteau, S., & Albertini, C.** (2011). An assessment of morphogenetic fluctuation during reproductive phase change in Arabidopsis. *Annals of Botany*, 107(6), 1017–1027.
- Qaderi, M. M., Martel, A. B. and Dixon, S. L.** (2019). Environmental factors influence plant vascular system and water regulation. *Plants* **8**, 65.
- Ragni, L. and Greb, T.** (2018). Secondary growth as a determinant of plant shape and form. *Semin. Cell Dev. Biol.* **79**, 58–67.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Raven, J. A.** (1991). Long-term functioning of enucleate sieve elements: Possible mechanism of damage avoidance and damage repair. *Plant Cell Environ.* **14**, 139–146.
- RAVEN, J. A.** (1992). Present and potential uses of the natural abundance of stable isotopes in plant science, with illustrations from the marine environment. *Plant. Cell Environ.* **15**, 1083–1091.
- Rende, U., Wang, W., Gandla, M. L., Jönsson, L. J. and Niittylä, T.** (2017). Cytosolic invertase contributes to the supply of substrate for cellulose biosynthesis in developing wood. *New Phytol.* **214**, 796–807.
- Rennie, E. A. and Scheller, H. V.** (2014). Xylan biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **26**, 100–107.
- Rennie, E. A. and Turgeon, R.** (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14162–7.
- Roach, M., Arrivault, S., Mahboubi, A., Krohn, N., Sulpice, R., Stitt, M. and Niittylä, T.** (2017). Spatially resolved metabolic analysis reveals a central role for transcriptional control in carbon allocation to wood. *J. Exp. Bot.* **68**, 3529–3539.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 675–709.
- Romano, C. P., Hein, M. B. and Klee, H. J.** (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev.* **5**, 438–446.
- Rosen, H.** (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 10–15.
- Ross-Elliott, T. J., Jensen, K. H., Haaning, K. S., Wager, B. M., Knoblauch, J., Howell, A. H., Mullendore, D. L., Monteith, A. G., Paultre, D., Yan, D., et al.** (2017). Phloem unloading in *Arabidopsis* roots is convective and regulated by the phloem-pole pericycle. *Elife* **6**, 1–31.
- Rubio-Díaz, S., Pérez-Pérez, J. M., González-Bayón, R., Muñoz-Viana, R., Borrega, N., Mouille, G., Hernández-Romero, D., Robles, P., Höfte, H., Ponce, M. R., et al.** (2012). Cell expansion-mediated organ growth is affected by mutations in three EXIGUA genes. *PLoS One* **7**, .
- Sager, R. and Lee, J. Y.** (2014). Plasmodesmata in integrated cell signalling: Insights from development and environmental signals and stresses. *J. Exp. Bot.* **65**, 6337–6358.
- Salleo, S., Lo Gullo, M. A., Trifilò, P. and Nardini, A.** (2004). New evidence for a role of vessel-associated cells and phloem in the rapid xylem refilling of cavitated stems of *Laurus nobilis* L. *Plant, Cell Environ.* **27**, 1065–1076.
- Sanchez, P., Nehlin, L. and Greb, T.** (2012). From thin to thick: Major transitions during stem development. *Trends Plant Sci.* **17**, 113–121.
- Sauer, N.** (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* **581**, 2309–2317.
- Sauer, N. and Stolz, J.** (1994). SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J.* **6**, 67–77.
- Scarpella, E. and Helariutta, Y.** (2010). Chapter Eight-Vascular Pattern Formation in Plants. *Curr. Top. Dev. Biol.* **91**, 221–265.
- Schieber, M. and Chandel, N. S.** (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24**, R453–R462.
- Schlesinger, A., Shelton, C. A., Maloof, J. N., Meneghini, M. and Bowerman, B.** (1999). Wnt pathway components orient a mitotic spindle in the early *Caenorhabditis elegans* embryo without

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- requiring gene transcription in the responding cell. *Genes Dev.* **13**, 2028–2038.
- Schuetz, M., Smith, R. and Ellis, B.** (2012). Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *J. Exp. Bot.* **64**, 11–31.
- Secchi, F. and Zwieniecki, M. A.** (2011). Sensing embolism in xylem vessels: The role of sucrose as a trigger for refilling. *Plant, Cell Environ.* **34**, 514–524.
- Secchi, F., Pagliarani, C. and Zwieniecki, M. A.** (2017). The functional role of xylem parenchyma cells and aquaporins during recovery from severe water stress. *Plant Cell Environ.* **40**, 858–871.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K.** (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 296–302.
- Sellami, S., Le Hir, R., Thorpe, M. R., Aubry, E., Wolff, N., Vilaine, F., Brini, F. and Dinant, S.** (2019a). Arabidopsis natural accessions display adaptations in inflorescence growth and vascular anatomy to withstand high salinity during reproductive growth. *Plants* **8**, 2–17.
- Sellami, S., Le Hir, R., Thorpe, M. R., Vilaine, F., Wolff, N., Brini, F. and Dinant, S.** (2019b). Salinity Effects on Sugar Homeostasis and Vascular Anatomy in the Stem of the Arabidopsis Thaliana Inflorescence. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3167.
- Séné, C. F. B., McCann, M. C., Wilson, R. H. and Grinter, R.** (1994). Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Plant Physiol.* **106**, 1623–1631.
- Shafi, A., Chauhan, R., Gill, T., Swarnkar, M. K., Sreenivasulu, Y., Kumar, S., Kumar, N., Shankar, R., Ahuja, P. S. and Singh, A. K.** (2015). Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in Arabidopsis under salt stress. *Plant Mol. Biol.* **87**, 615–631.
- Shi, D., Lebovka, I., López-Salmerón, V., Sanchez, P. and Greb, T.** (2019). Bifacial cambium stem cells generate xylem and phloem during radial plant growth. *Development* **146**, dev171355.
- Shi, H. and Chan, Z.** (2014). Improvement of plant abiotic stress tolerance through modulation of the polyamine pathway. *J. Integr. Plant Biol.* **56**, 114–121.
- Sibout, R., Eudes, A., Mouille, G., Pollet, B., Lapierre, C., Jouanin, L. and Séguin, A.** (2005). CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 2059–2076.
- Slewinski, T. L.** (2011). Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: A physiological perspective. *Molecular Plant*, **4**(4), 641–662.
- Smetana, O., Mäkilä, R., Lyu, M., Amiryousefi, A., Rodríguez, F. S., Wu, M., Solé-gil, A., Gavarrón, M. L., Siligato, R., Miyashima, S., et al.** (2019). High levels of auxin signalling define the stem-cell organizer of the vascular cambium. *Nature* **565**, 485–491.
- Smith, R. A., Schuetz, M., Karlen, S. D., Bird, D., Tokunaga, N., Sato, Y., Mansfield, S. D., Ralph, J. and Samuels, A. L.** (2017). Defining the Diverse Cell Populations Contributing to Lignification in Arabidopsis thaliana Stems. *Plant Physiol.* **174**, 1028–1036.
- Smith, R. A., Schuetz, M., Roach, M., Mansfield, S. D., Ellis, B., & Samuels, L.** (2013). Neighboring parenchyma cells contribute to Arabidopsis xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *Plant Cell*, **25**(10), 3988–3999.
- Somerville, C.** (2006). Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 53–78.
- Sosso, D., Luo, D., Li, Q. B., Sasse, J., Yang, J., Gendrot, G., Suzuki, M., Koch, K. E., McCarty, D. R., Chourey, P. S., et al.** (2015). Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nat. Genet.* **47**, 1489–1493.



## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Spicer, R.** (2014). Symplasmic networks in secondary vascular tissues: Parenchyma distribution and activity supporting long-distance transport. *J. Exp. Bot.* **65**, 1829–1848.
- Spicer, R. and Groover, A.** (2010). Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytol.* **186**, 577–592.
- Srivastava, A. C., Ganesan, S., Ismail, I. O. and Ayre, B. G.** (2008). Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 sucrose/H<sup>+</sup> symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiol.* **148**, 200–211.
- Stadler, R. and Sauer, N.** (1996). The Arabidopsis thaliana AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot. Acta* **109**, 299–306.
- Stein, O., Avin-Wittenberg, T., Krahnert, I., Zemach, H., Bogol, V., Daron, O., Aloni, R., Fernie, A. R. and Granot, D.** (2014). Arabidopsis Fructokinases Are Important for Seed Oil Accumulation and Vascular Development. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–16.
- Stein, O., Damari-Weissler, H., Secchi, F., Rachamilevitch, S., German, M. A., Yeselson, Y., Amir, R., Schaffer, A., Holbrook, N. M., Aloni, R., et al.** (2016). The tomato plastidic fructokinase SIFRK3 plays a role in xylem development. *New Phytol.* **209**, 1484–1495.
- Steppe, K. and Lemeur, R.** (2004). An experimental system for analysis of the dynamic sap-flow characteristics in young trees: Results of a beech tree. *Funct. Plant Biol.* **31**, 83–92.
- Stewart, J. J., Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Wenzl, C. A., Muller, O. and Adams, W. W.** (2016). Growth temperature impact on leaf form and function in Arabidopsis thaliana ecotypes from northern and southern Europe. *Plant Cell Environ.* **39**, 1549–1558.
- Stewart, J. J., Polutchko, S. K., Adams, W. W., Cohu, C. M., Wenzl, C. A. and Demmig-Adams, B.** (2017). Light, temperature and tocopherol status influence foliar vascular anatomy and leaf function in Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant.* **160**, 98–110.
- Stitt, M. and Zeeman, S. C.** (2012). Starch turnover: Pathways, regulation and role in growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 282–292.
- Stitt, M., Sulpice, R. and Keurentjes, J.** (2010). Metabolic networks: How to identify key components in the regulation of metabolism and growth. *Plant Physiol.* **152**, 428–444.
- Sugita, R., Kobayashi, N. I., Hirose, A., Saito, T., Iwata, R., Tanoi, K. and Nakanishi, T. M.** (2016). Visualization of uptake of mineral elements and the dynamics of photosynthates in arabidopsis by a newly developed Real-Time Radioisotope Imaging System (RRIS). *Plant Cell Physiol.* **57**, 743–753.
- Sulpice, R., Pyl, E. T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M. C., et al.** (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10348–10353.
- Synytsya, A., Čopíková, J., Matějka, P. and Machovič, V.** (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydr. Polym.* **54**, 97–106.
- Tardieu, F. and Granier, C.** (2000). Quantitative analysis of cell division in leaves: methods, developmental patterns and effects of environmental conditions. *Plant Mol. Biol.* **43**, 555–567.
- Tarpley, L. and Vietor, D. M.** (2007). Compartmentation of sucrose during radial transfer in mature sorghum culm. *BMC Plant Biol.* **7**, 1–10.
- Todaka, D., Zhao, Y., Yoshida, T., Kudo, M., Kidokoro, S., Mizoi, J., Kodaira, K. S., Takebayashi, Y., Kojima, M., Sakakibara, H., et al.** (2017). Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. *Plant J.* **90**, 61–78.



## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Truernit, E. and Sauer, N.** (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of B-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* **196**, 564–570.
- Truernit, E., Bauby, H., Belcram, K., Barthelemy, J. and Palauqui, J.-C.** (2012). OCTOPUS, a polarly localised membrane-associated protein, regulates phloem differentiation entry in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **139**, 1306–1315.
- Trusov, Y. and Botella, J. R.** (2016). Plant G-Proteins Come of Age: Breaking the Bond with Animal Models. *Front. Chem.* **4**, 1–9.
- Turner, S. R. and Sommerville, C. R.** (1997). Collapsed Xylem Phenotype of *Arabidopsis* Identifies Mutants Deficient in Cellulose Deposition in the Secondary Cell Wall. *Plant Cell* **9**, 689–701.
- Turner, S., Gallois, P. and Brown, D.** (2007). Tracheary element differentiation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 407–433.
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., et al.** (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *Plant J.* **57**, 1065–1078.
- Valluru, R. and Van den Ende, W.** (2011). Myo-inositol and beyond - Emerging networks under stress. *Plant Sci.* **181**, 387–400.
- van Bel, A. J. E.** (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell Environ.* **26**, 125–149.
- Van Den Ende, W. and Valluru, R.** (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: Scavenging and salvaging? *J. Exp. Bot.* **60**, 9–18.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and F., S.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, research0034.1-0034.11.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. and Boerjan, W.** (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **153**, 895–905.
- Verbančič, J., Lunn, J. E., Stitt, M. and Persson, S.** (2018). Carbon Supply and the Regulation of Cell Wall Synthesis. *Mol. Plant* **11**, 75–94.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. and Zhu, J.-K.** (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* **45**, 523–539.
- Waites, R. and Hudson, A.** (1995). *phantastica*: A gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* **121**, 2143–2154.
- Waites, R., Selvadurai, H. R. N., Oliver, I. R. and Hudson, A.** (1998). The *Phantastica* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell* **93**, 779–789.
- Walerowski, P., Gündel, A., Yahaya, N., Truman, W., Sobczak, M., Olszak, M., Rolfe, S., Borisjuk, L. and Malinowski, R.** (2018). Clubroot disease stimulates early steps of phloem differentiation and recruits SWEET sucrose transporters within developing galls. *Plant Cell* **30**, 3058–3073.
- Wang, L., Yao, L., Hao, X., Li, N., Qian, W., Yue, C., ... Wang, X.** (2018). Tea plant SWEET transporters: expression profiling, sugar transport, and the involvement of CsSWEET16 in modifying cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, **96**(6), 577–592.
- Wooding, F. B. P. and Northcote, D. H.** (1964). The development of the secondary wall of the xylem in *Acer pseudoplatanus*. *J. Cell Biol.* **23**, 327–337.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E. and Neuhaus, H. E.** (2006). Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell* **18**, 3476–3490.
- Xuan, Y. H., Hu, Y. B., Chen, L.-Q., Sosso, D., Ducat, D. C., Hou, B.-H. and Frommer, W. B.** (2013). Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E3685–E3694.
- Yamada, K. and Osakabe, Y.** (2018). Sugar compartmentation as an environmental stress adaptation strategy in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **83**, 106–114.
- Yamada, K., Osakabe, Y., Mizoi, J., Nakashima, K., Fujita, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2010). Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *J. Biol. Chem.* **285**, 1138–1146.
- Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K., & Demura, T.** (2011). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant Journal*, *66*(4), 579–590.
- Yamamoto, R., Demura, T. and Fukuda, H.** (1997). Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiol.* **38**, 980–983.
- Yamamoto, R., Fujioka, S., Demura, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. and Fukuda, H.** (2001). Brassinosteroid levels increase drastically prior to morphogenesis of tracheary elements. *Plant Physiol.* **125**, 556–563.
- Ye, Z.-H.** (2002). Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 182–202.
- Yuan, M., Zhao, J., Huang, R., Li, X., Xiao, J. and Wang, S.** (2014). Rice MtN3/saliva/SWEET gene family: Evolution, expression profiling, and sugar transport. *J. Integr. Plant Biol.* **56**, 559–570.
- Zeeman, S. C., Delatte, T., Messerli, G., Umhang, M., Stettler, M., Mettler, T., Streb, S., Reinhold, H. and Kötting, O.** (2007). Starch breakdown: Recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms. *Funct. Plant Biol.* **34**, 465–473.
- Zhang, Q., Xie, Z., Zhang, R., Xu, P., Liu, H., Yang, H., ... Li, L.** (2018). Blue Light Regulates Secondary Cell Wall Thickening via MYC2/MYC4 Activation of the NST1-Directed Transcriptional Network in *Arabidopsis*. In *The Plant cell* (Vol. 30).
- Zhao, C., Avci, U., Grant, E. H., Haigler, C. H. and Beers, E. P.** (2008). XND1, a member of the NAC domain family in *Arabidopsis thaliana*, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *Plant J.* **53**, 425–436.
- Zhao, X., Liu, N., Shang, N., Zeng, W., Ebert, B., Rautengarten, C., Zeng, Q. Y., Li, H., Chen, X., Beahan, C., et al.** (2017). Three UDP-xylose transporters participate in xylan biosynthesis by conveying cytosolic UDP-xylose into the Golgi lumen in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **69**, 1125–1134.
- Zheng, M., Liu, X., Lin, J., Liu, X., Wang, Z., Xin, M., Yao, Y., Peng, H., Zhou, D. X., Ni, Z., et al.** (2019). Histone acetyltransferase GCN5 contributes to cell wall integrity and salt stress tolerance by altering the expression of cellulose synthesis genes. *Plant J.* **97**, 587–602.
- Zhong, R. and Ye, Z. H.** (1999b). IFL1, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* **11**, 2139–2152.
- Zhong, R. and Ye, Z.-H.** (1999a). IFL1, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* **11**, 2139–2152.
- Zhong, R., Taylor, J. J. and Ye, Z. H.** (1997). Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* **9**, 2159–2170.

## V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zhou, A., Ma, H., Feng, S., Gong, S., & Wang, J.** (2018). A novel sugar transporter from *Dianthus spiculifolius*, DsSWEET12, affects sugar metabolism and confers osmotic and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 1–10.
- Zhu, X., Zhang, L., Kuang, C., Guo, Y., Huang, C., Deng, L., Sun, X., Zhan, G., Hu, Z., Wang, H., et al.** (2018). Important photosynthetic contribution of silique wall to seed yield-related traits in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.* **137**, 493–501.
- Zwieniecki, M. A. and Holbrook, N. M.** (2009). Confronting Maxwell's demon: biophysics of xylem embolism repair. *Trends Plant Sci.* **14**, 530–534.

---

## VI. ANNEXES

---



**Tableau S1** : Séquences des oligonucléotides utilisés pour le génotypage des mutants *sweets*

Numéro ATG	Nom de l'oligonucléotide	Séquence (5' → 3')	Taille du fragment (bp)	Utilisation
At3g16690	sweet16-4_LP	TGCAAATAATTTAGCAACCGC	1742	Génotypage
	sweet16-4_RP	TATAAATGATCTGGGGCCATC		
	SWEET16ATG-stopF	ATGGCAGACTTGAGTTTTTATGTC	693	PCR pleine longueur
	SWEET16ATG-stopR	TTAAGCGAGGAGAGGTTGATT		
At4g15920	sweet17-1_LP	TGATGTGAGGCCCTCCCTCTT	1625	Génotypage
	sweet17-1_RP	CCGTTTTGGTTGTCGTTTTT		
At3g48740	sweet11-1_LP	GATGTTTTGGAGACCAAGCTG	1558	Génotypage
	sweet11-1_RP	GGCTCCTTTATGGTCTTGCTC		
At5g23660	sweet12-1_LP	CTAAACCCGGAACCAAGATC	1638	Génotypage
	sweet12-1_RP	GAACAACCCCAATCACGTTTG		



**Tableau SII : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la quantification d'expression de gènes par qPCR**

Numéro ATG	Nom du gène	Séquence de l'oligonucléotide F	Séquence de l'oligonucléotide R	Taille du fragment (bp)	% d'efficacité	Référence
At1g16490	<i>MYB58</i>	AAGCGGTTCAAAAAGGTTCT	GCATCATCGTCTTTGCTTGA	109	98	Ce travail
At1g27450	<i>APT1</i>	GAGACATTTTGCCTGGGATT	CGGGGATTTTAAAGTGAACA	124	96,2	Ce travail
At1g28470	<i>SND3</i>	TTCCTCCACCGGCCATCAAA	CTGGCGACCATAGTTGGTGT	183	103,8	Shafi et al., 2019
At1g32770	<i>SND1/NST3</i>	GCAGCAACTGGGCTAGTCTT	CCCATCGCTGCATCATAGTA	126	93,6	Ce travail
At1g46480	<i>WOX4</i>	GACAAAGAACAATCATCGTCACTAGACA	TTCTCCACCAATGGTTCTCTCA	51	92,4	Smetana et al., 2019
At1g62990	<i>KNAT7</i>	GAAAGCTGTTAATGGCTTGCCG	TCGGTAGCAACGGACCAAAAT	190	95,3	Shafi et al., 2019
At1g63910	<i>MYB103</i>	GGGAAA CAGGTGGGCTCATA	TGGTAGAGGCCCTCGATGGTA	197	100,3	Shafi et al., 2019
At1g71930	<i>VND7-2</i>	CCAGCTCTACCACTCGAAA	AACTGCGGGGAGCTCAAATGTT	186	95,1	Shafi et al., 2019
At1g73410	<i>MYB54</i>	AACCGAAAACCCCTTTCACGGA	ACGAGGCTTAGAGGTTTGGC	174	87,8	Shafi et al., 2019
At1g79180	<i>MYB63</i>	GACAAACCCGATCTGCTGGA	CCCAGTTCGCTTCTCTAGGT	189	99,8	Shafi et al., 2019
At3g08500	<i>MYB83-2</i>	GTCGCCCTTCGCTGGATCAAT	AAGCCGCTTCTTCAATGTCG	191	85,8	Shafi et al., 2019
At3g62250	<i>UBQ5</i>	CCAAGCCGAAGAAGATCAAG	ACTCCTTCTCAAACGCTGA	105	98,6	Ce travail
At4g18780	<i>CES48</i>	AGGTCTCCCACTCGCAACAC	CTCATCGTAAGGATTTGCCGC	168	97,9	Shafi et al., 2019
At4g32880	<i>AthB8</i>	AACACCACTTGACCCCTCAACATCAG	CACGCAACCAACAAGGCTTATCC	276	91,9	Smetana et al., 2019
At4g34270	<i>TIP41</i>	GCTCATCGGTACGCTCTTTT	TCCATCAGTCAGAGGCTTCC	117	93,7	Ce travail
At4g39620	<i>MYB4</i>	ACAGAGGGATTGATCCCAACG	TCGACCTTTGGAGCAGAAAGT	133	97,9	Ce travail
At5g12870	<i>MYB46</i>	GAATGTGAAAGAAGGTGATTGGTACA	CGAAGGAACCTCAGTGTTCATCA	150	73,5	Takeuchi et al., 2018

**Tableau SIII : Répétitions des analyses parentées dans les chapitres I, II et III avec représentations de phénotypes répétés dans les différentes cultures et le nombres de cultures indépendantes analysées au cours des trois années de thèse**

Analyses	Résultats 2016-2017	Résultats 2017-2018	Résultats 2018-2019	Nombre de répétitions (cultures indépendantes)
<b>Localisation tissulaire</b> (construction <i>pSWEET:GUS</i> )	Soécificité tissu ou cellule spécifique (section basale de la hampe florale) <b>pSWEET11</b> : fibres (xylème) <b>pSWEET12</b> : cellules de parenchyme (phloème et xylème) <b>pSWEET16</b> : cellules de parenchyme (phloème et xylème et procambium) <b>pSWEET17</b> : cellules de parenchymes (xylème) + analyses dan autres organes (feuilles, fleurs, siliques : Figures 30 à 33)	Analyses selon la classification des pôles de type-M, de type-B et de type-L (Park et al., 2015) avec M : connexion dans la hampe principale, B : connexion avec les inflorescences latérales et L: connexion avec les feuilles caulinées <b>Pôles M : SWT 11, 12, 16 et 17</b> <b>Pôles B : SWT 11, 12, 16 et 17</b> <b>Pôles L : SWT12, 16 et 17</b>	<b>Analyses à différents stade de développement</b> (Hall et Ellis, 2013) et dans <b>différents types de pôles vasculaires</b> (Park et al., 2015) - Sous le bouton floral - A mi hauteur dans un entre nœud en éléngation - Section basale dans le premier entre-nœud où l'éléngation est terminée (Figures 47 à 50)	5 cultures
<b>Croissance rosette</b> <b>Croissance de la hampe florale</b> <b>Ratio xylème/section de hampe</b>	Cinétique de croissance Mutants plus petits (diamètre, hauteur) <i>swt16swt17</i> et quadruple mutant réduits	Cinétique de croissance Mutants plus petits (diamètre, hauteur) <i>swt16swt17</i> et quadruple mutant réduits	Cinétique de croissance (Figures 35 et 36) Mutants plus petits (diamètre, hauteur) (Figure 52) <i>swt16swt17</i> et quadruple mutant réduits	Cinétique de croissance de la rosette : 3 cultures Hampe florale : 5 cultures
<b>Analyse quantitative du xylème</b> (comptabilisation du nombre de cellules conductrices et surface de ces dernières)	Vaisseaux > 350 $\mu\text{m}^2$ plus petits chez <i>swt11swt12</i> (Le Hir et al., 2015), <i>swt16swt17</i> et chez le quadruple mutant	Mesures du nombre de fibres et de vaisseaux Mesures de la taille des fibres et des vaisseaux	Mesures sur toutes les lignées (Figure 53 à 56)	3 cultures
<b>Analyse de la composition pariétale</b> (FT-IR)	<i>Sw11swt12</i> , <i>swt16swt17</i> et <i>swt11swt12swt16</i> : modifications pariétales (Figures 58 et 59)	-	Toutes les lignées mutantes dont le quadruple mutant: modifications pariétales (Figure 60) + analyses par types de pôles vasculaires (Figure 61 et 62)	2 cultures
<b>Quantification des métabolites dans la les feuilles et dans la hampe florale</b>	Dosages de sucres : Accumulation de saccharose, glucose et fructose dans les feuilles matures	Dosage de sucres chez <i>swt16</i> , <i>swt17</i> et <i>swt16swt17</i> : accumulation de fructose dans la hampe florale	Analyse métabolomique de la hampe florale (Figure 43)	Dosages de sucres : 2 cultures GC-MS : 1 culture
<b>Analyses des mutants en conditions de stress</b>	Tolérance au gel : -5°C Stress hydrique (phénoscopes) : cinétique de croissance	Tolérance au gel : -5°C et -7°C Stress hydrique (phénoscopes) : cinétique de croissance	Stress hydrique (phénoscopes) : cinétique de croissance et GC-MS (rosette) Température fraîche : impact sur le système vasculaire	Gel : 4 cultures Stress hydrique : 3 cultures (GCMS sur 1 culture) Températures fraîche : 3 cultures

VI. ANNEXES

**Tableau SIV : Liste des 158 métabolites identifiés dans la hampe florale**

<b>Abbréviation</b>	<b>Nom complet [temps de rétention]</b>
1,5-anhydro-D-	[219984] 1,5-anhydro-D-sorbitol [16.967]
1,6-anhydro-gl	[2724705] 1,6-anhydro-glucose [15.326]
1-decanol (dec	[8174] 1-decanol (decyl alcohol) [11.34]
1-nonanol	[8914] 1-nonanol [10.014]
2,3-butanediol	[262] 2,3-butanediol 2 [6.55]
2-hydroxypyrid	[8871] 2-hydroxypyridine [6.519]
3-(methylthio)	[77743] 3-(methylthio)-propylamine [11.
3,5-dimethoxy-	[637775] 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnami
3-indoleaceton	[351795] 3-indoleacetonitrile [17.214]
4-hydroxybenzo	[135] 4-hydroxybenzoic acid [14.505]
4-hydroxypyrid	[12290] 4-hydroxypyridine [8.204]
9H-purine-6-am	[190] 9H-purine-6-amine [17.073]
acetoxyhydroxami	[1990] acetoxyhydroxamic acid [7.72]
acetyl-L-serin	[189] acetyl-L-serine 1 [10.009]
adenine 1	[190] adenine 1 [17.066]
adenosine 5'-d	[6022] adenosine 5'-diphosphate [26.864]
adipic acid	[196] adipic acid [12.996]
allantoin 1	[204] allantoin 1 [17.293]
allantoin 3	[204] allantoin 3 [19.167]
alpha ketoglut	[51] alpha ketoglutaric acid [13.859]
arabinose	[66308] arabinose [14.897]
arachidic acid	[10467] arachidic acid [22.367]
aspartic acid	[5960] aspartic acid 1 [12.002]
aspartic acid	[5960] aspartic acid 2 [13.207]
azelaic acid	[2266] azelaic acid [16.359]
benzoic acid (	[243] benzoic acid (pmm) [9.710]
benzothiazole	[7222] benzothiazole [9.574]
Beta- alanine	[239] Beta- alanine 1 [12.044]
beta-gentiobio	[441422] beta-gentiobiose 2 [25.42]
beta-glycerolp	[2526] beta-glycerolphosphate [15.645]
beta-sitostero	[5321342] beta-sitosterol [28.848]
capric acid	[2969] capric acid [12.399]
cholesterol	[304] cholesterol [27.555]
cinnamic acid	[444539] cinnamic acid [13.562]
citraconic aci	[643798] citraconic acid 1 [11.003]
citraconic aci	[643798] citraconic acid 3 [12.222]
citraconic aci	[643798] citraconic acid 5 [12.513]
citramalic aci	[439766] citramalic acid [12.63]
citric acid	[311] citric acid [16.615]
citrulline 2	[9750] citrulline 2 [16.691]

VI. ANNEXES

cyclohexanamin	[7965] cyclohexanamine [6.93]
cysteinylglyci	[65270] cysteinylglycine 1 [16.586]
D (+)altrose 1	[441032] D (+)altrose 1 [17.397]
D-(+) trehalos	[7427] D-(+) trehalose [24.752]
dehydroascorbi	[835] dehydroascorbic acid 1 [16.863]
dehydroascorbi	[835] dehydroascorbic acid 4 [17.739]
D-glucose 1	[24749] D-glucose 1 [17.426]
D-glucose 2	[24749] D-glucose 2 [17.625]
D-glucose-6-ph	[439958] D-glucose-6-phosphate 1 [21.39]
D-glucose-6-ph	[439958] D-glucose-6-phosphate 2 [21.55]
DL-3-aminoisob	[64956] DL-3-aminoisobutyric acid 2 [12
DL-isoleucine	[791] DL-isoleucine 1 [8.576]
DL-isoleucine	[791] DL-isoleucine 2 [10.225]
D-malic acid	[92824] D-malic acid [12.794]
D-mannose 1	[18950] D-mannose 1 [17.287]
D-saccharic ac	[5460673] D-saccharic acid [18.614]
D-sorbitol	[5780] D-sorbitol [17.898]
elaidic acid	[637517] elaidic acid [20.508]
erythrono-1,4-	[5325915] erythrono-1,4-lactone [12.049]
ethanolamine	[700] ethanolamine [9.879]
ferulic acid	[445858] ferulic acid [19.312]
fructose 1	[5984] fructose 1 [17.18]
fructose 2	[5984] fructose 2 [17.288]
fructose 6-pho	[69507] fructose 6-phosphate [21.194]
fumaric acid	[444972] fumaric acid [10.94]
galactinol 2	[439451] galactinol 2 [26.479]
galactitol	[11850] galactitol [17.986]
galactonic aci	[128869] galactonic acid 2 [18.504]
galacturonic a	[445929] galacturonic acid 1 [17.917]
gamma-aminobut	[119] gamma-aminobutyric acid (GABA) [1
gluconic acid	[604] gluconic acid 2 [18.297]
gluconic acid	[736] gluconic acid lactone 1 [17.303]
Glucopyranose	[PMM008] Glucopyranose [18.05?]
glutaconic aci	[5280498] glutaconic acid 1 [11.852]
glutaric acid	[743] glutaric acid (pmm) [11.704]
glyceric acid	[439194] glyceric acid [10.735]
glycerol	[753] glycerol [9.941]
glycerol 1-pho	[754] glycerol 1-phosphate [16.056]
glycine	[750] glycine [10.456]
glycolic acid	[757] glycolic acid (sl) [7.451]
glyoxylic acid	[760] glyoxylic acid [10.813]
hexanoic acid	[8892] hexanoic acid (sl) [7.413]
homovanillic a	[1738] homovanillic acid (HVA) [16.076]

VI. ANNEXES

isocitric acid	[1198] isocitric acid [16.583]
isopropyl beta	[656894] isopropyl beta-D-1-thiogalacto
itaconic acid	[811] itaconic acid [10.839]
L-(+) lactic a	[107689] L-(+) lactic acid (sl) [7.251]
lactose 1	[84571] lactose 1 [24.386]
L-alanine 2	[5950] L-alanine 2 [11.182]
L-allothreonin	[99289] L-allothreonine 2 [16.365]
L-ascorbic aci	[5785] L-ascorbic acid [17.939]
L-asparagine 2	[236] L-asparagine 2 [14.984]
lauric acid	[3893] lauric acid [14.789]
leucrose	[165577] leucrose [24.975]
L-glutamic aci	[33032] L-glutamic acid 2 [14.398]
L-glutamic aci	[33032] L-glutamic acid 3 (dehydrated)
L-glutamine 1	[738] L-glutamine 1 [13.431]
L-glutamine 2	[738] L-glutamine 2 [14.083]
L-glutamine 3	[738] L-glutamine 3 [16.092]
linoleic acid	[5280450] linoleic acid [20.399]
L-leucine 2	[6106] L-leucine 2 [9.945]
L-lysine 2	[5962] L-lysine 2 [17.643]
loganin	[16212335] loganin [25.963]
L-ornithine 2	[6262] L-ornithine 2 [16.632]
L-proline 2	[145742] L-proline 2 [10.321]
L-serine 1	[5951] L-serine 1 [9.706]
L-serine 2	[5951] L-serine 2 [11.174]
L-threonine 1	[6288] L-threonine 1 [10.224]
L-threonine 2	[6288] L-threonine 2 [11.464]
L-tryptophan 2	[6305] L-tryptophan 2 [20.466]
L-valine 2	[6287] L-valine 2 [9.151]
maleic acid	[444266] maleic acid [10.323]
malonic acid 1	[867] malonic acid 1 [8.919]
maltose 2	[6255] maltose 2 [24.915]
mandelic acid	[439616] mandelic acid [12.588]
melibiose 1	[440658] melibiose 1 [25.565]
myo-inositol	[892] myo-inositol [19.354]
myristic acid	[11005] myristic acid [16.887]
Myristic Acid	[RTL] Myristic Acid d27 [16.727]
neohesperidin	[442439] neohesperidin [22.867]
N-ethylglycine	[316542] N-ethylglycine 2 [8.773]
nicotinic acid	[938] nicotinic acid [10.27]
N-methylalanin	[5288725] N-methylalanine [8.43]
norvaline 1 (p	[65098] norvaline 1 (pmm) [7.907]
oleic acid	[445639] oleic acid [20.504]
O-phosphocolam	[1015] O-phosphocolamine [16.232]

## VI. ANNEXES

oxalic acid	[971] oxalic acid [7.883]
palmitic acid	[985] palmitic acid [18.846]
palmitoleic ac	[445638] palmitoleic acid [18.728]
pantothenic ac	[6613] pantothenic acid 2 [18.371]
Phenylalanine	[994] Phenylalanine 1 [13.545]
Phenylalanine	[994] Phenylalanine 1 [13.545] - 1
phosphoric aci	[1004] phosphoric acid [9.966]
phytol 2	[6430833] phytol 2 [20.045]
porphine 1	[66868] porphine 1 [10.77]
putrescine	[1045] putrescine [15.709]
pyruvic acid (	[1060] pyruvic acid (sl) [7.151]
quinic acid	[6508] quinic acid [17.076]
Raffinose (pmm	[439242] Raffinose (pmm) [28.969]
rhamnose 1	[220001] rhamnose 1 [15.574]
rhamnose 2	[220001] rhamnose 2 [15.656]
ribose	[993] ribose [15.113]
salicylic acid	[338] salicylic acid [13.075]
sedoheptulose	[165007] sedoheptulose 7-phosphate [23.194]
shikimic acid	[8742] shikimic acid [16.433]
stearic acid	[5281] stearic acid [20.675]
succinic acid	[1110] succinic acid [10.509]
Sucrose	[5988] Sucrose [23.988]
tagatose 1	[2724552] tagatose 1 [17.011]
threonic acid	[5460407] threonic acid [13.652]
trans-aconitic	[444212] trans-aconitic acid [15.842]
triethanolamin	[7618] triethanolamine [14.464]
tyramine	[5610] tyramine [17.562]
tyrosine 2	[6057] tyrosine 2 [17.871]
urea	[1176] urea [9.599]
uric acid 1	[1175] uric acid 1 [19.331]
xylose 2	[6027] xylose 2 [14.791]
xylulose	[439204] xylulose [15.077]



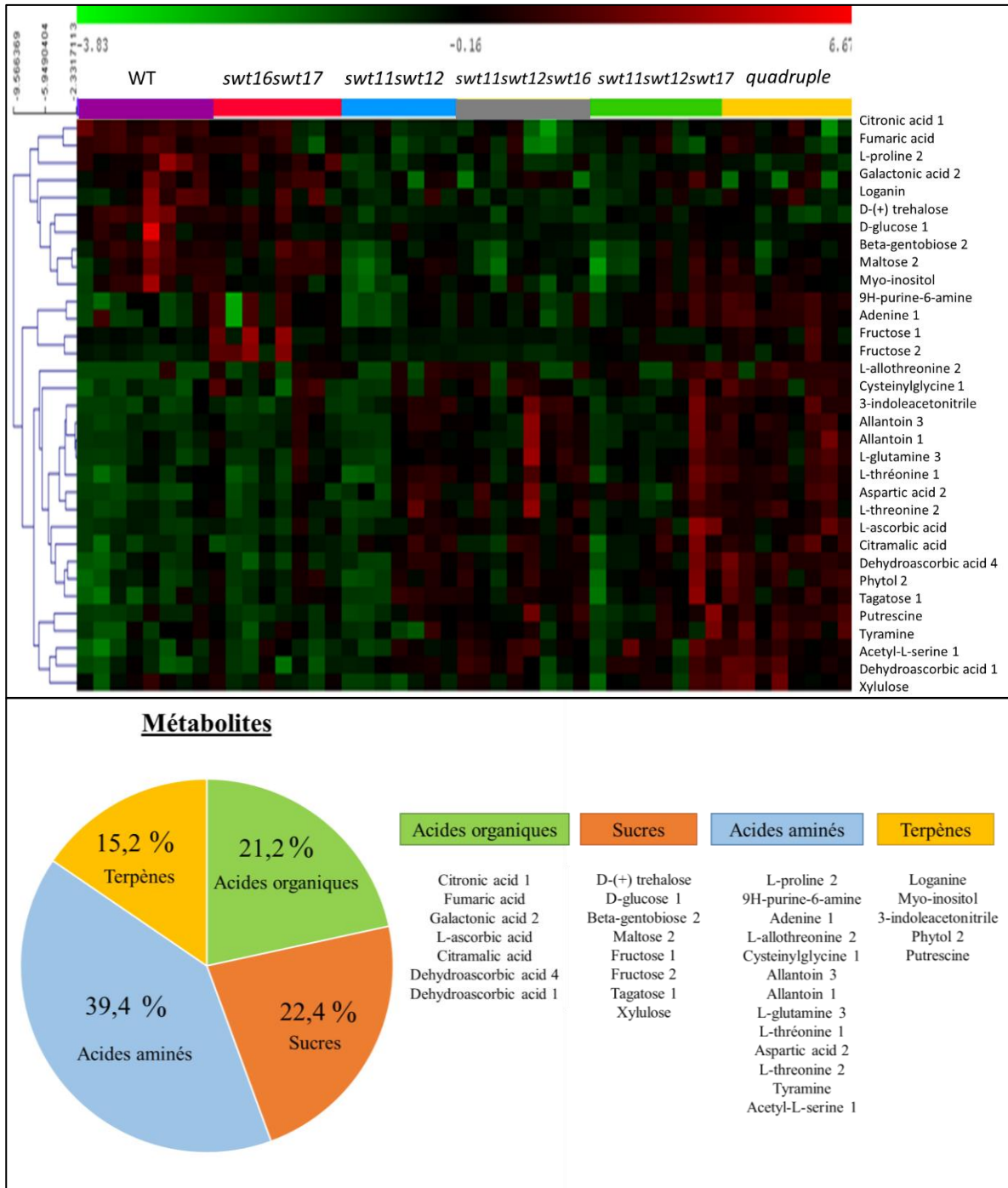
## VI. ANNEXES

**Tableau SV : Liste des métabolites accumulés ou réduits dans la hampe florale d'au moins un mutant *sweet***

Représentation des métabolites et de la valeur de p du test statistique ANOVA

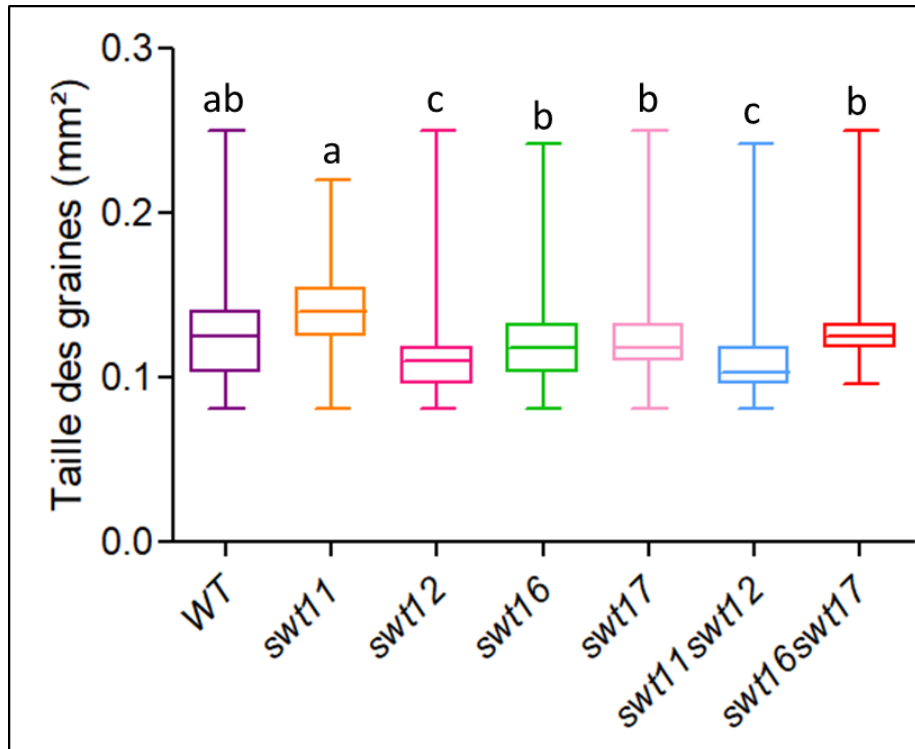
Métabolite	p-value
<b>D-(+) trehalose</b>	5.4035E-08
<b>L-proline 2</b>	5.0032E-05
<b>citraconic acid 1</b>	7.9291E-05
<b>fructose 2</b>	1.2109E-04
<b>dehydroascorbic acid 1</b>	1.2204E-04
<b>fumaric acid</b>	2.6500E-04
<b>beta-gentiobiose 2</b>	3.1199E-04
<b>dehydroascorbic acid 4</b>	5.0263E-04
<b>acetyl-L-serine 1</b>	1.4884E-03
<b>9H-purine-6-amine</b>	3.0338E-03
<b>tyramine</b>	4.4618E-03
<b>aspartic acid 2</b>	5.1322E-03
<b>phytol 2</b>	5.5438E-03
<b>citramalic acid</b>	6.6446E-03
<b>L-glutamine 3</b>	1.0111E-02
<b>adenine 1</b>	1.1195E-02
<b>putrescine</b>	1.2197E-02
<b>fructose 1</b>	1.4124E-02
<b>L-ascorbic acid</b>	1.4582E-02
<b>myo-inositol</b>	1.4999E-02
<b>cysteinylglycine 1</b>	1.5553E-02
<b>3-indoleacetonitrile</b>	1.6800E-02
<b>L-threonine 1</b>	1.9146E-02
<b>xylulose</b>	2.2996E-02
<b>D-glucose 1</b>	2.5727E-02
<b>3-indoleacetonitrile</b>	2.5793E-02
<b>allantoin 3</b>	2.5855E-02
<b>L-allothreonine 2</b>	3.2090E-02
<b>tagatose 1</b>	3.3317E-02
<b>maltose 2</b>	3.6952E-02
<b>L-threonine 2</b>	4.0500E-02
<b>galactonic acid 2</b>	4.0572E-02
<b>allantoin 1</b>	4.7029E-02
<b>loganin</b>	4.9237E-02

## VI. ANNEXES



**Figure S1: Analyse métabolomique de la hampe florale**

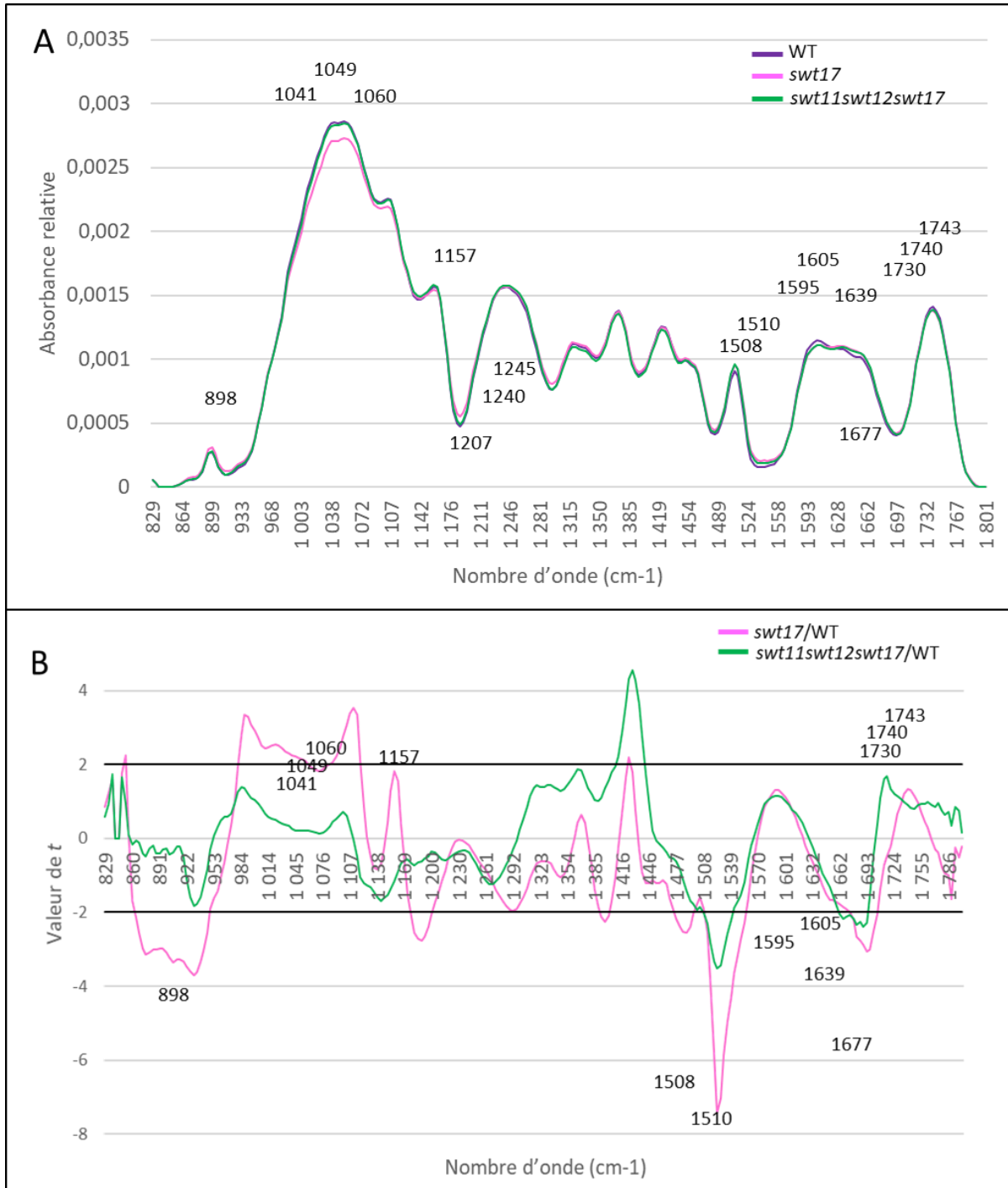
Carte des chaleurs représentant les valeurs de chaque échantillon pour tous les génotypes pour les 33 métabolites pour lesquels des différences significatives sont observées entre au moins deux génotypes avec WT en violet, *Atsweet16sweet17* en rouge, *Atsweet11sweet12* en bleu, *Atsweet11sweet12sweet16* en gris, *Atsweet11sweet12sweet17* en vert et le quadruple mutant en jaune (Test ANOVA p value < 0,05 avec n>7) (A) et Représentation graphique des classes de métabolites en % avec les acides organiques en vert, les sucres en orange, les acides aminés en bleu et les terpènes en jaune (B).



**Figure S2:** Mesures de la taille des graines des lignées WT, *sweet11*, *sweet12*, *sweet16*, *sweet17*, *sweet11sweet12* et *sweet16sweet17*.

Représentation graphique des boîtes à moustache et Test statistique ANOVA paramétrique et post-test de Tukey avec  $n \geq 120$  graines par génotype.

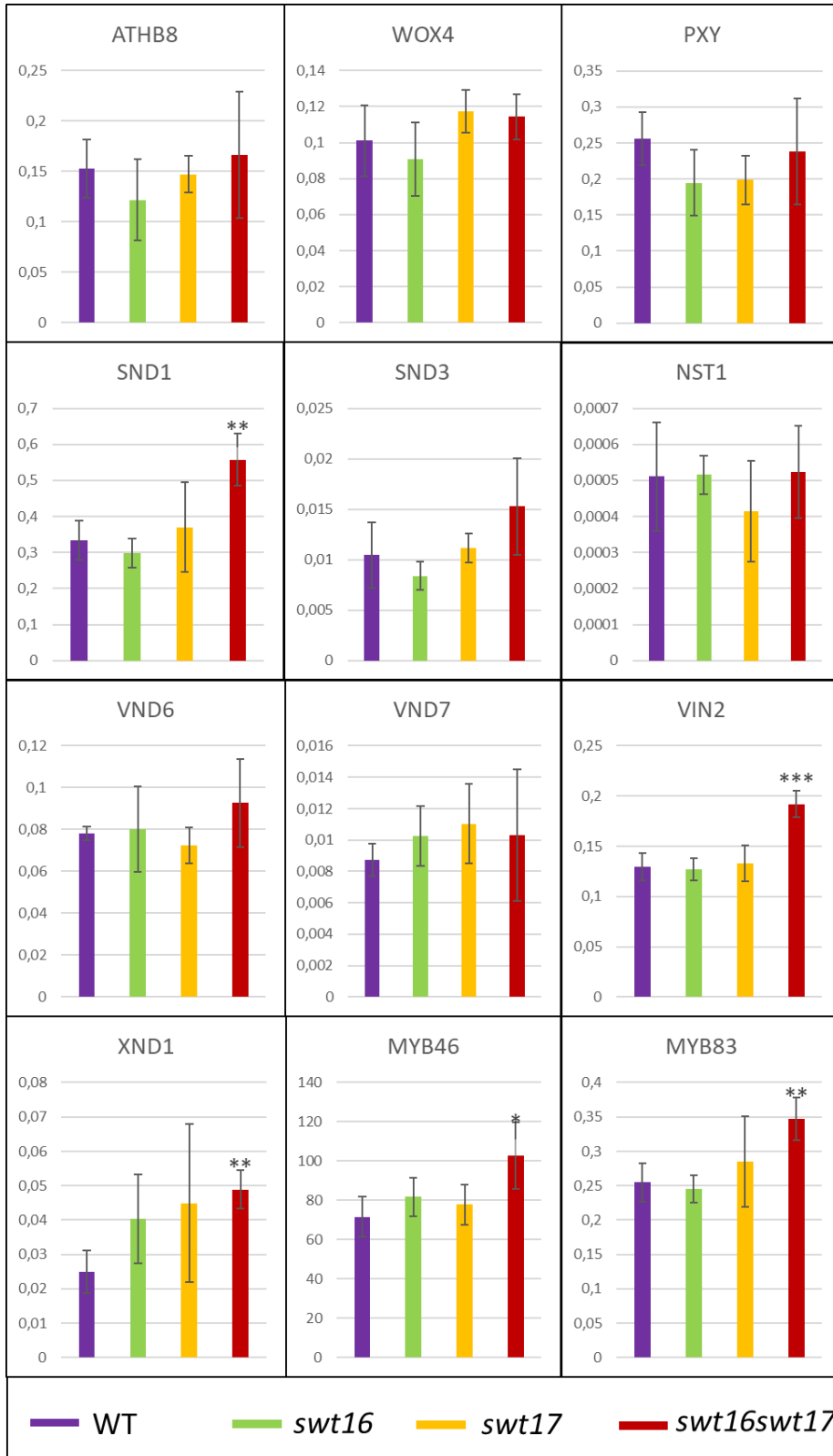
## VI. ANNEXES



**Figure S3: Analyse de la composition pariétale des lignées WT, *swt17* et *swt11swt12wt17***

Spectre moyen d'absorbance des quatre génotypes en fonction du nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ) (A) et Représentation graphique des valeurs de  $t$  de Student obtenues lors de la comparaison des absorbances des lignées mutantes avec le WT à chaque nombre d'onde (B). Les valeurs de  $t$  (axe des ordonnées) ont été reportées pour chaque nombre d'onde (axe de abscisses). Les valeurs de  $t > 2$  et  $t < -2$  indiquent une différence significative entre la lignée mutée et le WT. Les mesures ont été effectuées sur  $n = 4$  plantes par génotype et sur tous les pôles vasculaires des plantes ( $n \geq 8$  pôles vasculaires par plante).

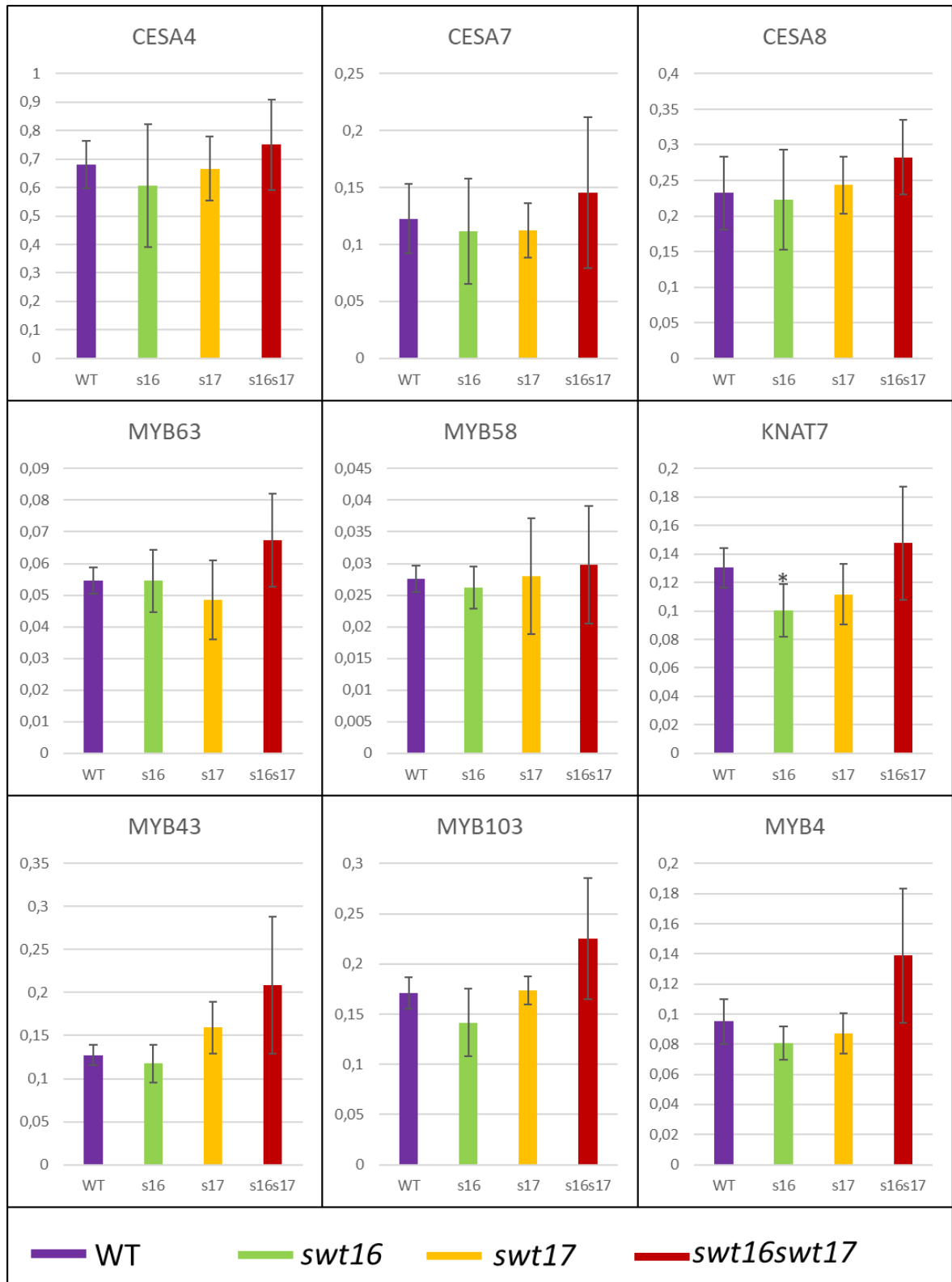
## VI. ANNEXES



**Figure S4 : Expression de gènes impliqués dans les processus développementaux des fibres et des vaisseaux de xylème chez *swt16*, *swt17* et *swt16swt17***

Représentation des moyennes sous forme d'histogrammes avec un test *t* de Student ( $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$  \*\*\* n = 4 plantes)

## VI. ANNEXES

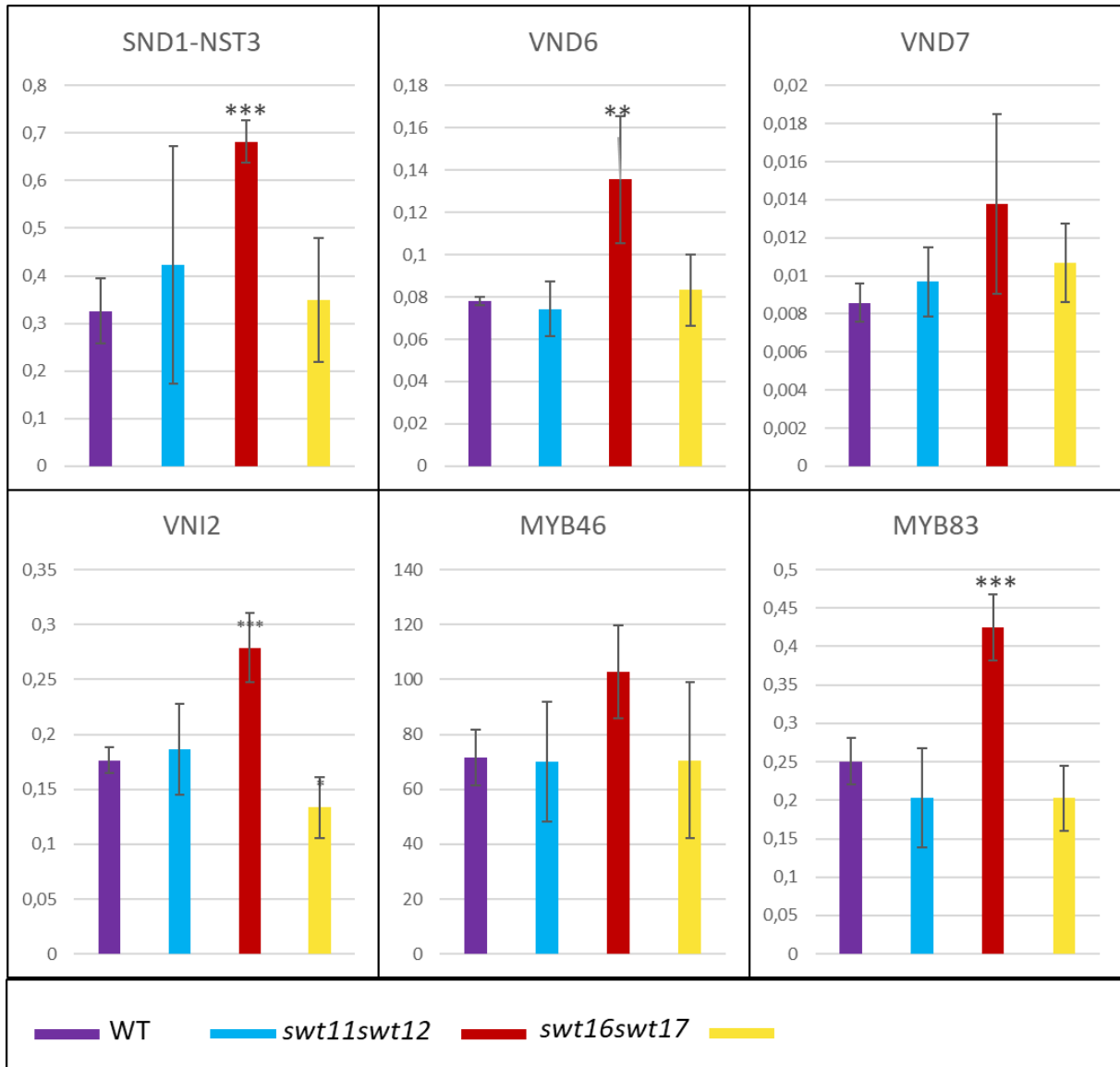


**Figure S5 : Expression de gènes impliqués dans la formation des composés pariétaux chez *swt16*, *swt17* et *swt16swt17***

Représentation des moyennes sous forme d'histogrammes avec un test *t* de Student ( $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$  \*\*\* n = 4 plantes)



## VI. ANNEXES



**Figure S6 :** Expression de gènes impliqués dans les processus développementaux et dans la formation des composés pariétaux des fibres et des vaisseaux de xylème chez *swt11swt12*, *swt16swt17* et *swt11swt12swt16swt17*

Représentation des moyennes sous forme d'histogrammes avec un test *t* de Student ( $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$  \*\*\* n = 4 plantes)



**Titre :** Rôle des transporteurs SWEET dans le développement du système vasculaire d'*Arabidopsis thaliana*, la croissance et l'adaptation de la plante à son environnement.

**Mots clés :** SWEET, allocation des sucres, développement du xylème, stress abiotique, hampe florale.

**Résumé :** La hampe florale d'*Arabidopsis thaliana* portant les inflorescences latérales, les feuilles caulinées, les fleurs et les siliques représente 60% de la biomasse de la plante, principalement grâce à la présence de la paroi secondaire des cellules de xylème. Au cours de la formation de la paroi secondaire une quantité importante de sucres est nécessaire. Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport de ces sucres restent à ce jour inconnus. Des travaux précédents ont suggéré que les transporteurs SWEET11 et SWEET12, membres de la famille des SWEETs (Sugar Will Eventually Be Exported Transporters) pourraient permettre ce transport entre les cellules du xylème. De plus, les transporteurs tonoplastiques SWEET16 et SWEET17 seraient également de bons candidats. Afin de mieux comprendre le rôle des SWEET dans le développement, la croissance et la physiologie des plantes, la caractérisation fonctionnelle des simples, doubles, triples et quadruple mutants *sweet* a été réalisée. Après avoir cartographié finement le domaine d'expression de ces gènes, une analyse phénotypique et métabolomique a été réalisée. Les résultats obtenus suggèrent un rôle important des transporteurs plasmalémniques SWEET11 et SWEET12 dans la balance C/N, particulièrement au moment de l'induction floral mais également en favorisant la remobilisation de l'azote vers les

graines. De plus, l'analyse de leur domaine d'expression ainsi que l'utilisation d'une technique de microscopie basée sur la segmentation et de la spectroscopie vibrationnelle sur les différents mutants ont permis de suggérer que les SWEETs jouent un rôle clé dans le développement des fibres et des vaisseaux. En effet, SWEET16 pourrait intervenir au moment de la division cellulaire et de l'accroissement cellulaire alors que SWEET17 interviendrait au moment de la formation et du renforcement de la paroi secondaire des vaisseaux et/ou fibres. Enfin, le comportement des mutants a été observé en conditions de stress abiotiques (sécheresse, résistance au gel, températures fraîches) par GC-MS et des analyses histologiques. Les résultats obtenus montrent que les mutants présentent une meilleure résistance au gel et à des températures fraîches mais pas à la sécheresse. Pour conclure, les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de montrer que les transporteurs SWEETs ont des rôles spécifiques et complémentaires dans le développement, la croissance et la physiologie de la plante. De plus, ces travaux mettent en lumière le rôle central des échanges de sucres entre la vacuole et le cytosol au moment de l'accroissement cellulaire des vaisseaux de xylème ainsi que l'importance des cellules voisines à proximité des vaisseaux pour subvenir à l'épaississement de leurs parois.

**Title :** Role of SWEET transporters in the vascular system development in *Arabidopsis thaliana*, its growth and in the adaptation to the environment.

**Keywords :** SWEET, sugar allocation, xylem development, abiotic stress, floral stem.

**Abstract :** *Arabidopsis thaliana*'s floral stem is composed of axillary stems, cauline leaves, flowers and siliques and represents 60% of the plant biomass, thanks to the secondary cell wall in the xylem conductive cells. During the secondary cell wall formation, an important amount of sugars is needed. However, the mechanisms by which sugars are transported to their site of use are far from being understood. Previous work suggested that SWEET11 and SWEET12, members of the SWEET family (Sugar Will Eventually Be Exported Transporters) could achieve this task. Moreover, SWEET16 and SWEET17 that are tonoplast transporters located in the xylem cells could also be good candidates. To further understand the role of the SWEET in the development, the growth and the physiology of the plant, I analyzed simple, double, triple and quadruple mutant lines of SWEET11, SWEET12, SWEET16 and/or SWEET17. First, their expression patterns were mapped spatially and temporally. Furthermore, using growth parameters kinetics and metabolomics approach, our results suggest that SWEET11 and SWEET12 play a key role in the C/N

balance especially around the floral stem emergence and by enhancing the nitrogen remobilization to the seeds. Moreover, analysis of their expression pattern, a segmentation-based approach and vibrational spectroscopy analysis of the mutant lines allow to suggest that SWEETs transporters play a key role in vessel and/or fiber development. Indeed, SWEET16 might act during cell division and cell enlargement whereas SWEET17 has been shown to act on the secondary cell wall formation and reinforcement. Finally, the behavior of the mutant lines was assessed under different abiotic stress conditions (drought, cold and freezing temperatures) by using metabolomic analysis or histological studies. Our results show that even if the mutant lines are more tolerant to freezing and cold stress, they are not more resistant to drought. Overall, this work suggests specific and complementary roles of these SWEETs during plant growth, development and physiology. It highlights also the importance of the sugar transport between vacuole and cytosol role during cell elongation and the importance of neighboring living cells during the cell wall reinforcement.

