



**HAL**  
open science

**Variation des teneurs en glucides et régulation des niveaux relatifs de transcrits du gène du transporteur de saccharose LpSUT1 par les glucides et en réponse à la modulation des relations sources-puits chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L)**

Hans Lone Sang

► **To cite this version:**

Hans Lone Sang. Variation des teneurs en glucides et régulation des niveaux relatifs de transcrits du gène du transporteur de saccharose LpSUT1 par les glucides et en réponse à la modulation des relations sources-puits chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L). Biologie végétale. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC223 . tel-03132443

**HAL Id: tel-03132443**

**<https://theses.hal.science/tel-03132443v1>**

Submitted on 5 Feb 2021

**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.



Normandie Université

## THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Variation des teneurs en glucides et régulation des niveaux relatifs de transcrits du gène du transporteur de saccharose LpSUT1 par les glucides et en réponse à la modulation des relations sources-puits chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L)**

Présentée et soutenue par  
**Hans LONE SANG**

Thèse soutenue publiquement le 18/12/2020  
devant le jury composé de

Mme NATHALIE POURTAU	Maître de conférences HDR, Université de Poitiers	Rapporteur du jury
M. SOULAIMAN SAKR	Professeur des universités, Université d'Angers	Rapporteur du jury
Mme SYLVIE DINANT	Directeur de recherche à l'INRA, INRA de Versailles	Président du jury
M. FREDERIC MEURIOT	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme NATHALIE NOIRAUD-ROMY	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme MARIE-PASCALE PRUD'HOMME	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par MARIE-PASCALE PRUD'HOMME, Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen)**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement



Ecophysiologie  
Végétale,  
Agronomie  
& nutritions N.C.S



## *Remerciements*

---

### **Le temps est la ressource la plus précieuse à notre disposition.**

*Au cours de cette thèse, j'ai réalisé qu'une matinée pouvait passer en un éclair. Qu'une journée pouvait être aussi brève qu'une averse - les mois, la durée d'une marée. L'année 2020 a été particulièrement houleuse. Mais en regardant vers l'arrière, il est possible de réaliser tout le chemin qui a été parcouru pendant ce voyage.*

-

*Ces quatre années ont été une belle aventure.*

Je tenais à exprimer toute ma gratitude à Frédéric Meuriot pour son engagement continu dans ce travail doctoral, ses conseils et ses critiques constructives ; Nathalie Noiraud-Romy pour son expertise en biologie moléculaire et statistiques ; Annette Morvan-Bertrand pour ses conseils avisés pour mener les analyses biochimiques et Marie-Pascale Prud'homme pour son œil très expérimenté et sa bonne humeur.

Je souhaite également remercier les membres du jury qui ont accepté de me consacrer de leur temps pour évaluer mon travail : Nathalie Pourtau et Soulaïman Sakr, je vous remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs du présent écrit ; Sylvie Dinant, je vous remercie d'avoir accepté d'être examinatrice.

Mes pensées vont également à Didier Goux et Nicolas Ellie du CMABIO3, avec qui j'ai aussi eu la chance de partager un week-end de vulgarisation scientifique à l'occasion de la Fête de la Science. Je remercie également Caroline Chagnot et toute l'équipe ABTE qui ont consacré beaucoup d'énergie à la réalisation du projet « Microphyllos ». A tout le personnel du laboratoire : merci. Rien de tout cela n'aurait été possible sans votre contribution à toutes et tous. A tous les stagiaires que j'ai pu co-encadrer, je vous souhaite de profiter d'un vent favorable. Doctorants, ayez courage et soyez vaillants. L'aventure en vaut la peine. Enfin, je devais aussi remercier l'association OPTIC dans laquelle j'ai eu la chance d'investir de mon temps pendant deux années. Grâce à elle, j'ai pu acquérir une expérience précieuse dans la gestion de projets et de financements par l'organisation de deux Journées des Ecoles doctorales - mais elle m'a également permis d'élargir mon horizon et de faire la connaissance de nombreux étudiants et doctorants qui n'auraient jamais croisé ma route en d'autres circonstances.



*A celles et ceux que j'ai aimés,  
que j'aime,  
et que j'aimerai*





# Abréviations

**2-DOG :** 2-Deoxyglucose  
**3-OMG :** 3-O-Methylglucose  
**6-CFDA :** 6-carboxyfluorescéine  
**6-DOG :** 6-Deoxyglucose

## A

**ABTE :** Equipe Aliments Bioprocédés  
Toxicologie Environnements  
**ADN :** Acide désoxyribonucléique  
**ADP :** Adenosine Diphosphate  
**AGPase :** ADP-glucose pyrophosphorylase  
**ANOVA :** *Analysis of variance* (analyse de la variance)  
**ARNm :** Acide Ribonucléique messenger  
**ATP :** Adenosine Triphosphate  
**ATPase :** Adenosine Triphosphate Phosphatase

## C

**CC :** Cellule compagne  
**cDNA :** *Complementary DNA* (ADN complémentaire)  
**CFU :** *Colony-Forming Units* (Unités formant colonies)  
**CMABIO3 :** Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie  
**cv :** cultivar  
**CWINV :** *Cell-Wall Invertase* (invertase pariétale)

## D

**DNA :** *Deoxyribonucleic acid* (Acide désoxyribonucléique)  
**DW :** *Dry Weight* (masse sèche)

## E

**EDTA :** acide éthylènediaminetétraacétique  
**eEF1 $\alpha$  :** *eukaryotic Elongation Factor 1 $\alpha$*   
**eIF4 $\alpha$  :** *eukaryotic Initiation Factor 4 $\alpha$*

## F

**FBP :** Fructose-6-bisphosphatase  
**FEAST :** Equipe Fructanes, Environnement et Transport des glucides  
**FEH :** Fructan Exohydrolase  
**FRK :** Fructokinases  
**Fru :** Fructose  
**FT :** Fructosyltransférase  
**FW :** *Fresh Weight* (masse fraîche)

## G

**GAPDH :** Glycerinaldéhyde 3-Phosphate Dehydrogenase  
**GAS1 :** galactinol-synthase 1  
**GFP :** *Green Fluorescent Protein*  
**Glu :** Glucose  
**Glu-6P :** Glucose-6P  
**GOPOD :** Glucose Oxidase/Peroxidase  
**GSA :** Glucosamine  
**GUS :**  $\beta$ -glucuronidase

## H

**HPAEC**  
**-PAD :** *High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* (chromatographie haute performance couplée à une détection ampérométrique en champs pulsés)  
**HPLC :** *High Performance Liquid Chromatography* (chromatographie liquide à haute performance)

## I

**INRAE :** Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement  
**IRMS :** *Isotope-ratio mass spectrometry* (Spectrométrie de Masse Ratio Isotopique)

## K

**KEH :** Kestose Exohydrolase  
**K<sub>m</sub> :** Constante de Michaelis

## L

**LU :** *Livestock Unit* (unité gros bétail)

## M

**MAPK :** *Mitogen Activated Protein Kinase*  
**MFS :** *Major facilitator superfamily* (superfamille des facilitateurs majeurs)  
**MRS :** De Man, Rogosa and Sharpe  
**MS :** Matière Sèche

## N

**NADPH :** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
**NBISE :** Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

## P

**Pal :** Palatinose  
**PAR :** *Photosynthetically Active Radiation* (radiation photosynthétiquement active)  
**PBS :** Phosphate Buffer Saline  
**PCR :** *Polymerase chain reaction* (Réaction en chaîne par polymérase)  
**PDIE :** Protéines réellement Digestibles dans l'Intestin grêle permises par l'Energie apportée par l'aliment  
**PFA :** Paraformaldehyde  
**PGM :** Phosphoglucomutase  
**PPFD :** *photosynthetic photon flux density* (densité du flux magnétique de photons photosynthétiques)  
**pv. :** pathovar

## Q

**QTL :** *Quantitative Trait Locus* (Locus de caractères quantitatifs)

## R

- RGS1** : *Regulator of G-Protein Signaling 1*  
**RNA** : *Ribonucleic acid* (Acide ribonucléique)  
**ROS** : *Reactive Oxygen Species*

## S

- SAU** : Surface Agricole Utile  
**SBE** : *Starch-branching Enzymes* (enzymes de ramification de l'amidon)  
**SE** : *Sieve Element* (tube criblé) ou *Standard Error* (Erreur standard)  
**SEM** : *Scanning Electron Microscopy* (microscopie électronique à balayage)  
**SEtk** : *tick-walled Sieve Element* (tube criblé aux parois épaisses)  
**SEtn** : *thin-walled Sieve Element* (tube criblé aux parois fines)  
**SFT** : Sucrose:fructanes FructosylTransferase  
**SPP** : Sucrose-Phosphate Phosphatase  
**SPS** : Sucrose-Phosphate Synthase  
**SS** : *Starch Synthases* (amidon synthases)  
**SST** : Saccharose:Saccharose Fructosyltransférase  
**STH** : Surfaces Toujours en Herbe  
**STP** : *Sugar Transport Protein* (protéine de transport de glucides)  
**Suc** : Sucrose (saccharose)  
**SUC** : *Sucrose Carrier* (transporteur de glucides)  
**SuSy** : Sucrose Synthase  
**SUT** : *Sucrose Transporter* (transporteur de saccharose)  
**SWEETs** : *Sugars Will Eventually be Exported Transporters*

## T

- TMT** : Transporteur de Monosaccharides Tonoplastique  
**TOR** : *Target Of Rapamycin*  
**TPS** : Tréhalose-6P Synthase

## U

- UDP** : Uridine diphosphate  
**UFL** : Unité fourragère Lait  
**UV** : Ultraviolet

## V

- V<sub>max</sub>** : Taux maximal de réaction lors de la saturation d'une enzyme par un substrat

## W

- WINK** : *With No lysine K*





# Table des matières

---

<b>I.</b>	<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Analyse bibliographique.....</b>	<b>7</b>
<b>A.</b>	<b>Prairies normandes et le ray-grass anglais.....</b>	<b>7</b>
1.	Prairies normandes.....	7
2.	Ray-grass anglais.....	9
<b>B.</b>	<b>Métabolisme glucidique.....</b>	<b>13</b>
1.	Photosynthèse.....	13
2.	Amidon, réserve minoritaire de carbone.....	13
3.	Fructanes, réserves majoritaires de carbone et molécules multifonctionnelles.....	15
4.	Saccharose : molécule centrale du métabolisme carboné.....	19
<b>C.</b>	<b>Transport du saccharose.....</b>	<b>25</b>
1.	Histologie des parties aériennes.....	25
2.	Transport latéral du saccharose.....	29
3.	Chargement direct du saccharose dans le phloème.....	33
4.	Transport à longue distance du saccharose.....	35
5.	Déchargement du phloème.....	35
<b>D.</b>	<b>Protéines transmembranaires de transport du saccharose.....</b>	<b>37</b>
1.	Transporteurs SWEETs.....	39
2.	Transporteurs de saccharose (SUTs).....	41
3.	L'importance des SUTs dans la gestion du carbone.....	55
<b>E.</b>	<b>Régulation des SUTs par des facteurs biotiques et abiotiques.....</b>	<b>59</b>
1.	Défoliation chez le ray-grass anglais.....	59
2.	Modulation des sources par le régime lumineux.....	61
3.	Modulation des puits par des micro-organismes.....	67
<b>F.</b>	<b>Régulation des SUTs par les glucides.....</b>	<b>69</b>
1.	Effet des glucides sur l'activité des SUTs.....	71
1.	Effet des glucides sur l'expression des SUTs.....	73
<b>G.</b>	<b>Saccharose, glucose et fructose comme molécules « signal ».....</b>	<b>75</b>
1.	Le signal saccharose.....	75
2.	Les signaux glucose et fructose.....	77
<b>H.</b>	<b>Objectifs de recherche.....</b>	<b>83</b>
<b>III.</b>	<b>Chapitre 1.....</b>	<b>89</b>
<b>A.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>95</b>
<b>B.</b>	<b>Materials and method.....</b>	<b>99</b>
1.	Plant material and growth conditions.....	99
2.	Water soluble sugar analysis.....	101
3.	Starch enzymatic assay.....	101
4.	Transcript level analysis.....	103

5.	Statistical analysis .....	105
<b>C.</b>	<b>Results.....</b>	<b>105</b>
1.	Sugar content and <i>LpSUT1</i> relative expression in mature leaf blades.....	105
2.	Sugar content and <i>LpSUT1</i> relative expression in leaf sheaths.....	107
<b>D.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>107</b>
1.	The decrease of starch and sucrose contents during the night period of the diel cycle in leaf blades and leaf sheaths has a low effect on <i>LpSUT1</i> relative transcript levels.....	109
2.	The increase of starch and sucrose contents during the light period of the diel cycle in leaf blades and leaf sheaths has a low effect on <i>LpSUT1</i> relative transcript levels.....	111
3.	Hexoses rather than sucrose as putative signal molecules for the regulation of <i>LpSUT1</i> transcript levels .....	115
	<b>Transition vers chapitre 2 .....</b>	<b>119</b>
<b>IV.</b>	<b>Chapitre 2.....</b>	<b>121</b>
<b>A.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>127</b>
<b>B.</b>	<b>Materials and method .....</b>	<b>131</b>
1.	Bacteria isolation from the field.....	131
2.	Plant material and growth conditions .....	133
3.	Micrograph acquisition using Scanning Electron Microscopy (SEM).....	135
4.	Bacteria enumeration on the lower face of blades using confocal microscopy .....	135
5.	Water soluble sugar analysis.....	137
6.	<i>Lp-SUT1</i> transcript level analysis .....	137
7.	Statistical analysis .....	139
<b>C.</b>	<b>Results.....</b>	<b>141</b>
1.	Plant growth, total leaf blade surface and bacteria density.....	141
2.	Sugar contents and <i>Lp-SUT1</i> relative expression in mature leaf blades.....	141
3.	Sugar contents and <i>Lp-SUT1</i> relative expression in leaf sheaths.....	143
4.	Sugar content and <i>Lp-SUT1</i> relative expression in elongating leaf bases....	143
<b>D.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>143</b>
1.	Bacteria are present in numbers, aggregate in epidermal recesses, but are not bound to phloem conducting tissues.....	145
2.	<i>Curtobacterium</i> locally induces a large and quick mobilization of sugars and a distant up-regulation of <i>Lp-SUT1</i> expression in growing tissues.....	147
3.	<i>Hafnia</i> induced the accumulation of hexoses and the regulation of <i>Lp-SUT1</i> expression.....	149
<b>E.</b>	<b>Opening .....</b>	<b>151</b>
	<b>Transition vers chapitre 3 .....</b>	<b>155</b>
<b>V.</b>	<b>Chapitre 3.....</b>	<b>157</b>
<b>A.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>163</b>

<b>B.</b>	<b>Materials and method .....</b>	<b>169</b>
1.	Plant material.....	169
2.	Experimental procedure, treatment and harvest.....	169
3.	Water soluble sugar analysis.....	171
4.	<i>Lp-SUT1</i> transcript level analysis .....	173
5.	Statistical analysis .....	175
<b>C.</b>	<b>Results.....</b>	<b>175</b>
1.	Transpiration of excised leaf blades in response to exogenous sugars .....	175
2.	Sugar contents and <i>Lp-SUT1</i> transcript levels in response to exogenous sugars .....	175
<b>D.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>179</b>
1.	Sucrose is an up-regulating signal for <i>Lp-SUT1</i> expression .....	179
2.	Glucose is a signal for <i>Lp-SUT1</i> transcriptional regulation but not fructose.....	183
3.	Different sugar signaling pathways for <i>Lp-SUT1</i> regulation .....	187
<b>VI.</b>	<b>Discussion générale.....</b>	<b>191</b>
<b>A.</b>	<b>Importance de la régulation transcriptionnelle du gène <i>LpSUT1</i> en réponse à une modulation des sources et puits.....</b>	<b>193</b>
1.	Le cycle nyctéméral et le rythme circadien pour les sources .....	195
2.	Les bactéries de la phyllosphère comme puits supplémentaire de carbone ..	197
<b>B.</b>	<b>Recherche de signaux glucidiques et Implication de la voie de signalisation de l'hexokinase.....</b>	<b>201</b>
<b>C.</b>	<b>Nouveau cadre conceptuel du transport du saccharose .....</b>	<b>207</b>
<b>VII.</b>	<b>Conclusion et perspectives de recherche.....</b>	<b>217</b>
<b>A.</b>	<b>Confirmation de la place de <i>LpSUT1</i> dans le transport latéral du saccharose dans les limbes.....</b>	<b>217</b>
1.	Utilisation de mutant <i>lpsut1</i> et histologie .....	217
2.	Identification et caractérisation des SUTs inconnus .....	221
3.	Place de la régulation post-transcriptionnelle de <i>LpSUT1</i> .....	223
<b>B.</b>	<b>Poursuivre l'identification de signaux glucidiques et leurs mécanismes de perception.....</b>	<b>225</b>
1.	Utilisation d'autres analogues de glucides .....	225
2.	La comparaison avec des plantes entières.....	227
3.	L'étude de la réponse aux phytohormones.....	229
<b>VIII.</b>	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>231</b>
<b>IX.</b>	<b>Annexes .....</b>	<b>249</b>



# Introduction générale

---



# I. Introduction générale

Le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) est la poacée la plus abondante des prairies normandes (Leconte et al., 2010). Ses propriétés nutritionnelles et sa richesse en sucres en font une source d'alimentation privilégiée pour les bovins (GNIS, 2018). C'est aussi une espèce à refoliation rapide, adaptée aux cycles de fauche ou de pâturage. Cette repousse rapide, à la suite de l'élimination des limbes photosynthétiquement actifs, se produit grâce à la mobilisation efficace des réserves carbonées présentes dans les tissus foliaires laissés en place, à savoir les gaines des feuilles matures et la base des feuilles en croissance où se trouvent les méristèmes foliaires (Morvan-Bertrand et al., 1999a, 1999b, 2001). L'amidon représente une réserve mineure de carbone tandis que les fructanes, polymères solubles de fructose élaborés à partir du saccharose, constituent la réserve majeure du ray-grass anglais (Pavis et al., 2001) et plus généralement des Poacées prairiales des régions froides et tempérées (Chatterton et al., 1989). Ces deux réserves carbonées peuvent être mobilisées sous la forme de saccharose, molécule centrale du métabolisme carboné et composé carboné majoritairement transporté *via* les tissus conducteurs du phloème. Pour permettre le développement de la plante et sa repousse après défoliation, **un transport efficace du carbone est nécessaire à l'échelle de la plante entière entre les organes sources (limbes avant défoliation, gaines après défoliation) et les organes puits de carbone (racines, bases de feuilles en croissance, gaines avant défoliation, organes reproducteurs).**

Dans les parties aériennes du ray-grass anglais, il existe histologiquement une discontinuité symplasmique entre les cellules du parenchyme phloémien et les cellules compagnes, imposant de ce fait un passage apoplasmique du saccharose pour lui permettre d'atteindre le phloème (Berthier et al., 2009). Ce passage est réalisé grâce à des transporteurs actifs de saccharose, les SUTs. Comme ni la photosynthèse, ni la capacité physique du phloème à transporter le saccharose ne semble limitante chez les végétaux (Wu et Birch, 2007 ; Wingenter et al., 2010), **l'hypothèse générale à l'origine de ce travail doctoral est que les SUTs sont des éléments clés de la gestion active des ressources carbonées entre les organes sources et les organes puits.**

Sur les quatre SUTs potentiellement présents chez le ray-grass anglais, seuls LpSUT1 et LpSUT2 ont été identifiés et caractérisés. **LpSUT1 serait responsable du transport latéral du saccharose vers les tissus conducteurs dans les limbes, les gaines et les bases de feuilles en croissance, tandis que LpSUT2 aurait plutôt un rôle senseur des concentrations en glucides internes au tissu** (Berthier et al., 2009 et 2014). Les niveaux de transcrits et de protéines LpSUT2 mesurés étant très faibles (Berthier et al., 2014), ce travail



doctoral s'est entièrement focalisé sur *LpSUT1*. Les transporteurs responsables du transport à longue distance du saccharose, c'est-à-dire du chargement et du déchargement du phloème, sont régulés au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Xu et al., 2018). **L'étude de la régulation des SUTs, comme *LpSUT1*, responsables du transport latéral du saccharose, est quant à elle peu connue.** Au laboratoire, la régulation de *LpSUT1* a été étudiée dans le cadre de la défoliation. Il a été montré que les niveaux de transcrits étaient démultipliés (23 à 40 fois les niveaux initiaux) au cours des premières heures de refoliation dans les gaines et les bases de feuilles en croissance (Berthier et al., 2014). Dans ce contexte, il n'existe aucune donnée sur la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* dans les limbes, puisque ces derniers sont éliminés par la défoliation. De ce fait, une part importante du travail doctoral s'est donc focalisée sur la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* dans les limbes avec comme hypothèse que la régulation fine des niveaux de transcrits *LpSUT1* est un élément-clé de la gestion efficace des ressources carbonées entre les organes sources et les organes puits du ray-grass anglais.

**Pour tester cette hypothèse, une première approche a consisté à étudier et moduler les relations entre les sources et les puits de carbone du ray-grass anglais par des facteurs biotiques et abiotiques susceptibles de provoquer une perturbation importante de la disponibilité du saccharose similaire à la défoliation.**

Les glucides sont aussi des molécules « signal » capables de percevoir les modifications des relations source-puits et de moduler l'expression de gènes. Il a ainsi été démontré que des gènes du métabolisme carboné pouvaient être régulés par le saccharose (dont les *SUTs* ; Weber et al., 1997 ; Chiou et Bush, 1998 ; Vaughn et al., 2002) et les hexoses issus de son métabolisme (fructose et glucose). Cependant, aucun senseur direct du saccharose n'a été identifié à ce jour et les voies de signalisation qui permettent la perception indirecte de la concentration en saccharose sont encore peu connues (Wind et al., 2010 ; Tognetti et al., 2013 ; Li et Sheen, 2016). Il existe aussi très peu d'informations sur les voies de signalisation déclenchées par le fructose (Sakr et al., 2018) alors que chez les espèces accumulatrices de fructanes telles que le ray-grass anglais, le fructose est produit en grande quantité lors de la mobilisation des fructanes. En revanche, les voies de signalisation déclenchées par le glucose sont mieux caractérisées. Elles peuvent impliquer l'hexokinase (Sheen, 2014). L'utilisation d'analogues structuraux des glucides et d'inhibiteurs de l'hexokinase rend possible l'identification des molécules « signal » et renseigne sur le senseur et certains éléments des voies de transmission du signal (Aguilera-Alvarado et Sánchez-Nieto, 2017). L'implication de l'hexokinase dans la régulation transcriptionnelle des gènes *SUTs* n'a pas encore été explorée chez les végétaux.



**De ce fait, le deuxième objectif de ce travail doctoral a été de déterminer si le saccharose, le glucose et/ou le fructose étaient des molécules « signal » et si l'hexokinase était impliquée dans la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1*.**

La première partie de ce manuscrit aborde l'importance du ray-grass anglais au sein de l'écosystème prairial. Le métabolisme glucidique des végétaux supérieurs ainsi que le transport du saccharose sont ensuite décrits pour souligner l'importance des transporteurs de saccharose et leur régulation en réponse à des facteurs biotiques et abiotiques. Enfin, le rôle signal des glucides majeurs, comme le saccharose, le glucose et le fructose est abordé. Les résultats obtenus sont organisés en trois chapitres correspondant chacun à un article scientifique.

- **Lonesang H, Noiraud-Romy N, Prud'homme M-P, Meuriot F. 2020.** The transcriptional regulation of the lateral sucrose transporter *LpSUT1* is independent of the diel variations of sucrose content in leaf blades and leaf sheaths of *Lolium perenne*. *Physiologia Plantarum*. Article soumis. Facteur d'impact : 4,148.

- **Lonesang H, Noiraud-Romy N, Prud'homme M-P, Morvan-Bertrand A, Ellie N, Goux D, Cretenet M, Dalmaso M, Chagnot C., Meuriot F. 2020.** Phyllosphere bacteria induce the mobilization of fructans and sucrose and the transcriptional up-regulation of the sucrose lateral transporter *Lp-SUT1* in *Lolium perenne*. *Plant Physiology and Biochemistry*. Article rédigé à soumettre. Facteur d'impact : 3,720.

- **Lonesang H, Noiraud-Romy N, Prud'homme M-P, Meuriot F. 2020.** Sugars, hexokinase, and the regulation of the expression of the lateral sucrose transporter *Lp-SUT1* in *Lolium perenne*. *Functional Plant Biology*. Article rédigé à soumettre. Facteur d'impact : 2,430.

La discussion générale synthétise les apports de ce travail doctoral et argumente sur la place de la régulation transcriptionnelle du transporteur *LpSUT1* dans le mécanisme de transport du saccharose chez le ray-grass anglais et dégage de nouvelles perspectives de recherches. Les résultats exposés dans le deuxième chapitre ont fait l'objet d'un poster scientifique présenté aux 2<sup>èmes</sup> journées scientifiques de la fédération de recherche NORVEGE le 17 & 18 Mai 2018 à Deauville (deuxième prix du jury ; **Annexe I**) ainsi qu'une présentation orale aux Journées de l'Ecole doctorale NBISE du 21 & 22 Mars 2019 à Caen (premier prix du jury, extrait en **Annexe II**).



# **Analyse bibliographique**

---





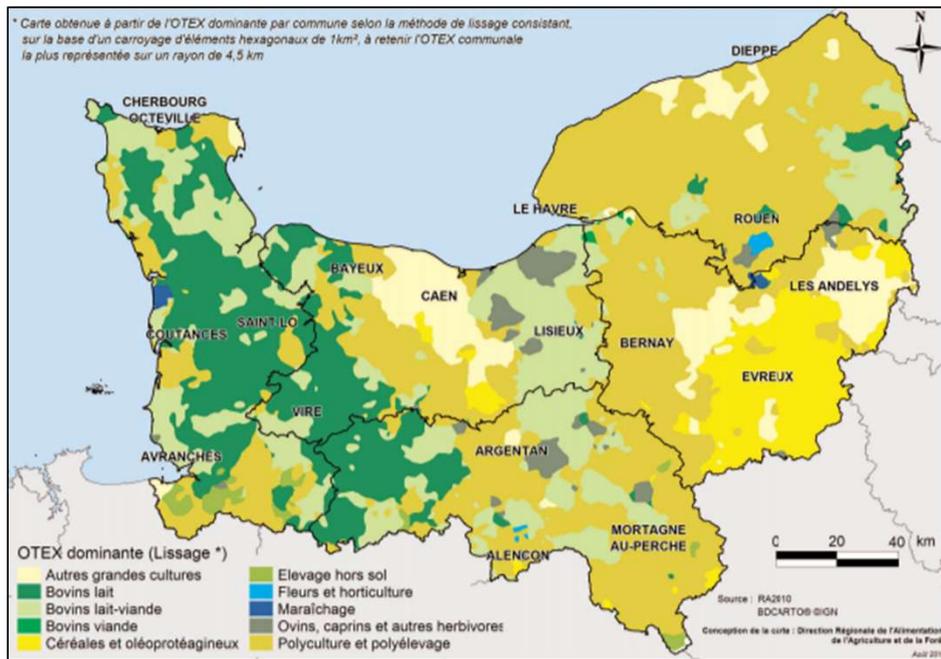


FIGURE 1. Caractérisation des exploitations agricoles en Normandie (DRAAF Normandie, 2017).



FIGURE 2. Les 5 produits laitiers AOP (Appellations d'Origine Protégée) normands (Seité, 2015).

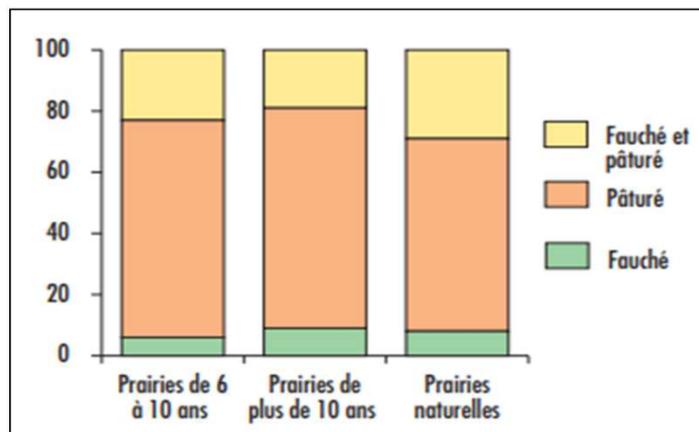


FIGURE 3. Modes d'exploitation des prairies permanentes normandes (DRAAF Normandie, 2006).

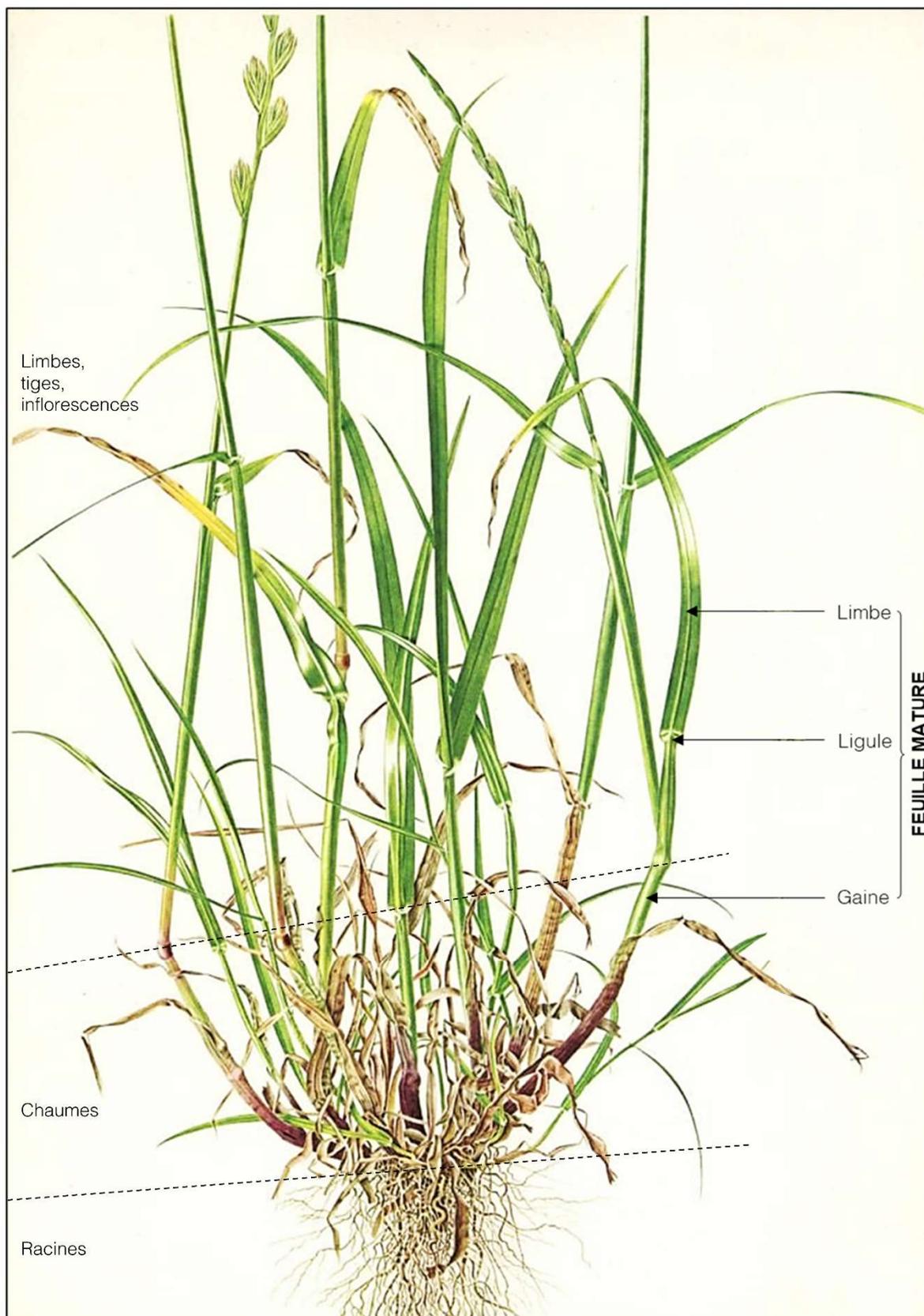
## II. Analyse bibliographique

### A. Prairies normandes et le ray-grass anglais

Dans le monde, les prairies représentent 26% des surfaces émergées et 70% de la Surface Agricole Utile (SAU ; [Le Cain et al., 2002](#) ; [Wang et Fang, 2009](#)). En France, elles correspondent à environ 50% de la SAU ([Maciejewski et Osson, 2015](#)). Cet écosystème est donc particulièrement représenté et il montre de nombreux atouts qui participent à son rôle agro-économique majeur, aux côtés des systèmes de grandes cultures.

#### 1. Prairies normandes

La Normandie est la région française où la proportion de prairies relative à la SAU est la plus élevée (70% de SAU, soit 2 millions d'hectares ; [Agriscopie, 2019](#)). Les prairies sont le socle commun sur lequel s'appuient l'élevage normand (principalement bovins et équidés) ([Figure 1](#)), et par extension, la production laitière normande, de renommée internationale ([Figure 2](#)). De ce fait, la bonne gestion des cultures prairiales (*e.g.* cycles de fauche et de pâturage, apports en azote), en conciliant le respect de la tradition et celui de l'environnement, est au cœur des préoccupations des éleveurs. Les prairies y sont traditionnellement exploitées selon deux méthodes. Tout d'abord, il est possible de récolter leur biomasse par fauche mécanique pour une consommation ultérieure grâce à la production de fourrages sous la forme de foins ou d'ensilage. Toutefois, la grande majorité de cette biomasse est prélevée par les animaux pour une consommation directe par pâturage ([Figure 3](#)). Selon leur mode de gestion (*i.e.* maximisation de la pérennité ou bien de la productivité du couvert), différents types de prairies existent. Par ordre d'importance surfacique, il existe tout d'abord les prairies naturelles, (57% des surfaces prairiales normandes ; [Leconte et al., 2010](#)) qui sont aussi désignées comme des « prairies permanentes » ou « surfaces toujours en herbe » (STH). Il s'agit de prairies sans labours, semées il y a plus de six ans ([Palacio-Rabaud, 2000](#)) et dont la pérennité peut s'étaler sur des dizaines d'années. Ensuite, il y a les prairies temporaires, semées depuis moins de 6 ans (21% des prairies normandes en 2010), mais qui sont cependant plus productives en termes de biomasse élaborée du fait de pratiques de fertilisation et d'itinéraires techniques adaptés. Enfin, une très faible proportion des surfaces prairiales cultivées sont appelées prairies artificielles (3%). Ces prairies sont moins pérennes que les prairies naturelles (jusqu'à une dizaine d'années seulement) mais leur productivité est la plus forte.

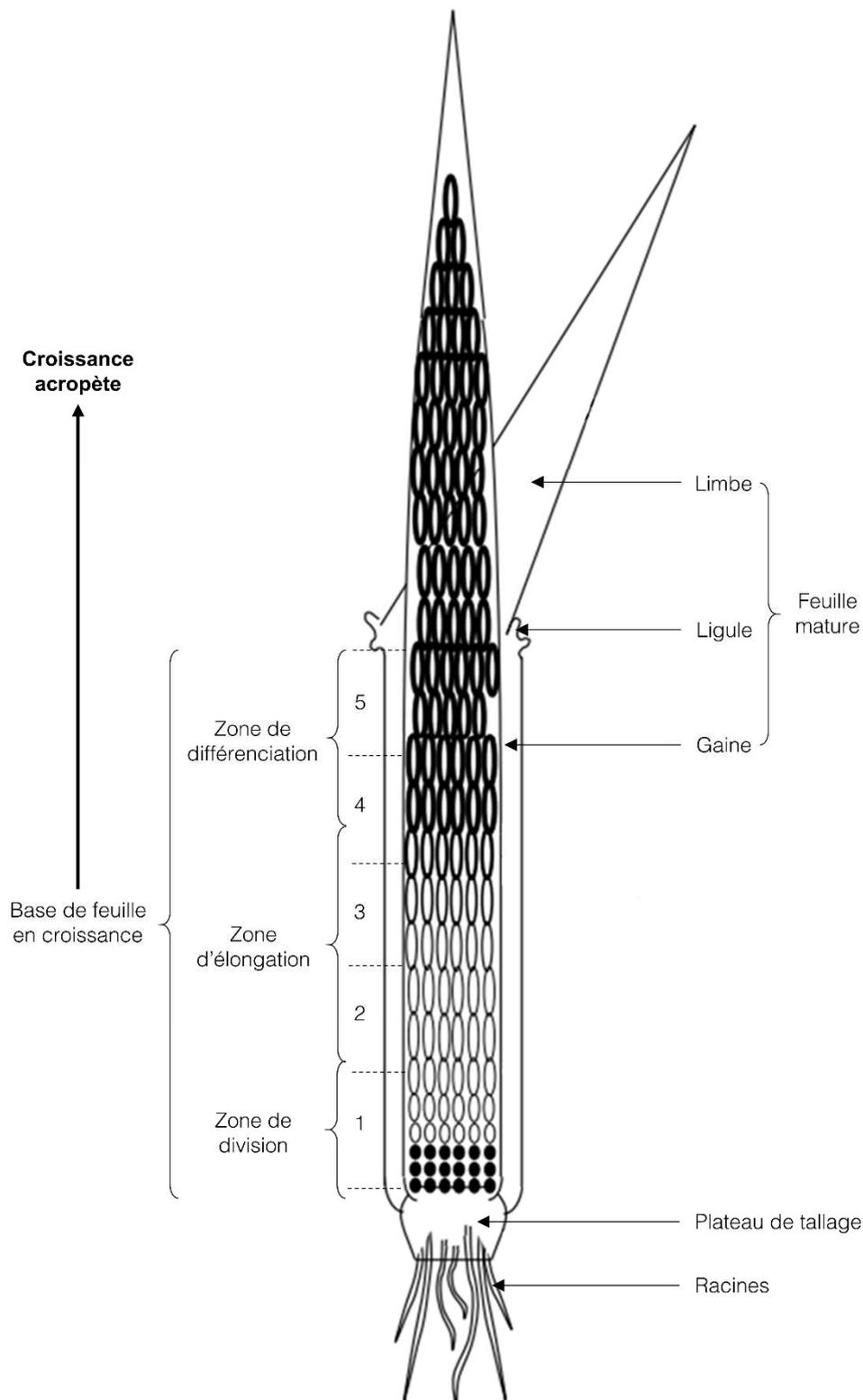


**FIGURE 4.** Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) d'environ 10 talles (source inconnue). Chaque feuille mature possède un point de basculement (ligule) qui délimite le limbe et la gaine associée. Les feuilles d'un même talle s'enroulent les unes autour des autres et la feuille en croissance est toujours située au centre.

Les prairies jouent donc un rôle crucial pour la santé animale (Séguin et al., 2010) et dans la qualité des produits issus de l'élevage car elles sont gérées avec pour but principal l'alimentation des herbivores (majoritairement des bovins en Normandie) au travers de la production de fourrages de haute qualité. Elles rendent aussi un ensemble de services écosystémiques (service d'approvisionnement et de régulation par exemple) (Tasset, 2019). Parmi les 61 espèces de Poacées qui ont été recensées dans les prairies normandes permanentes (Leconte et al., 2004), le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), est la poacée présente dans les plus grandes proportions. Cette espèce revêt donc un intérêt agro-économique majeur (Leconte et al., 2010) et représente un levier important pour l'amélioration des rendements fourragers normands. Elle constitue de ce fait l'espèce modèle de ce travail doctoral.

## 2. Ray-grass anglais

Le ray-grass anglais est une espèce pérenne qui possède des caractéristiques morphologiques et physiologiques qui le rendent particulièrement adapté pour supporter à répétition, au cours de la saison et des années, la pâture et/ou la fauche. C'est une Angiosperme monocotylédone, pouvant être considérée comme vivace pour un pied mère. Il se développe en formant des touffes composées d'unités végétales appelées « talles » qui sont produites en continu. Chaque talle est constituée d'une partie racinaire et de parties aériennes qui sont séparées au niveau d'un « plateau de tallage », l'équivalent du collet chez les dicotylédones (Figure 4). Après fragmentation de ce plateau de tallage lors du piétinement par les animaux ou après sarclage mécanique, une multiplication végétative se produit et conduit à la formation de nouveaux pieds-mères qui ont une durée de vie propre allant de 10 à 15 ans, expliquant aussi la grande pérennité des prairies permanentes, sur des dizaines d'années. Les parties aériennes de chaque talle sont formées de trois feuilles enroulées entre elles à leur base en feuillets concentriques et qui présentent un port érigé. Chaque feuille peut être ensuite séparée en deux parties. La partie supérieure, le limbe, et inférieure, la gaine, sont séparées par une zone anatomique caractéristique appelée ligule (Figure 4). De ce fait, une feuille est considérée comme mature lorsque le limbe foliaire s'écarte de la plante en basculant au niveau de la ligule. La feuille en croissance est située au centre de chaque talle, protégée à sa base par les gaines des feuilles matures qui l'enserrent. Cette base est divisée en trois zones successives : la zone de division (située entre le plateau de tallage et 5 mm au-dessus), d'élongation (entre 5-35 mm) et de différenciation (au-dessus de 35 mm et jusqu'à la ligule)

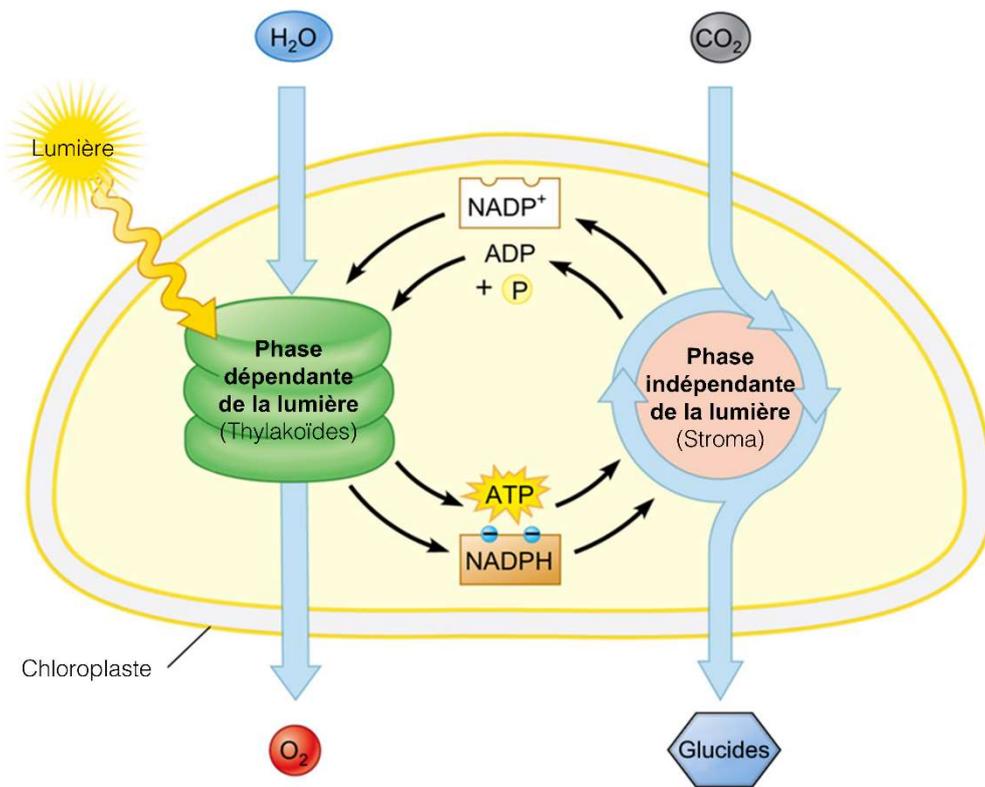


**FIGURE 5.** Schéma d'une talle de ray-grass anglais (d'après Berthier *et al.*, 2014). La base de feuille en croissance est divisée en 3 zones : (1) la zone de division, (2-4) zone d'élongation, (3-5) zone de différenciation. Chaque section numérotée mesure 1 cm de haut. Les ovales représentent les cellules dont la paroi s'épaissit au cours de leur croissance.

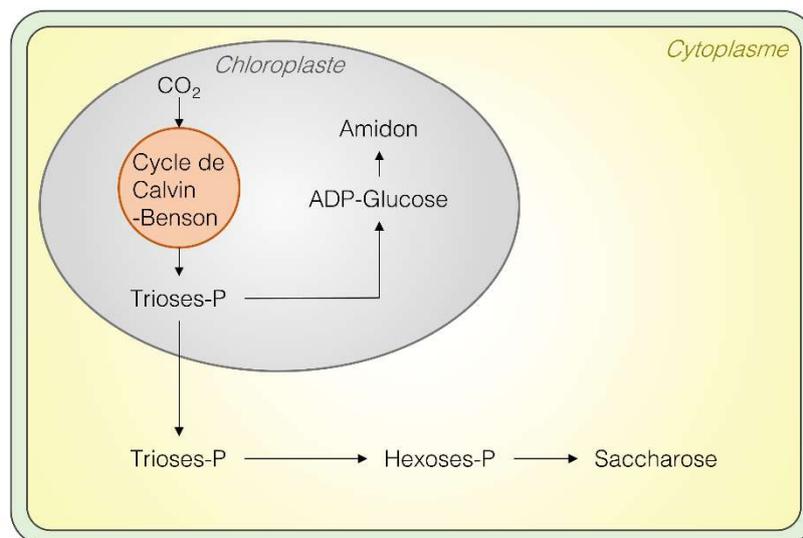
cellulaires (Figure 5) (Berthier et al., 2014). Ces trois zones réunies forment alors la base d'une feuille en croissance. Dans chaque base de feuille en croissance, et donc pour chaque talle, se trouve un méristème foliaire qui se situe juste au-dessus du plateau de tallage. Cette morphologie spécifique du ray-grass anglais lui permet de survivre au prélèvement de ses parties aériennes supérieures (GNIS, 2012), car ses méristèmes foliaires, producteur de nouvelles feuilles, sont alors protégés et hors de portée des bovins (qui ne peuvent prélever qu'à partir de 6 à 8 cm au-dessus du sol). En parallèle, la plante produit de nouvelles talles de façon exponentielle, puisque chaque talle devenue mature produit en continu une nouvelle talle. De plus, la vitesse de croissance de ses feuilles est élevée (plus de 1,5 mm par jour). **La morphologie du ray-grass anglais est ainsi parfaitement adaptée au pâturage.**

Ce dernier possède également des caractéristiques nutritionnelles et un métabolisme glucidique qui le rendent très intéressant pour la production de biomasse végétale pour les exploitations laitières. Il existe plusieurs unités de mesure reflétant les propriétés énergétiques et nutritionnelles d'un végétal utilisé par les exploitants laitiers. Il existe par exemple l'Unité fourragère Lait (UFL). Une UFL correspond à la valeur énergétique qu'apporte 1 kg d'orge (*Hordeum vulgare* L.) pour l'animal. Une autre unité de mesure est le PDIE (Protéines réellement Digestibles dans l'Intestin grêle permises par l'Energie apportée par l'aliment). Une vache laitière de 650 kg nécessite 12,2 UFL et 1294 g de PDIE pour produire quotidiennement 12 L de lait (Kadi, 2007), une vache de race Normande pouvant peser entre 700 et 1100 kg. Le ray-grass anglais correspond à 0.98 UFL et possède un PDIE de 100 g/kg MS<sup>-1</sup>. Il est inférieur à celui des tourteaux de soja (229 g/kg MS<sup>-1</sup>) et bien supérieur à celui du maïs d'ensilage (*Zea mays*, L.) avec 67 g/kg MS<sup>-1</sup>, largement utilisé par les éleveurs laitiers, notamment en Normandie. Enfin, le ray-grass anglais est une espèce très appétente pour les bovins car elle est peu astringente et elle présente surtout des teneurs en glucides élevées dans les feuilles. Cette particularité augmenterait les rendements laitiers (Miller et al., 1999, 2001). **L'ensemble de ces caractéristiques nutritionnelles font donc du ray-grass anglais une très bonne source d'alimentation pour les bovins.**

Malgré la diminution, voire l'arrêt brutal de ses capacités photosynthétiques causée par la défoliation subie lors de la fauche ou le pâturage, le ray-grass anglais est capable de retrouver son autotrophie pour le carbone en moins de trois jours (Morvan-Bertrand et al., 1999b). Grâce à sa morphologie adaptée et à ses qualités nutritionnelles, le ray-grass anglais est donc non seulement une espèce parfaitement adaptée à l'élevage, mais aussi une espèce **capable de maintenir une bonne production de biomasse malgré des cycles de**



**FIGURE 6.** Les deux phases de la photosynthèse se déroulant dans les chloroplastes (Pearson Education, 2012). La phase dépendante de la lumière fait appel à la chaîne de transport des électrons des membranes des thylakoïdes. Celle indépendante de la lumière utilise le cycle de Calvin-Benson.



**FIGURE 7.** Production de glucides par la photosynthèse dans le chloroplaste et le cytoplasme (d'après Taiz *et al.*, 2014).

**défoliation répétés au cours de la saison.** Puisque cette adaptation physiologique nécessite une utilisation (*i.e.* mobilisation) efficace des réserves de glucides préalablement stockées dans des organes épargnés par la coupe (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a, 1999b, 2001), il apparaît nécessaire de détailler le métabolisme glucidique du ray-grass anglais.

## B. Métabolisme glucidique

### 1. Photosynthèse

La photosynthèse permet de convertir le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) atmosphérique en glucides dans les chloroplastes des végétaux (pour revue complète, se référer à Johnson, 2016). Chez le ray-grass anglais, comme chez toutes les Poacées, la photosynthèse a lieu dans les tissus dont les cellules possèdent des chloroplastes, à savoir les limbes des feuilles matures, les gaines associées et la partie mature (émergée) des limbes foliaires en croissance (Borland et Farrar, 1989 ; Allard et Nelson, 1991) (Figure 4). Brièvement, elle se produit en deux phases distinctes appelées **i**) phase dépendante de la lumière (réactions photochimiques) et **ii**) phase indépendante de la lumière (réactions thermochimiques) (Figure 6). A la lumière, la photolyse de l'eau (H<sub>2</sub>O) permet la production d'O<sub>2</sub> et de protons et la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique en produisant de l'ATP et du NADPH. Ces molécules sont utilisées au cours de la phase indépendante de la lumière pour réduire le CO<sub>2</sub> en glucides (CH<sub>2</sub>O), et plus particulièrement, en trioses-phosphate. Les trioses-P produits dans le stroma des chloroplastes peuvent être convertis en amidon, un polymère de glucose servant de réserve carbonée, par la production intermédiaire d'ADP-glucose (Figure 7) (Taiz *et al.*, 2014).

### 2. Amidon, réserve minoritaire de carbone

L'amidon est composé de deux polymères de glucose : l'amylose (avec les liaisons α1-4), et l'amylopectine (avec les liaisons α1-4 et ~5% de ramifications en α1-6) (Figure 8) (Hannah et James, 2008). Il existe très peu de littérature concernant la biosynthèse de l'amidon chez le ray-grass (Cairns *et al.*, 2002). De ce fait, ce seront les voies de biosynthèse de l'amidon identifiées chez d'autres Poacées qui seront brièvement explicitées ici (Figure 9) (Comparot-Moss et Denyer, 2009). Par l'action de pyrophosphorylases d'une part, et d'une kinase et d'une isomérase d'autre part, le fructose est converti en glucose-6-P et l'UDP-glucose produit par la SuSy est converti en ADP-glucose dans le cytoplasme. Dans les

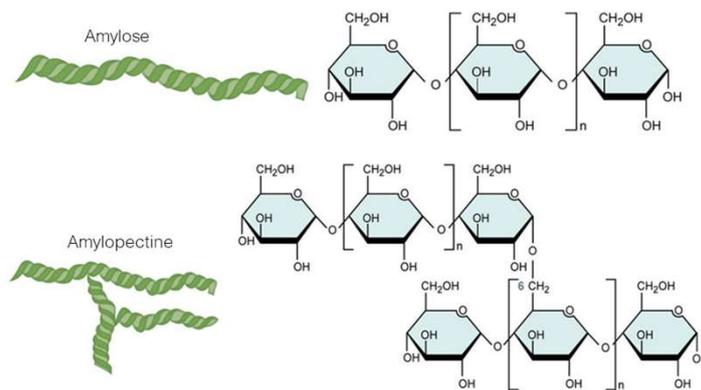


FIGURE 8. Structure moléculaire de l'amylose et de l'amylopectine composant l'amidon (OpenStax CNX, 2016)

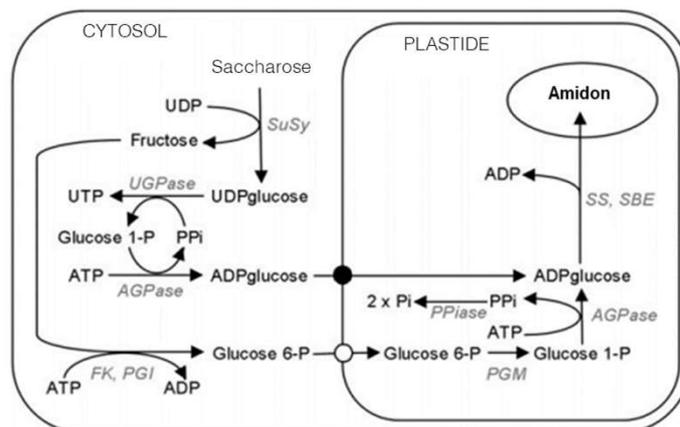


FIGURE 9. Biosynthèse de l'amidon dans les plastides (Comparot-Moss et Denyer, 2009). SuSy : Sucrose Synthase ; UGPase : UDP-Glucose Pyrophosphorylase ; PGM : Phosphoglucomutase ; FK : Fructokinase ; PGI : Phosphogluucose Isomérase ; PPiase : Pyrophosphatase ; AGPase : ADP-glucose Pyrophosphatase ; SS : Starch Synthase ; SBE : Starch Branching Enzyme. Les cercles représentent des transporteurs d'hexoses transmembranaires.

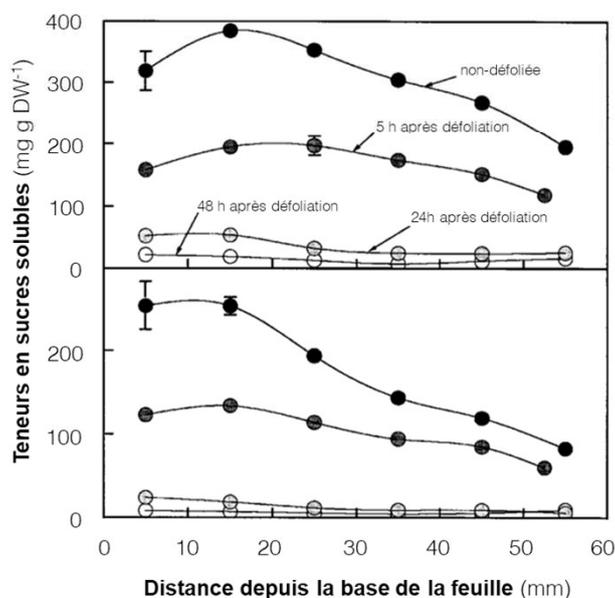


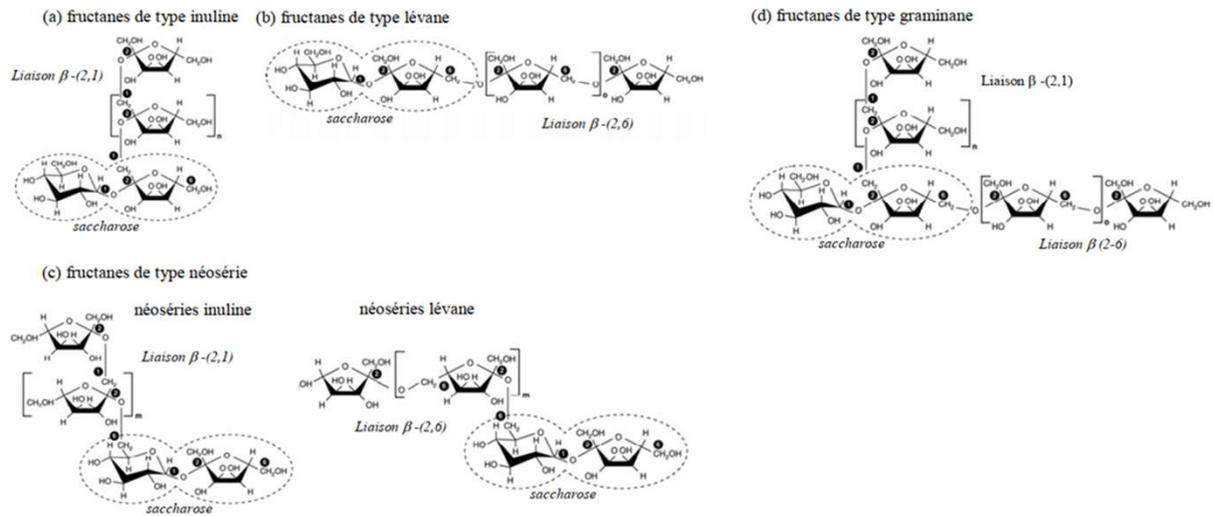
FIGURE 10. Changements de la distribution spatiale des concentrations en sucres solubles dans les bases de feuilles en croissance de *L. perenne* au moment de la défoliation (0 h) et après 5, 24, et 48 h de repousse. Les valeurs représentent la moyenne de trois réplicats. Les barres verticales indiquent l'erreur standard lorsqu'elles sont plus larges que les symboles (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001).

amyloplast, le glucose-6-P et l'ADP-glucose sont alors importés par le biais de transporteurs spécifiques (le transporteur Glucose-6-Phosphate/Phosphate et le transporteur ATP/ADP (Neuhaus et Wagner, 2000). Dans les chloroplastes, ces étapes préliminaires ne sont pas nécessaires, et le glucose 6-P ainsi que l'ATP sont fournis directement par la photosynthèse (Comparot-Moss et Denyer, 2009). Dans les amyloplast et les chloroplastes, le Glucose-6-Phosphate doit alors être à son tour converti en ADP-Glucose. Cette conversion fait appel à une phosphoglucomutase (PGM) et l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase). L'anabolisme de l'amidon peut alors commencer. Celui-ci fait appel à plusieurs amidon synthases (*Starch Synthases* ; SS) pour produire les polymères d'amylose. La ramification du polymère est alors assurée par plusieurs isoformes d'enzymes de ramification de l'amidon (*Starch-branching Enzymes* ; SBE).

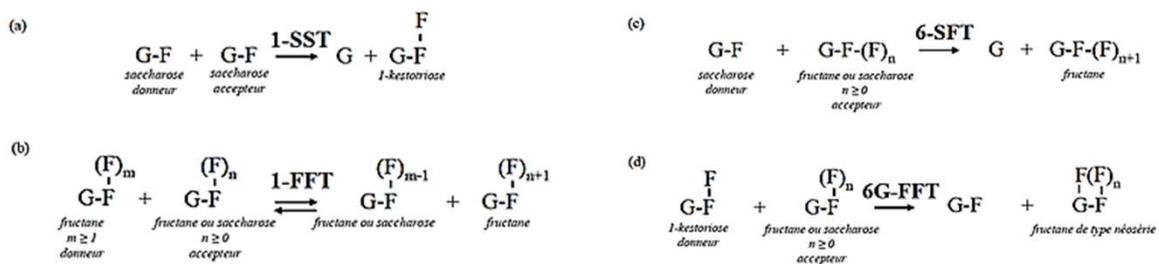
L'amidon est minoritaire chez le ray-grass anglais car il ne représente que 0,4% du total de la matière fraîche des feuilles (5,3 mg.g MS<sup>-1</sup> contre 61,6 mg.g MS<sup>-1</sup> dans les feuilles de trèfle des prés (*Trifolium pratense* L.) (Jones, 1990 ; Cairns et al., 2002) et parce que la plante ne produit pas non plus d'organe de stockage d'amidon spécialisé tel que le tubercule chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). **La présence d'enzymes de déramification et de dégradation de l'amidon permet toutefois la remobilisation de ces réserves carbonées minoritaires pour la production de saccharose dans le cytoplasme des cellules.**

### **3. Fructanes, réserves majoritaires de carbone et molécules multifonctionnelles**

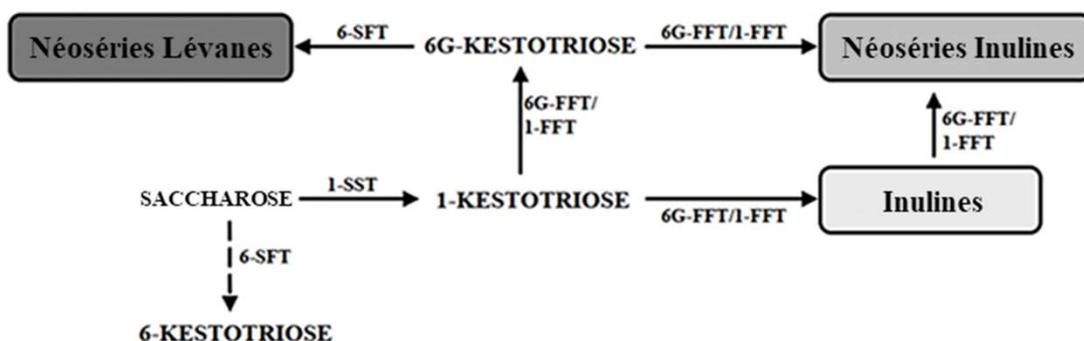
Les fructanes sont des polymères hydrosolubles de fructose rattachés à une molécule de saccharose et présents chez environ 15% des végétaux supérieurs, dont l'ordre des Poales dont font partie l'orge, le blé (*Triticum aestivum* L.) et le ray-grass anglais (Hendry, 1993). Ils sont accumulés en grandes quantités assez exclusivement dans les vacuoles et dans la plupart des tissus. Deux organes se distinguent cependant : les gaines et la base des feuilles en croissance, qui peuvent contenir à elles deux près de 70% de l'ensemble des fructanes de la plante entière (Figure 10) (Morvan-Bertrand et al., 2001). Outre un rôle essentiel de réserve carbonée, plusieurs rôles leurs sont également attribués dans la littérature. Ainsi, lorsque la plante est soumise à de basses températures, les teneurs en fructanes augmentent (Abeynayake et al., 2015). Il est envisagé que leur accumulation pourrait augmenter la pression osmotique des cellules et diminuer le point de congélation de l'eau, et donc augmenter la résistance du végétal aux basses températures (Krasensky



**FIGURE 11.** Classification des fructanes (Ritsema et Smeekens, 2003). Structure des quatre types de fructanes. (a) type inuline, (b) type lévane, (c) type néosérie, (d) type graminane. La molécule de saccharose est entourée par des pointillés et le numéro dans un rond noir correspond au numéro de l'atome de carbone dans la molécule.



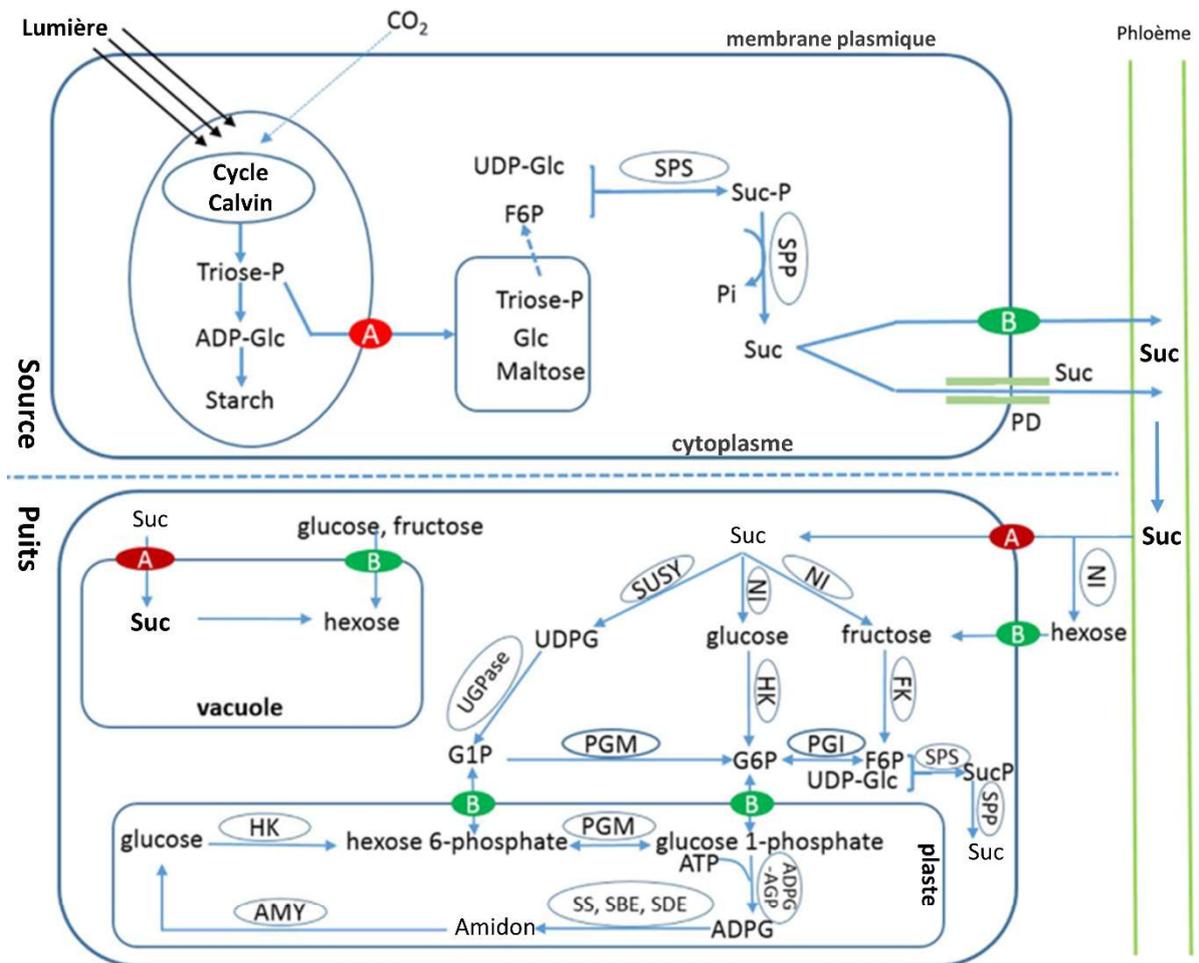
**FIGURE 12.** Enzymes de l'anabolisme des fructanes (Lothier, 2007b). Légende : (a) saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST) (EC 2.4.1.99). (b) fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT) (EC 2.4.1.100). (c) saccharose:fructane 6-fructosyltransférases (6-SFT) (EC 2.4.1.10). (d) fructane:fructane 6Gfructosyltransférase (6G-FFT). Les traits verticaux symbolisent des liaisons  $\beta$ -(2,1) et les traits horizontaux des liaisons  $\beta$ -(2,6). F, fructose; G, glucose; G-F, saccharose.



**FIGURE 13.** Modèle pour la synthèse des fructanes par la saccharose : saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST), la fructane : fructane 6G-FFT/fructane : fructane 1-fructosyltransférase (6G-FFT/1-FFT) et la saccharose : fructane 6-fructosyltransférase (6-SFT) chez *Lolium perenne* L. (Prud'homme *et al.*, 2007).

et Jonak, 2012). De plus, Hinch et al., (2000) ont démontré que certains fructanes pouvaient fortement augmenter la résistance physique des membranes lipidiques vis-à-vis du stress provoqué par le gel, la sécheresse ou la salinité. Enfin, les fructanes présentent un pouvoir antioxydant vis-à-vis d'espèces réactives de l'oxygène dont le radical hydroxyle, responsable des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (Stonayova et al., 2010 ; Peshev et al., 2013). Les fructanes semblent donc jouer un rôle majeur dans la résistance des plantes aux stress abiotiques. Ils sont aussi bénéfiques pour les animaux et l'Homme qui les ingèrent du fait de leur effet pré-biotique (Kaur et Gupta, 2003). Ainsi, les sélectionneurs travaillent depuis près de 20 ans à améliorer les variétés de ray-grass anglais pour qu'elles soient plus riches en glucides foliaires, et en particulier en fructanes.

Chez le ray-grass anglais, la majorité des fructanes sont des polymères de fructose liés entre eux par des liaisons  $\beta(2,6)$ , de type néosérie lévane (Pavis et al., 2001) (Figure 11). Le ray-grass anglais produit aussi des fructanes de type inuline et de type néosérie inuline. A la différence de l'orge et du blé, il ne produit pas de graminanes et n'accumule pas de lévanes, hormis quelques traces de 6-kestotriose. Les fructanes sont produits par des fructosyltransférases (Figure 12) à partir du saccharose importé dans les vacuoles depuis le cytoplasme des cellules (Ritsema et Smeekens, 2003). La synthèse de la majorité des fructanes du ray-grass anglais commence par celle du 1-kestotriose (Figure 13). Elle est catalysée par la saccharose : saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST ; Chalmers et al., 2003), qui transfère le résidu fructosyl d'une autre molécule de saccharose en formant une liaison  $\beta(2-1)$  (Figure 12). Les inulines sont produites par addition successive de résidus fructosyl en  $\beta(2-1)$  sur le résidu fructosyl du 1-kestotriose par la fructane : fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT ; Lasseur et al., 2006). C'est aussi à partir du 1-kestotriose qu'est produit le 6G-kestotriose, premier fructane des néoséries inuline et lévane (Figure 13). La réaction est catalysée par la 6-glucose-fructosyltransférase (6G-FFT ; Lasseur et al., 2006 ; Rasmussen et al., 2014) qui transfère le résidu fructosyl du 1-kestotriose sur le résidu glucosyl du saccharose (Figure 12). La néosérie lévane est produite par addition successive de résidus fructosyl en  $\beta(2-6)$  par la saccharose : fructane 6-fructosyltransférase (6-SFT ; Lasseur et al., 2011) qui utilise le saccharose comme donneur de résidu fructosyl (Figure 12). La néosérie inuline est produite par addition successive de résidus fructosyl en  $\beta(2-1)$  grâce à la 1-FFT (Figure 13). La 6G-FFT peut aussi transférer le résidu fructosyl sur le résidu glucosyl des inulines (Vijn et al., 1997), si bien que les fructanes de la néosérie inuline peuvent aussi être issus des inulines (Figure 13). Chez le ray-grass anglais, les activités 6G-FFT et 1-FFT sont assurées par la même protéine (Lasseur et al., 2006) (Figure 13).



**FIGURE 14.** Anabolisme et catabolisme du saccharose (d'après Wang *et al.*, 2016). Légende : ADP-Glc : ADP-glucose ; Glc : glucose ; triose-P : triose-phosphate ; G6P : Glc-6-phosphate ; G1P : Glc-1-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; UDPG : uridine diphosphate glucose ; Suc-P : Suc-phosphate ; SPS : Suc-phosphate synthase ; SPP : Suc-phosphate phosphatase ; PGI : phosphoglucose isomerase ; NI : neutral invertase ; SUSY : sucrose synthase ; HK : hexokinase ; FK : fructokinase ; PGM : phosphoglucomutase ; UGPase : UGP-glucose pyrophosphorylase. SE : tube criblé. CC : cellule compagne. A : transporteur de saccharose. B : protéine de transport de glucides.

Tout comme l'amidon, les fructanes peuvent être rapidement et massivement remobilisés. La dégradation des fructanes conduit à la libération de fructose qui permet de produire à nouveau du saccharose. Les enzymes impliquées dans le catabolisme des fructanes sont les Fructanes Exohydrolases (FEH). Elles sont vacuolaires, et diffèrent principalement entre elles par le type de liaisons qu'elles sont capables d'hydrolyser (Van den Ende *et al.*, 2018). Les 1-FEH hydrolysent majoritairement les liaisons  $\beta$ 2-1 tandis que les 6-FEH agissent préférentiellement sur les liaisons  $\beta$ 2-6. Ces deux types de FEHs ont été clonées et identifiées chez le ray-grass anglais (Lothier *et al.*, 2007a, 2010 et 2014). Chez d'autres espèces, il a aussi été identifié des 6&1-FEH, capables d'hydrolyser les deux types de liaisons (Kawakami *et al.*, 2005) et une 6-KEH qui n'agit que sur le 6-kestotriose.

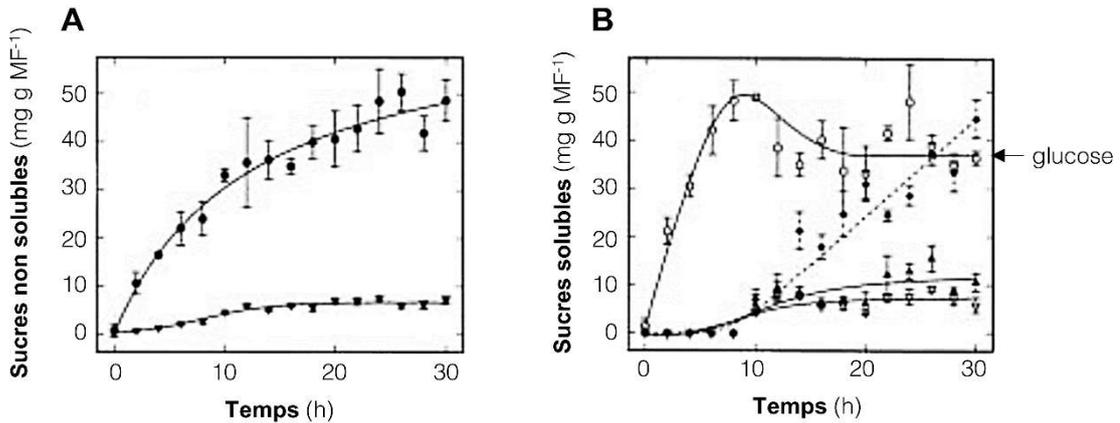
La photosynthèse, mais également le catabolisme des réserves d'amidon et de fructanes peuvent ainsi produire de grandes quantités de saccharose. Il n'est donc pas étonnant de constater que ce disaccharide revêt un rôle majeur dans le métabolisme carboné du ray-grass anglais comme chez la majorité des végétaux supérieurs.

#### 4. Saccharose : molécule centrale du métabolisme carboné

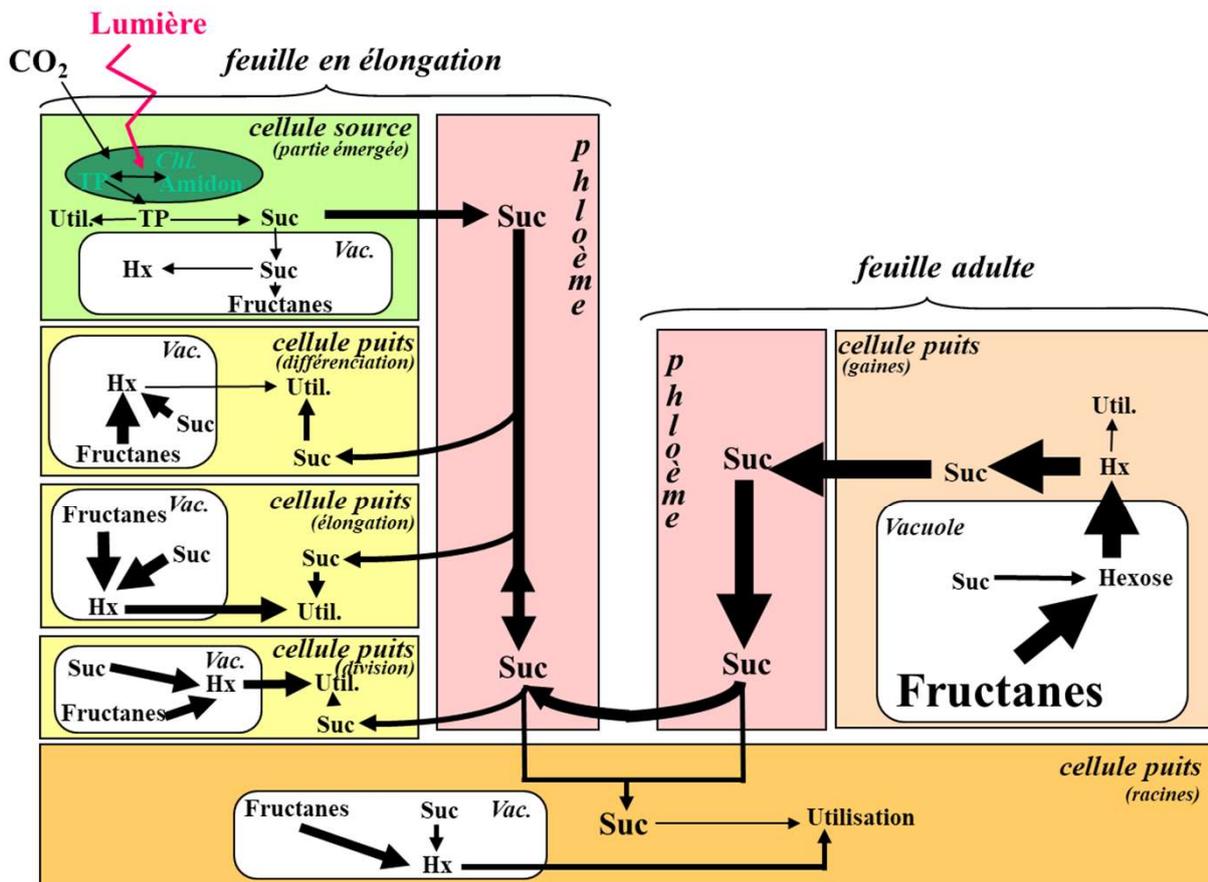
Le saccharose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside) est une molécule du métabolisme glucidique dont l'anabolisme et le catabolisme ont été décrits dans la littérature depuis de nombreuses années. Il peut en effet être mobilisé pour la synthèse de l'amidon et des fructanes, mais aussi être produit par la photosynthèse. Dans ce cas, la synthèse et la dégradation du saccharose sont exclusivement cytoplasmiques.

Il existe deux voies d'anabolisme du saccharose. La première fait appel à deux enzymes (Figure 14) (Wang *et al.*, 2016). Tout d'abord, une molécule d'UDP-glucose est produite à partir des hexoses-P de la photosynthèse, et plus particulièrement du fructose-6-Phosphate. L'UDP-glucose et une autre molécule de fructose-6-Phosphate sont converties en saccharose-6-Phosphate par la Sucrose-Phosphate Synthase (SPS). Puis, ce dernier est converti en saccharose par la Sucrose-Phosphate Phosphatase (SPP) (Wind *et al.*, 2010). La seconde voie anabolique fait appel à une enzyme qui intervient dans la voie du catabolisme du saccharose mais dont l'activité est réversible (Stein et Granot, 2019). Il s'agit de la Sucrose Synthase (SuSy) capable de convertir de façon réversible l'UDP-glucose et du fructose en saccharose.

En parallèle, il existe deux voies cytoplasmiques du catabolisme du saccharose (Figure 14). Elles permettent la conversion de ce dernier en hexoses qui sont nécessaires



**FIGURE 15.1.** Suivi des teneurs en glucides solubles et amidon de feuilles excisées de ray-grass d'Italie (*Lolium temulentum* L.) (Cairns *et al.*, 2002). Les mesures ont été effectuées au cours de 30 h de lumière continue (300  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) après 6 jours de pénombre (100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). **(A)** Evolution des teneurs en glucides non structurés (●—● : glucides solubles totaux ; ▼—▼ : amidon). **(B)** Evolution des teneurs en glucides solubles (○—○ : saccharose ; ◆—◆ : fructanes, ▲—▲ : glucose ; ▽—▽ : fructose). Les barres d'erreurs représentent  $n = 3 \pm$  erreur standard.



**FIGURE 15.2.** La remobilisation des fructanes au sein des compartiments tissulaires du ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) quelques heures après la défoliation (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001). Les gaines de la feuille mature (à droite) et la base des feuilles en croissance, composée d'une zone de division, éloungation, différenciation (à gauche) sont épargnées par la défoliation. Après une remobilisation locale des fructanes vacuolaires dans tous les compartiments qui en possèdent, ce sont les fructanes accumulés dans les gaines qui compensent la perte de l'activité photosynthétique. Ces fructanes sont convertis en saccharose (Suc) qui est transporté dans le phloème vers les racines (orange) et la base des feuilles en croissance (à gauche) pour favoriser la production de nouvelles feuilles et la récupération de l'autotrophie au carbone par le biais de l'activité photosynthétique (vert).

pour une utilisation ultérieure par les différentes voies du métabolisme glucidique. La voie principale est catalysée par des invertases, dont la présence a été aussi démontrée dans les vacuoles et les parois cellulaires (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). Ces enzymes catalysent la dissociation directe du saccharose en glucose et fructose. La deuxième voie utilise la Saccharose Synthase (SuSy). Cette enzyme utilise de l'UDP pour produire une molécule d'UDP-glucose et une molécule de fructose à partir du saccharose (Bhowmik et al., 2006). Les hexoses ainsi produits sont ensuite phosphorylés et utilisés par de nombreuses voies métaboliques, comme source d'énergie (glycolyse) ou de squelettes carbonés nécessaires à la synthèse des biomolécules (composés structuraux comme la cellulose, l'hémicellulose, les pectines, ainsi que les acides aminés, les acides nucléiques, les composés secondaires). Les hexoses sont aussi mis en réserve sous forme d'amidon combiné ou non, selon les espèces, à d'autres formes carbonées comme les fructanes, (Sturm, 1999). **Le saccharose est donc une molécule centrale, à l'intersection des voies métaboliques du carbone chez les végétaux.**

Une étude de Cairns et al. (2002) s'est intéressée au lien entre le saccharose et l'amidon chez le ray-grass d'Italie. Des feuilles excisées ont été cultivées à faible intensité lumineuse ( $100 \mu\text{mol de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pendant 6 jours) pour les vider de leurs glucides. Puis, ces dernières ont été remises pendant 30 heures en lumière continue ( $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Un suivi des teneurs en glucides solubles et d'amidon a montré que la synthèse de l'amidon se produisait en parallèle à celle du saccharose, mais atteignait rapidement un seuil ( $7 \text{ mg g MF}^{-1}$ ) malgré l'augmentation en parallèle de la teneur en saccharose (jusqu'à  $25 \text{ mg g MF}^{-1}$ ) (Figure 15). Il est possible que la limite physique imposée par le nombre fini de chloroplastes accumulant de l'amidon puisse expliquer cette limitation et que la synthèse de l'amidon soit donc directement dépendante de la photosynthèse et non des teneurs en saccharose disponible. En parallèle, il est intéressant de noter que les teneurs en fructanes continuaient à augmenter pendant les 30 heures expérimentales. Les vacuoles semblent donc permettre l'accumulation bien plus importante de fructanes que d'amidon dans les chloroplastes.

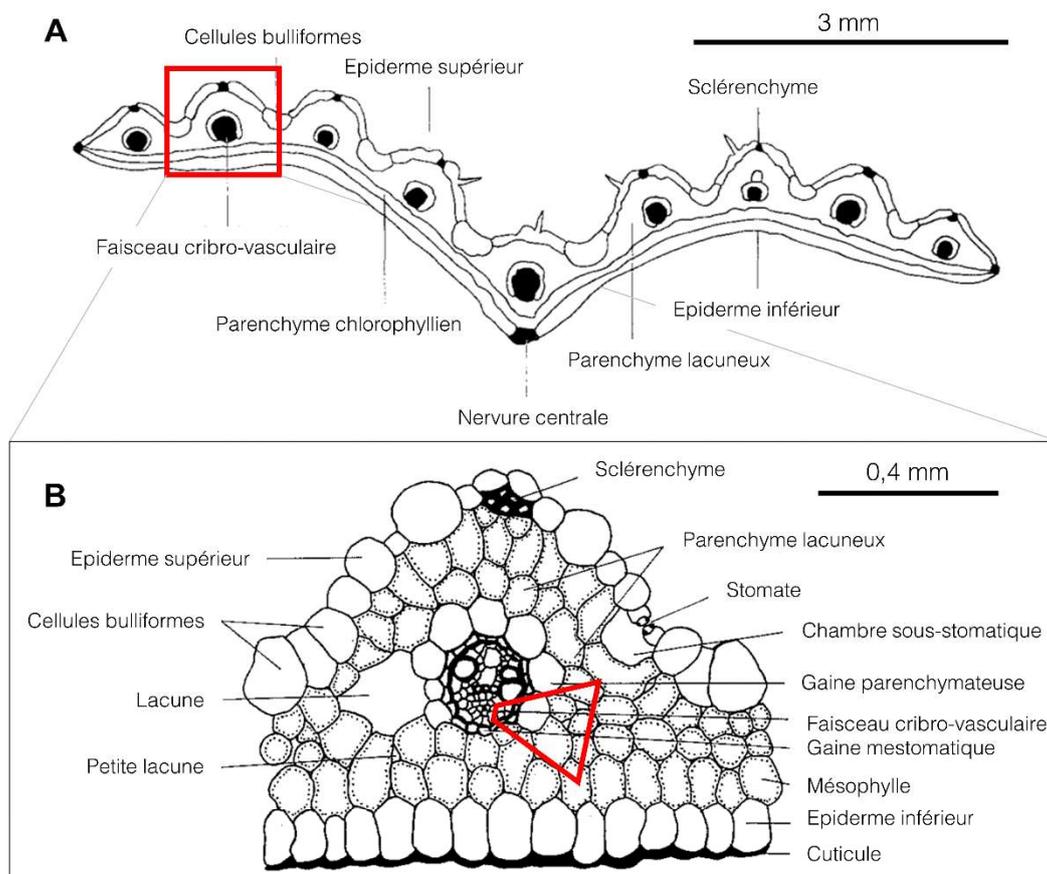
Chez les céréales et les Poacées comme le ray-grass anglais, les teneurs en fructanes sont la résultante d'un équilibre constant entre anabolisme et catabolisme (Wagner et Wiemken, 1989). Mais lors de la défoliation, 85% des fructanes accumulés dans les vacuoles des gaines et de la zone d'élongation de la base des feuilles en croissance sont rapidement (en moins de 24 heures) hydrolysés en fructose, qui est converti en saccharose pour être exporté vers les méristèmes foliaires et favoriser la refoliation (Figure 15.2) (Morvan-Bertrand et al., 1999b et 2001). Chez le ray-grass anglais, les racines sont des

**TABLEAU I.** Composition des solutés circulants dans la sève phloémienne des gaines chez le ray-grass anglais (d'après Amiard *et al.*, 2004). Le tableau présente les concentrations en acides aminés, nitrate et glucides dans la sève phloémienne qui a été collectée par stylectomie de pucerons de gaines de *Lolium perenne* L. pendant les 6 h de repousse après défoliation des limbes. Les glucides représentent 6,5 fois le carbone transporté dans le phloème par les acides aminés (AA). Les % représentent la part relative de chaque glucide au regard de l'ensemble des glucides mesurés ici dans la sève phloémienne. C<sub>sucres</sub>: carbone de sucres.

Substance collectée	Gaine intacte	Gaine après défoliation
<b>Acides aminés</b>	77	28
Aspartate (mmol L <sup>-1</sup> )	104	41
Glutamate (mmol L <sup>-1</sup> )	4	5
Sérine (mmol L <sup>-1</sup> )	57	26
Glutamine (mmol L <sup>-1</sup> )	171	45
Glycine (mmol L <sup>-1</sup> )	14	15
Thréonine (mmol L <sup>-1</sup> )	19	5
Alanine (mmol L <sup>-1</sup> )	7	2
Tyrosine (mmol L <sup>-1</sup> )	< seuil détection	1
Valine (mmol L <sup>-1</sup> )	9	4
C <sub>AA</sub> (mg C mL <sup>-1</sup> )	24,4	8,7
N <sub>AA</sub> (mg N mL <sup>-1</sup> )	8,9	3,1
<b>Glucides</b>	% Glucides totaux	
Saccharose (mmol L <sup>-1</sup> )	<b>1041</b>	<b>90,5%</b>
Glucose (mmol L <sup>-1</sup> )	63	5,5%
Fructose (mmol L <sup>-1</sup> )	17	1,5%
<i>myo</i> -inositol (mmol L <sup>-1</sup> )	29	2,5%
C <sub>sucres</sub> (mg C mL <sup>-1</sup> )	157,8	34,8

organes puits de carbone mais ne correspondent pas à des organes de stockage, si bien que à la suite d'une défoliation, ce ne sont pas elles qui alimentent les méristèmes foliaires en carbone (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999b). La remobilisation massive des fructanes dans les gaines et la zone d'élongation de la base des feuilles en croissance s'accompagne d'une diminution des activités d'anabolisme (FT et 1-SST), et une augmentation de celle du catabolisme (FEH) (Allard et Nelson, 1991 ; Lothier *et al.*, 2010 et 2014). La défoliation provoque donc un changement important du métabolisme des fructanes en faveur de leur catabolisme afin de pouvoir créer un flux de saccharose soutenu depuis les organes devenus sources (les gaines) vers les organes puits (les méristèmes foliaires) pour une refoliation efficace (Figure 15.2). Cette efficacité du ray-grass anglais vis-à-vis de l'utilisation et la remobilisation importante et rapide de ses réserves de fructanes est très probablement la raison expliquant la rapidité et l'efficacité de sa refoliation. Mais tous les organes ne disposent pas de réserves suffisamment importantes de fructanes (*e.g.* le limbe en croissance, les racines). Par définition, un **organe source** de carbone est un organe qui produit plus de carbone qu'ils n'en consomment, comme les limbes photosynthétiques le jour, et les gaines dans le cadre d'une remobilisation de leurs réserves de fructanes après défoliation (Durand *et al.*, 2018). Les **organes puits** sont à l'inverse des organes qui consomment plus de carbone qu'ils n'en produisent, comme les feuilles en croissance. **Un transport efficace du carbone remobilisé, entre les organes source de carbone et les organes puits est essentiel pour ne pas limiter la capacité de refoliation du ray-grass anglais.**

Le saccharose représente plus de 90% des glucides circulant dans le phloème, le principal tissu de conduction de la sève élaborée (Tableau I) (Amiard *et al.*, 2004). Ni les fructanes (absents), ni le fructose (jusqu'à 17 mM), ne sont véhiculés en quantités suffisantes pour égaler le saccharose qui dépasse les 1000 mM. De plus, les membranes lipidiques ainsi que l'agencement et les caractéristiques structurales des cellules (*e.g.* répartition des plasmodesmes, subérisation) constituent des obstacles que le saccharose doit surmonter pour atteindre le phloème et être ensuite transporté des organes sources vers les organes puits de carbone. **L'étude du transport du saccharose chez le ray-grass anglais semble donc essentielle pour expliquer l'excellente capacité de refoliation de la plante.**



**FIGURE 16.** Schéma de limbe de ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) (Charles-Edwards *et al.*, 1972). **(A)** coupe transversale d'une zone médiane de limbe. **(B)** coupe transversale des tissus à proximité d'un faisceau cribro-vasculaire. Les pointillés représentent les cellules possédant des chloroplastes.

## C. Transport du saccharose

### 1. Histologie des parties aériennes

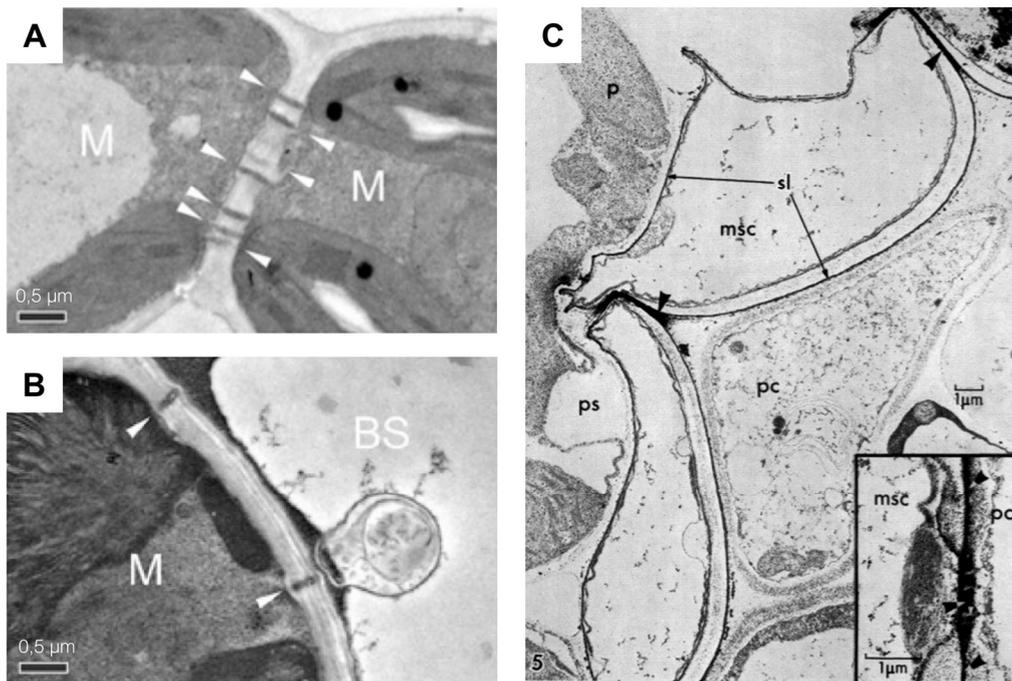
Les limbes et leurs gaines associées présentent au moins trois zones d'intérêt (Figure 16) (Charles-Edwards *et al.*, 1972) : **a)** le mésophylle, principal lieu de photosynthèse, **b)** la gaine périfasciculaire, qui entoure les faisceaux conducteurs dont **c)** le phloème, qui conduit la sève riche en saccharose vers les organes puits.

#### a) Mésophylle

La majorité des parties aériennes du ray-grass anglais est composée de parenchyme chlorophyllien appelé mésophylle (Figure 16B) (Charles-Edwards *et al.*, 1972). Les cellules de ce parenchyme forment entre elles une continuité de cytoplasmes appelée symplasma qui est permis par la présence de canaux de communications cytoplasmiques appelés plasmodesmes. Ils sont établis au travers des parois cellulaires mais leur nombre et leur diamètre d'ouverture peuvent varier (Lucas *et al.*, 2013 ; Sager *et Lee*, 2018). A l'inverse, l'apoplasme représente l'ensemble des espaces libres entre les parois cellulaires des différentes cellules. Cependant et comme chez la plupart des monocotylédones, **les faisceaux conducteurs** (xylème et phloème) **sont séparés du reste des tissus par une enveloppe de cellules aux parois épaisses appelée la gaine périfasciculaire**, (Leegood, 2008) (Figure 16B). La présence des plasmodesmes permet de faire le lien entre le mésophylle d'une part, et le phloème d'autre part, au travers de la gaine-périfasciculaire.

#### b) Gaine périfasciculaire

La gaine périfasciculaire est un double anneau de cellules aux parois plus épaisses que celles des cellules du mésophylle (Berthier *et al.*, 2014). L'anneau externe (appelé parfois « gaine parenchymateuse ») est composé de cellules photosynthétiques aux dimensions comparables à celles du mésophylle (Figure 16B). Il possède moins de plasmodesmes à l'interface entre les cellules du mésophylle et celles de ce parenchyme, comparativement aux cellules du mésophylle entre elles (Leegood, 2008). Chez une autre Poacée, le blé, le mésophylle est relié aux cellules de la gaine parenchymateuse par des plasmodesmes (Figure 17) (Leegood, 2008). L'anneau interne de cellules de la gaine périfasciculaire est appelé gaine mestomatique (Figure 16B). Les cellules sont de dimension plus réduite, sont dépourvues de chloroplastes, et ont une paroi plus épaisse en vis-à-vis des cellules du

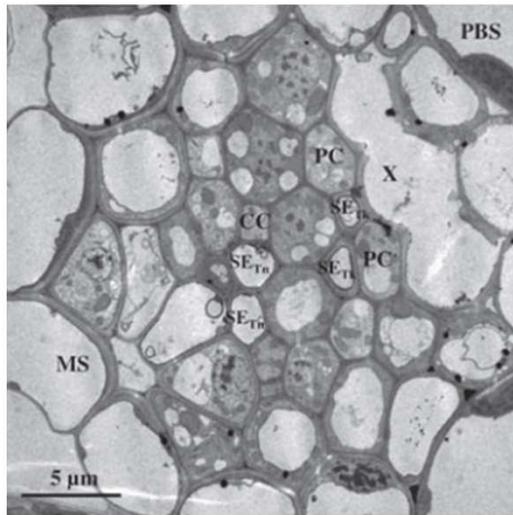


**FIGURE 17.** Micrographies électroniques de plasmodesmes chez des Monocotylédones (Danila *et al.*, 2016). **(A)** Entre cellules de mésophylle de riz (*Oryza sativa* L.); **(B)** à l'interface mésophylle-gaine périfasciculaire de riz. Les flèches blanches ou noires indiquent la position des plasmodesmes. **(C)** Gaine périfasciculaire de blé (*Triticum aestivum* L.), traitée à l'hexamine d'argent, montrant la subérisation (sl) totale des parois des cellules de gaine mestomatique (msc). ps : gaine de parenchyme, pc : cellule de parenchyme phloémien, p : plaste. Le cadre en bas à droite de l'image est un agrandissement d'une zone de plasmodesmes à la subérisation plus importante mais n'obturant pas le plasmodesme.

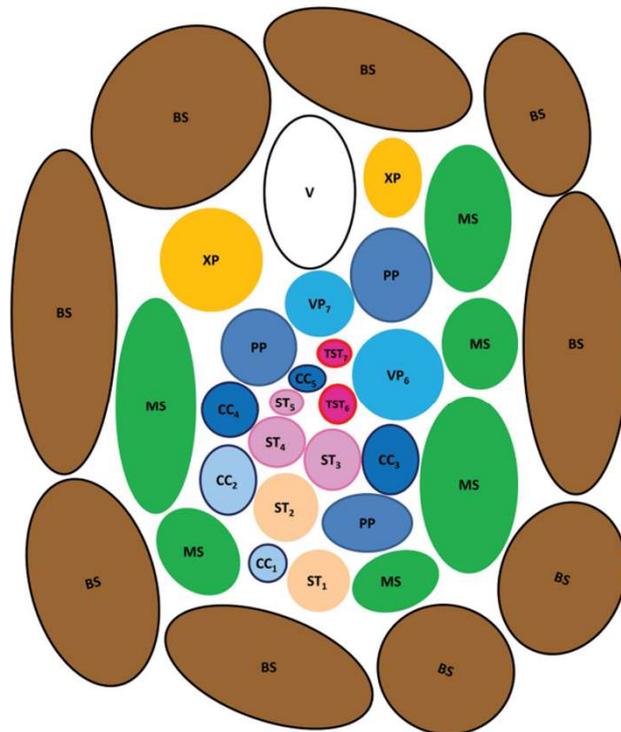
phloème (Berthier et al., 2009). De plus, dans les feuilles de nombreuses monocotylédones, les parois des cellules de la gaine mestomatique sont subérisées (Mertz et Brutnell, 2014). La subérisation est le mécanisme permettant l'imprégnation de la cellulose par de la subérine. Cette dernière représente une barrière hydrophobe qui oblige un passage de l'eau et des solutés (tel que le saccharose) par des plasmodesmes. Chez le blé, un marquage à l'hexamine d'argent, marqueur de subérisation en microscopie électronique, a démontré que les cellules de la gaine mestomatique ont des parois subérisées sur leur totalité mais qui n'interrompt pas les plasmodesmes (Figure 17C) (O'Brien et Carr, 1969). Il n'existe pas ou peu d'espace intercellulaire. L'apoplasme entre les cellules de la gaine parenchymateuse et de la gaine mestomatique est très réduit voire absent à cause de l'imperméabilité de la paroi causée par la présence de subérine (Figure 17C) (O'Brien et Carr, 1969). **Chez le ray-grass anglais, l'absence ou réduction de l'apoplasme entre les deux anneaux cellulaires de la gaine périfasciculaire et la présence d'une subérisation qui semble probable contribuerait à l'idée que la gaine périfasciculaire représente une barrière rendant très difficile un passage non contrôlé de solutés par l'apoplasme et un retour depuis la gaine mestomatique vers le mésophylle.** Des plasmodesmes existent cependant à l'interface entre les cellules de la gaine mestomatique et les premières cellules de parenchyme phloémien.

### c) Phloème

Le phloème est un tissu spécialisé constitué de cellules non conductrices de sève (cellules de parenchyme phloémien) et des cellules conductrices (cellules compagnes et tubes criblés) (Figure 18 et 19) (Berthier et al., 2009 ; Braun et al., 2014). Deux grands types de tubes criblés ont été identifiés dans le phloème. Le phloème présente en effet d'une part un à deux tubes criblés aux parois épaisses (*Thick-walled Sieve Elements*, SE<sub>tk</sub>) (Botha, 2013). Ils sont localisés à proximité du xylème et sont reliés par quelques rares plasmodesmes aux cellules de parenchyme phloémien proches. D'autre part, il existe des tubes criblés qui possèdent des parois fines (*Thin-walled Sieve Elements*, SE<sub>tn</sub>) (Figure 18 et 19). Ils s'empilent les uns sur les autres dans le sens longitudinal et forment ainsi les faisceaux du phloème qui permettent le transport de sève élaborée vers les organes puits. La différence d'épaisseur des parois entre SE<sub>tk</sub> et SE<sub>tn</sub> pourrait s'expliquer par une fonction différente de ces cellules. Par l'exposition de feuilles de maïs à du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, Fritz et al. (1983) ont démontré que ce sont les SE<sub>tn</sub> qui accumulaient le plus de marquage et **seraient les tubes criblés impliqués dans le transport de sève chez les monocotylédones.** Les tubes



**FIGURE 18.** Micrographie d'un faisceau cribro-vasculaire de ray-grass anglais en coupe transversale de limbe (Berthier *et al.*, 2009). Légende : CC, cellule compagne; MS, gaine mestomatique; PBS, gaine parenchymateuse; PC, cellule de parenchyme phloémien; Tn, tubes criblés aux parois fines; X, vaisseaux du xylème.



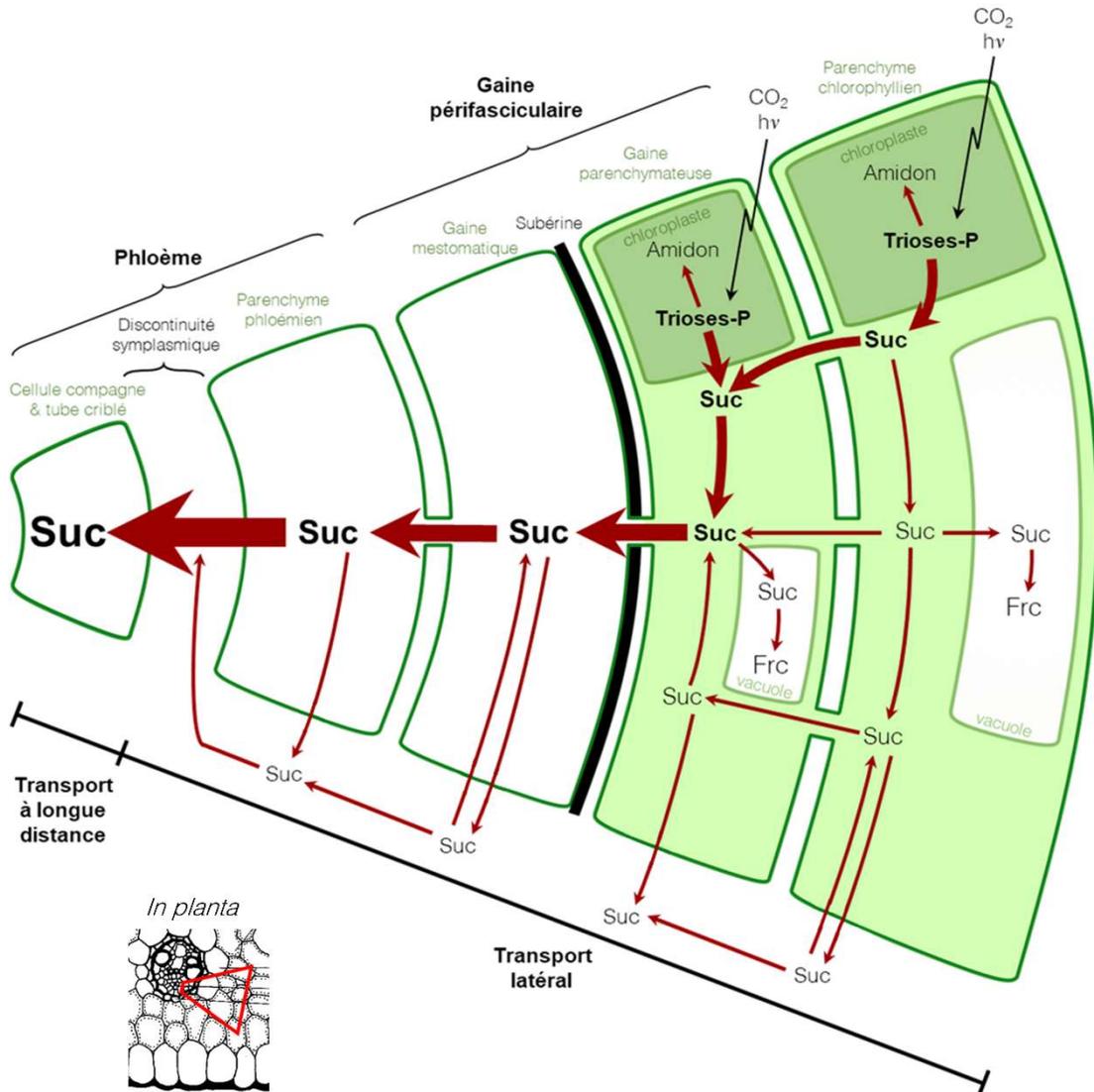
**FIGURE 19.** Schéma d'un faisceau conducteur de riz (*Oryza sativa*, L.) (Braun *et al.*, 2014 d'après Kaneko *et al.*, 1980). La gaine périfasciculaire (Bundle Sheath; BS) entoure les faisceaux. Les vaisseaux du xylème (V) sont entourés de cellules de parenchyme xylémien (XP). La gaine mestomatique (MS) est positionnée de façon interne aux cellules de la BS, adjacente au xylème et phloème. CC : cellules compagnes, ST : tubes criblés aux parois fines, PP : cellules de parenchyme phloémien, VP : cellules compagnes de protophloème, TST : tubes criblés aux parois épaissies.

criblés sont des cellules viables mais énucléées et au cytoplasme possédant une diversité d'organites très réduits. Ils sont reliés (par des plasmodesmes) non seulement aux cellules de parenchyme phloémien voisines, mais également aux cellules compagnes (Oparka et Turgeon, 1999). Seuls les SE<sub>tn</sub> forment en effet ces complexes SE-CC (*Sieve Elements – Cellules Compagnes*) (Evert et al., 1996) ce qui permet aux cellules compagnes d'approvisionner les tubes criblés en nutriments et saccharose par le biais des plasmodesmes. Pour transporter le saccharose en provenance de la gaine-périfasciculaire, il semblerait que les cellules de parenchyme phloémien soient reliées par des plasmodesmes à celles de la gaine mestomatique. **Cependant, il est certain qu'une discontinuité symplasmique se produit ensuite entre la cellule de parenchyme phloémien et la cellule compagne avec une absence totale de plasmodesmes** (Berthier et al., 2014).

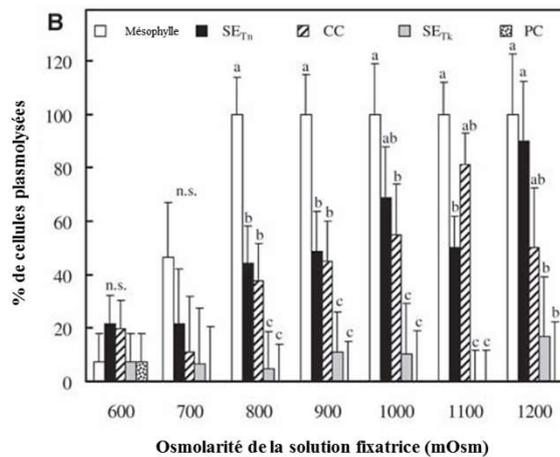
Malgré ces problématiques de diversité structurelles et fonctionnelles des cellules retrouvées au sein des organes de la plante, un transport efficace du saccharose est nécessaire pour permettre un approvisionnement et une mobilisation efficace du carbone vers les organes puits lorsque cela est nécessaire. En tenant compte de cette diversité, le mécanisme de transport du saccharose d'un organe source vers un organe puits a été défini en plusieurs étapes : **i)** transport latéral, **ii)** chargement direct du phloème, **iii)** transport à longue distance et **iv)** déchargement du phloème.

## 2. Transport latéral du saccharose

Le transport latéral correspond au transport de saccharose à moyenne distance, généralement sur quelques millimètres (Le Hir, 2020) et entre cellules (Aubry et al., 2019). Dans les organes sources photosynthétiques, cette étape correspond typiquement au transport du saccharose, depuis les cellules du mésophylle jusqu'aux cellules de parenchyme phloémien. La présence de plasmodesmes jusqu'aux cellules de parenchyme phloémien lorsque le saccharose se trouve dans le cytoplasme permettrait **le transport simple et majoritaire de ce soluté par voie symplasmique jusqu'au phloème**, comme cela est le cas chez les arbres (Zhang et al., 2014). Certaines familles végétales comme les Cucurbitacées, Onagracées et Oléacées, possèdent un transport latéral amélioré par la conversion du saccharose en stachyose et raffinose, deux molécules de plus haut poids moléculaire, dans des cellules du phloème appelées cellules intermédiaires et qui ressemblent à des cellules compagnes (Comtet et al., 2017). Cette conversion permet d'empêcher un retour en arrière des glucides par les plasmodesmes. Ce mécanisme appelé « **polymer trapping** » permettrait également d'améliorer le gradient de saccharose au sein



**FIGURE 20.** Schématisation de l'organisation des compartiments tissulaires et des flux de saccharose d'un limbe de ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), du mésophylle au phloème. Le gradient vert représente la présence de chloroplastes, qui ne sont retrouvés que dans le mésophylle et la gaine parenchymateuse. Une couche hydrophobe de subérine sépare la gaine mestomatique de la gaine parenchymateuse. L'épaisseur des flèches représente une estimation de l'importance du flux de saccharose.



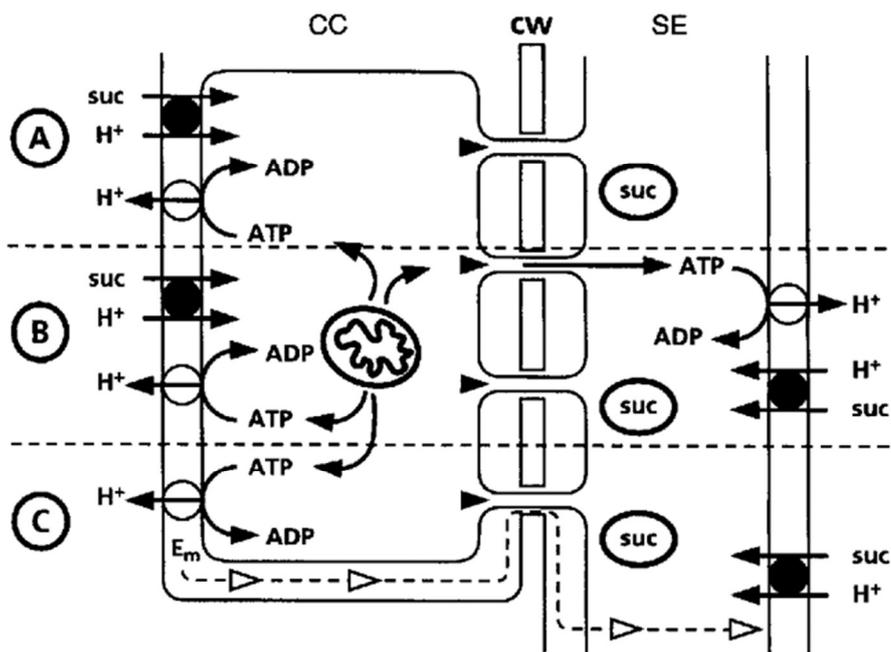
**FIGURE 21.** Pourcentage de cellules plasmolysées selon différentes osmolarités (Berthier *et al.*, 2009). Légende : CC, cellule compagne; SE<sub>Tk</sub> : tubes criblés aux parois épaisses, SE<sub>Tn</sub> : tubes criblés aux parois fines, PC : cellule de parenchyme phloémien. Les lettres indiquent l'appartenance à différents groupes de mesures statistiquement différents à une marge d'erreur de 5% (ANOVA). Les cellules ont été soumises à un traitement de sorbitol.

de la feuille pour augmenter le flux du saccharose vers le phloème, ce qui diminue son accumulation dans le tissu source de carbone.

**Cependant, chez les Poacées, il existe souvent une discontinuité symplasmique entre les cellules de parenchyme phloémien et les cellules compagnes** qui rend impossible un transport latéral exclusivement symplasmique (Figure 20) (Braun et al., 2014 ; Zhang et Turgeon, 2018). Le saccharose est une molécule très hydrosoluble mais qui n'est pas capable d'une diffusion rapide au travers des membranes comme le tonoplaste ou le plasmalemma. De plus, la concentration en saccharose est très élevée dans le phloème si bien qu'un gradient de concentration est défavorable au transport du saccharose vers le phloème (Zhang et Turgeon, 2018). Pour permettre le transport latéral du saccharose vers les cellules du phloème, la plante fait alors appel à des perméases spécialisées, permettant un transport facilité ou actif du saccharose de part et d'autre des membranes. Il est suggéré que des facilitateurs permettent d'abord l'efflux du saccharose dans l'apoplasme en suivant le gradient de concentration (Figure 20) (Chen et al., 2010). Puis, des transporteurs actifs permettent l'importation du saccharose dans le symplasme des cellules proches du phloème pour accumuler le saccharose à une forte concentration (Figure 20). **Le saccharose peut donc emprunter une voie apoplasmique** exclusivement, ou en parallèle à une voie symplasmique, si elle existe, pour rejoindre le phloème (Figure 20).

Chez le ray-grass anglais, grâce à un suivi de la plasmolyse des différents types cellulaires (de mésophylle, de parenchyme phloémien, des cellules compagnes, et des deux types de tubes criblés ;  $SE_{tn}$  et  $SE_{tk}$ ) selon un gradient de sorbitol allant de 400 à 1200 mOsm, il a été démontré que l'osmolarité induisant 100% de cellules plasmolysées est plus faible pour le mésophylle (800 mOsm) que pour les  $SE_{tn}$  (90% à 1200 mOsm) (Figure 21) (Berthier et al., 2009). De ce fait, il existe un fort écart de pression osmotique entre le mésophylle comparé aux les tubes criblés qui pourrait être expliqué par une concentration en saccharose plus forte dans les tubes criblés. Or le saccharose est le glucide majoritaire transporté par le phloème (plus de 90% des glucides circulants à des concentrations pouvant atteindre 1000 mM) (Amiard et al., 2004). Le gradient de concentration de saccharose existant entre les cellules du mésophylle (productrices de saccharose) jusqu'au phloème (où il est chargé activement et à forte concentration) n'est pas favorable à une voie symplasmique exclusive car il faudrait que la concentration phloémienne soit inférieure à celle du mésophylle.

La gaine périfasciculaire, qui sépare le mésophylle du phloème, pourrait revêtir par sa présence un rôle essentiel dans le transport latéral du saccharose chez le ray-grass anglais. **Pour permettre l'accumulation du saccharose aux abords du complexe SE-CC, la**

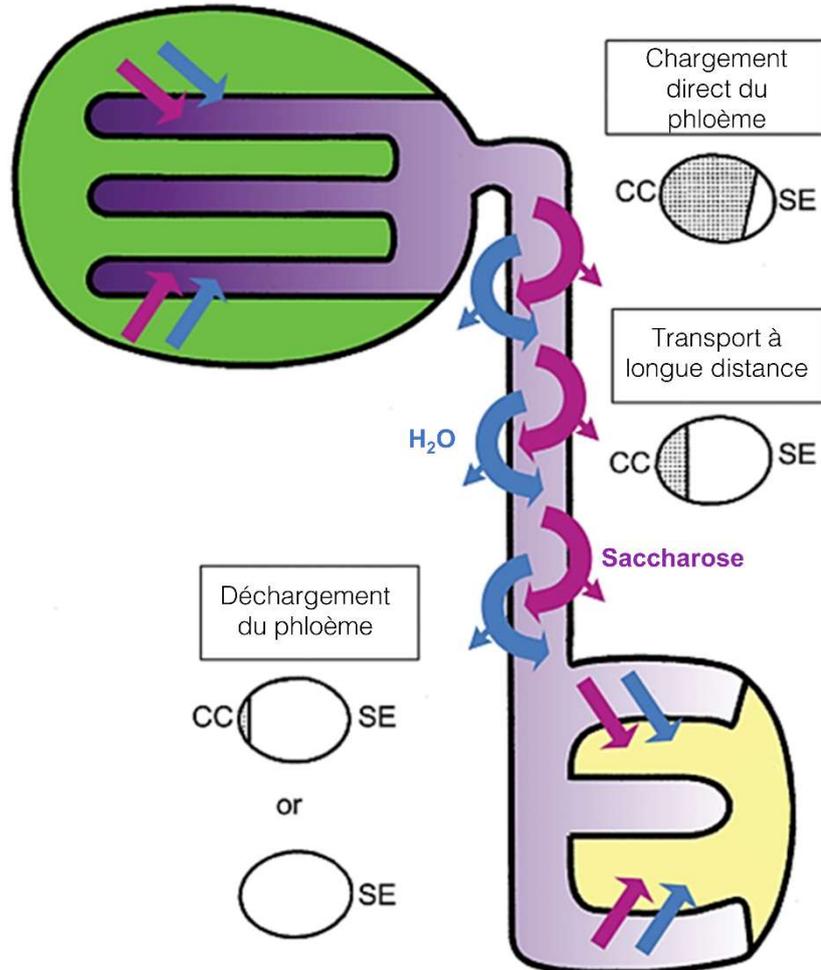


**FIGURE 22.** Rôle central des cellules compagnes et mécanismes du chargement direct du phloème en saccharose (Van Bel, 1996). Il existe trois moyens permettant de concentrer le saccharose dans le tube criblé (SE) : **(A)** le saccharose est importé par des transporteurs actifs dans la cellule compagne (CC) et transféré par les plasmodesmes dans le tube criblé, **(B)** l'ATP produit par les mitochondries de la cellule compagne est transférée par les plasmodesmes dans le tube criblé permettant l'activation de transporteurs actifs et le chargement direct du saccharose dans le tube criblé, **(C)** les pompes à protons génèrent un potentiel électrogénique ( $E_m$ ) qui se propage dans la membrane des cellules compagnes jusqu'à celle du tube criblé pour activer des transporteurs actifs. Suc : saccharose. H<sup>+</sup> : protons.

**plante recourt à des transporteurs actifs de saccharose** (qui seront détaillés dans le prochain chapitre) qui ont été localisés sur le plasmalemme des cellules de la gaine périfasciculaire et des cellules compagnes (Berthier *et al.*, 2014). Ces protéines permettent à l'interface mésophylle-gaine périfasciculaire de concentrer le saccharose apoplasmique dans le cytoplasme des cellules de la gaine périfasciculaire et possiblement dans leurs larges vacuoles. Le saccharose doit alors forcément transiter par les plasmodesmes pour atteindre les cellules de la gaine mestomatique, adjacente et plus interne, à cause de la couche de subérine qui empêche une traversée apoplasmique. Si le saccharose venait à refluer dans l'apoplasme du côté de la gaine parenchymateuse, **la présence des transporteurs actifs permettrait aussi son rapatriement et réduirait ainsi la possibilité de son reflux**, qui ne serait pas efficient pour la plante. D'autre part, la présence supposée de perméases à la membrane des cellules de parenchyme phloémien et des transporteurs actifs de saccharose sur le plasmalemme des cellules compagnes produirait un flux important et continu de saccharose vers les cellules compagnes, ce qui provoquerait consécutivement en amont, un flux symplasmique de saccharose de la gaine mestomatique vers les cellules du parenchyme phloémien, et ainsi de suite (Figure 20) (Braun *et al.*, 2014 ; Lucas *et al.*, 2013).

### 3. Chargement direct du saccharose dans le phloème

Le chargement direct du phloème désigne l'étape qui correspond à l'entrée du saccharose dans la cellule compagne. Cependant, il n'existe pas de plasmodesmes entre les cellules du parenchyme phloémien et les cellules compagnes et, *a fortiori* les éléments de sève SE<sub>tk</sub> et SE<sub>tn</sub> (Braun *et al.*, 2014). Le saccharose doit donc transiter par l'apoplasme avant d'être importé dans le cytoplasme des cellules compagnes. Le passage des membranes fait appel aux mêmes protéines qu'évoquées pour le transport latéral au niveau de la gaine périfasciculaire (Figure 22) (Van Bel, 1996). Après une diffusion facilitée au travers des parois cellulaires par le biais de perméases, **le saccharose est chargé activement dans le cytoplasme des cellules compagnes par le biais des transporteurs actifs** (Figure 22). Il peut alors atteindre les tubes criblés par le biais des plasmodesmes nombreux qui les relient aux cellules compagnes, sans possibilité pour le saccharose de refluer directement vers les cellules du parenchyme phloémien ou de la gaine mestomatique à cause de l'absence de plasmodesmes. L'enchaînement longitudinal des tubes criblés forme un symplasma continu (qui sera désigné sous le terme de « vaisseau du phloème ») grâce



**FIGURE 23.** Schématisation du modèle de flux de masse de Münch (De Schepper *et al.*, 2013). Les flèches violettes représentent le flux de saccharose et les flèches bleues le flux d'eau. La proportion relative de cellules compagnes (CC) et tubes criblés (SE) dans chacun des compartiment du phloème. Le saccharose est transporté par le phloème avec un efflux possible le long de l'axe phloémien. La concentration en saccharose qui génère la pression osmotique est contrôlée par les mécanismes d'exportation/importation du saccharose dans les complexes cellules compagnes-tubes criblés. Dans les sources, l'import de saccharose dans le phloème domine. Les symboles ovales représentent la proportion de cellules compagnes en relatif à celle des tubes criblés. L'abondance de cellules compagnes est associée à un chargement du phloème en saccharose plus important.

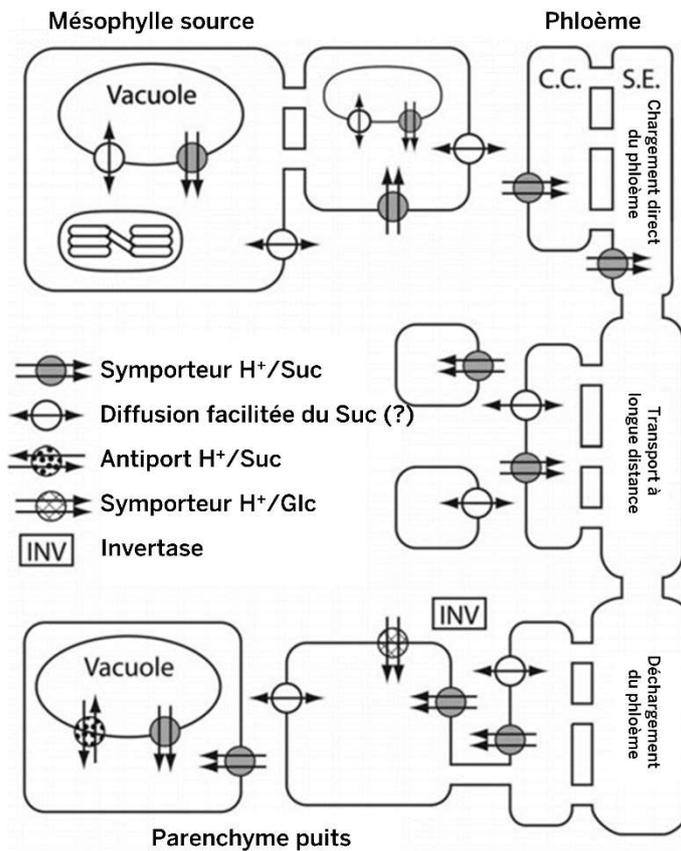
aux cribles qui sont présents à l'interface entre chaque tube et qui permet le transport à longue distance du saccharose vers les organes puits.

#### 4. Transport à longue distance du saccharose

Le chargement direct et actif du phloème en saccharose génère une concentration très élevée dans les tubes criblés au niveau des organes sources (jusqu'à 1000 mM ; [Amiard et al., 2004](#)). Par conséquent, la forte pression osmotique qui en résulte crée un appel d'eau depuis le xylème situé à proximité. A l'inverse, la pression osmotique est plus faible dans les organes puits car le saccharose est déchargé du phloème, pour être utilisé par les cellules. **Ce sont ces différences de concentrations en saccharose et de pressions osmotiques locales qui seraient à l'origine de la génération du flux d'eau et de solutés appelé flux de masse** ([Figure 23](#)) ([Münch, 1930](#) ; [De Schepper et al., 2013](#)). La concentration en saccharose forme alors un gradient décroissant depuis les organes sources jusqu'aux organes puits. L'amplitude du flux de masse dépendrait directement de la production de saccharose dans les sources d'une part, et de la consommation de saccharose dans les organes puits d'autre part. La distance du puits par rapport à la source est également importante dans la génération du flux de masse. En effet, un puits en amont d'un autre puits va nécessairement prélever une partie du saccharose transporté et réduire le flux de masse restant vers le puits le plus éloigné. En prenant en compte la consommation en saccharose et la distance, il est possible de définir l'idée d'une « force puits », variable, qui permettrait d'orienter la direction du flux de masse et l'approvisionnement en saccharose en privilégiant les organes dont la force puits est plus grande ([Ayre, 2011](#)). Le saccharose atteint alors le ou les organes puits, où il doit nécessairement pouvoir être déchargé dans le tissu.

#### 5. Déchargement du phloème

Il existerait deux voies possibles pour le déchargement du saccharose phloémien dans les organes puits de carbone chez les monocotylédones ([Carpaneto et al., 2005](#) ; [Lemoine et al., 2013](#)). L'une des voies de déchargement pourrait être symplasmique, à condition que des plasmodesmes soient présents ([Patrick, 2013](#)). En effet, les cellules hétérotrophes des organes puits de carbone utilisent ou convertissent le saccharose en continu, si bien que le gradient de concentration serait favorable à un efflux du saccharose du vaisseau du phloème jusqu'au parenchyme. Mais une voie apoplasmique peut également exister,



**FIGURE 24.** Diagramme du transport du saccharose (Ayre, 2011). **Partie haute :** dans les cellules de mésophylle, l'influx et l'efflux sont dirigés par les gradients de concentration caractéristiques de la diffusion facilitée et la présence de symporteurs saccharose/ $H^+$  implique un efflux actif. Les efflux au travers de la membrane plasmique se produisent par un mécanisme inconnu et la récupération du saccharose par les SUTs pourrait être un phénomène généralisé ; l'efflux pourrait être supérieur à proximité du complexe cellule compagne/tube criblé. Le chargement du phloème en saccharose dans l'organe source est catalysé par les SUTs. **Partie médiane :** le saccharose est relâché du phloème pour entrer dans des réserves transitoires et approvisionner les tissus environnants. Le saccharose mobilisé des réserves transitoires est très probablement retourné vers le phloème par les mêmes SUTs impliqués dans le chargement direct du phloème. **Partie basse :** le saccharose et les autres nutriments sont déchargés de façon symplasmique au travers des plasmodesmes ou de façon transmembranaire dans l'apoplasme. Le saccharose apoplasmique est récupéré dans les cellules dans le besoin directement par les SUTs ou est hydrolysé par les invertases pariétales et récupéré par des transporteurs d'hexoses. L'accumulation de saccharose dans les vacuoles semble être catalysé par l'antiport de saccharose/ $H^+$  et le symport sur le tonoplaste implique la présence d'efflux actif depuis les vacuoles. Suc : saccharose. Glc : glucose.

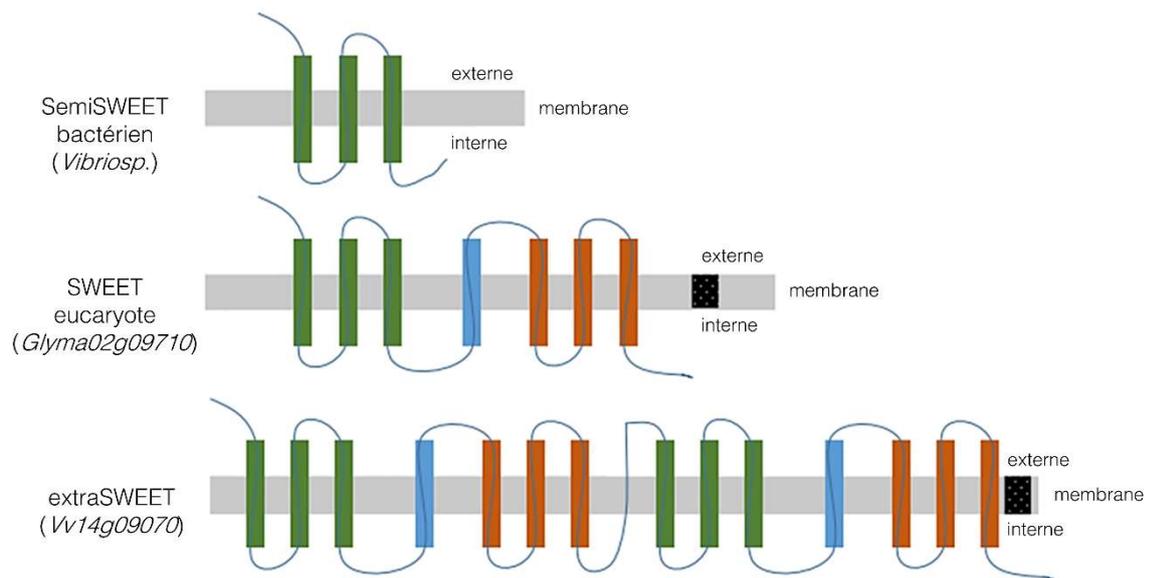
exclusive ou en parallèle à la voie symplasmique (Grof et al., 2014) s'il n'existe pas de plasmodesmes à l'interface avec les cellules compagnes. Un déchargement exclusif de type apoplasmique en l'absence de plasmodesmes nécessiterait alors la présence de facilitateurs puis de transporteurs actifs de saccharose pour l'importation de ce dernier dans le cytoplasme des cellules. Une régulation positive de ces derniers en parallèle à une voie symplasmique pourrait aussi permettre d'accélérer plus encore le déchargement du saccharose en accélérant l'efflux de ce dernier. Le saccharose peut alors être métabolisé ou converti en composés de réserve (Figure 24) (Ayre, 2011).

Dans les organes puits du ray-grass anglais, comme les gaines et la base des feuilles en croissance, les faisceaux conducteurs sont entourés par une gaine périfasciculaire qui doit être identique à celle des limbes matures (limbe et gaine formant la feuille ; Berthier et al., 2014). La présence de plasmodesmes à l'interface entre les cellules compagnes et les cellules de parenchyme phloémien, qui permettrait un déchargement direct du saccharose par la voie symplasmique, n'est cependant pas connue. Cependant, la présence d'une voie apoplasmique est très probable, car une régulation positive de l'expression transcriptionnelle d'un transporteur actif de saccharose, positionné au niveau des membranes des cellules de la gaine périfasciculaire et du mésophylle, a été démontrée en réponse à la défoliation des limbes. Les auteurs suggèrent que cette régulation permettrait une augmentation de l'importation du saccharose dans la base des feuilles en croissance pour favoriser la refoliation (Berthier et al., 2014).

L'état des connaissances sur les différentes étapes du transport du saccharose chez le ray-grass anglais met ainsi en évidence la nécessité d'un passage apoplasmique du saccharose, plus particulièrement **1)** pour le chargement direct du phloème, et **2)** le déchargement du saccharose dans le tissu puits. La quasi-totalité des étapes du transport du saccharose sont totalement dépendantes - ou peuvent être accélérées par la présence de perméases et de transporteurs actifs. Pour aller plus loin dans la compréhension du transport du saccharose et son optimisation chez le ray-grass anglais, il est donc nécessaire de détailler les caractéristiques de ces protéines.

#### **D. Protéines transmembranaires de transport du saccharose**

Il existe deux familles de protéines transmembranaires clés impliquées dans le transport du saccharose : **1) les perméases SWEETs** (*Sugar Will Eventually Efflux Transporters*) et **2) les SUTs** (transporteurs de saccharose - *SUCrose Transporters* aussi appelés *SUCrose Carriers*, SUCs chez *Arabidopsis thaliana* L.).



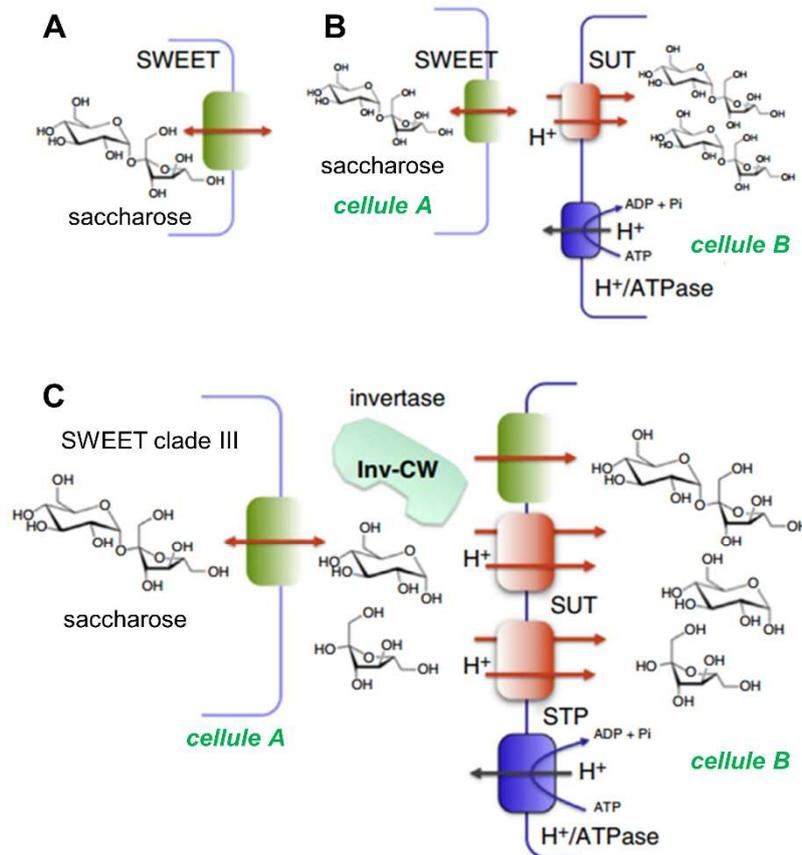
**FIGURE 25.** Architecture des domaines conservés des protéines SWEETs (Patil *et al.*, 2015). Les protéines SWEETs sont classées en 3 types majeurs selon leur nombre de tri-domaines transmembranaires. Les protéines avec un seul tri-domaine sont classées comme semi-SWEETs. Les gènes des protéines avec deux tri-domaines (7 hélices  $\alpha$ ) sont classées comme des SWEETs. Les gènes des protéines avec quatre tri-domaines ont été nommés *extraSWEETs*. Les boîtes noires montrent les domaines de protéine associée qui peuvent être N-terminal ou C-terminal. La figure n'est pas à l'échelle.

## 1. Transporteurs SWEETs

Chez les végétaux, les SWEETs sont des uniports à 7 (SWEETs) ou 14 domaines (extraSWEETs) transmembranaires (Jeena et al., 2018) (Figure 25 ; Patil et al., 2015) dont l'existence a été mise en évidence par Chen et al., 2010. La plupart des monocotylédones possèderaient environ 20 gènes paralogues de SWEETs (Jeena et al., 2018) (21 gènes potentiels chez l'orge et chez le sorgho (*Sorghum bicolor*, L.), 24 gènes chez le maïs ; Patil et al., 2015). Ils ont été localisés sur le plasmalemme, mais aussi sur le tonoplaste ou la membrane de l'appareil de Golgi (Kryvoruchko et al. 2016 ; Chardon et al., 2013 ; Chen et al., 2015). Ils permettent le transport passif par diffusion facilitée de glucides (hexoses et/ou disaccharides, dont le saccharose) dans le sens de l'importation ou l'efflux (pour la même protéine mais à des vitesses différentes, ou uniquement l'un ou l'autre, selon la famille SWEET considérée). Le transport est de faible affinité puisque les SWEETs possèdent une  $K_m$  supérieure à 10 mM, et jusqu'à 70 mM chez *A. thaliana* par exemple avec des essais d'absorption de saccharose radiomarqué en ovocytes de Xénope (Chen et al., 2012). Ils sont donc dépendants de la concentration et du gradient de saccharose entre compartiments, car ils nécessitent par définition une concentration importante de glucides pour commencer à générer une activité de transport équivalente à plus de 50% de leur vitesse de transport maximale. Chez le riz et *A. thaliana*, Chen et al., 2012 ont mis en évidence la présence de protéines SWEET (respectivement OsSWEET11 et OsSWEET14 ; AtSWEET11, et AtSWEET12) localisées au niveau du phloème (et plus précisément dans les cellules du parenchyme phloémien chez *A. thaliana*). L'hypothèse était que ces SWEETs étaient les perméases permettant l'efflux du saccharose dans l'apoplasme à l'interface des cellules du parenchyme phloémien et des cellules compagnes, pour l'étape clé de chargement direct du saccharose dans le phloème. Pour tester cette hypothèse, une analyse de doubles mutants *atsweet11; 12* a été réalisée. Les résultats ont montré des plantes qui présentaient une accumulation de glucides dans les feuilles, des chloroses et une croissance réduite de la plante (Figure 26) (Chen et al., 2012). Or, en conditions physiologiques, l'apoplasme ne possède pas une concentration en saccharose élevée (< 3 mM, Lohaus et al., 2001). La photosynthèse qui a lieu dans les cellules sources permet un approvisionnement en continu en saccharose cytoplasmique qui augmente la différence de concentration entre le symplasme et l'apoplasme et génère ainsi un gradient favorable à un efflux passif vers l'apoplasme. Dans cette expérimentation, l'absence de SWEETs chez les mutants a produit un phénotype où le transport à longue distance du saccharose semblait inhibé. **Il est donc supposé que les SWEETs permettraient l'efflux du saccharose du cytoplasme vers l'apoplasme, avec un rôle-clé pour permettre l'étape finale du**



**FIGURE 26.** Caractérisation phénotypique de mutants *atsweet11* et *atsweet12* chez *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2012). **(A)** Réduction de la croissance du double mutant *atsweet11;12* par rapport à la lignée sauvage et isogénique Col-0 (contrôle). **(B et C)** Accumulation d'amidon plus élevée dans les simples et doubles mutants *atsweet11;12* à la fin de la période de lumière et d'obscurité (en condition de forte intensité lumineuse).



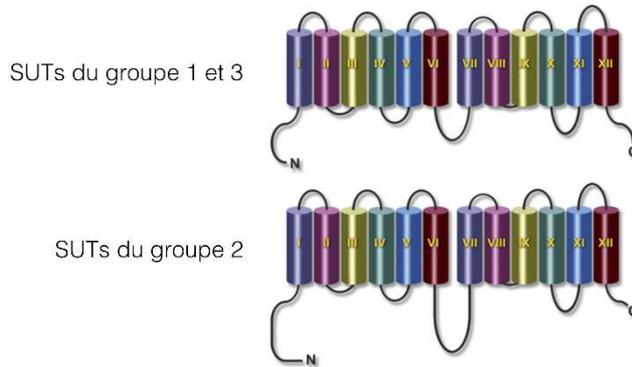
**FIGURE 27.** Les SWEETs pour l'efflux de sucres (Eom *et al.*, 2015). **(A)** Les sucres peuvent être exportés des cellules, comme par exemple le nectar, par les SWEETs. **(B)** Les SWEETs pour l'efflux du saccharose depuis le parenchyme phloémien pour le chargement de ce dernier dans le phloème. La cellule A exporte le saccharose dans l'apoplasme, qui est consécutivement chargé (contre son gradient de concentration) dans le complexe cellule compagne/tube criblé (cellule B) grâce à un SUT tirant son énergie d' $H^+$ /ATPase. **(C)** Les SWEETs pour l'efflux du saccharose de l'enveloppe de la graine pour approvisionner l'endosperme en développement et l'embryon. Le saccharose exporté de la cellule A est soit importé par les SUTs ou SWEETs dans la cellule B, soit après hydrolyse par des invertases pariétales (Inv-CW) importés grâce à des SWEETs du clade I/II ou par des transporteurs d'hexoses, par exemple la famille STP de symporteurs d'hexoses/ $H^+$ . Note : le transport monodirectionnel des SWEETs n'a pas été formellement démontré.

**chargement direct du phloème dans les organes sources** (Figure 27) (Eom et al., 2015). De plus, dans les organes puits, ils pourraient aussi jouer un rôle non négligeable dans le déchargement du saccharose puisque la concentration phloémienne est bien supérieure (jusqu'à 1000 mM) aux  $K_m$  moyen des SWEETs (10 – 70 mM). Le gradient de saccharose est également favorable au déchargement puisque les concentrations des cellules non-photosynthétiques de parenchyme qui entourent le phloème sont nécessairement plus faibles par la métabolisation ou conversion du saccharose en réserves carbonées (Figure 27). **Les SWEETs pourraient ainsi jouer un rôle clé dans l'efflux passif du saccharose au cours du déchargement du phloème.** Dans les puits, Ruan et al., 2010 proposent cependant en parallèle l'existence possible d'invertases pariétales (*Cell Wall Invertases* ; CWINV) qui pourraient dégrader le saccharose en glucose et fructose. La diminution de la concentration en saccharose dans l'apoplasme pourrait alors augmenter l'intensité du gradient de saccharose entre le phloème et les tissus alentours pour favoriser d'autant plus un flux de masse en direction du puits. De plus, les hexoses produits pourraient eux aussi être importés dans le symplasme par des transporteurs spécifiques ou par l'action d'autres transporteurs d'hexoses membranaires (McCurdy et al., 2010), ce qui accélérerait d'autant plus l'étape de déchargement du saccharose dans les organes puits.

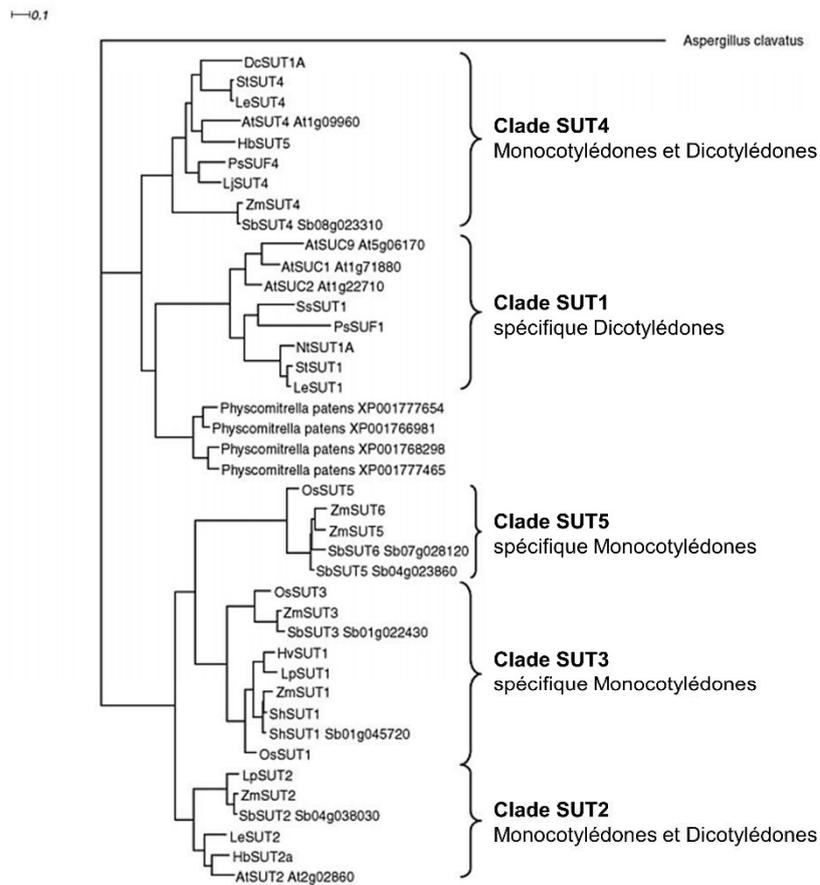
**Il n'existe aucun gène SWEET identifié chez le ray-grass anglais à ce jour.** Il est fortement envisagé que des LpSWEETs soient présents à chaque étape qui nécessite le passage transmembranaire du saccharose vers l'apoplasme en suivant le gradient de concentration. Par exemple, au niveau du tonoplaste, où ils pourraient permettre la diffusion passive d'hexoses ou de saccharose remobilisés de la vacuole ou produits à partir des fructanes, vers le cytoplasme. Cependant, **leur nature de transporteurs passifs les rend difficilement éligibles comme acteurs forts de régulation du transport du saccharose chez les végétaux car leur activité est trop dépendante du gradient de concentration, qui lui-même est la résultante de multiples autres facteurs traduisant une modification des relations sources-puits vis-à-vis du carbone** (e.g. photosynthèse, anabolisme, catabolisme, conversions, transport). **C'est donc l'étude de transporteurs actifs, les SUTs, qui a été privilégiée dans le cadre de ce travail doctoral.**

## 2. Transporteurs de saccharose (SUTs)

La seconde famille de transporteurs susceptibles d'assurer le transport du saccharose appartient à la superfamille des facilitateurs majeurs ou MFS. Les protéines de cette superfamille seraient le produit d'une triplication d'un motif de 2 domaines transmembranaires en épingle à cheveux, suivie d'une duplication de ces 6 domaines pour



**FIGURE 28.** Modèle en deux dimensions des transporteurs de saccharose du groupe 1 à 3 (d'après Sauer, 2007). Le premier modèle montre la structure des SUTs du groupe 1 et 3 (d'après la classification de Kühn et Grof, 2010). Le deuxième modèle montre la structure prédite des SUTs du groupe 2. Les extrémités N et C sont cytoplasmiques pour les transporteurs plasmalemmiques. Les hélices sont montrées avec des couleurs différentes qui soulignent la présence de domaines conservés.



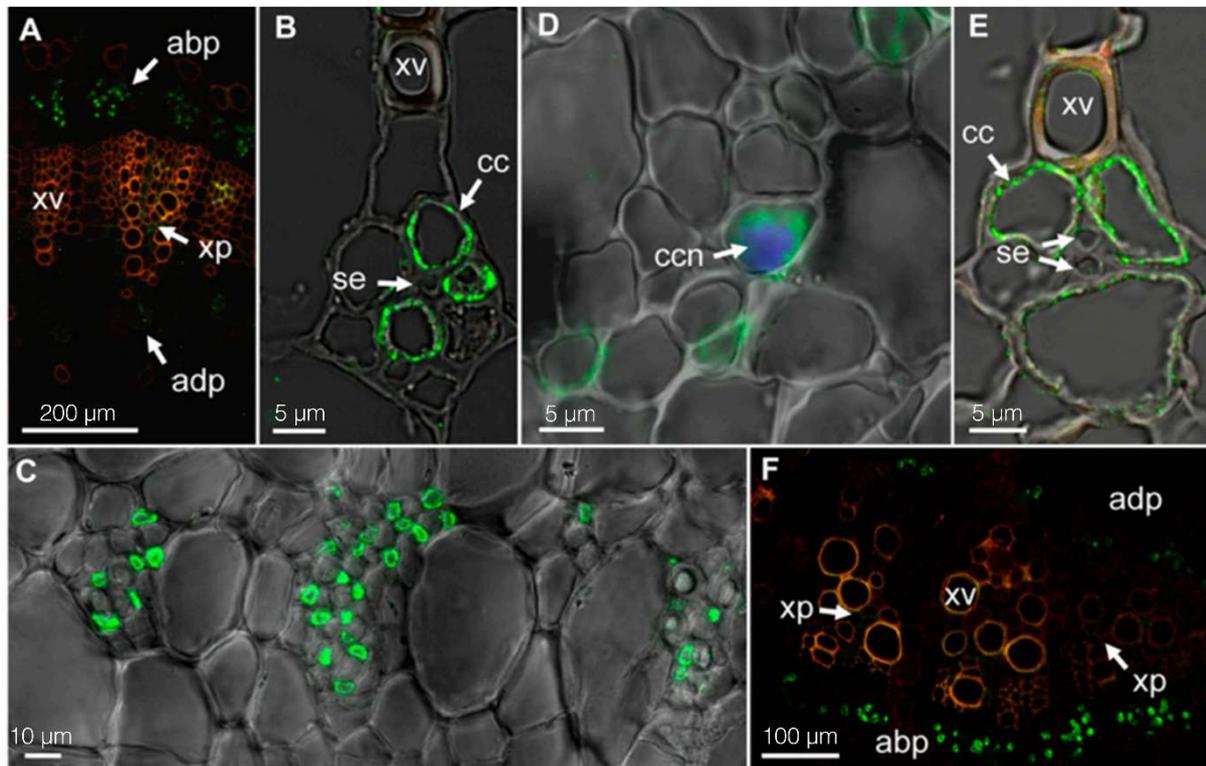
**FIGURE 29.** Arbre phylogénétique représentant les transporteurs de saccharose de Monocotylédones, Dicotylédones, mousses et champignons (Kühn et Grof, 2010). La séquence d'*Aspergillus clavatus* (ACL009530) a été utilisée comme groupe externe. *Arabidopsis thaliana*: AtSUC1, At1g71880; AtSUC2, At1g22710; AtSUT2, At2g02860; AtSUT4, At1g09960; AtSUC9, At5g06170. *Daucus carota*: DcSUT1A, CAA76367; *Hevea brasiliensis*: HbSUT2a, ABJ51934; HbSUT5, ABK60189. *Hordeum vulgare*: HvSUT1, CAB75882. *Lycopersicon esculentum* renamed *Solanum lycopersicum*: LeSUT1, CAA57726; LeSUT2, AAG12987; LeSUT4, AAG09270. *Lotus japonicus*: LjSUT4, CAD61275. *Lolium perenne*: LpSUT1, EU255258; LpSUT2, ACU87542. *Nicotiana tabacum*: NtSUT1A, CAA57727. *Oryza sativa*: OsSUT1, AAF90181; OsSUT3, BAB68368; OsSUT5, BAC67165. *Pisum sativum*: PsSUT1, AAD41024; PsSUF1, ABB30163; PsSUF4, A3DSX1. *Saccharum hybrid*: ShSUT1, AAV41028. *Solanum tuberosum*: StSUT1, CAA48915; StSUT4, AAG25923. *Sorghum bicolor* (Sorghum Genome Project: [www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)): SbSUT1, Sb01g045720; SbSUT2, Sb04g038030; SbSUT3, Sb01g022430; SbSUT4, Sb08g023310; SbSUT5, Sb04g023860; SbSUT6, Sb07g028120. *Triticum aestivum*: TaSUT1A, AAM13408; TaSUT1B, AAM13409; TaSUT1D, AAM13410. *Zea mays* (Maize Genome Project: <http://www.maizesequence.org/index.html>) ZmSUT1, BAA83501; ZmSUT2, AAS91375; ZmSUT3, ACF86653; ZmSUT4, AAT51689; ZmSUT5, ACF85284; ZmSUT6, ACF85673.

obtenir la structure protéique en 12 domaines transmembranaires divisés en deux parties par une boucle cytoplasmique de 30 à 40 acides aminés (Figure 28) (Reddy et al., 2012 ; Aoki et al., 2003). Les protéines de la MFS peuvent être des uniports, des symports ou des antiports et sont capables de transporter un bon nombre de métabolites (e.g. nitrate/nitrite, ions, polyols, sidérophores), dont le saccharose (Saier, 2000). L'identification moléculaire du premier SUcrose Transporter (SUT) a été précédée par de multiples approches biochimiques. Ainsi, dans un premier temps, l'utilisation de disques foliaires et de vésicules de plasmalemma a permis de mettre en évidence la présence d'un transport du saccharose saturable, électrogénique, spécifique du saccharose. Ce dernier était dû à une protéine qui nécessite une force proton motrice pour réaliser un co-transport H<sup>+</sup>/saccharose (Komor, 1977 ; Delrot, 1981 ; Bush, 1989). Ensuite, l'identification du premier gène de transporteur de saccharose, *SoSUT1* (*Spinacea oleracea* Sucrose Transporter 1) a eu lieu au début des années 1990 chez l'épinard (Riesmeier et al., 1992). Par la suite, le criblage de banques d'ADNc par hybridation moléculaire de sondes homologues ou hétérologues a permis de cloner de nombreux ADNc codant des transporteurs de saccharose chez les dicotylédones et les monocotylédones (Sauer, 2007). **Chez le ray-grass anglais, une analyse par homologie de séquence sur une banque d'ADN phagique (P. Barre, com. personnelle.) a permis de suggérer l'existence de seulement quatre transporteurs SUTs.**

Selon leurs structures, leur localisation cellulaire et leurs rôles présumés, plusieurs classifications ont été proposées pour les transporteurs SUT. Nous allons maintenant détailler les 5 groupes de transporteurs identifiés et caractérisés chez les monocotylédones et les dicotylédones en nous basant sur la classification établie par Kühn et Grof, 2010 (Figure 29).

### a) Groupe 1

Les SUTs du groupe 1 (clade SUT1 ; Figure 29) sont spécifiques des dicotylédones. L'un des SUTs les mieux caractérisés de ce groupe est AtSUC2, chez *A. thaliana*. Les transcrits et les protéines du transporteur AtSUC2 sont exprimés dans les cellules compagnes des nervures secondaires des feuilles et en quantités qui augmentent en parallèle avec l'avancée du développement des feuilles en organe source (Tuernit et Sauer, 1995 ; Stadler et Sauer, 1996 ; Wright et al., 2003). La question se pose donc de savoir si cette augmentation traduirait un besoin d'exportation du saccharose croissant au fur et à mesure de l'augmentation de l'activité photosynthétique de la feuille. Des lignées de

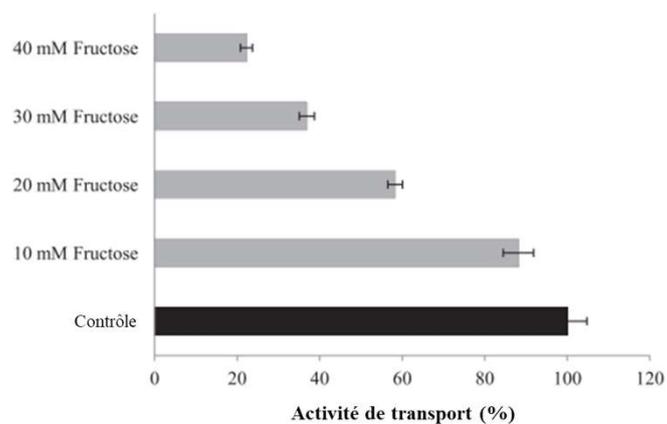


**FIGURE 30.** Immunolocalisation des protéines SUT1 chez la tomate (**A à C**) et la pomme de terre (**D à F**) par détection de la fluorescence avec  $\alpha$ SolSUT1 (Schmitt *et al.*, 2008). La coloration orange (**A, E et F**) montre l'auto-fluorescence des composés phénoliques des cellules lignifiées et la coloration verte montre la localisation de SUT1. Les images en lumière blanche et les images confocales ont été superposées pour B et E. (**A**) Protéines LeSUT1 dans une coupe transversale d'une nervure principale de feuille source de carbone. (**B**) Protéines LeSUT1 dans une coupe transversale de secondaire de feuille source de carbone. (**C**) Agrandissement du phloème abaxial d'une feuille source (similaire à A). LeSUT1 n'est localisé que dans les cellules les plus petites (cc). (**D**) StSUT1 et coloration histochimique d'un noyau au DAPI (bleu) dans une coupe transversale de la nervure principale d'une feuille source. (**E**) StSUT1 dans une coupe transversale d'une nervure secondaire d'une feuille source. (**F**) StSUT1 dans une section transversale de nervure principale de feuille source. La détection des anticorps était anti-lapin IgG-Cy2 incubé sur des sections de microtome de 5  $\mu$ m d'épaisseur pour B et E, ou coupées à la main pour les autres clichés. abp : phloème abaxial, adp : phloème adaxial, ccn : noyau de cellule compagne, xv : vaisseau du xylème, xp : parenchyme xylémien, se : tube criblé,

mutants d'insertions aléatoires touchés sur le gène *AtSUC2* ont montré une capacité d'export du saccharose réduite dans les feuilles, qui menait à une accumulation de glucides solubles et une diminution de la pigmentation en chlorophylles dans les feuilles, ainsi qu'une réduction drastique de la croissance de la plante (Gottwald et al., 2000 ; Srivastava et al., 2008). La complémentation de telles lignées dans le cadre d'une germination avec un milieu complémenté à 1% de saccharose permettait après 25 jours de contrer ce retard de croissance et de retrouver un développement conforme à celui d'une lignée sauvage (Gottwald et al., 2000). De ce fait, la mutation du gène *AtSUC2* empêcherait l'exportation du carbone depuis les organes sources (les cotylédons) ce qui provoque en retour l'accumulation de sucres puis l'inhibition de la photosynthèse dans ces derniers. Pour confirmer cette hypothèse, un suivi de l'expression du gène *AtSUC2* placé sous le contrôle du promoteur de la galactinol-synthase 1 (*CmGAS1*) de melon (*Cucumis melo*, L.), spécifique d'une expression protéique dans les nervures secondaires, a été réalisé dans un mutant d'insertion homozygote *atsuc2*. Les résultats ont montré un retour à la quasi-normalité du phénotype de la lignée mutante (Srivastava et al., 2008). Ces résultats ont alors permis d'établir qu'*AtSUC2* est un transporteur de saccharose dont le rôle principal est le **chargement direct du phloème dans les nervures secondaires des feuilles d' *A. thaliana***. Ce même rôle de chargement du phloème en saccharose peut être attribué à d'autres SUTs du groupe 1 dont les protéines ont été localisées dans le phloème et plus spécifiquement à la membrane des cellules du complexe SE-CC. C'est le cas par exemple de StSUT1 dans les tubes criblés des feuilles de la pomme de terre (Kühn et al., 1997 ; Barker et al., 2000), et au niveau des cellules compagnes pour NtSUT1 chez le tabac (*Nicotiana tabacum*, L.) et LeSUT1 chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*, M., redevenue *Solanum lycopersicum*, L. depuis la directive européenne 2013/45 du 31 Mars 2014; Figure 30 ; Schmitt et al., 2008).

## b) Groupe 2

Les SUTs du groupe 2 (clade SUT2 ; Figure 29) sont présents à la fois chez les monocotylédones (e.g. OsSUT4, ZmSUT2) et les dicotylédones (e.g. AtSUT2/AtSUC3, LeSUT2) (Aoki et al., 2003 ; Sauer, 2007). Les membres de ce groupe présentent quelques particularités. La boucle cytoplasmique centrale, située entre les 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> domaines transmembranaires et l'extrémité N-terminale est constituée de 20 à 40 acides aminés supplémentaires tandis que l'extrémité C-terminale est légèrement plus courte que celle des SUTs du groupe 1 (Eckart et al., 2003 ; Sauer, 2007). La boucle interne pourrait être la cible d'intermédiaires de voies cytoplasmiques de régulations. Chez les dicotylédones, les



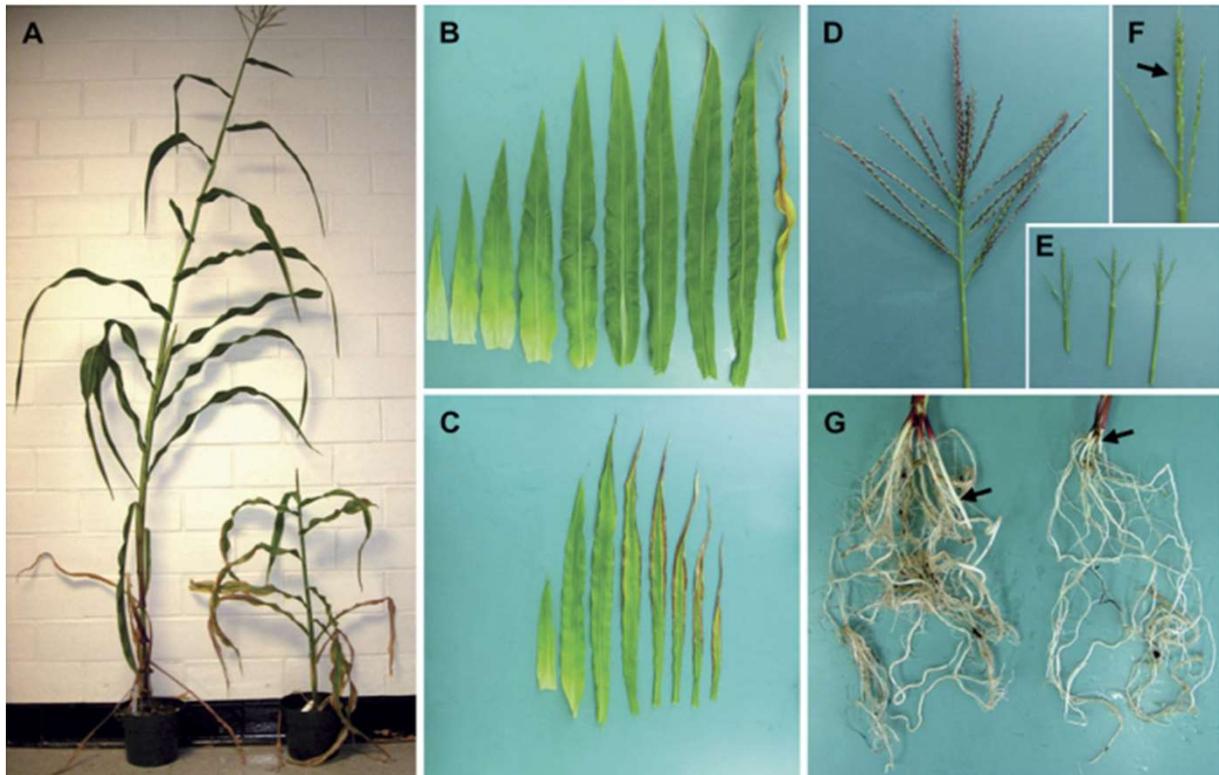
**FIGURE 31.** Inhibition de LpSUT2 par la concentration en fructose dans des cellules de levures (Berthier *et al.*, 2014). Pendant l'absorption, la concentration de saccharose était de 10 mM et le pH externe 4.5. Le fructose a été ajouté 30 s avant l'addition de saccharose. Les échantillons contrôle étaient traités en parallèle : 100% =  $192,25 \pm 9,19$  nmol saccharose  $\text{mg}^{-1}$  protéine  $\text{min}^{-1}$ . Pour déterminer la vitesse d'absorption du saccharose dépendante de LpSUT2, celle des cellules contrôle (avec un plasmide vide) ont été soustraites de celles des cellules exprimant LpSUT2. Les résultats consistent en la moyenne  $\pm$  erreur standard de deux expérimentations indépendantes de 3 réplicats.

protéines SUT2 présentent une affinité variable pour le saccharose avec des valeurs apparentes de  $K_m$  de l'ordre de 2 à 20 mM (Sauer, 2007). Chez les monocotylédones, leurs homologues présentent des caractéristiques moléculaires similaires et il n'est pas rare que les transporteurs du groupe 2 soient localisés sur le plasmalemme du complexe SE-CC et possèdent des niveaux de transcrits supérieurs dans les organes puits. Etant donné que les senseurs présumés de saccharose peuvent conserver leur activité de transport ( $K_m$   $AtSUT2 = 1,9$  mM chez *A. thaliana* ; Meyer et al. 2000), l'hypothèse est que les SUTs du groupe 2 jouent **un rôle plus particulier de senseur de saccharose et pourraient agir par oligomérisation avec des protéines de régulation ou leurs homologues SUTs impliqués dans le chargement direct du phloème.**

**Le deuxième transporteur identifié chez le ray-grass anglais, LpSUT2, a été classé parmi les SUTs du groupe 2 (Berthier et al., 2014).** Il présente les caractéristiques structurales des membres de ce groupe avec une boucle cytoplasmique centrale d'une soixantaine d'acides aminés. La protéine LpSUT2 exprimée dans un système hétérologue (levures) possède une  $K_m$  pour le saccharose de 6,2 mM et a la particularité d'être inhibée par le fructose (diminution de 23% du transport du saccharose dès 10 mM de fructose) (Figure 31). Il a été localisé dans le mésophylle des gaines et de la base des feuilles en croissance mais avec un niveau relatif faible de transcrits dans les gaines foliaires et à la limite du seuil de détection à la base des feuilles en croissance (Berthier et al., 2014). L'expression des transcrits *LpSUT2* ne semble pas non plus inductible (Furet et al., 2012 ; Berthier et al., 2014) et celle des protéines LpSUT2 semble très faible, puisqu'un marquage par immunolocalisation ne montrait pas de signal dans les gaines foliaires ni les bases de feuilles en croissance (Berthier et al., 2014). Le ray-grass étant une plante à fructanes (polymères de fructose) conduisant lors de leur mobilisation à la libération de fructose et donc à la synthèse de saccharose, l'ensemble de ces éléments a amené à penser que ce transporteur pourrait jouer un rôle de senseur de fructose ou de saccharose du fait de ses caractéristiques biochimiques. **Etant donné le très faible niveau d'expression et du fait de la grande stabilité de ses transcrits, ainsi que son expression protéique parfois indétectable, l'étude du transporteur LpSUT2 n'a cependant pas fait l'objet de ce travail doctoral.**

### c) Groupe 3

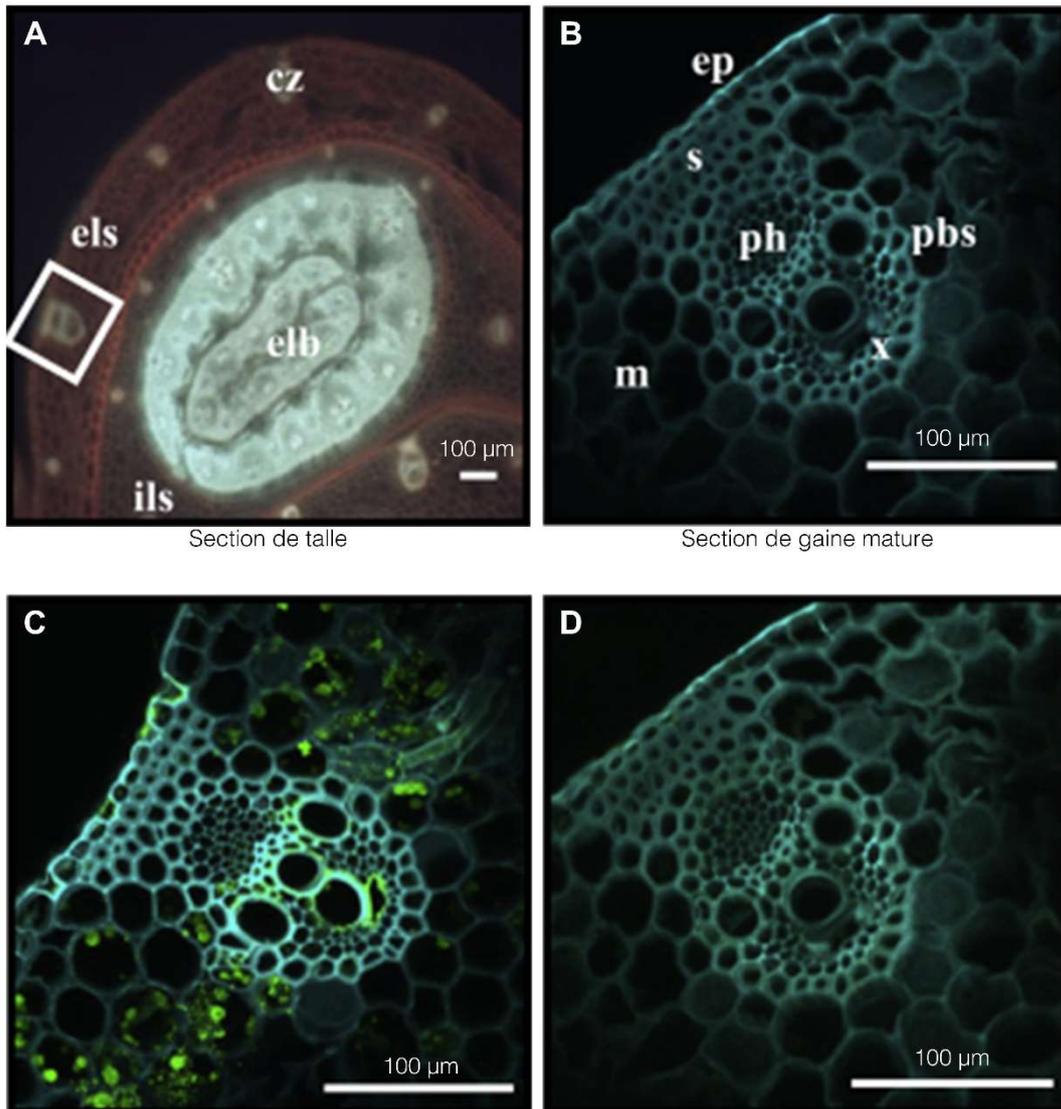
Les SUTs du groupe 3 (clade SUT3 ; Figure 29) ne sont présents que chez les monocotylédones. Une distinction en deux classes a été proposée en se basant sur les gènes des transporteurs *OsSUT1* et *OsSUT3* (Aoki et al., 2003).



**FIGURE 32.** Les mutants *sut1* ont une croissance réduite des tissus végétatifs et reproducteurs (Slewinski *et al.*, 2009). **(A)** Photographie d'un mutant *sut1* de 10 semaines (droite) et d'un contrôle du même âge (gauche). **(B)** Feuilles d'une plante sauvage de 6 semaines. **(C)** Un mutant *sut1* de même âge a moins de feuilles qui sénescent prématurément. Dans **(B)** et **(C)**, les feuilles sont classées des plus âgées (droite) aux plus jeunes (gauche). **(D)** Epis de plants sauvages. **(E)** Epis de 3 mutants *sut1* montrant un retard de développement. **(F)** Les épis des mutants *sut1* montrent des groupements vides sur les embranchements et un développement limité des épillets (flèches). **(G)** Le système racinaire de plants sauvages de 10 semaines (gauche) et de mutants *sut1* de même âge (droite) avec un nombre réduit de racines, de ramifications et un retard de croissance. Les flèches indiquent les racines de soutien.

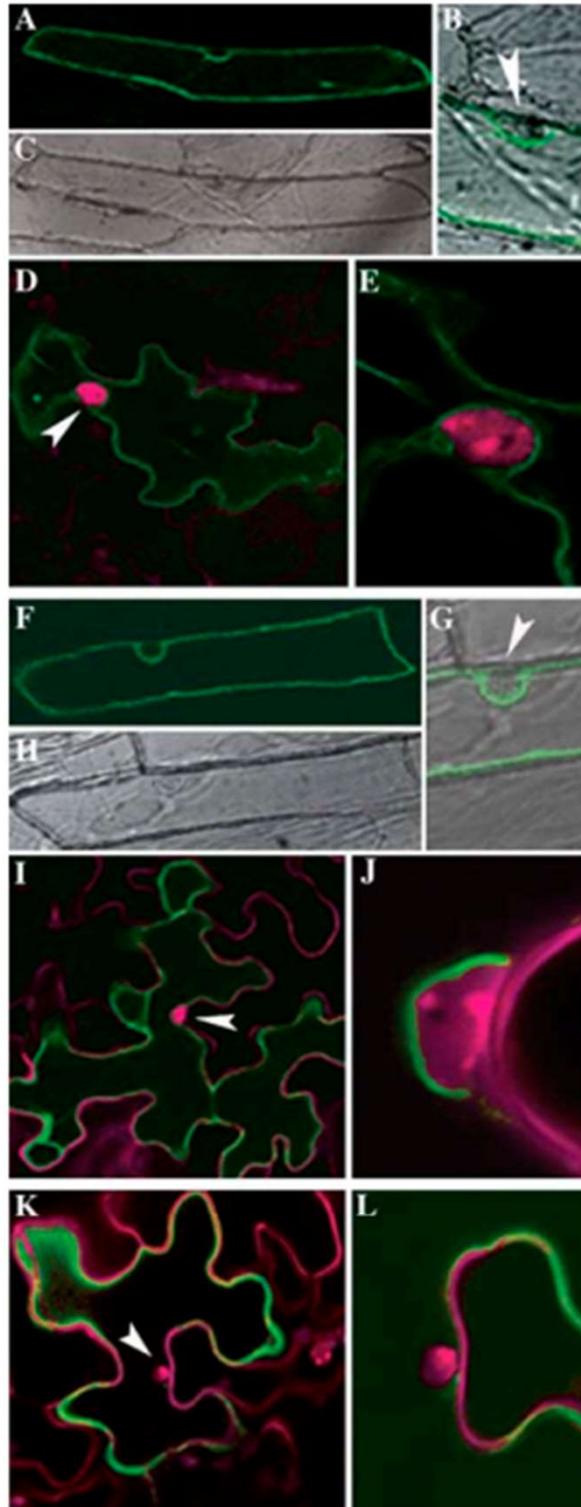
Les transporteurs de type SUT1 ont fait l'objet de multiples études. Ainsi, après l'identification du gène *OsSUT1* (Hirose et al., 1997), plusieurs gènes orthologues ont été isolés chez d'autres céréales comme le maïs (Aoki et al., 1999), l'orge (Weschke et al., 2000), le blé (Aoki et al., 2002). Tous les transporteurs du groupe 3 sont fonctionnels et possèdent une forte affinité pour le saccharose avec des  $K_m$  entre 2 et 8 mM et une spécificité élevée car capables de ne prendre en charge que presque exclusivement le saccharose (Hirose et al., 1997 ; Weschke et al., 2000 ; Sivitz et al., 2005 ; Aoki et al., 2002). Chez les Poacées, les études menées ont principalement porté sur les organes puits. Ainsi, le gène *OsSUT1* était le plus exprimé dans les organes nécessitant l'importation de carbone tels que les graines en cours de germination, la panicule et les gaines foliaires (Matsukura et al., 2000). L'étude de constructions d'ARN anti-sens *OsSUT1* a montré que la croissance des plantes n'était pas affectée, sauf au moment de l'étape de remplissage des grains de riz (Ishimaru et al., 2001 ; Scofield et al., 2002). Il a été proposé que le transporteur *OsSUT1* jouerait un rôle dans le transport du saccharose pour le remplissage des grains mais possiblement aussi pour la remobilisation des réserves d'amidon dans les gaines et les graines en cours de germination (Scofield et al., 2002 ; Aoki et al., 2003). Chez le blé et chez l'orge, deux espèces très proches du ray-grass anglais, les gènes des transporteurs *TaSUT1* et *HvSUT1* sont les plus exprimés au niveau des grains (Bagnall et al., 2000 ; Weschke et al., 2000), ce qui suggère que ces transporteurs seraient responsables de l'apport de saccharose dans les grains en développement, de façon assez similaire à la protéine *OsSUT1* chez le riz. Cependant, les transcrits *SUT1* ont aussi été détectés dans les feuilles, les entre-nœuds chez le blé (Aoki et al., 2004), le maïs (Aoki et al., 1999 ; Carpaneto et al., 2005), et l'orge (Weschke et al., 2000). Chez le maïs, une lignée mutante *knock-out zmsut1* présente une perte de la capacité d'exportation du saccharose depuis les organes sources accompagnée d'un retard de croissance significatif et une sénescence précoce dans les feuilles similaire à ce qui était observé pour des lignées mutantes *atsuc2* (Figure 32) (Slewinski et al., 2009). Le transporteur *ZmSUT1* semble donc être impliqué dans le chargement direct du saccharose dans le phloème au niveau des feuilles de maïs (Slewinski et al., 2009). En revanche, les niveaux d'expression des transcrits *OsSUT1* sont plus faibles dans les feuilles, qu'elles soient jeunes ou matures (Aoki et al., 2003). Des lignées mutantes d'ARN anti-sens *OsSUT1* n'ont pas permis d'établir un rôle de la protéine *OsSUT1* dans le chargement du phloème (Ishimaru et al., 2001 ; Scofield et al., 2002). **De ce fait, le rôle des transporteurs de saccharose du groupe 3 n'est pas clairement définissable. Ils peuvent être impliqués dans l'exportation du saccharose depuis les organes sources (les feuilles) et/ou les organes puits (gaines et grains notamment).**

### Gaines matures



**FIGURE 33.** Immunolocalisation de LpSUT1 (**C**) et de LpSUT2 (**D**) par microscopie confocale dans des coupes transversales de gaines (à 4 cm de hauteur) de ray-grass anglais intact (**C et D**) (Berthier *et al.*, 2014). (**A et B**) Coupes contrôles de gaines. Aucun marquage n'était initialement détecté dans ces tissus. (**C**) Distribution de la protéine LpSUT1 dans une section de gaines de plantes intactes. (**D**) Distribution de la protéine LpSUT2 dans une section de gaines de plantes intactes. La coloration verte montre la position des anticorps spécifiques de LpSUT1 (**C**) et LpSUT2 (**D**). Les chloroplastes apparaissent bleus. cz : zone de conduction, els : gaine externe, ils : gaine interne, ep : cellules épidermiques, s : cellules du sclérenchyme, m : cellules du mésophylle, pbs : gaine périfasciculaire, ph : phloème, x : xylème.

Chez le ray-grass anglais, le transporteur LpSUT1 a été identifié et classé dans le groupe 3 des SUTs (Berthier et al., 2014). Il s'agit d'une protéine de 522 acides aminés agencée en 12 domaines transmembranaires avec une boucle cytoplasmique et une extrémité N-terminale de longueur standard. L'analyse de l'homologie de sa séquence protéique a révélé une forte similarité avec les séquences des transporteurs HvSUT1 (orge, Weschke et al., 2000) et TaSUT1 (blé, Aoki et al., 2002) du groupe 3. Le transporteur HvSUT1 aurait un rôle important à l'interface des caryopses d'orge (mais n'est pas confiné qu'aux organes puits), de même que TaSUT1 dont l'expression relative des transcrits est induite dans les grains au cours de leur période de remplissage. Chez le ray-grass anglais, le gène *LpSUT1* est exprimé dans tous les organes, mais plus particulièrement dans les gaines et les limbes, et ses niveaux relatifs de transcrits augmentent très fortement dans les gaines et les bases de feuilles en croissance au cours des premières heures de refoliation (Berthier et al., 2009). Une cartographie du gène *LpSUT1* (Berthier et al., 2011) a localisé de façon très intéressante le gène sur le chromosome LG4 du ray-grass anglais dans des QTLs liés à l'élongation foliaire (Lothier et al., 2007a). **Le transporteur LpSUT1 pourrait donc jouer un rôle très important dans le transport du carbone au cours de la refoliation du ray-grass anglais.** Ce dernier possède en outre un  $K_m$  de 5,6 mM traduisant une forte affinité pour le saccharose qui lui permet de fonctionner efficacement même lorsque les concentrations en saccharose sont faibles, comme dans l'apoplasme des cellules de mésophylle. Par immunolocalisation dans les gaines et les bases de feuilles en croissance, le transporteur LpSUT1 a été en grande majorité localisé sur le plasmalemme des cellules du mésophylle et de la gaine périfasciculaire, mais pas au niveau du phloème (cellules du parenchyme phloémien incluses) (Figure 33) (Berthier et al., 2014). Cependant, au vu de la très grande similarité tissulaire observée entre les limbes et leurs gaines associées, il serait possible que le transporteur LpSUT1 soit également localisé au niveau du mésophylle et de la gaine périfasciculaire dans les limbes. Les niveaux relatifs de transcrits, l'activité et la localisation du transporteur LpSUT1 semblent ainsi indiquer que **le transporteur LpSUT1 jouerait un rôle crucial pour le transport latéral du saccharose, avant l'étape de chargement direct du phloème dans les sources** (limbes, gaines au cours de la refoliation), **et après le déchargement du saccharose dans les puits** (bases de feuilles en croissance). Il semble essentiel pour permettre la gestion des réserves carbonées de la plante lors de modifications des relations sources/puits du carbone au cours de la refoliation (les gaines devenant sources de carbone grâce à la remobilisation des fructanes en saccharose).



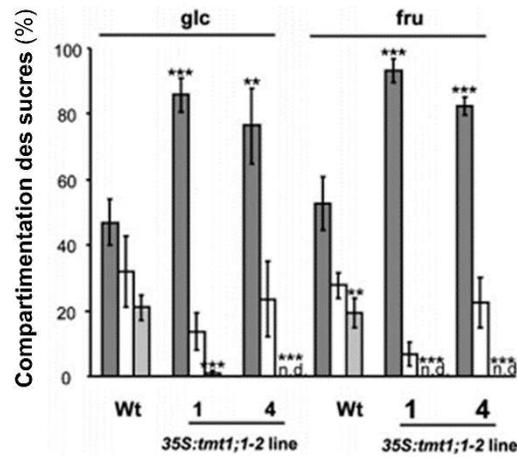
**FIGURE 34.** Localisation subcellulaire de HvSUT2, AtSUT4 et AtSUC2 par expression transitoire de protéines de fusion avec la GFP dans l'épiderme d'oignon et d'*Arabidopsis* (Endler *et al.*, 2006). Les parois cellulaires et les noyaux d'*Arabidopsis* ont été colorés en rouge avec de l'iodure de propidium. Les noyaux sont indiqués par les flèches. **(A à E)** Localisation tonoplastique de HvSUT2 dans l'épiderme d'oignon **(A à C)** et d'*Arabidopsis* **(D à E)**. **(A)** Fluorescence de la protéine de fusion HvSUT2-GFP dans l'épiderme d'oignon et **(C)** cliché en transmission de la même cellule. Le tonoplaste est localisé du côté interne du cytoplasme incluant le noyau comme montré dans le détail des clichés **(B et E)**. **(F à J)** Localisation de la protéine de fusion AtSUT4-GFP sur le tonoplaste, transitoirement exprimé dans les cellules d'épiderme de l'oignon **(F à H)** et d'*Arabidopsis* **(I et J)**. Comme montré dans les clichés **(G et J)**, le tonoplaste fluorescent (vert) entoure le noyau. **(K et L)** Localisation plasmalemmique d'AtSUC2-GFP dans l'épiderme d'*Arabidopsis*.

#### d) Groupe 4

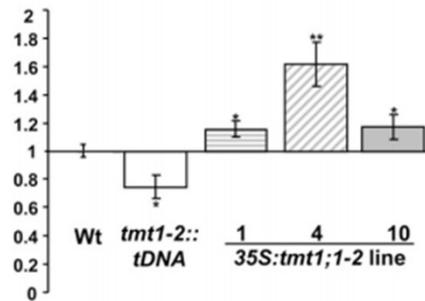
Les SUTs du groupe 4 (clade SUT4 ; **Figure 29**) sont retrouvés à la fois chez les monocotylédones et les dicotylédones (**Kühn et Grof, 2010**). Ils possèdent une affinité pour le saccharose qui peut être assez variable, chez l'orge (*HvSUT2*,  $K_m = 5$  mM ; **Weschke et al., 2000**) et *A. thaliana* (*AtSUT4*,  $K_m = 11,6$  mM ; **Weise et al., 2000**). Chez l'orge, le niveau de transcrits *HvSUT2* le plus élevé se situe dans les feuilles en croissance bien qu'une expression soit présente dans l'ensemble des tissus (**Weschke et al., 2000**). Une observation similaire a été faite chez le riz pour les transcrits *OsSUT2* (**Aoki et al., 2003**). L'expression transitoire de constructions *GFP-HvSUT2* et *GFP-AtSUT4* dans l'épiderme externe d'oignon (*Allium cepa* L.) et dans l'épiderme de feuilles d'*A. thaliana* a permis de localiser ces transporteurs au niveau du tonoplaste (**Endler et al., 2006**) (**Figure 34**). Plus récemment, cette localisation tonoplastique a aussi été confirmée par des constructions avec la GFP pour différents transporteurs comme *OsSUT2* chez le riz (**Eom et al., 2011**) et *NtSUT4* chez le tabac (**Okubo-Kurihara et al. 2011**), *CmSUT4* chez le melon, ou *LeSUT4* chez la tomate (**Schneider et al., 2012**). Contrairement aux autres transporteurs du groupe SUT4, la protéine *StSUT4* a été localisée dans la membrane plasmique des tubes criblés de pomme de terre et non dans le tonoplaste (**Chincinska et al., 2008**). **Les SUTs du groupe 4, pour leur grande majorité, seraient ainsi localisés sur le tonoplaste et permettraient l'efflux du saccharose des vacuoles acides (pH  $\approx$  5,5) vers le cytoplasme des cellules en utilisant les protons présents dans les vacuoles. Un transporteur similaire doit être présent chez le ray-grass anglais du fait de l'omniprésence de fructanes et de saccharose vacuolaires, mais aucun *LpSUT4* n'a été identifié à ce jour.**

#### e) Groupe 5

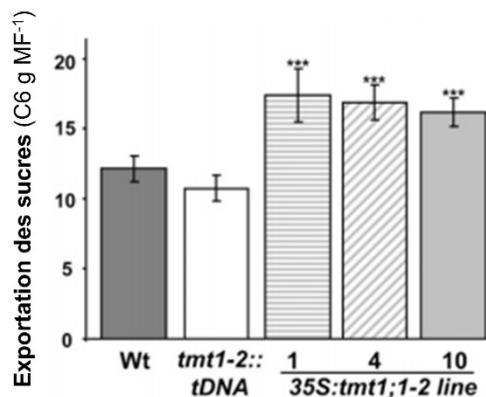
Le groupe 5 des SUTs (clade SUT5 ; **Figure 29**) regroupe des transporteurs de saccharose non caractérisés pour la plupart, et exclusifs aux monocotylédones. Ils possèdent une activité de transport dont l'affinité serait inférieure à celle des transporteurs du groupe 3 (**Sun et al., 2010 ; Eom et al., 2011**) et la sélectivité change selon l'espèce végétale considérée. Par exemple, ils sont exprimés dans la majorité des organes, mais plus particulièrement dans les feuilles en croissance chez le riz (*OsSUT5* ; **Aoki et al., 2003**) et dans les racines chez le maïs (*ZmSUT5* ; **Usha et al., 2015**). **De ce fait, leur rôle est aujourd'hui encore inconnu dans la littérature et pourrait être très différent selon les espèces. Il n'existe à ce jour pas de transporteur *LpSUT5* identifié chez le ray-grass anglais.**



**FIGURE 35.** Niveaux et compartimentation du glucose (Glc) et du fructose (Fru) dans des plantules sauvage ou mutantes d'insertion spécifique du gène *AtSUC2* d'*Arabidopsis* cultivées dans un milieu liquide (Wingenter *et al.*, 2010). Les plantules ont été cultivées en milieu liquide supplémenté de 5% de glucose. La compartimentation des sucres a été analysée par fractionnement non-aqueux. Les barres en gris foncé représentent la vacuole, les blanches les plastides, et les gris clair le cytosol. L'analyse statistique a été menée en comparaison avec la lignée sauvage (Wt).



**FIGURE 36.** Expression du gène *AtSUC2* dans les feuilles d'*Arabidopsis* (Wingenter *et al.*, 2010). Les plantes ont été cultivées pendant 8 semaines sur sol, et les feuilles ont été récoltées à la fin de la période de lumière.



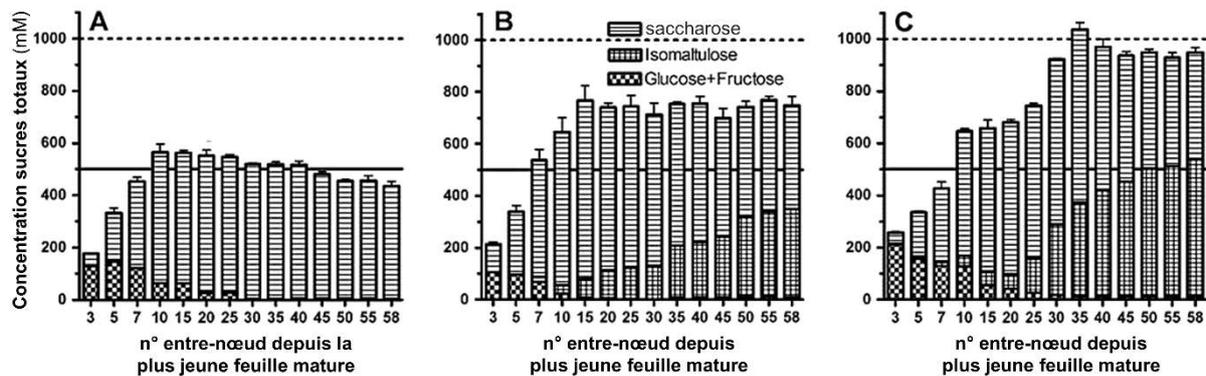
**FIGURE 37.** Teneurs en sucres de l'exsudat phloémien de feuilles matures excisées d'*Arabidopsis* (Wingenter *et al.*, 2010). Les plantes ont été cultivées pendant 8 semaines sur sol, et les feuilles ont été récoltées à la fin de la période de lumière. L'exsudation a été réalisée pendant 16 h dans 15 mM d'EDTA (pH 7.5) à l'obscurité.

**Ainsi, il a été identifié chez les végétaux de très nombreux transporteurs de saccharose dont la localisation et la fonction peuvent être très différentes selon les étapes du transport du saccharose.** Dans les organes sources, ces transporteurs permettraient l'importation du saccharose depuis l'apoplasme, notamment lors de l'étape de chargement direct du phloème, critique pour les espèces à chargement apoplasmique comme le ray-grass anglais. Dans les puits, leur action pourrait aussi permettre d'accélérer la vitesse de déchargement du saccharose, et ainsi augmenter le gradient décroissant de saccharose présent respectivement entre les organes sources et les organes puits, et donc la vitesse globale du flux phloémien existant entre les organes sources et puits.

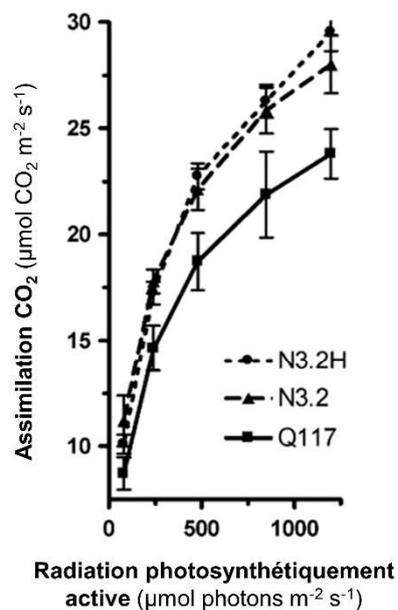
### **3. L'importance des SUTs dans la gestion du carbone**

Chez *A. thaliana*, lorsque le stockage de glucose dans les vacuoles des cellules de mésophylle est forcé par la surexpression du transporteur de monosaccharides tonoplastique TMT1, une diminution significative de la concentration en glucose cytoplasmique a été mesurée (Wingenter et al., 2010). Cette diminution s'accompagne en contrepartie d'une augmentation de l'expression des transcrits du transporteur de saccharose AtSUC2 dans les feuilles (Figure 35 et 36) impliqué dans le chargement direct du phloème en saccharose (Wingenter et al., 2010). Cette surexpression du gène *AtSUC2* était accompagnée d'une augmentation effective en aval de la concentration en saccharose phloémien (mesurée après provocation d'un efflux de sève par l'incubation des pétioles avec 15 mM EDTA) (Figure 37). La séquestration vacuolaire du glucose par la surexpression de TMT1 aurait donc induit l'augmentation du transport à longue distance du saccharose par le biais d'AtSUC2. Les feuilles perdaient en force source de carbone puisqu'une partie de ce carbone disponible pour l'exportation était immédiatement séquestré. **Lorsque la force d'une source de carbone diminue, une régulation transcriptionnelle des gènes SUTs pourrait être une réponse mise en place par la plante pour maintenir un gradient de saccharose favorable dans le phloème entre les organes sources et les puits.**

Chez la canne à sucre (*Saccharum sp.*), les tiges représentent un puits majeur car elles accumulent de très grandes quantités de saccharose. Wu et Birch, 2007 ont démontré qu'il était possible d'augmenter de plus de 25% les teneurs en glucides solubles dans les tiges par la surexpression hétérologue tonoplastique d'une isomérase bactérienne capable de convertir le saccharose en isomaltulose vacuolaire (Figure 38). **La capacité physique du phloème à transporter du saccharose à longue distance ne semblerait donc pas limitante.**



**FIGURE 38.** Profils d'accumulation de sucres de cultivars Q117 de canne à sucre (A) et de lignées transgéniques (B et C) montrant l'accumulation substantielle d'isomaltulose et l'amélioration de la concentration en sucres totale dans le jus (Wu et Birch, 2007). Les plants ont été cultivés pendant 16 mois avec 59 entre-nœuds à la troisième génération végétative.



**FIGURE 39.** Amélioration de la photosynthèse dans les secondes feuilles matures des lignées transgéniques SugarBooster (N3.2 et N3.2H) en comparaison avec le contrôle (Q117) d'après la mesure de la vitesse d'assimilation du CO<sub>2</sub> (Wu et Birch, 2007).

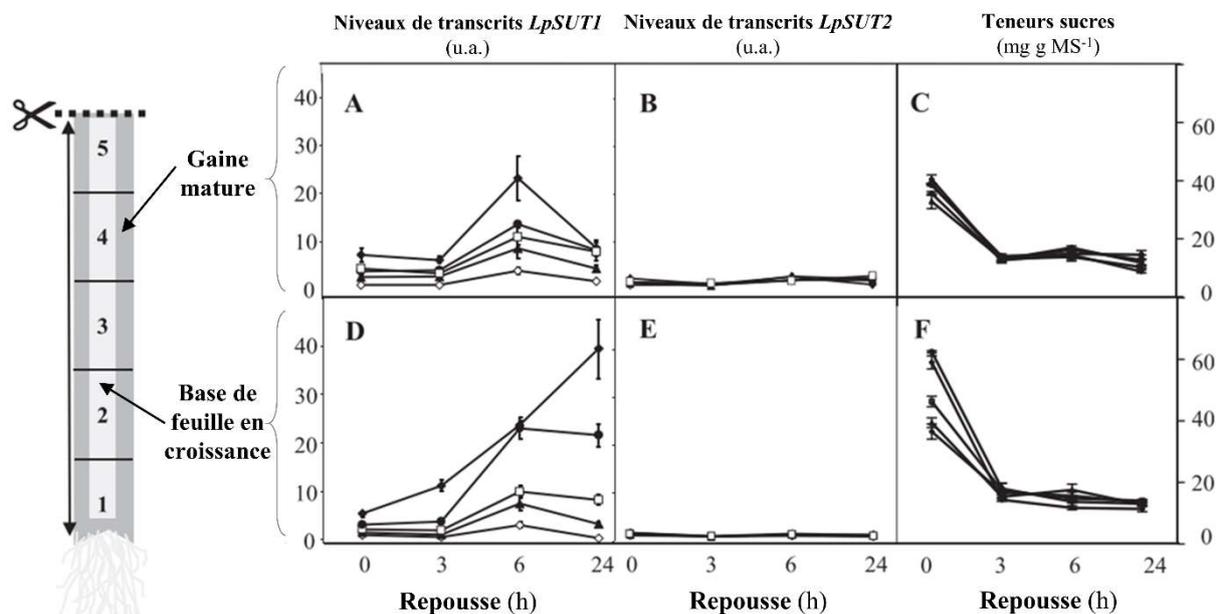
De plus, l'assimilation du carbone mesurée augmente alors de 5 à 20% selon les feuilles suivies en réponse à la lumière à un PAR compris entre 80-1250  $\mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$  (Figure 39 ; Wu et Birch, 2007). En amont du transport du saccharose, **la photosynthèse n'est donc pas limitante vis-à-vis du carbone**. En parallèle dans les feuilles, l'activité d'exportation du saccharose dépendant du gradient de protons (mesuré en vésicules de plasmalemmes et très probablement liée aux SUTs) augmentait de 20 à 30%. Chez *A. thaliana*, la pomme de terre, le tabac, la tomate et le maïs, il a été démontré que des mutants spécifiques des transporteurs du groupe 1, impliqués dans le chargement direct du saccharose dans le phloème, possédaient dans les organes sources une activité d'export du saccharose réduite qui conduisait à l'accumulation de glucides, un retard de croissance et de floraison (Riesmeier et al., 1994 ; Bürkle et al., 1998 ; Gottwald et al., 2000 ; Hackel et al., 2006 ; Srivastava et al., 2008 ; Slewinski et al., 2009). Chez le riz cependant, la mutation du gène *OsSUT1* n'engendrait qu'un remplissage des grains réduits, mais pas de perturbation du transport du saccharose dans les organes sources de carbone (Ishimaru et al., 2001 ; Scofield et al., 2002). Pour expliquer ce phénotype, les auteurs suggèrent que *OsSUT1* serait spécifique des grains et non du chargement direct du phloème en saccharose.

Chez le riz, la surexpression hétérologue du gène *AtSUC2* associé à un promoteur spécifique du phloème permettait d'obtenir un meilleur rendement des grains (+ 16 %) qui a été associé à une meilleure activité de transport et photosynthétique en amont (Wang et al., 2015). Chez *A. thaliana*, une surexpression de gènes *SUTs* a aussi été réalisée avec pour objectif d'augmenter l'exportation du saccharose depuis les organes sources de carbone et réduire le rétrocontrôle négatif des glucides sur l'activité photosynthétique (Dasgupta et al., 2014). Cependant, malgré l'augmentation de l'activité d'exportation du saccharose dans les organes sources, les plantes présentaient un phénotype de retard de croissance. Ce phénotype a cependant été expliqué et attribué à une carence en phosphate. **La régulation transcriptionnelle des SUTs, notamment lors de l'étape de chargement direct du phloème en saccharose semble donc être cruciale pour garantir un équilibre dans la balance minérale de la plante, sa croissance, et l'accumulation des réserves de carbone.**

Le manque de données permettant d'évaluer l'importance de la régulation des SUTs pour la gestion des ressources carbonées chez les végétaux est un facteur limitant pour la compréhension du métabolisme du carbone général des végétaux (Liesche et al., 2017). **L'hypothèse à l'origine de ce travail doctoral est que la régulation des SUTs serait l'élément clé de la gestion active des ressources carbonées entre les organes sources et les organes puits chez les végétaux.**

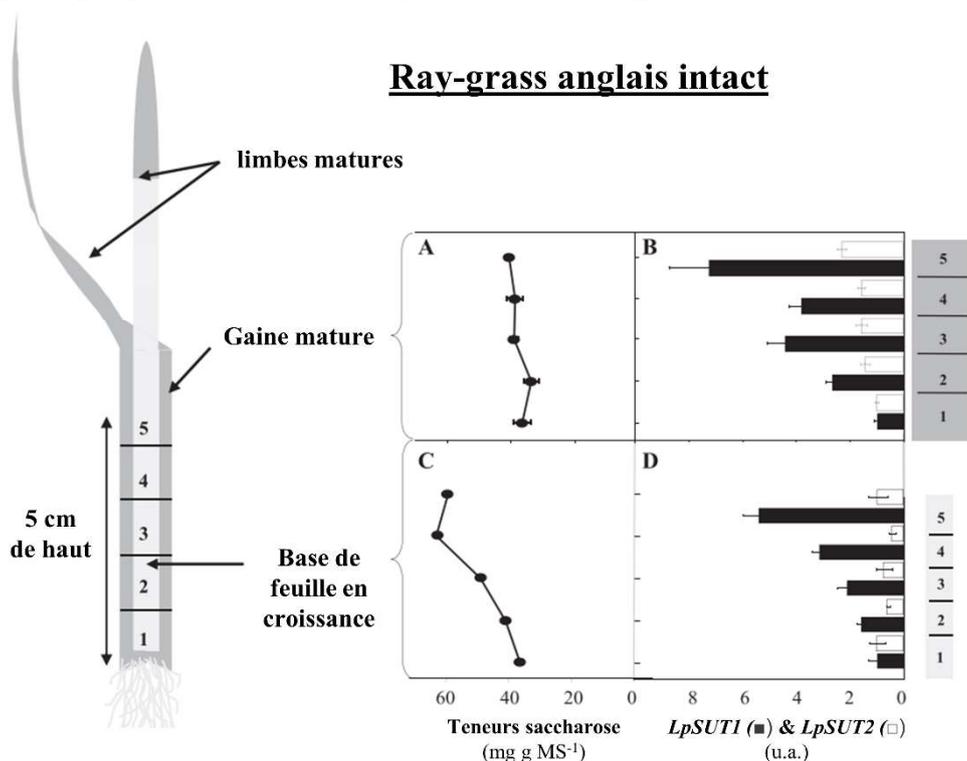
## Ray-grass anglais défolié

◇ Segment 1   ▲ Segment 2   □ Segment 3   ● Segment 4   ◆ Segment 5



**FIGURE 40.** Teneurs en saccharose et niveaux de transcrits *LpSUT1* et *LpSUT2* dans les bases de feuilles en croissance et gaines matures de *Lolium perenne* L. après défoliation (Berthier *et al.*, 2014). Les deux organes ont été disséqués dans la longueur depuis la base en sections de 1 cm de long. **(C, F)** Teneurs en saccharose. **(A, D)** Niveaux de transcrits *LpSUT1* et **(B, E)** *LpSUT2* dans les gaines matures **(A, B, C)** et dans les bases de feuilles en croissance **(D, E, F)** de plantes défoliées, aux temps 0, 3, 6 ou 24 h de repousse.

## Ray-grass anglais intact



**FIGURE 41.** Teneurs en saccharose et niveaux de transcrits *LpSUT1* et *LpSUT2* dans les bases de feuilles en croissance et gaines matures de *Lolium perenne* L. intacts (Berthier *et al.*, 2014). Les deux organes ont été disséqués dans la longueur en sections de 1 cm de long. **(A, C)** Teneurs en saccharose dans les gaines matures et les bases de feuilles en croissance. **(B, D)** Niveaux de transcrits *LpSUT1* (noir) et *LpSUT2* (blanc) dans les gaines matures et dans les bases de feuilles en croissance.

## E. Régulation des SUTs par des facteurs biotiques et abiotiques

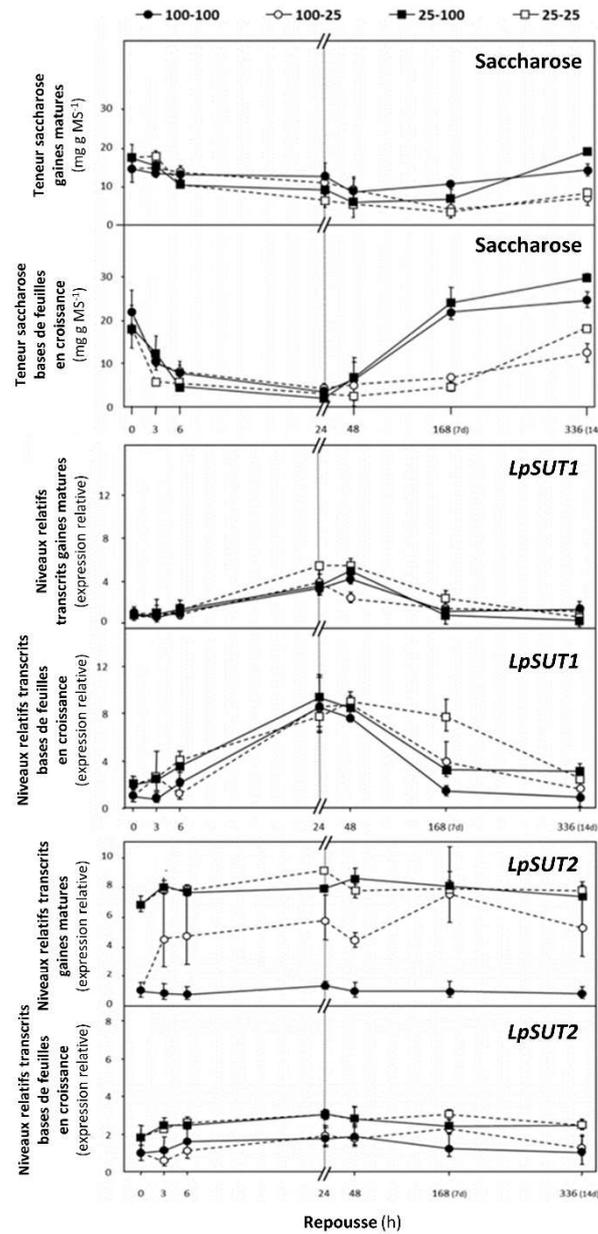
De nombreux facteurs biotiques et abiotiques modifient les relations sources-puits au sein des plantes et ces modifications peuvent s'accompagner d'une régulation des transporteurs SUTs.

### 1. Défoliation chez le ray-grass anglais

A notre connaissance, l'étude de l'effet de la défoliation sur la régulation des SUTs n'a été menée que chez le riz (Chen *et al.*, 2009) et le ray-grass anglais (Berthier *et al.*, 2009 et 2014 ; Lee *et al.*, 2011 ; Furet *et al.*, 2012). La défoliation est une perturbation majeure pour la plante dans les prairies pâturées ou fauchées car elle exige la mise en place d'une réponse rapide (Berthier *et al.*, 2009 et 2014 ; Furet *et al.*, 2012). Dans ces études, **la défoliation correspond à un retrait instantané des parties de façon à reproduire les effets d'un pâturage de bovins ou d'une récolte mécanique par fauche.**

Chez le riz, un suivi des niveaux d'expression des gènes a été réalisé sur des jeunes plants de riz défoliés à une hauteur de 6 cm après 2, 6 et 24 h de repousse (Chen *et al.*, 2009). Les résultats ont démontré à 2 h une régulation négative des gènes de l'anabolisme de l'amidon et positive pour le gène de l' $\alpha$ -amylase, responsable de son catabolisme, ainsi que celui de la sucrose-phosphate synthase et ceux de transporteurs de glucides. Après 24 h, les niveaux de transcrits des gènes de transporteurs de glucides n'étaient plus régulés. **L'hypothèse est que la dégradation de l'amidon pendant les premières heures de repousse permet l'alimentation des organes puits de carbone par la production de saccharose et l'induction de son transport.**

Chez le ray-grass anglais, la défoliation conduit à une mobilisation des ressources carbonées (fructanes et saccharose) avec une conversion des gaines puits en sources par la mobilisation des fructanes qui est nécessaire du fait de la perte des limbes, les sources principales de carbone. Ni les niveaux de transcrits (très faibles), ni ceux des protéines (signal trop faible) du transporteur LpSUT2 ne montraient de variation après défoliation (Berthier *et al.*, 2014). Couplé à ses caractéristiques moléculaires correspondant au groupe 2 des SUTs, les auteurs ont suggéré que **LpSUT2 pourrait avoir un rôle senseur de glucides et un rôle négligeable dans le transport même du saccharose.** Cependant, la refoliation du ray-grass anglais s'effectue conjointement à une augmentation de plus de 2 fois de l'expression relative des transcrits *LpSUT1* dans les gaines et les bases de feuilles en croissance qui constituent alors les chaumes (*i.e.* tissus épargnés par la coupe car situés sous les 5 cm de hauteur et donc hors de portée de la bouche des animaux ou sous la barre



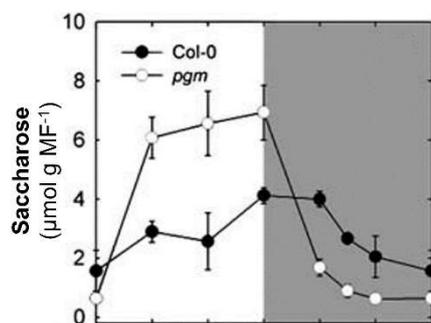
**FIGURE 42. (A)** Teneurs en saccharose dans les gaines matures et **(B)** les bases de feuilles en croissance de ray-grass anglais cultivé à 100-100 (●), 100-25 (○), 25-100 (■) et 25-25 (□), avant et après défoliation et 336 h de repousse (Furet *et al.*, 2012). Niveaux relatifs de transcrits *LpSUT1* **(C, D)** et *LpSUT2* **(E, F)** respectivement dans les gaines matures et les bases de feuilles en croissance.

de coupe du matériel agricole) (Figure 40) (Berthier et al., 2009 ; 2014). Il a aussi été montré que les niveaux relatifs de transcrits *LpSUT1* suivaient un gradient qui augmente de manière acropète dans les gaines et les bases de feuilles en croissance (Figure 41) (Berthier et al., 2014), comme si la proximité des méristèmes foliaires, à l'extrémité basale des bases de feuilles en croissance, diminuait la nécessité d'un transport de saccharose par le phloème et l'intervention de *LpSUT1*. Dans une expérimentation de défoliation croissante où des plants de ray-grass étaient coupés à 20, 40 et 60 mm de hauteur, les niveaux de transcrits *LpSUT1* étaient inversement corrélés avec la hauteur de coupe (Lee et al., 2011). Les plantes défoliées les plus sévèrement montraient aussi une induction positive la plus élevée de gènes liés à l'activité photosynthétique une fois le stade à une feuille atteint, malgré la perte la plus importante de leur surface foliaire. Les auteurs suggéraient que l'activité photosynthétique des gaines était régulée positivement pour expliquer l'accélération observée de la repousse de nouveaux limbes. **L'augmentation des niveaux de transcrits *LpSUT1*, qui serait responsable du transport latéral du saccharose dans les organes sources et de son importation dans les organes puits, pourrait alors agir de concert afin de permettre d'augmenter l'importation du saccharose vers la base des feuilles en croissance.**

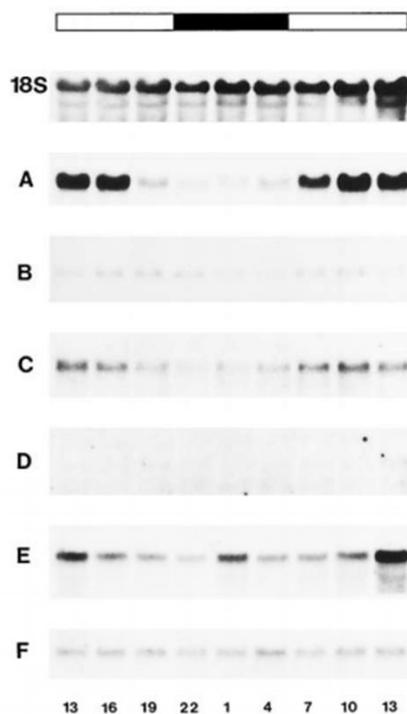
## 2. Modulation des sources par le régime lumineux

Au cours d'une étude réalisée par Xu et al. (2018), il a été démontré que les niveaux de transcrits de nombreux transporteurs de saccharose n'étaient pas affectés par une forte (400-800  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ou une faible intensité lumineuse (< 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) chez les espèces à chargement apoplasmique (*A. thaliana*, soja, pomme de terre, tomate, maïs, riz, blé et orge). Cependant chez la pomme de terre, l'expression du gène *StSUT4*, localisé sur les tubes criblés, était également réduite en réponse à une forte intensité lumineuse (400-800  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Xu et al., 2018). Lorsque cette intensité est encore plus élevée (1300  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), il a été démontré une inhibition de l'expression des gènes *AtSUC1*, *AtSUC2* et *AtSUC7* chez *A. thaliana* qui a été plutôt attribuée à des conditions d'éclairement trop importantes pour la plante. **Les auteurs suggèrent que la capacité de transport existant chez les espèces apoplasmiques est suffisante pour ne pas nécessiter de régulation de l'expression des gènes *SUTs*, ou que cette régulation s'effectuerait au niveau post-transcriptionnel.**

Chez le ray-grass anglais, l'influence de l'intensité lumineuse (100% ou 25% de la lumière naturelle supplémentée par une radiation photosynthétiquement active de 440  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sur la régulation transcriptionnelle de *LpSUT1* a été étudiée dans



**FIGURE 43.** Variation de la concentration en saccharose dans les rosettes de lignées sauvages et *pgm* d'*Arabidopsis* durant un cycle nycthéral (Bläsing *et al.*, 2005).

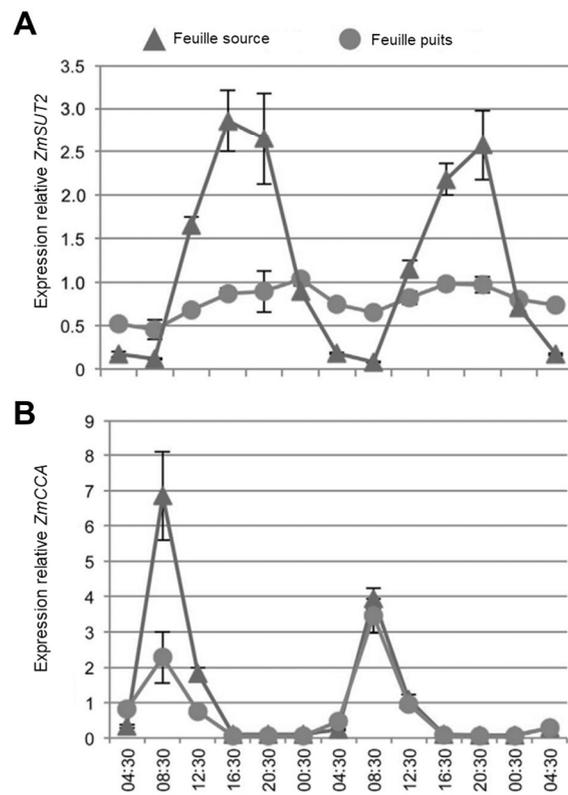


**FIGURE 44.** Expression des ARNm *DcSUT1* et *DcSUT2* dépendante de la lumière (Shakya et Sturm, 1998). Des plants de 12 semaines ont été récoltés à 3 h d'intervalle entre 13:00 au jour 1 et 13:00 au jour 2. Les ARN totaux (10 µg/piste) de feuilles entières (pétiole inclus) (**A, C, E**) et du tiers central des racines pivots (excluant la couronne et l'extrémité) (**B, D et F**) ont été hybridés en Northern blot avec une sonde <sup>32</sup>P pour la *chlorophyll a/b-binding protein* (**A et B**), *DcSUT1* (**C et D**) et *DcSUT2* (**E et F**). Un fragment 18S de la tomate a été utilisé comme référence. La barre au dessus montre le régime lumineux au moment de la récolte et les chiffres en dessous, l'heure de récolte.

les gaines et les bases de feuilles en croissance du ray-grass anglais dans un contexte de repousse après défoliation (Furet et al., 2012). Deux lots de plantes, chacun acclimaté avant défoliation et pendant 2 semaines à 100% ou 25% du PAR ont été conservés ou transférés pendant 2 semaines également à 100% ou 25% du PAR après avoir subi une défoliation (Furet et al., 2012). L'hypothèse des auteurs reposait sur le fait que les plantes acclimatées à l'ombre devaient disposer d'une capacité d'exportation et de transport réduite. Cela devait donc s'accompagner d'une vitesse de repousse inférieure et possiblement dépendante d'une expression relative du gène *LpSUT1* inférieure comparativement à celle de plantes pré-cultivées à 100% du PAR. Les teneurs en saccharose mesurées ont diminué d'environ 50% dans les gaines, et jusqu'à 80% dans les bases de feuilles en croissance dans les premières 24 h, avant de se stabiliser dans les gaines et d'augmenter jusqu'au niveau pré-défoliation dans les bases de feuilles en croissance après 7 jours (Figure 42) (Furet et al., 2012). L'expression des transcrits *LpSUT1* mesurée était 8 à 25 fois supérieure (respectivement dans les gaines et les bases de feuilles en croissance) dès 24 h après défoliation mais de façon totalement indépendante du régime lumineux avant ou après défoliation (Figure 42) (Furet et al., 2012). L'expression du gène *LpSUT1* est donc à priori insensible au régime lumineux et fortement régulée en réponse à la défoliation. **La plante est capable d'induire très fortement et très rapidement ce levier de réponse dans les puits pour ajuster le transport et optimiser l'utilisation de son carbone.**

**Le cycle nyctéméral représente la succession journalière d'une phase de lumière, l'héméropériode, et d'obscurité, la nyctipériode.** Chez la plupart des végétaux, une variation de la concentration en saccharose est observée au cours du cycle nyctéméral dans les feuilles, car la dégradation de l'amidon la nuit ne suffit généralement pas à compenser l'arrêt de la photosynthèse. Ainsi, la teneur en saccharose augmente au cours de la période de jour et diminue pendant la période nuit (Figure 43) (Bläsing et al., 2005). Shakya et Sturm (1998) font l'hypothèse que la vitesse de transport du saccharose est élevée pendant la journée et faible pendant la nuit. Chez la carotte (*Daucus carota* L., dicotylédone), les niveaux de transcrits *DcSUT1*, responsable du chargement direct du saccharose dans le phloème des feuilles, étaient élevés le jour, et faibles la nuit. Cela suggère donc fortement un rôle de la régulation transcriptionnelle de *DcSUT1* dans les variations nyctémérales de la concentration en saccharose dans les feuilles (Figure 44) (Shakya and Sturm, 1998).

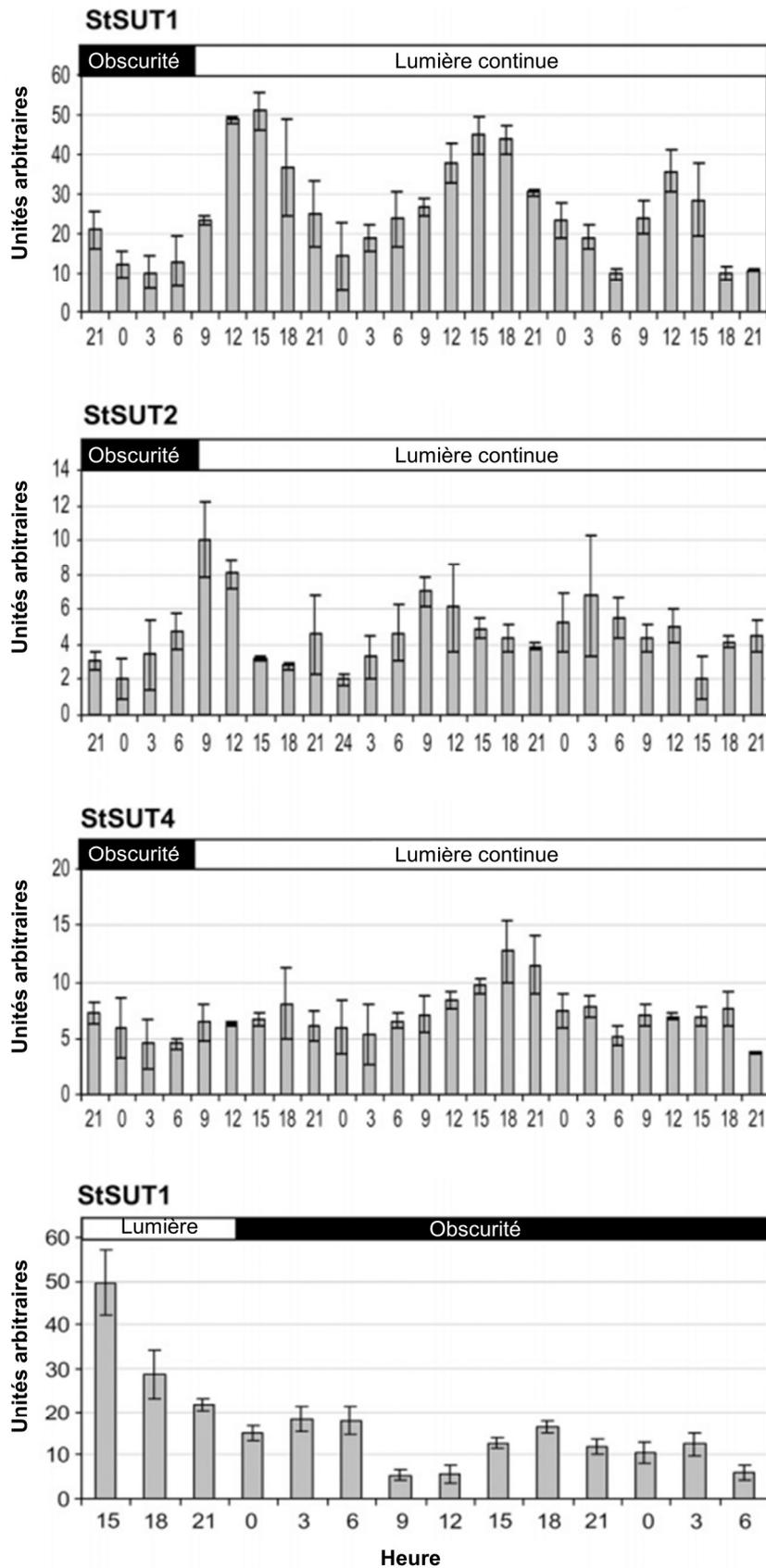
Chez les monocotylédones telles que le riz et le maïs, l'importance de l'expression relative des transcrits de transporteurs du groupe 4 (tonoplastiques) a été mise en évidence au regard de l'exportation du saccharose vers les organes puits qui se produit la



**FIGURE 45.** Analyse de l'expression de l'ARNm *ZmSUT2* chez le maïs (Leach *et al.*, 2017). **(A)** *ZmSUT2* et **(B)** *ZmCCA* (*Circadian Clock Associated*) dans les feuilles matures (triangles) et immatures (ronds). L'aube était à 5:45, le crépuscule à 8:45.

nuit. Ainsi, chez le maïs, [Leach et al. \(2017\)](#) ont montré que les transcrits *ZmSUT2* étaient surexprimés en fin de journée (entre 16h30 et 20h30 dans les feuilles matures, [Figure 45](#)). L'amplitude de cette variation journalière est toutefois moins grande dans les jeunes feuilles en croissance qui sont encore puits de carbone. La plante semble directement percevoir le besoin d'exportation de son carbone et elle optimise la régulation de l'expression de ses transcrits *SUTs*. Chez le riz et le maïs, des lignées mutantes pour *ossut2* ou *zmsut2* ont montré un retard de croissance et une accumulation de glucides significative dans les feuilles par rapport à la lignée d'origine en fin de jour comme de nuit pour le riz ([Eom et al., 2011](#)) et en fin de nuit seulement chez le maïs ([Leach et al., 2017](#)). L'hypothèse est que la perte de fonction du transporteur tonoplastique provoque une impossibilité de remobilisation du saccharose transitoirement stocké dans les vacuoles et en conséquence, un retard de croissance par une carence de l'approvisionnement en carbone la nuit. La surexpression des transcrits *ZmSUT2* en fin de journée permettrait de préparer la feuille à exporter le saccharose accumulé dans les cellules vers les organes puits dès le début de la nyctipériode ([Ferne et Stitt, 2012](#)). La diminution de l'expression des transcrits en début de journée permettrait quant à elle de rétablir des réserves de saccharose vacuolaire dans les feuilles matures. **La régulation transcriptionnelle des *SUTs* du groupe 4 pourrait donc être corrélée à l'intensité lumineuse.**

Le **rythme circadien** correspond à une horloge biologique endogène capable d'assurer une périodicité de 24h indépendamment de stimuli environnementaux et d'adapter cette périodicité en fonction de la précocité ou du retard de certains stimuli (exposition à une lumière, température) ([McClung, 2006](#)). [Chincinska et al. \(2008\)](#) et [He et al. \(2008\)](#) ont montré que le gène *LeSUT1* de la tomate possède un élément *cis* de réponse appelé *Evening Element* sous la forme d'une séquence AAAATATCT qui permet l'expression du gène en fin de période de jour, notamment par le biais du rythme circadien ([Harmer et Kay, 2005](#)). Les transporteurs StSUT1 et StSUT4 de la pomme de terre, localisés sur le plasmalemma des tubes criblés, montrent des niveaux de transcrits qui oscillent dans les feuilles même en lumière continue en chambre de culture ([Chincinska et al., 2008](#)) avec un maximum différent de celui de la tomate, en milieu d'héméroperiode ([Figure 46](#)) ([Kühn et al., 1997](#) ; [Chincinska et al., 2008](#)). Le transporteur StSUT2 (aux niveaux de transcrits faibles mais au rôle inconnu) montre quant à lui une périodicité différente de variation de ses transcrits, avec un maximum en début d'héméroperiode ([Figure 46](#)) ([Chincinska et al., 2008](#)). **Ces différences d'induction des niveaux de transcrits entre transporteurs de groupes différents et entre espèces ne permettent pas d'affirmer qu'une**



**FIGURE 46.** Quantification des niveaux d'ARNm de transporteurs de saccharose en lumière continue et des transcrits *StSUT1* dans l'obscurité (Chincinska *et al.*, 2008). Unités arbitraires en % du gène de l'ubiquitine.

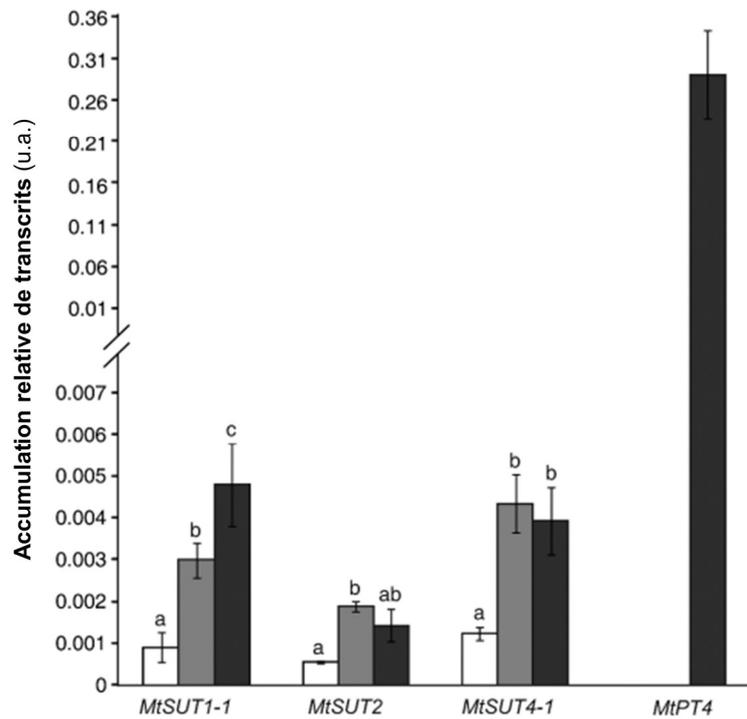
**régulation de type circadienne puisse être généralisée à tous les SUTs, chez toutes les espèces.**

### **3. Modulation des puits par des micro-organismes**

L'importance de la régulation de transporteurs de glucides (mais rarement de SUTs) a été mise en évidence chez de nombreux végétaux à l'échelle du gène et de la protéine dans le cadre d'interactions avec des micro-organismes (*e.g.* champignons, bactéries) pathogènes et symbiotiques. Dans ce type d'interaction, la plante doit en effet compenser les perturbations du métabolisme du carbone causées par la compétition ou le partage des glucides avec ces micro-organismes qui pourraient être perçus comme un puits additionnel qu'il faut approvisionner en carbone.

#### **a) Bactéries pathogènes**

De nombreuses études menées chez le riz ont par exemple démontré le rôle indéniable des SWEETs (plus particulièrement OsSWEET11, 12, 13 et 14) dans le transfert des glucides de la plante hôte par les agents pathogènes la colonisant (Yang *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2011). Ces quatre facilitateurs d'export des glucides vers l'apoplasme sont en effet régulés positivement par des souches bactériennes de *Xanthomonas* (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Ces souches utilisent différentes protéines effectrices pour cibler les régions promotrices de ces SWEETs et ainsi permettre leur surexpression afin de conduire à une libération de glucides que ces bactéries peuvent alors assimiler à leur profit (Antony *et al.*, 2010). De plus, OsSWEET11, OsSWEET12 et OsSWEET14 font partie du clade III des SWEETs, et ils pourraient à ce titre être impliqués dans le transport plus spécifique du saccharose (Eom *et al.*, 2015). L'induction de leur transcription pourrait ainsi permettre d'augmenter l'efflux de saccharose à destination de l'apoplasme des cellules végétales, où il serait disponible pour être prélevé par les micro-organismes (Chen *et al.*, 2010 ; Baker *et al.*, 2012). Il a aussi été mis en évidence un mécanisme inverse, où la régulation transcriptionnelle ou de l'expression protéique de SWEETs (chez la tomate ; Asai *et al.*, 2016) ou de transporteurs d'hexoses (AtSTP13 chez *A. thaliana*; Yamada *et al.*, 2016) permettait de limiter le développement des micro-organismes par la recapture des glucides apoplasmiques vers le cytoplasme des cellules végétales.



**FIGURE 47.** Analyse des niveaux de transcrits *MtSUT1-1*, *MtSUT2*, *MtSUT4-1* et *MtPT4* (transporteur de phosphate) dans les racines de Luzerne tronquée (*Medicago truncatula* L.) (Doidy *et al.*, 2012). Les plantes ont été traitées avec un traitement fort-phosphate (HP, 1.3 mM, en blanc) ou faible-phosphate (LP, 0.13 mM, gris) ou faible-phosphate et inoculé avec le champignon mycorhizien *G. intraradices* (noir).

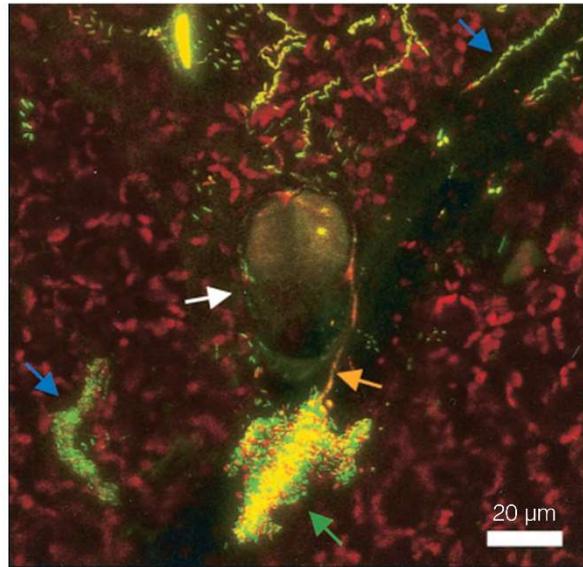
**Cependant, le rôle des SUTs n'a a priori pas été démontré dans la littérature dans les interactions avec les micro-organismes pathogènes, mais plutôt dans les interactions symbiotiques.** Ainsi, chez la luzerne tronquée (*Medicago truncatula* L.) et la tomate, leur rôle a été mis en évidence au sein des systèmes mycorhiziens à l'interface racinaire entre la plante-hôte et le champignon symbiotique (Figure 47) (Doidy et al., 2012 ; Boldt-Burisch et al., 2011). Les niveaux relatifs de transcrits *SUTs* augmentaient significativement dans les feuilles (en parallèle d'une diminution des teneurs en glucides solubles), tandis que dans les racines, les teneurs en glucides augmentaient. Ce constat a permis de proposer l'hypothèse que la présence du champignon est comparable au développement d'un puits supplémentaire que la plante approvisionne en saccharose par l'augmentation de son exportation depuis les sources telles que les feuilles (Garcia et al., 2016).

### **b) Bactéries de la phyllosphère**

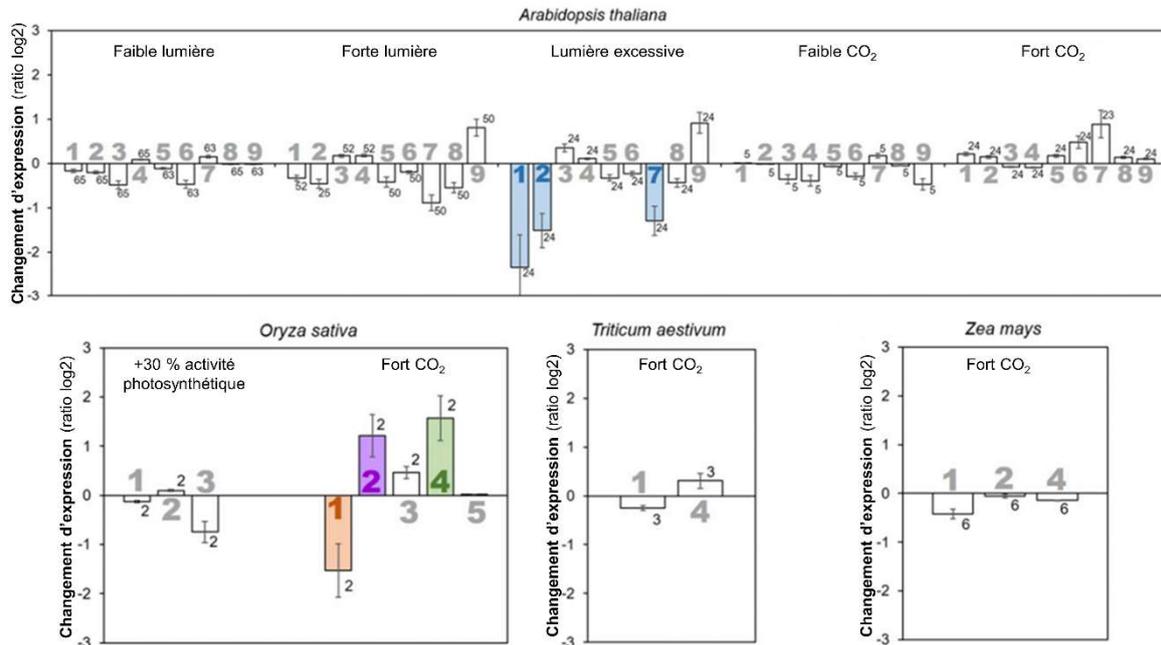
**Très peu d'études s'intéressent à l'effet des bactéries non pathogènes présentes non pas sur les parties racinaires mais sur les parties aériennes (i.e. la phyllosphère).** Or, les bactéries sont présentes en nombre sur les limbes, à raison de  $10^6$  à  $10^7$  cellules par  $\text{cm}^2$  (Andrews et Harris, 2000). Leur présence au niveau de la phyllosphère pourrait non seulement avoir un impact sur le métabolisme glucidique des plantes hôtes, mais **elles pourraient aussi exercer un effet sur la qualité du lait du fait de leur présence sur une espèce prairiale telle que le ray-grass anglais.** En effet, dans les prairies, la surface des parties aériennes du ray-grass anglais est colonisée par des bactéries épiphytes (Figure 48) (Lindow et Brandl., 2003). De plus, à la surface de leurs feuilles, de nombreuses espèces végétales présentent des glucides ayant possiblement fui vers l'apoplasme depuis le mésophylle (Fiala et al., 1990). **Les bactéries de la phyllosphère seraient donc en compétition constante entre elles et avec la plante hôte pour les ressources carbonées de leur hôte,** si bien que ces glucides seraient le facteur principal limitant en retour la croissance et la diversité bactérienne (Mercier et Lindow, 2000).

## **F. Régulation des SUTs par les glucides**

La majorité des études réalisées sur la régulation transcriptionnelle des SUTs ont été réalisées sur ceux responsables du chargement direct du phloème dans les feuilles sources de carbone. Encore très récemment, l'importance de cette régulation des gènes de SUTs responsables du chargement direct du saccharose dans les feuilles a d'ailleurs été



**FIGURE 48.** Micrographie confocale de la microflore naturelle de la phyllosphère de Haricot (Lindow et Brandl, 2003). Un large agrégat de bactéries (flèche verte), qui inclut aussi un hyphes de champignon (flèche orange) s'est formé à la base d'un trichome glandulaire (flèche blanche). Les bactéries sont également présentes à la jonction des cellules et sur les nervures (flèches bleues). L'arrière-plan rouge correspond à l'auto-fluorescence des chloroplastes des cellules.

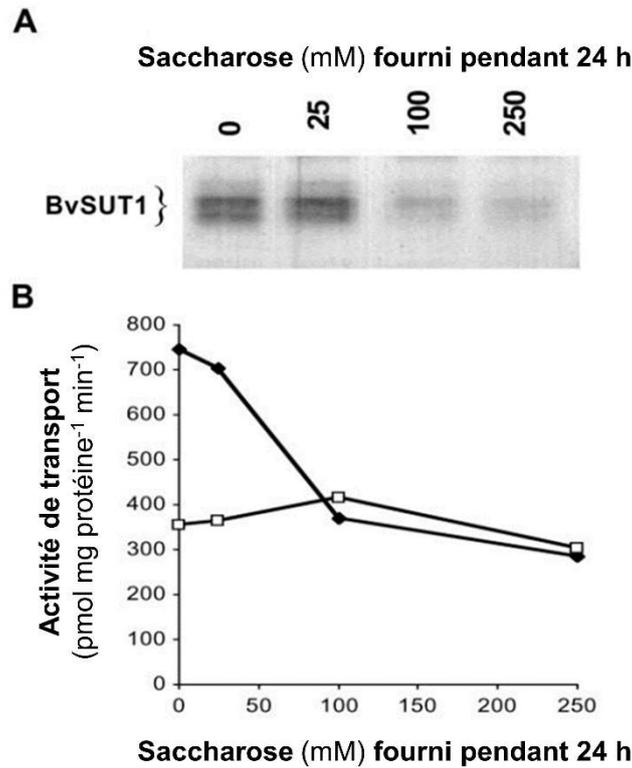


**FIGURE 49.** Influence de la modification de l'intensité lumineuse, du CO<sub>2</sub> atmosphérique, ou de la vitesse d'activité photosynthétique (Pn) sur l'expression du gène de *SUTs* (Xu *et al.*, 2018). **(A)** *Arabidopsis*. **(B)** Riz. **(F)** Blé. **(G)** Maïs. Les différences significatives sont signalées par les couleurs. Les chiffres indiquent le groupe du transporteur SUT mesuré.

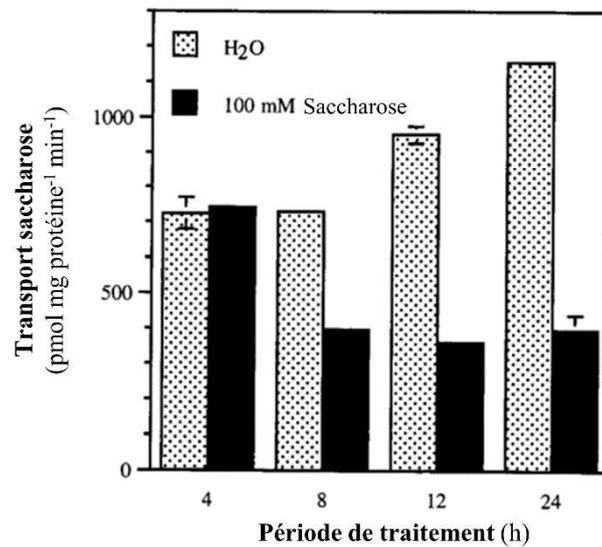
précisée par une publication de [Xu et al. \(2018\)](#) au cours de la première année de ce travail doctoral. Dans un premier temps, les données de transcription de gènes *SUTs* obtenues dans la littérature en réponse de facteurs abiotiques (l'intensité lumineuse, la concentration en CO<sub>2</sub>, la sécheresse, la température) chez 9 Angiospermes (5 dicotylédones et 4 monocotylédones, dont le maïs, le riz, le blé et l'orge, qui sont par ailleurs des espèces à chargement apoplasmique) ont été normalisées et comparées. Dans un second temps, des expérimentations complémentaires ont été menées sur une sélection d'espèces végétales, dont le maïs et le blé ([Figure 49](#)) ([Xu et al., 2018](#)). Il a été démontré que l'augmentation observée de la capacité d'exportation de saccharose dans les tissus sources en réponse à certains de ces facteurs n'avait pas toujours d'effet sur la régulation transcriptionnelle des *SUTs* responsables du chargement direct du saccharose, malgré la variation des concentrations locales en glucides. En revanche, une diminution de cette capacité d'exportation était généralement accompagnée d'une diminution des transcrits *SUTs*. Une régulation positive des *SUTs* est donc suggérée comme se déroulant au niveau post-transcriptionnel. Ces facteurs modifient aussi les teneurs en glucides solubles, et notamment celles du saccharose. **Les variations de concentrations en glucides observées lors de l'étude de facteurs abiotiques et biotiques pourraient constituer des signaux idéaux pour la régulation de l'expression des gènes *SUTs*.**

## 1. Effet des glucides sur l'activité des *SUTs*

Par expression hétérologue en levures, il a été démontré chez l'épinard (*Spinacia oleracea* L.) que l'activité du transporteur SoSUT1 augmentait de plus de deux fois lorsque les levures étaient pré-incubées 30 s avec de 10 mM de glucose ou de fructose ([Riesmeier et al., 1992](#)). Chez *A. thaliana*, 10 mM de glucose induisent aussi un triplement de la V<sub>max</sub> des transporteurs AtSUC1 et AtSUC2 ([Sauer et Stolz, 1994](#)). En revanche, par expression hétérologue dans des ovocytes de xénope, l'activité de transport de saccharose était inhibée en présence de 10 mM de glucose pour HvSUT1 chez l'orge ([Sivitz et al., 2005](#)) et ShSUT1 chez la canne à sucre ([Reinders et al., 2006](#)). De manière comparable, chez la luzerne tronquée, l'activité du transporteur PmSUC2 était inhibée en présence de di- ou tri-saccharides tels que le tréhalose et le raffinose ([Gahrtz et al., 1994](#)). Il semble donc que la variation des concentrations ainsi que la nature des glucides jouent un rôle contrasté vis-à-vis de l'expression des transporteurs de saccharose. Un effet inhibiteur du saccharose lui-même a été démontré sur l'activité des *SUTs* dans une étude de [Chiou et Bush \(1998\)](#). Des vésicules de plasmalemmes de feuilles excisées ont permis de mettre en évidence une



**FIGURE 50.** Abondance des protéines BvSUT1 et activité de transport en réponse à un apport exogène de saccharose (Vaughn *et al.*, 2002). **(A)** Immunotransfert de PMVs isolées de feuilles approvisionnées en quantités croissantes de saccharose pendant 24 h. **(B)** Transport du saccharose (losanges noirs) et de l'alanine (carrés blancs) dépendants de la force protomotrice dans les mêmes PMVs.



**FIGURE 51.** Activité de transport du saccharose nécessitant un symporteur sur le plasmalemme de vésicules isolées de feuilles de betterave (*Beta vulgaris* L.) traitées avec H<sub>2</sub>O ou 100 mM de saccharose pendant 4, 8, 12 ou 24 h (Chiou et Bush, 1998).

diminution de 50 à 65% du transport de saccharose ( $V_{\max}$ ) de BvSUT1 lorsque les feuilles excisées d'origine ont été incubées pendant plus de 8 h en présence de 100 mM de saccharose radiomarqué (Chiou et Bush, 1998). En revanche, une concentration en saccharose supérieure (250 mM) ne conduisait qu'à une diminution de 20 à 25% de cette activité de transport après 24 h d'incubation (Chiou et Bush, 1998). Ce dernier résultat est différent de ceux d'une expérimentation ultérieure, lors de laquelle cette diminution de l'activité de BvSUT1 était continue avec une gamme de saccharose exogène similaire après 24 h d'incubation sans différence du traitement 250 mM (Figure 50) (Vaughn et al., 2002). **Une telle régulation pourrait permettre, lorsque le saccharose est abondant, de limiter l'exportation de ce dernier depuis les limbes pour provoquer l'accumulation de glucides solubles et l'inhibition en retour de l'activité photosynthétique. Elle pourrait également permettre l'accumulation de réserves carbonées.**

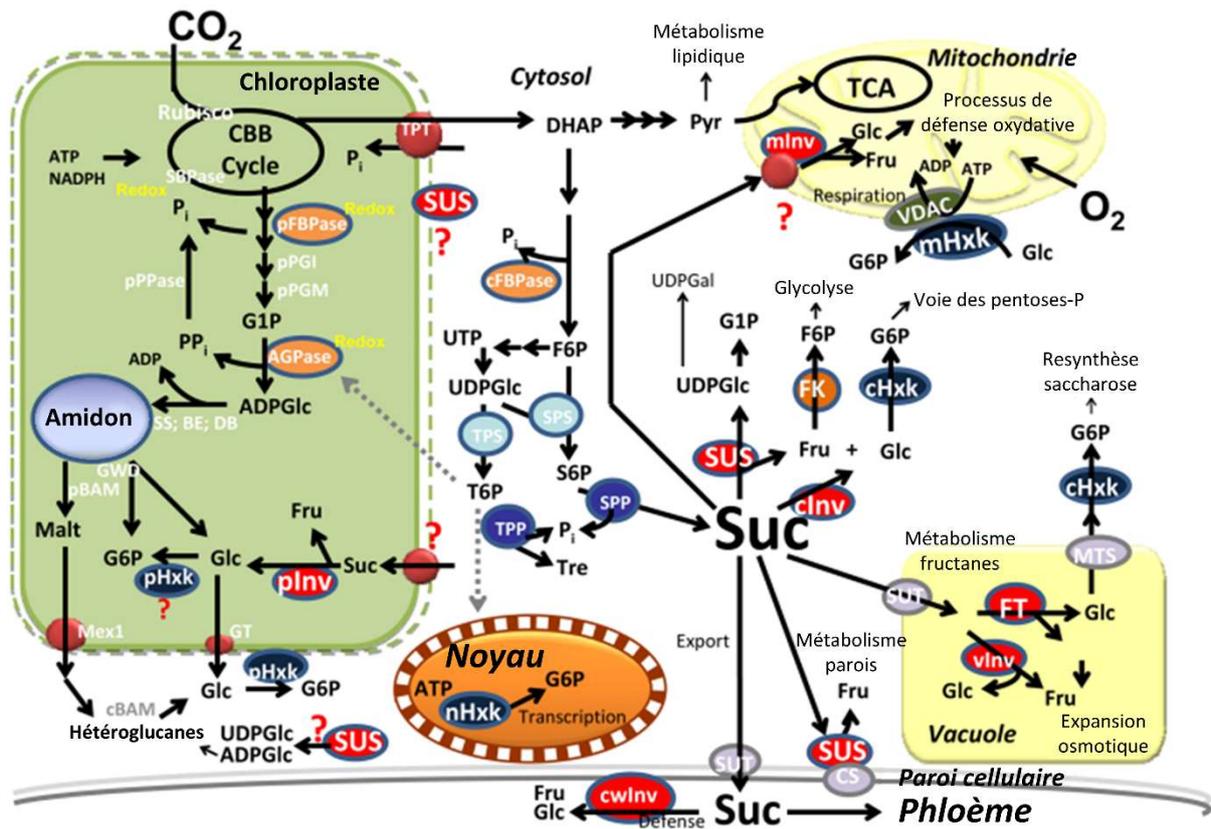
Chez le ray-grass anglais, l'activité du transporteur LpSUT1 (et à l'inverse de celle de LpSUT2) mesurée en expression hétérologue chez la levure était 30% plus élevée lorsque les levures étaient pré-incubées pendant 30 s avec 10 mM de fructose (Berthier et al., 2009 ; 2014). LpSUT2 pourrait alors être un senseur de fructose pour la régulation des SUTs chez le ray-grass anglais.

**La régulation de l'activité des SUTs vis-à-vis des glucides semble être sous l'influence de facteurs multiples encore mal connus, si bien qu'il est nécessaire de commencer par l'étude de la régulation de l'expression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des SUTs.**

## 1. Effet des glucides sur l'expression des SUTs

L'effet du saccharose sur la régulation transcriptionnelle de gènes du métabolisme carboné a pu être observé au cours d'expérimentations impliquant l'ajout de saccharose exogène. Avec des constructions de gène rapporteur *patatin-GUS* (qui utilise le promoteur d'une *lipid acyl hydrolase* très présente dans les tubercules de pomme de terre), une forte augmentation de l'indice de coloration GUS a été mise en évidence avec l'ajout de 300 à 400 mM de saccharose sur des explants de pomme de terre (Wenzler et al., 1989). Cette induction était aussi observée par expression hétérologue de cette construction chez le tabac. **Il existerait donc des promoteurs de gènes sensibles à la concentration en saccharose et le mécanisme de perception du saccharose serait très probablement conservé au sein de différentes espèces végétales (Wenzler et al., 1989).**

Concernant les SUTs, la régulation de l'expression de transcrits *SUTs* par le saccharose a d'abord été démontrée dans des cotylédons de fève, *Vicia faba* L. (Weber et al.,



**FIGURE 52.** Métabolisme central des cellules photosynthétiques (Tiessen et Padilla-Chacon, 2013). Le carbone photosynthétique est converti en amidon dans le chloroplaste, et en saccharose (Suc) dans le cytosol. Le saccharose est réparti dans différentes voies métaboliques et compartiments subcellulaires par des isozymes.

**Légende :** BE : enzyme de ramification. cBAM, pBAM : bêta-amyloses cytosoliques et plastidiales. CBB : Calvin-Benson-Bassham. CS : cellulose synthase. DB : enzyme de déramification. DHAP : dihydroxyacétone phosphate. Fru : fructose. FBP : fructose-1,6-bisP phosphatase. FK : fructokinase. FT : fructosyltransférase. Glu : glucose. G6P : glucose-6P. G1P : glucose-1P. GT : transporteur de glucose. GWD : glucan water dikinase. Hxk : hexokinase cytosolique, mitochondriale, nucléaire ou plastidiale. Inv : invertase. Malt : maltose. Mex : exporteur de maltose. Pyr : pyruvate. S6P : sucrose-6P. SBPase : sedoheptulose-1,7-bisP phosphatase. SPP : sucrose-6P phosphatase. SPS : sucrose-6P synthase. SS : starch synthase. SUS : sucrose synthase. SUT : transporteur de saccharose. Tre : tréhalose. T6P : tréhalose-6P. TCA : cycle des acides tricarboxiliques. TPP : tréhalose-6P phosphatase. TPT : translocateur de triose-P. VDAC : canal anion potentiel-dépendant.

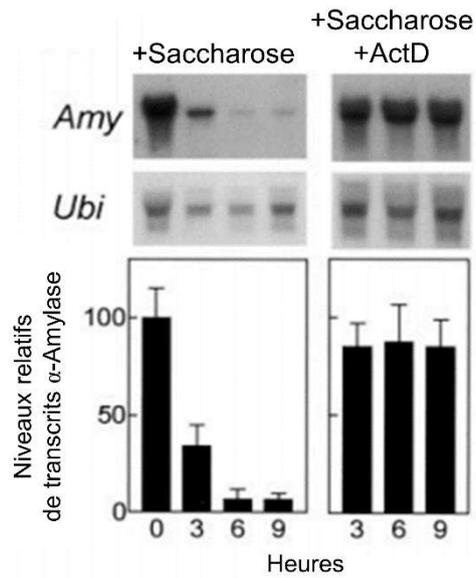
1997). L'ajout de 150 mM de saccharose exogène induisait une diminution de 50% de la quantité d'ARNm *VfSUT1* (du groupe 3, impliqué dans le remplissage des grains) dans les cotylédons contrairement à un apport de 10 mM de saccharose (Weber et al., 1997). Les mêmes effets ont néanmoins été observés, et dans les mêmes proportions, en réponse à l'ajout de glucose. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que la disponibilité des glucides *in situ* permet d'ajuster le transport du saccharose via l'expression de *VfSUT1* au cours du remplissage des grains. Chez la betterave (*Beta vulgaris* L.), espèce à chargement apoplasmique, la quantité de transcrits du gène *BvSUT1* (responsable du chargement direct du phloème depuis les limbes) diminuait jusqu'à 70% avec une gamme de concentration en saccharose allant de 0 à 250 mM (Figure 51) (Chiou et Bush, 1998). **Ainsi, il semble que plus le saccharose est disponible (pour son transport depuis les sources ou dans les puits), plus les niveaux de transcrits des gènes SUTs concernés diminuent.** Le fait que les niveaux de transcrits d'un transporteur du groupe 1 diminuent avec l'augmentation de la concentration en saccharose pourrait également laisser penser que le nombre de protéines de transporteurs n'est pas limitant, ou qu'une régulation post-transcriptionnelle (stabilité des ARNm *SUTs* ou phosphorylation, oligomérisation des protéines *SUTs*, interactions avec d'autres protéines) pourrait avoir lieu, comme récemment suggéré (He et al., 2008 ; Krügel et al., 2008 ; Xu et al., 2018).

## G. Saccharose, glucose et fructose comme molécules « signal »

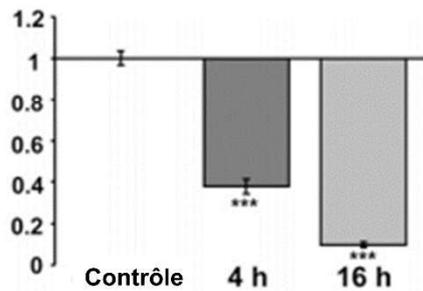
Il est connu que différentes voies du métabolisme carboné sont régulées par les glucides pour permettre une gestion très fine du carbone en réponse à des variations de l'environnement des végétaux (Figure 52) (Tiessen et Padilla-Chacon, 2012 ; Rolland et al., 2006).

### 1. Le signal saccharose

Si le saccharose lui-même était une molécule « signal » permettant la régulation des gènes *SUTs*, alors la plante pourrait réagir assez instantanément et de façon très fine et efficace aux modulations des relations sources et puits vis-à-vis du carbone. Son devenir peut être multiple au sein des voies métaboliques. Le saccharose peut en effet servir de substrat à l'établissement de réserves carbonées ou être rapidement métabolisé en glucose et fructose. Il est par conséquent difficile d'évaluer son rôle en tant que molécule « signal » (Tognetti et al., 2013).



**FIGURE 53.** Saccharose, turanose et déstabilisation déstabilisation des ARNm de l' $\alpha$ -amylase par une voie transcription-dépendante chez l'orge (Loreti *et al.*, 2000). ActD (10  $\mu$ g/mL) et saccharose (40 mM) ont été ajoutés à des embryons prétraités pendant 12 h dans 1  $\mu$ M GA<sub>3</sub> et 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Les échantillons ont été récoltés toutes les 3 h. Amy :  $\alpha$ -amylase. Ubi : ubiquitine.



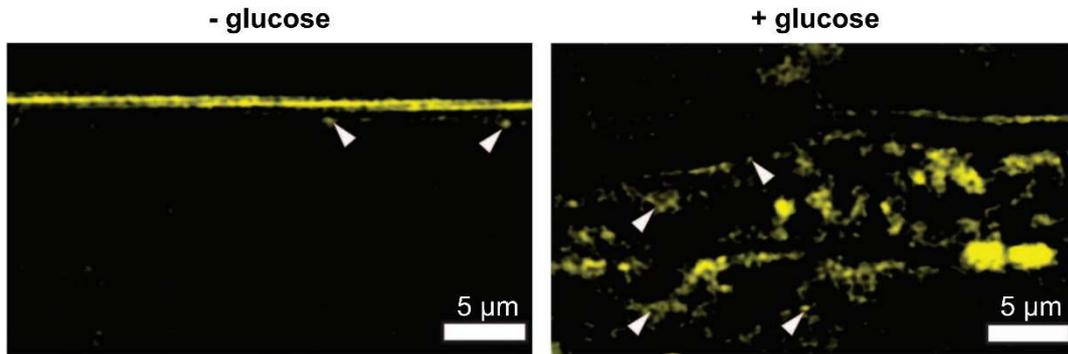
**FIGURE 54.** Répression par le glucose du gène *SUC2* dans des disques foliaires d'*Arabidopsis* de lignées sauvages incubées dans 100 mM de glucose après 4 et 16 h de traitement (Wingenter *et al.*, 2010).

En comparant son effet à celui d'analogues structuraux où une substitution artificielle des résidus fructosyl par du glucosyl ou galactosyl a été menée, il a été démontré que seuls les disaccharides possédant un résidu fructosyl déclencheraient la répression du gène de l' $\alpha$ -amylase dans le scutellum d'embryons chez l'orge (Figure 53) (Loreti et al., 2000). Mais il est important de noter que la présence du résidu fructosyl au sein du disaccharide pourrait ne pas être obligatoire selon le gène considéré. En effet, le tréhalose (Glc[1-1]Glc), qui est un disaccharide structurellement proche du saccharose, pouvait aussi contribuer à la régulation du gène de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (*Apl3*) chez *A. thaliana* (Wingler et al., 2000). **Le mécanisme de perception du saccharose pourrait être dépendant du résidu glucosyl ou fructosyl**, mais il n'est pas exclu que la perception du tréhalose, faisant appel à une voie de signalisation distincte (Loreti et al., 2001), puisse être impliqué dans la régulation transcriptionnelle des gènes *SUTs*. **Il est suggéré que des récepteurs membranaires, essentiellement plasmalemmiques et/ou tonoplastiques pourraient être responsables de la perception de ces disaccharides, rôle qui est d'ailleurs envisagé pour les SUTs du groupe 2 (Kühn et Grof, 2010) dont fait partie LpSUT2 chez le ray-grass anglais (Berthier et al., 2014).**

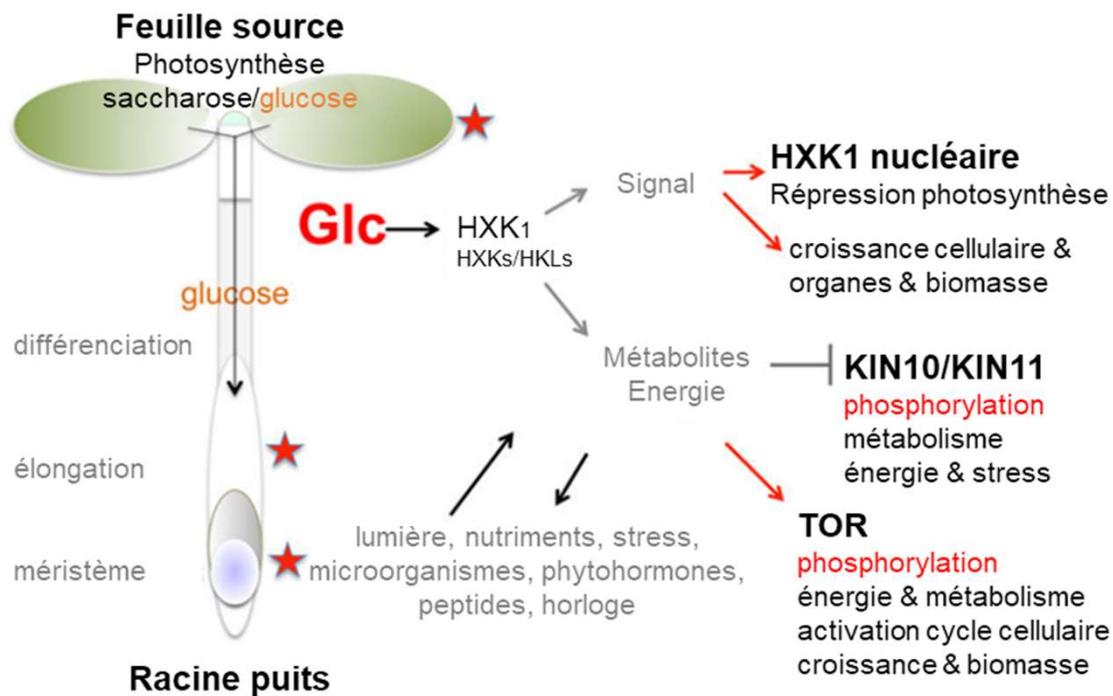
**Cependant, aucun senseur direct de saccharose n'a aujourd'hui été identifié dans la littérature et les voies de signalisation qui permettent la perception de la concentration en saccharose sont encore peu connues (Wind et al., 2010 ; Tognetti et al., 2013 ; Li et Sheen, 2016).** Le saccharose lui-même pourrait ne pas être le signal perçu. En effet, **le saccharose peut être rapidement converti en glucose et fructose (Wind et al., 2010)** si bien que l'un et/ou l'autre de ces deux molécules pourraient jouer un rôle majeur dans la signalisation glucidique chez les végétaux.

## 2. Les signaux glucose et fructose

L'effet du glucose sur la régulation de mécanismes en lien avec la gestion des ressources carbonée chez les végétaux a été démontrée chez *A. thaliana* sur des transporteur d'hexoses STP (*Sugar Transport Protein*) (Rottman et al., 2016). L'ajout *in vitro* de 50 mM de glucose exogène sur des échantillons de tubes de pollen conduisait en effet à une forte diminution des niveaux de transcrits *AtSTP4* et *AtSTP10*. Pour ce qui est des SUTs, dans une autre expérimentation, l'apport de glucose exogène (100 mM) dans des disques foliaires a montré une inhibition de plus de 60% de la transcription du gène *AtSUC2*, responsable du chargement direct du saccharose, après 4 h (Figure 54) (Wingenter et al., 2010).



**FIGURE 55.** Formation d'endosomes sur le plasmalemme en présence de glucose qui contient la protéine RGS dans des cellules d'épiderme d'hypocotyle d'*Arabidopsis* (Phan *et al.*, 2013). Les plantules exprimant la construction AtRGS1-YFP ont été traitées avec 6% de glucose suivi d'une fixation dans 4% de paraformaldéhyde avant imagerie en SR-SIM. Les flèches montrent la structure endosomale près de la membrane plasmique ponctuelle (en haut) ou en agrégat (en bas).

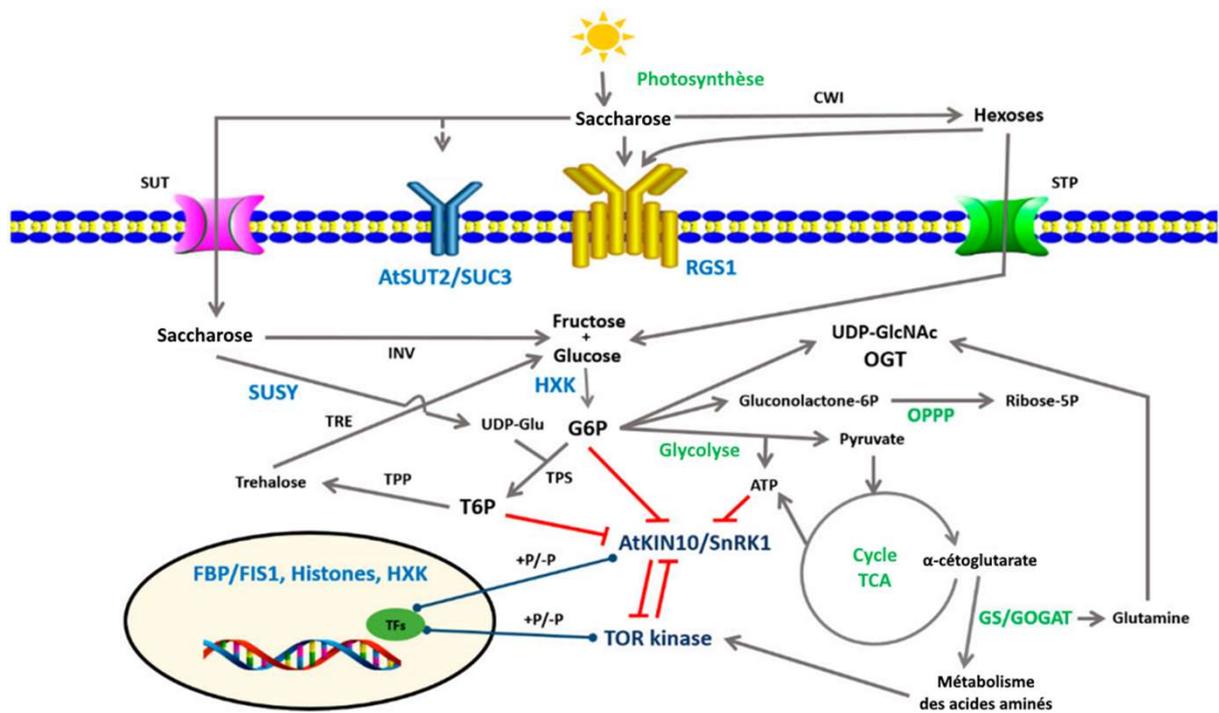


**FIGURE 56.** Réseau de signalisation par le glucose chez *Arabidopsis* (Sheen, 2014). Le glucose est produit par le tissu photosynthétique ou de réserve et transporté sous la forme de saccharose ou glucose vers le tissu puits de carbone et les organes pour favoriser la prolifération de cellules, leur élongation, expansion et pour maintenir l'homéostasie énergétique et métabolique. Les mécanismes et fonctions de régulation de 3 régulateurs majeurs, HXK1, KIN10/11 et TOR, modulés par le glucose, sont représentés. Le réseau de signalisation par le glucose est étroitement lié avec les voies de signalisation contrôlées par l'intensité lumineuse, les nutriments, les stress et microorganismes, ainsi que les phytohormones, peptides et horloges internes. Les étoiles rouges montrent les lieux d'action de la voie de signalisation par le glucose. Glc : glucose. HXK : hexokinase. HKLS : hexokinase-like. KIN : *Arabidopsis* protein kinase. TOR : *target of rapamycin*.

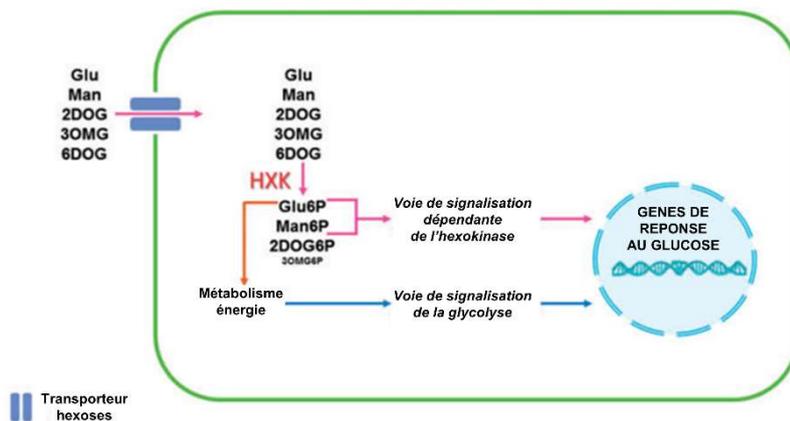
La perception de ce signal est aujourd'hui attribuée à deux mécanismes principaux. Le premier implique un récepteur à 7 domaines transmembranaire appelé RGS1 (*Regulator of G-Protein Signaling 1*) (Phan et al., 2013). RGS1 inhibe les protéines G et la présence de glucides augmentent l'activité intrinsèque GTPase de la sous-unité  $G\alpha$  de la protéine G hétérotrimérique avec laquelle il se lie, ce qui déclencherait en retour la phosphorylation de RGS1 par le recrutement de kinases WINK (*With No lysine K*) par la sous-unité  $G\beta$ , puis l'endocytose des RGS1 phosphorylés (Figure 55 et 56) (Phan et al., 2013 ; Sakr et al., 2018). L'activation des kinases WINK permettrait la transmission du signal. De plus, en fonction de la concentration en glucose, différentes kinases WINK peuvent être activées, ce qui pourrait expliquer la régulation différentielle de gènes vis-à-vis de différentes concentrations d'hexoses (pour revue complète, voir Sakr et al., 2018). Cette voie de perception des glucides reste pour le moment assez peu documentée dans la littérature. Cependant, il existe un **deuxième mécanisme de perception des hexoses, qui implique des kinases spécialisées dans la prise en charge spécifique du fructose ou du glucose.**

Pour le fructose, des fructokinases (FRK) ont été identifiées et catalysent la conversion du fructose en fructose-6P (Pego et Smeekens, 2000 ; Granot et al., 2014), mais aucun lien n'a été démontré à ce jour entre cette kinase et la régulation transcriptionnelle de gènes par le fructose (Sakr et al., 2018). Il existerait cependant une Fructose-6-bisphosphatase (FBP) au niveau du noyau qui serait capable de percevoir le signal fructose (Figure 57) (Cho et Yoo, 2011 ; Sakr et al., 2018) ainsi qu'un facteur d'inhibition de transcription (ANAC089 chez *A. thaliana*; Li et al., 2011). Le fructose comme molécule « signal » est une piste non négligeable pour la régulation de niveaux de transcrits *LpSUT1* car **le fructose est produit en grande quantité lors de la remobilisation des fructanes chez le ray-grass anglais.** Mais la connaissance très limitée de la voie de réponse au fructose rend aujourd'hui **difficile d'aller plus loin dans la compréhension du rôle des fructokinases dans la perception du fructose au cours de ce travail doctoral.**

Pour le glucose en revanche, les kinases majeures qui ont été démontrées comme responsables de la régulation de nombreux de gènes de réponse au glucose sont les hexokinases (Sheen, 2014). Les hexokinases sont des enzymes ubiquistes retrouvées dans les mitochondries, les plastes ou encore le cytoplasme et elles sont impliquées dans la phosphorylation du glucose en glucose-6P pour la première étape de la glycolyse (Xiao et al., 2000 ; Veramendi et al., 2002). Différents aspects du métabolisme carboné régulés par le glucose ont en effet été démontrés comme dépendants de la voie des hexokinases. C'est le cas par exemple de l'inhibition de la photosynthèse par le glucose (Moore et al., 2003). De plus, outre le lien direct qui existe entre la voie des hexokinases et la glycolyse par le



**FIGURE 57.** Schématisation du métabolisme glucidique et voies de signalisation chez *Arabidopsis* (Sakr et al., 2018). La perception des glucides fait appel à des senseurs de glucose (HXK : hexokinase, OGT : O-Glucose N-acétyl transférase) ; des senseurs de fructose (*i.e.* FBP/FIS1 : fructose-1,6-bisphosphatase) ; des senseurs de saccharose et d'hexoses (RGS1 : *regulator of G-protein signaling*) et des senseurs putatifs de saccharose (SUSY : SUcrose Synthase, le transporteur de saccharose putatif AtSUT2/SUC3). Deux senseurs « énergie » sont présents en aval de la perception des glucides : AtKIN10/SnRK1 (*sucrose non-fermentation-related protein kinase 1*) et la TOR kinase (*target of rapamycin kinase*). CWI : invertase pariétale ; G6P : glucose-6-phosphate ; GS/GOGAT : glutamine synthetase/glutamate oxoglutarate aminotransférase ; INV : invertase ; OPPP : voie oxydative des pentoses phosphate ; STP : Sugar transport protein ; SUT : sucrose transporter ; cycle TCA : cycle des acides tricarboxyliques ; TFs : facteurs de transcription ; TPS : T6P synthase ; TPP : trehalose 6P phosphatase ; T6P : trehalose 6-phosphate ; UDPGlc : Uridine diphosphate glucose ; UDPGlc-NAC : UDP N-acetylglucosamine.



**FIGURE 58.** Les analogues de glucose non métabolisables sont utilisés pour faire la différence entre les voies de signalisation dépendantes ou indépendantes de l'hexokinase (Aguilera-Alvarando et Sánchez Nieto, 2017). Glu : glucose, Glu6P : glucose-6P, 2DOG : 2-déoxyglucose, 6DOG : 6-déoxyglucose, 3OMG : 3-O-méthylglucose, Man : mannose, HXK : hexokinase.

produit de leur activité enzymatique, il a également été démontré des interactions possibles avec certaines phytohormones, dont l'acide abscissique, l'éthylène, les auxines et les cytokinines (Moore et al., 2003 ; Cho et al., 2010 ; Sheen., 2014). Cependant, le fonctionnement de ces interactions reste peu connu car très complexe et aux conséquences multiples pour la plante. Il a aussi été démontré grâce à la disponibilité de mutants dépourvus d'hexokinases que la présence de ces dernières était nécessaire pour observer la répression par le glucose de l'expression de certains gènes codant des transporteurs d'hexoses STP (Cordoba et al., 2014). De plus, en utilisant des analogues structuraux du glucose (2-déoxyglucose, mannose et O-méthylglucose, 6-déoxyglucose) pouvant ou non être phosphorylés par l'hexokinase ainsi que des inhibiteurs de son activité de phosphorylation (mannoheptulose, glucosamine), il a été démontré que la perception et la transmission du signal pouvait se produire à trois niveaux différents autour de la voie de l'hexokinase :

**i) par fixation du glucose sur le site actif de l'enzyme, indépendamment de l'activité de phosphorylation.** Par l'utilisation de lignées transgéniques dont l'hexokinase conservait son site catalytique et de transduction du signal, mais perdait son activité de phosphorylation, ce sont les premières enzymes végétales décrites dont l'activité enzymatique et de signalisation était indépendante (Moore et al., 2003). Leur site catalytique serait également capable d'accepter le fructose, mais différents auteurs ne considèrent que le glucose comme signal exclusif car les hexokinases possèdent une affinité 100 fois plus forte pour ce dernier que pour le fructose (Gonzali et al., 2002 ; Cho et Yoo, 2011).

**ii) par l'activité de phosphorylation de l'hexokinase** qui pourrait initier la transduction d'un signal vers d'autres voies internes de signalisation pour permettre de réguler les gènes de réponse au glucose (Aguilera-Alvarado et Sánchez-Nieto, 2017),

**iii) par un glucide intermédiaire de la voie de la glycolyse**, encore plus en aval de l'hexokinase, qui aurait à son tour un rôle de signal pour d'autres voies de perception et de transmission du signal,

Il serait donc possible de déterminer si la régulation transcriptionnelle de *LpSUT1* en réponse au saccharose, glucose (dérivé du saccharose) ou fructose (dérivé des fructanes) serait dépendante ou non de la voie des hexokinases en utilisant des analogues structuraux des glucides (Figure 58) et en suivant l'évolution des niveaux de transcrits *SUTs*, de façon similaire à la littérature (Sakr et al., 1997 ; Chiou et Bush, 1998 ; Vaughn et al., 2002).



En conclusion, le saccharose, mais également les glucides qui lui sont associés, (comme le glucose et le fructose), pourraient donc être les molécules « signal » qui, par la modification de leurs concentrations *in situ*, permettraient à la plante de percevoir une modification des relations sources-puits entre les organes. En retour, cela permettrait de finement réguler l'expression de gènes *SUTs* pour adapter à chaque instant le transport du saccharose en réponse à un environnement fluctuant. **Cependant, cette relation n'a pas encore été mise en évidence pour les gènes des transporteurs *SUTs* impliqués dans le transport latéral, comme par exemple *LpSUT1* chez le ray-grass anglais.**

## H. Objectifs de recherche

Le transport du saccharose serait l'élément limitant la gestion fine et efficace de la distribution du carbone chez les plantes à chargement apoplasmique. Dans ce mécanisme, la régulation transcriptionnelle des gènes *SUTs* semble importante, mais elle a essentiellement été menée sur les *SUTs* du groupe 1, responsables du chargement direct du saccharose dans le phloème. Chez le ray-grass anglais, il a été démontré une forte augmentation des niveaux de transcrits *LpSUT1* en réponse à la défoliation, pour permettre une mobilisation du carbone issu de la dégradation des fructanes pour la refoliation. Or, le transporteur *LpSUT1* est un élément-clé du transport latéral dans les organes sources de carbone et devrait permettre d'augmenter l'importation du saccharose dans les organes puits, deux étapes encadrant le transport à longue distance du saccharose régit par les *SUTs* du groupe 1.

**Ainsi, l'hypothèse fonctionnelle à l'origine de ce travail doctoral est que la régulation des niveaux de transcrits *LpSUT1* est l'élément-clé de la distribution active des ressources carbonées entre les organes sources et les organes puits du ray-grass anglais.**

Cependant, les informations sont manquantes en ce qui concerne les limbes, sources principales de carbone de la plante. Il existe également d'autres facteurs de l'environnement susceptibles de moduler les relations sources-puits du ray-grass anglais. Dès l'instant où l'assimilation (photosynthèse), l'anabolisme, le catabolisme ou le flux de saccharose sont affectés de façon significative par l'un de ces facteurs, une régulation modulée du transport du saccharose est attendue.



**Le premier objectif de ce travail doctoral a alors consisté à apporter des résultats originaux sur la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* en réponse à la modulation des relations entre organes sources et puits, en utilisant des facteurs biotiques et abiotiques susceptibles de provoquer une perturbation importante de la disponibilité du saccharose dans les limbes chez le ray-grass anglais.**

**Le chapitre 1** consiste en l'étude de la régulation des teneurs en glucides solubles et des niveaux de transcrits *LpSUT1* dans les feuilles (limbes et gaines) du ray-grass anglais en réponse au cycle nyctéméral et au rythme circadien (facteurs abiotiques) lors d'un suivi sur deux jours avec une photopériode de 8 h de nuit et 16 h de jour, suivie d'une période de 23 h de nuit prolongée. Ce chapitre a été rédigé sous la forme d'un article qui a été soumis à un comité de lecture (*The transcriptional regulation of the lateral sucrose transporter LpSUT1 is independent of the diel variations of sucrose content in leaf blades and leaf sheaths of Lolium perenne - Physiologia Plantarum*).

**Le chapitre 2** étend l'étude de la régulation transcriptionnelle de *LpSUT1* vers un facteur biotique. En collaboration au travers d'un projet soutenu par la région Normandie (appelé « Microphyllos »), des souches bactériennes ont été isolées de la phyllosphère de ray-grass anglais de prairies pâturées et elles ont été pulvérisées au niveau foliaire sur des plants de ray-grass anglais cultivés en serre. L'évolution des teneurs en glucides solubles et des niveaux de transcrits du gène *LpSUT1* a été suivi pendant 7 jours. En parallèle, la densité et la localisation des populations bactériennes a été suivie par microscopie électronique à balayage et confocale. Ce chapitre a également été rédigé sous la forme d'un article qui va être soumis *Plant Physiology and Biochemistry (Phyllosphere bacteria induce the mobilization of fructans and sucrose and the transcriptional up-regulation of the sucrose lateral transporter Lp-SUT1 in Lolium perenne)*.

Les facteurs biotiques et abiotiques provoquent souvent des variations des teneurs en glucides importantes. Or, les glucides sont des molécules « signal » impliquées dans la régulation du métabolisme carboné, mais aussi de l'activité et de l'expression des SUTs. Le saccharose, mais aussi le glucose et le fructose qu'il peut produire, sont de potentiels candidats. Cependant, leur implication dans la régulation transcriptionnelle de *LpSUT1* est encore inconnue. Parmi les voies de perception d'un tel signal, celle du glucose qui implique la voie de l'hexokinase est la mieux caractérisée à ce jour. Or, aucun lien n'a, à notre connaissance, été établi entre cette voie et la régulation transcriptionnelle des gènes *SUTs*.



**Le deuxième objectif de ce travail doctoral a donc consisté à déterminer si le saccharose, le glucose et/ou le fructose étaient des molécules « signal » et si la voie de l'hexokinase était impliquée dans la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1*.**

**Le chapitre 3** a visé à rechercher les signaux glucidiques et l'implication potentielle de l'hexokinase vis-à-vis de la régulation de l'expression transcriptionnelle de *LpSUT1* dans des limbes. Cela a été réalisé en incubant la base des limbes excisés de ray-grass anglais dans différentes solutions de glucides et leurs analogues structuraux (métabolisables ou non) ainsi qu'avec un inhibiteur de l'activité de phosphorylation de l'hexokinase (glucosamine). L'existence d'un signal saccharose a été testée avec des traitements à 100 mM de saccharose et 100 mM de palatinose ainsi qu'en présence de glucosamine (10 mM). L'existence d'un signal glucose et l'implication de la voie de l'hexokinase a été testée par des traitements à 100 mM de glucose ou fructose, et 10 mM d'analogues de glucose non-métabolisés (6-deoxyglucose, O-méthylglucose) ou au contraire phosphorylés (2-deoxyglucose, mannose) par l'hexokinase mais non métabolisés par la suite. Ce dernier chapitre a lui aussi été rédigé sous la forme d'un article qui sera soumis à *Functional Plant Biology* (*Sugars, hexokinase and transcriptional regulation of the lateral transporter LpSUT1 in Lolium perenne*).



# Chapitre 1

---

La régulation transcriptionnelle du transporteur latéral de saccharose LpSUT1 est indépendante de la variation nyctémérale de la teneur en saccharose dans les limbes et les gaines de *Lolium perenne*

***The transcriptional regulation of the lateral sucrose transporter LpSUT1 is independent of the diel variations of sucrose content in leaf blades and leaf sheaths of Lolium perenne***



### III. Chapitre 1

#### **La régulation transcriptionnelle du transporteur latéral de saccharose LpSUT1 est indépendante de la variation nyctémérale de la teneur en saccharose dans les limbes et les gaines de *Lolium perenne***

Lonesang H.<sup>1</sup>, Noiraud-Romy N.<sup>1</sup>, Prud'homme M.-P.<sup>1</sup>, Meuriot F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, EVA, 14000 Caen, France

**Correspondance** : Frédéric Meuriot

Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, EVA, 14000 Caen, France

Esplanade de la Paix, Université de Caen Normandie, 14032 Caen Cedex, France

Courriel : frederic.meuriot@unicaen.fr

---

**Article soumis à *Physiologia Plantarum***



## Résumé

Chez les monocotylédones, le transport nycthéral du carbone produit par la photosynthèse ou les composés de réserve (amidon et/ou fructanes) implique l'existence d'un transport actif du saccharose au travers du phloème qui s'appuie sur les transporteurs de saccharose (SUTs). Chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), LpSUT1 a été identifié et il a été suggéré qu'il serait impliqué dans le transport latéral du saccharose, avant son chargement actif dans le phloème. Le but de cette expérimentation était de mesurer l'importance de la régulation transcriptionnelle de *LpSUT1* comme facteur potentiellement limitant de la répartition rapide et efficace du carbone en réponse aux variations nycthérales des glucides. En dépit des grandes amplitudes de variation des teneurs en amidon et en saccharose dans les limbes matures et les gaines pendant le cycle nycthéral, les teneurs en fructanes, réserves de carbone majoritaire de la plante, étaient stables, en parallèle avec celles du glucose et du fructose. De ce fait, les fructanes sont les réserves de carbone à long terme ou d'urgence tandis que l'amidon et le saccharose constituent des réserves transitoires. Les niveaux de transcrits *LpSUT1* et les teneurs en glucose tendent à décliner à la fin d'une période de nuit prolongée. Les hexoses, plutôt que le saccharose, pourrait de ce fait jouer le rôle de molécules « signal » pour la régulation du gène *LpSUT1* chez le ray-grass anglais.

## Mots-clés

Transport du saccharose, fructanes, amidon, cycle nycthéral, rythme circadien



## **Abstract**

In monocots, the diel transport of C from photosynthesis or storage compounds (starch and/or fructan) involves an active transport of sucrose through the phloem relying on sucrose transporters (SUTs). In perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), LpSUT1 was identified and suggested to be involved in the lateral sucrose transport before its active loading in the phloem. The aim of the present study was to assess the importance of the transcriptional regulation of LpSUT1 as it could be the true key-element for fast and efficient C partitioning in response to diel sugar variations. Despite high variations of starch and sucrose contents in leaf blades and leaf sheaths during the diel cycle, the content of fructans, corresponding to the main C reserve in leaves, remained stable, together with fructose and glucose contents. Fructans act therefore as long term and emergency C storage while starch and sucrose are transitory reserves. Surprisingly, *LpSUT1* relative transcript levels stayed similar all along the diel cycle. *LpSUT1* relative transcript levels and glucose content tended to decline at the end of the following extended night. Hexoses rather than sucrose are then suggested to be putative signal molecules for the regulation of *LpSUT1* in ryegrass.

## **Keywords**

Sucrose transport, fructan, starch, diel cycle, circadian clock



## A. Introduction

During their lifespan, plants are submitted to a large array of ever-changing environmental stresses. Therefore, a tight and fine control of their C metabolism and partitioning both within and between tissues is necessary to optimize their growth and development (Kühn and Grof, 2010; Osorio *et al.*, 2014). In leaves of most temperate grasses and cereals, the photo-assimilated C leads to the production of starch and sucrose which can be used locally to sustain the cell metabolism or stored as fructans (Pollock and Cairns, 1991). Fructans are hydrosoluble fructose polymers produced from sucrose and found in 15% of plant species (Hendry and Wallace, 1993). It is estimated that 80% of the sucrose produced in photosynthetic leaves is loaded into the phloem sap for its further long-distance export towards C sink tissues (Ainsworth and Bush, 2011). Even if the long-distance transport of sucrose is defined by a sucrose gradient between different tissues along the path (*i.e.* mass flow; Lacoïnte and Minchin; 2008; De Schepper *et al.*, 2013), prioritization between source and sink tissues in apoplastic loading species is nevertheless influenced by the presence of active sucrose transporters that allow the loading of sucrose in the phloem. These proteins called Sucrose Transporters (SUTs) have been identified and characterized for more than two decades, but their regulation was only recently reported to be a key-step for the long-distance transport of sucrose between source and sink tissues, especially for the active loading of sucrose into the phloem (Lemoine *et al.*, 2013; Durand *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018). Other families of SUTs with different tissular or sub-cellular locations and functions were also described (Kühn and Grof, 2010). In Sugarcane (*Saccharum sp.*), *ShSUT1* is expressed in both leaf and stems (Casu *et al.*, 2003). It was localized in the cells surrounding the phloem (in the bundle sheath) but never in the phloem itself. *ShSUT1* was suggested to be involved in the sucrose import into the sucrose-accumulating stems of sugarcane or for sucrose export to the sinks, before it reaches the phloem cells (Rae *et al.*, 2005). Since such transporters could limit the following active loading of sucrose in the phloem and its subsequent distribution within the plant tissues, the role of lateral sucrose transporters in plants should be further investigated.

In perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), which is the predominant species in temperate grasslands and as such the backbone of sustainable agriculture, sucrose transporters 1 and 2 (LpSUT1 and LpSUT2, respectively) were identified and characterized (Berthier *et al.*, 2009; 2014). In grasses, a mature leaf is composed of a blade and a sheath. In both part of the leaves, the transporters were immunolocalized at the plasma membrane of the mesophyll and parenchyma bundle sheath cells, but neither in



the companion cells nor in the sieve elements of the phloem (Berthier et al., 2014). Since both the transcript and protein expression of LpSUT2 were very low, LpSUT1 was suggested to be the only SUT involved in the lateral transport of sucrose within the leaves. LpSUT1 serves an important dual purpose by allowing sucrose accumulation near the phloem cells in the source tissues (*i.e.* the leaf blades) and facilitating sucrose unloading in the sink tissues (*i.e.* the leaf sheaths). Additionally, when the plant was submitted to severe defoliation through the removal of all leaf blades, a strong up-regulation of *LpSUT1* transcript occurred in the leaf sheaths that undergo a sink-source transition (Berthier et al., 2009; 2014; Furet et al., 2012). This was observed in parallel to the depletion of sucrose and fructans. In consequence, the authors suggested that the transcriptional up-regulation of *LpSUT1* would lead to a concomitant increase of transporter proteins and of associated lateral transport of sucrose towards the phloem, to cope with the massive mobilization of fructans, which was previously shown to be responsible for the fast recovery of the plant after defoliation (Morvan-Bertrand et al., 2001). The lateral sucrose transport could therefore be one of the key-elements for fast and efficient C distribution amongst plant tissues in response to ever-changing environment.

At both the whole-plant and tissue levels, fluctuations of the environment are perceived and induce modifications of sugar contents within and between source and sink tissues (Roitsch, 1999). In the source leaves, it has long been reported that the succession of light and night periods (*i.e.* the diel cycle) strongly modulates the diurnal photosynthetic activity together with the sucrose and starch contents in the leaves (Bläsing et al., 2005; Borland and Farrar, 1985; 1989; Johnson, 2016). In strawberry leaves (*Fragaria ananassa* D.), the increase of the sucrose content over the light period was positively correlated to the increase of phloem sucrose loading (Miyoshi et al., 2017). The transcript levels of SUTs involved in direct phloem loading showed oscillation in leaves over the diel cycle. In carrot leaves (*Daucus carota* L.), *DcSUT1* expression was high at noon and low at midnight (Shakya and Sturm, 1998). In tomato leaves (*Solanum lycopersicum* L. also called *Lycopersicon esculentum* M.), *SISUT1* showed the highest expression at the end of the light period (Kühn et al., 1997). *ZmSUT2*, a vacuolar sucrose transporter in maize leaves (*Zea mays* L.), displayed a strong diel expression pattern, highest at the end of the light period and lowest at the end of the night period (Leach et al., 2017). Therefore, literature reveals that a strong need for sucrose export exists when photosynthesis is active, in the middle of the light period or near the shift between light and night. This need for sucrose could in return up-regulate the transcript levels of sucrose lateral transporters to match this demand but this has yet to be demonstrated. Indeed, sugar themselves could act as



signals and play a role in the tight regulation between C availability, demand and transport in each tissue and at all time, with sucrose being a relevant candidate because it is widely used by the C metabolism and transported by SUTs (Chiou and Bush, 1998; Durand et al., 2018). *SUTs* expression, however, could also be modulated by other sugars than sucrose, such as glucose (Weber et al., 1997) or fructose (Furet et al., 2012).

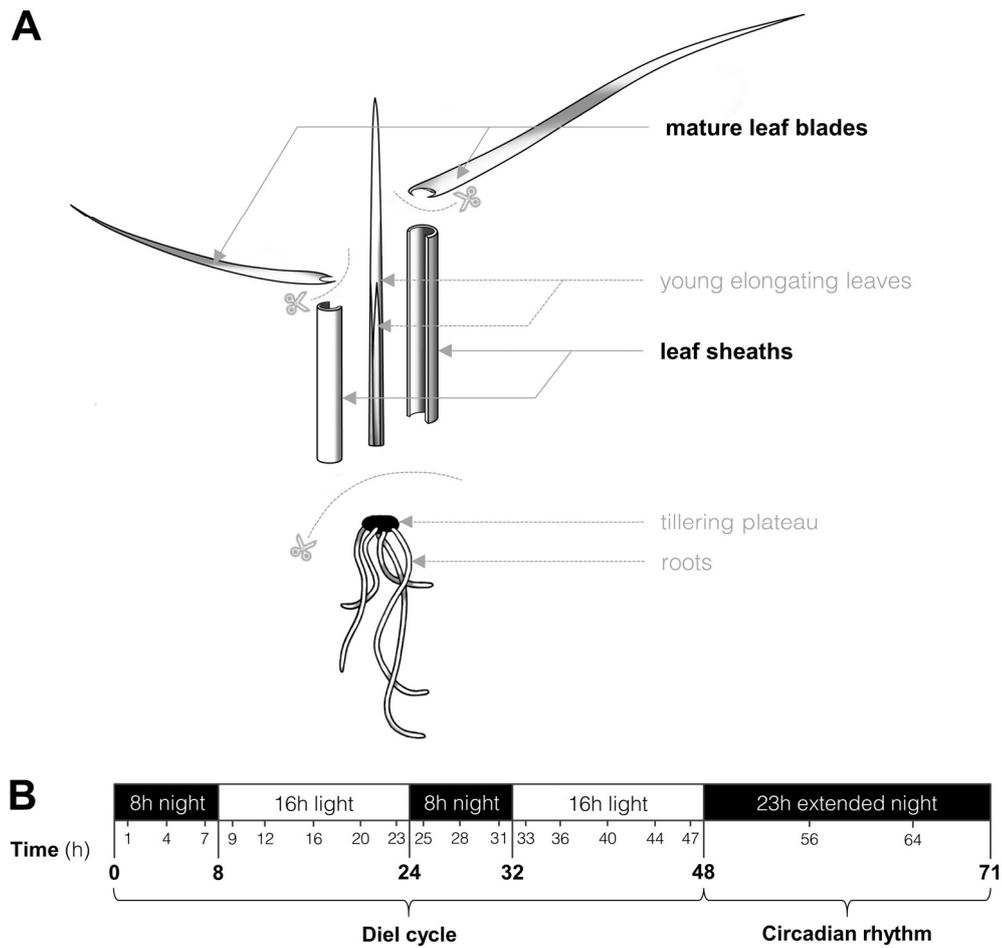
Only few studies assessed the possible transcriptional regulation of *SUTs* genes by the endogenous genetic clock called the circadian rhythm (McClung, 2006), which effects could be hidden behind a diel cycle. In potato leaves (*Solanum tuberosum* L.), StSUT1 and StSUT4 are involved in the direct phloem loading. Their transcript levels continued to increase and decrease in continuous light as they did over the diel cycle (Chincinska et al., 2008). Therefore, the transcriptional regulation of sucrose transporters could also be modulated by the circadian rhythm and this must be considered.

To our knowledge, neither the effects of the diel cycle nor the circadian rhythm on the regulation of the transcript levels of lateral sucrose transporters have been investigated in monocots. So far, LpSUT1 is the only known SUT transporter involved in the lateral transport of sucrose in perennial ryegrass. Knowing that the lateral transport of sucrose can be a limiting-step for the subsequent distribution of sucrose within the whole plant and according to the roles proposed for LpSUT1 in source (*i.e.* leaf blades) and sink (*i.e.* leaf sheaths) tissues of ryegrass, following its expression could be of particular interest. Therefore, the aim of this study was to assess whether the variations of sugars contents in source and sink tissues over the diel cycle and an extended night would lead to a coordinated transcriptional regulation of LpSUT1. An increase of *LpSUT1* expression is expected in the middle of the light period or at the shift between light and night period to cope with C needs. Plants were submitted to 8 h (night)/16 h (light) photoperiod for 2 days to assess the effects of the diel cycle, followed by 23 h of extended night to evaluate the effects of the circadian rhythm. Sugar contents and *LpSUT1* relative transcript levels were quantified during the time-course of the experiment with emphasis around the shifts between light and night periods.

## **B. Materials and method**

### **1. Plant material and growth conditions**

Seeds of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. AberAvon) were germinated on perlite and osmotic water then grown hydroponically in a greenhouse for 7 weeks on a



**FIGURE 59. (A)** Schematic representation of a perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) single tiller. A plant is a tuft composed of tillers all gathered on a tillering plateau. Each tiller is composed of mature leaf blades and their associated leaf sheaths that surround elongating growing leaves with a shoot meristem at their base. Harvested leaf tissues (mature leaf blades and their associated leaf sheaths) are presented in bold. **(B)** The effects of the diel cycle (first 48 h) and the circadian rhythm (23 h of extended night) were studied during the 71-hour time-course of experiment.

nutrient solution which composition was described by [Gonzalez et al. \(1989\)](#). The nutrient solution was aerated and changed every week to avoid any nutrient deficiency. Natural light was supplemented with lamps producing a photosynthetic photon flux density (PPFD) of  $440 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at canopy height during a 16 h/8 h day/night photoperiod at  $24^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$  on average. Prior to the experiment, plants were acclimated in a phytotron (Aralab FITOCLIMA D1200, Albarraque, Portugal) for 3 days at  $20^{\circ}\text{C}/18^{\circ}\text{C}$ , 16 h/8 h day/night with  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 60% relative humidity. For the experiment, plants were subjected to 8-hour night followed by 16-hour light during two consecutive days followed by 23 h of extended night. Mature leaf blades and their associated leaf sheaths were harvested separately after the removal of the young elongating leaves located at the center of each tiller ([Figure 59A](#)). Harvest times were 0, 1, 4, 7, 8, 9, 12, 16, 20, 23, 24, 25, 28, 31, 32, 33, 36, 40, 44, 47, 48, 56, 64 and 71 h with shorter harvest times near the shifts between night and light periods ([Figure 59B](#)). Plants were harvested in four replicates and sampled for sugar content and *LpSUT1* molecular analysis, after an immediate freezing in liquid nitrogen and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

## 2. Water soluble sugar analysis

Freeze dried samples were ground to dust using ball milling (0.5 mm stainless steel balls) (Retsch®, Haan, Germany) and fructans, sucrose, glucose and fructose contents in mature leaf blades and associated leaf sheaths were analyzed.  $40 \text{ mg DW}^{-1}$  were used to extract the water-soluble sugars with ethanol 80% and two water extractions as described before by [Lothier et al. \(2007\)](#).  $100 \mu\text{L}$  of each sample was purified on ion exchange resins ( $150 \mu\text{L COO}^{-}$ ,  $160 \mu\text{L}$  Pyrovinylpyrrolidone,  $250 \mu\text{L H}^{+}$ ) in Mobicol™ columns (MoBiTec, Göttingen, Germany). Purified fractions were then analyzed for soluble sugars by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Sugar-Pak-I™ column (Waters®, Milford, USA) and with a Ca-EDTA eluent at  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . The area of the different peaks of elution was integrated using the provided Breeze™ software by comparison with a soluble sugar standard ( $1 \text{ g L}^{-1}$  inulin, sucrose, glucose and fructose).

## 3. Starch enzymatic assay

Starch content analysis in mature leaf blades and their associated leaf sheaths was performed using the Total Starch Assay procedure from Megazyme® (Bray, Ireland) following the manufacturer protocol and as seen in [Ould-Ahmed et al., 2015](#). The pellets

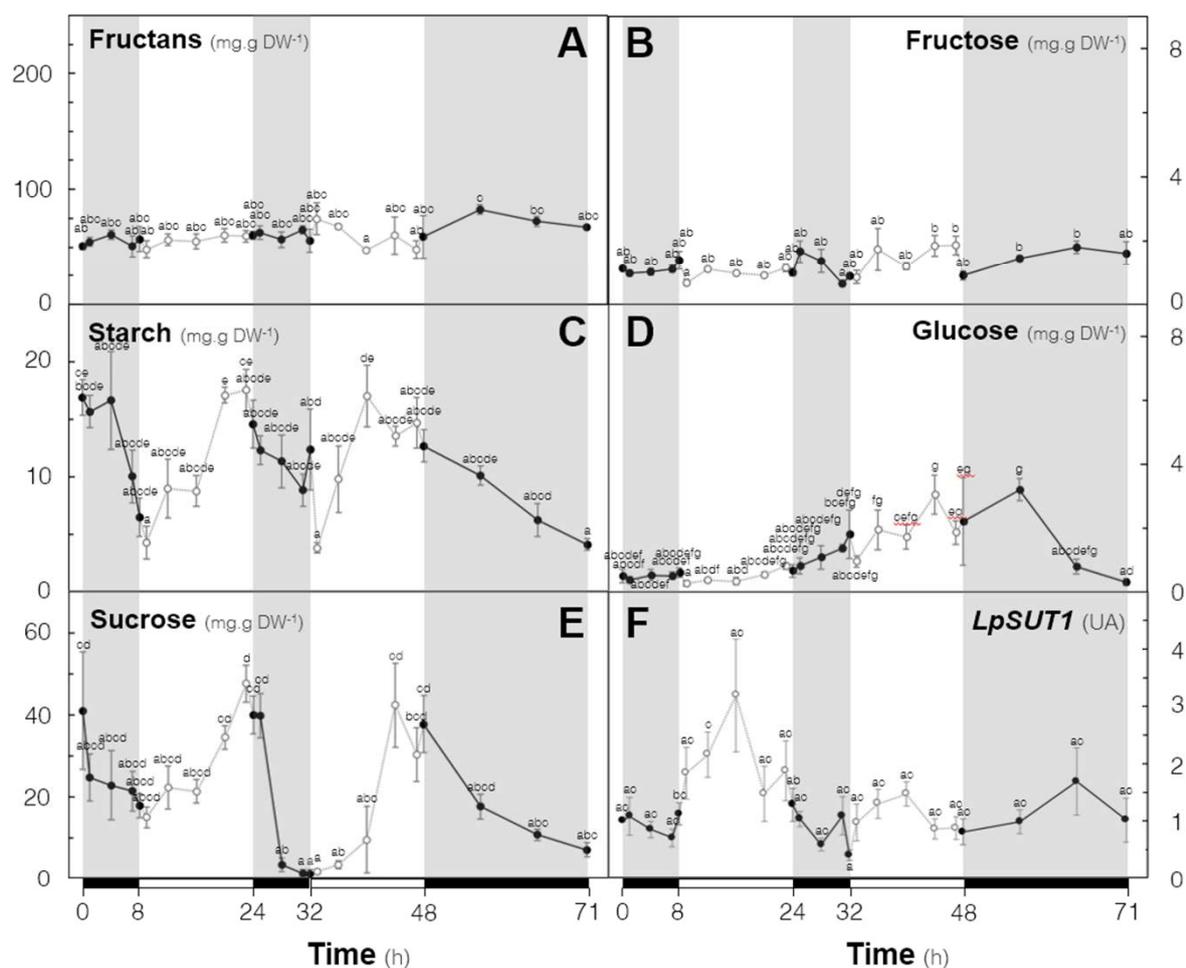


obtained during the previous sugar extraction step were used for starch (*i.e.* non water-soluble polymer, unlike fructans) analysis. Briefly, sample starch was broken down using a combination of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase enzymes. Produced glucose was then assessed using the GOPOD reagent (glucose oxidase/peroxidase) by spectrophotometry at 510 nm and starch content was deduced by comparison with internal maize starch (90-96%) and glucose ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) standards.

#### 4. Transcript level analysis

Analyses were conducted to assess the variation of the relative transcript levels of *LpSUT1* during the time-course of the experiment in mature leaf blades and their associated leaf sheaths. Dedicated samples ( $n = 3$  per harvest time for each harvested tissue) were ground using liquid nitrogen. Total RNA was extracted with Qiagen® RNeasy Mini Kit following the provided protocol. RNA integrity was tested against the 260/230 nm ratio (ranging from 1.9 to 2.1) and with a migration on a 1.2% agarose gel in a Tris-Acetate-EDTA 0.05X buffer. Reverse transcription was performed using  $1 \mu\text{g}$  of total RNA and iScript® cDNA synthesis kit (Bio-Rad®, Marnes La Coquette, France) in a thermocycler with the following parameters: 5 min at  $25^\circ\text{C}$ , 30 min at  $42^\circ\text{C}$  and 5 min at  $85^\circ\text{C}$ . Normalization of gene expression data of *LpSUT1* in real-time quantitative PCR involved the selection of *eEF1a* (eukaryotic Elongation Factor 1a) and of *eIF4a* (eukaryotic Initiation Factor 4a) as reference genes based on their superior stability compared to *18S* r RNA, *25S* r RNA and *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase). The corresponding specific primers used were SUT1F (5'-CAGGCAAGTATGGACCCAGT-3') and SUT1R (5'-ACCAAACACATGCACAGGAA-3') for *LpSUT1*, eEF1aF (5'-GGCTGATTGTGCTGTGCTTA-3') and eEF1aR (5'-CTCACTCCAAGGGTGAAAGC-3') for *eEF1a* and eIF4aF (5'-CCCTTGAGGGTATCAAGCAG-3') and eIF4aR (5'-ACTCCCTCATGATGATGTCC-3') for *eIF4a*. After a cDNA dilution at 1/100 in ultrapure water, a quantitative PCR was performed using a mix of  $4 \mu\text{L}$  cDNA,  $7.5 \mu\text{L}$  SYBRGreen®,  $0.75 \mu\text{L}$  forward/reverse primers and  $2 \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  with the following program: 3 min denaturation at  $95^\circ\text{C}$  and 35 cycles (10 s at  $95^\circ\text{C}$  and 40 s at  $60^\circ\text{C}$ ) in a thermocycler (C1000 Thermal Cycler and CFX96 Real-Time System from Bio-Rad®). Fluorescence was measured at 520 nm using the provided Opticon Monitor 3.0 software from Bio-Rad®. Following amplification, the relative expression ratio of the target gene was calculated using the efficiency (E) adjusted  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method as described by Pfaffl (2001). This was done

## MATURE LEAF BLADES



**FIGURE 60.** Evolution of the (A) fructans, (B) fructose, (C) starch, (D) glucose, (E) sucrose contents and (F) *LpSUT1* relative transcript levels in mature leaf blades submitted to different light regimes to study the effects of the diel cycle during the first 48 h (8 h night/16 h light) and the circadian rhythm (23 h of extended night). Night periods are represented by black and grey areas and light periods by white areas. When larger than symbols, error bars represent  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 4$  (sugar contents) and  $n = 3$  (transcript levels). Different letters above bars indicate significant differences ( $p < 0.05$ ), while *n.s.* indicates that values are not significantly different from each other.

for each sample and normalized against *EF1* and *eIF4 $\alpha$* . Results were then rescaled to 1 by comparison with the  $t_{0h}$ .

## 5. Statistical analysis

Results were expressed as the mean  $\pm$  SE for  $n = 4$  for sugar measurements and  $n = 3$  for *LpSUT1* transcripts levels (Figure 60 and 61). Statistical analysis was conducted using R Software (ver. 3.6.3, R Core Team, 2017). When data did not follow a normality law (Shapiro-Wilk) or a variance homogeneity (Bartlett) to perform a 1 factor ANOVA followed by a pairwise comparison (Tukey *t*-test), a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc comparison of the means was performed. Different letters above vertical bars indicate significant differences ( $p < 0.05$ ), while *n.s.* indicates that values are not significantly different.

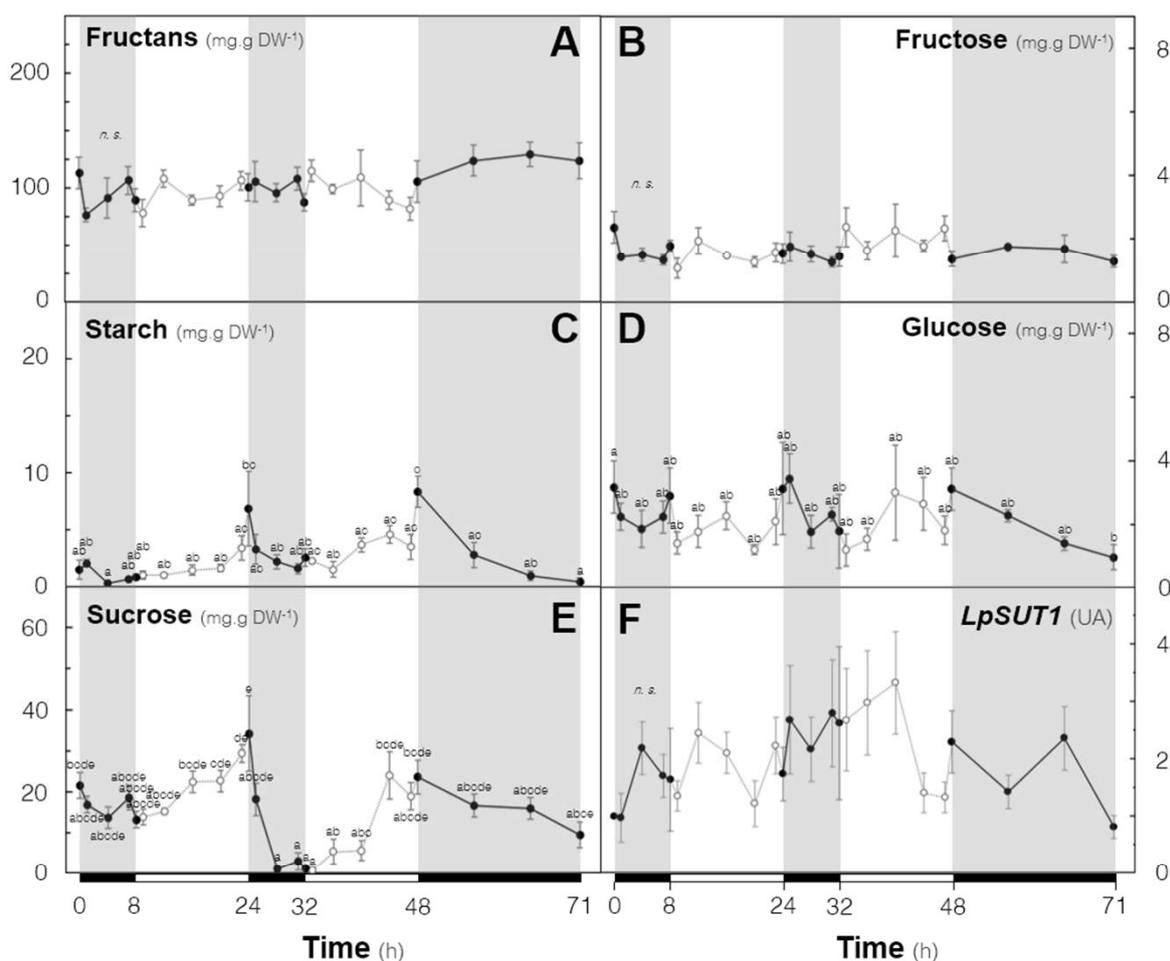
## C. Results

Fructans were quantitatively the main non-structural carbohydrate in both leaf blades and leaf sheaths (approximately 45% of the total carbohydrates on average), followed by sucrose and starch, and far beyond glucose and fructose contents (Figures 60 and 61).

### 1. Sugar content and *LpSUT1* relative expression in mature leaf blades

Fructans and fructose contents remained stable during most of the experiment and averaged  $60 \pm 2$  and  $1.2 \pm 0.1$  mg g DW<sup>-1</sup> during the diel cycle and the extended night (Figure 60A and 60B, respectively). Starch content decreased rapidly by approximately 70% during the night period and increased during the first part of the light period of the diel cycle, leading to similar contents as those measured at the start of the night period (Figure 60C). The decrease of the starch content was slower during the 23 h of extended night than during the night period of the diel cycle (Figure 60C). Glucose content remained stable during the first diel cycle and significantly increased during the second one and declined at the end of the extended night (Figure 60D). Together with starch content, sucrose content showed contrasted variations during the diel cycle and the extended night (Figure 60C and 60E). Similarly to starch, a significant depletion of more than 55% of the sucrose content

## LEAF SHEATHS



**FIGURE 61.** Evolution of the **(A)** fructans, **(B)** fructose, **(C)** starch, **(D)** glucose, **(E)** sucrose contents and **(F)** *LpSUT1* relative transcript levels in leaf sheaths submitted to different light regimes to study the effects of the diel cycle during the first 48 h (8 h night/16 h light) and the circadian rhythm (23h of extended night). Night periods are represented by black and grey areas and light periods by white areas. When larger than symbols, error bars represent  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 4$  (sugar contents) and  $n = 3$  (transcript levels). Different letters above bars indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Tukey  $t$ -test), while *n.s.* indicates that values are not significantly different from each other.

occurred rapidly during the night period and followed by a significant increase during the light period of the diel cycle. By contrast with starch, sucrose content can reach very low levels at the end of the night periods. During the extended night period, sucrose content did not decrease as fast as it is observed during the two previous night periods of the diel cycle (Figure 60E). Relative transcript levels of *LpSUT1* showed no significant variation during the whole course of the experiment, irrespective of the diel cycle and the extended night period (Figure 60F). However, they tended to increase during the first part of the light period and declined thereafter.

## 2. Sugar content and *LpSUT1* relative expression in leaf sheaths

Fructans and fructose contents showed no significant variations during the diel cycle and the following extended night period (Figure 61A and 61B). Glucose content remained stable during the diel cycle but tended to decline during the extended night (Figure 61D). Starch content showed diel pattern of accumulation and depletion but to a much lesser extent than in leaf blades (Figure 61C). Similarly to starch, sucrose content declined during the night and increased during the light periods of the diel cycle. During the second night of the diel cycle, similarly to the leaf blades, sucrose content decreased to almost negligible values in less than 4 h. Then, at the end of the light period, it increased and reached  $26 \pm 4$  mg g DW<sup>-1</sup>. Additionally, and as seen for starch and sucrose contents in leaf blades, the decrease in sucrose content was slower during the 23 h of extended night than during the night periods of the diel cycle (Figure 61E). Irrespective of the light regime, diel cycle or extended night, *LpSUT1* relative transcript levels were more or less stable during the diel cycle and tended to decrease at the end of the extended night (Figure 61F).

## D. Discussion

Little is known about the regulation of the sucrose lateral transport in leaves, when it could be the limiting step before the active loading of phloem with sucrose and its subsequent distribution within the different tissues. In ryegrass, the main represented species in temperate grasslands, it is hypothesized that the transcriptional regulation of the lateral sucrose transporter *LpSUT1* follows a diel cycle and can be altered by the circadian clock. Because literature reported that *SUTs* expression could be modulated by different sugars (Weber *et al.*, 1997; Chiou and Bush, 1998), and because *LpSUT1* serves a dual purpose in leaf blades and leaf sheaths, regulation of *LpSUT1* is expected to be



modulated by the variations of sugar contents in these tissues (Roitsch, 1999; Lemoine et al., 2013).

### **1. The decrease of starch and sucrose contents during the night period of the diel cycle in leaf blades and leaf sheaths has a low effect on *LpSUT1* relative transcript levels**

At the start of the experiment, plants were placed in night conditions. Despite the shutdown of the photosynthetic activity, the main sugar C pool represented by fructans together with fructose, the product of fructan degradation, did not show any significant variations in contents, even during the extended night of 23 h. This was not only observed in leaf blades but also in leaf sheaths. Fructan content did not decline either in leaf blades and leaf sheaths of other grasses, *Poa annua*, *Poa x jemtlandica* and *Poa pratensis*, during the night period (Borland and Farrar, 1985; 1989). This result could be surprising since fructans represent a storage C pool that is used in response to stress and disturbance. For example, it was reported that more than 80% of fructans are mobilized in less than one day in response to defoliation in leaf sheaths of ryegrass (Morvan-Bertrand et al., 2001; Berthier et al., 2009). Fructan mobilization sustains new leaf growth for a rapid return to C autotrophy (Morvan-Bertrand et al., 2001). Fructan content stability during the night period could be since the need for C was fulfilled at the expense of sucrose and starch, as it occurs in species that do not accumulate fructans.

Starch is the second C reserve. It may represent less than 25% of the non-structural carbohydrates as usually reported in leaves of fructan accumulating species (Cairns et al., 2002). It was present in higher quantities in mature leaf blades than in the corresponding leaf sheaths. In leaf blades, starch content displayed a two-fold decrease during the night period of the diel cycle. Starch content also declined in leaf sheaths but to a much lesser extent, as already reported in *Poa annua* while there was no night depletion of starch in leaf sheaths of *Poa x jemtlandica* and *Poa pratensis* (Borland and Farrar, 1985; 1989). When exists in leaf sheaths, the diel oscillation of starch could be either attributed to their low photosynthetic capacity (Borland and Farrar, 1985) or to their sink status during the light period and their source status during the night period. It is known that plants optimize starch degradation in a linear manner during the night to obtain very low levels of starch at dawn, but the precise mechanism of this regulation is still unknown (Scialdone and Howard, 2015). It has been proposed that the regulatory mechanism involves a coordinated regulation by the circadian clock (Graf et al., 2010) to anticipate the expected time of dawn



and by a real-time sensor of starch which content would be proportional to the starch reserves. This dual-sensory mechanism would allow the plant to correlate the time left before dawn with its current starch availability, and react by slowing down starch mobilization if the night is made longer (Scialdone *et al.*, 2013) as probably observed here, during the extended night period. The rapid depletion of starch did not lead to a significant and parallel mobilization of glucose during the light period. It could be reasonably argued that glucose was tightly buffered by its own metabolism and conversion into sucrose. The decrease in starch content was concomitant to an even faster and larger decrease of the sucrose pool which can be almost entirely depleted in leaf blades and leaf sheaths by the end of the night.

Despite such strong decline of starch and sucrose contents during the night, the relative transcript levels of *LpSUT1* were barely and not significantly modified.

## **2. The increase of starch and sucrose contents during the light period of the diel cycle in leaf blades and leaf sheaths has a low effect on *LpSUT1* relative transcript levels**

As expected, sucrose and starch contents increased in leaf blades during the light period of the diel cycle (Trevanion, 2000). They both started to increase after a lag time of 1 h following exposure to light. By contrast, fructan content stayed similar not only in leaf blades but also in leaf sheaths, as already reported in *Poa* species (Borland and Farrar, 1985; 1988; 1989) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L) (De Souza *et al.*, 2005). Chatterton *et al.* (1989) suggested that a threshold value of near 15% of the total nonstructural carbohydrates must be present before measuring any fructan accumulation in leaves of temperate grasses. In the current experiment, this value was not reached at the end of the light period since the nonstructural carbohydrates (starch, sucrose, glucose and fructose) represented around 7% and 5% in leaf blades and leaf sheaths, respectively. The steady-state level of fructan contents indicates that the plants were in conditions where C demand equals or exceeds C supply. This does not mean, however, that the fructan pools were not subjected to rapid turnover (Borland and Farrar, 1988).

During longitudinal transport, sucrose can be leaked and retrieved, but also used and stored by sink cells along the path (Minchin and Thorpe, 1987). Leaf sheaths serve as a thoroughfare for carbohydrates from the leaf blades to other parts of the plants like leaf meristems or roots (Borland and Farrar, 1985; 1989). Unloading of sucrose in this path tissue, whether on a short- or a long-term basis, by compartmentation or through metabolism to



other carbohydrate species like starch and fructans, is considered as an important means of buffering changes of sucrose concentration in the phloem sap and of regulating assimilate partitioning between sources and sinks (Borland and Farrar, 1989). Concomitantly to the diurnal accumulation of sucrose and starch in leaf blades and leaf sheaths, a peak of expression of *LpSUT1* was expected in leaf blades to coordinate sucrose production with its exportation and in leaf sheaths, to buffer sucrose transport by facilitating sucrose unloading. But contrary to the SUTs involved in the direct phloem loading, which show high expression during the light and low expression during the night in leaves (Kühn *et al.*, 1997; Shakya and Sturm, 1998; Chincinska *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2018), the lateral sucrose transporter *LpSUT1* did not show any significant variation of its relative transcript levels in both leaf tissues. The regulation of the relative transcript levels of the lateral transporter is therefore independent of the diurnal variations of sugar contents. This is in accordance with Furet *et al.* (2012), who showed that the light regime (either 100% or 25% of the photosynthetically active radiation) had no effect on the upregulation of *LpSUT1* expression that occurred as a response to defoliation in leaf sheaths. The influence of the circadian rhythm was not possible to assess since the relative transcript levels of *LpSUT1* remained stable during the diel cycle. The stability of the transcript levels of *LpSUT1* may not be representative, however, of *LpSUT1* abundance and activity. For instance, in Tomato, the expression of *LeSUT1*, involved in the direct loading of sucrose in the phloem, did not significantly change in response to high light, low light or dark conditions (Xu *et al.*, 2018). However, protein abundance showed strong differences which coincided with changes in sucrose content of the phloem sap. Therefore, the occurrence of high variations of sucrose content in leaf blades and leaf sheaths of ryegrass in the absence of transcriptional up- and down-regulation of the lateral sucrose transporter means that the existing capacity of *LpSUT1* is large enough to face sucrose fluctuations without additional proteins or that *LpSUT1* activity is not regulated at the transcriptional, but the post-transcriptional level. Indeed, it has been demonstrated that SUT activity can be regulated through different post-transcriptional mechanisms like dimerization (Krügel *et al.*, 2008). *LpSUT1* may also work in close coordination with other sugar transporters like SWEETs (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) which play some particular roles in sugar efflux, phloem loading, plant-pathogen interactions or reproductive development (Jeena *et al.*, 2018). Indeed, in sugarcane (*Saccharum species*), 22 SWEET genes have been recently identified and *SsSWEET1b/13a/13* were reported to be the predominant players in efflux of photosynthesized sucrose to the leaf apoplast but with diel expression patterns (Hu *et al.*,



2018). Using the protein sequences of sugarcane and sorghum (*Sorghum bicolor*) SWEET genes as a reference, we identified *L. perenne* SWEET1 and SWEET13 sequences (data not shown) and it can be interesting to assess if LpSWEET and LpSUT1 may coordinately contribute to sucrose transport.

### 3. Hexoses rather than sucrose as putative signal molecules for the regulation of *LpSUT1* transcript levels

In this study, the stability of *LpSUT1* transcript levels during the diel cycle was correlated with a stability of fructan and fructose contents. Fructan contents and *LpSUT1* expression could be regulated by the same signaling pathways to coordinate the mobilization of fructans with the capacity of lateral transport of sucrose in source and sink tissues. Sucrose could be the signal (Chiou and Bush, 1998) as already suggested in the context of regrowth after defoliation (Meuriot et al., 2013). But, despite high variations in sucrose contents over the diel cycle, *LpSUT1* relative transcript levels did not show any highly significant variation so that sucrose might not be the signal that triggers the regulation of its expression. Hexoses rather than sucrose are suggested to be putative signal molecules for the transcriptional regulation of *LpSUT1* in ryegrass. One argument in favor of this hypothesis is that *LpSUT1* relative transcript levels tended to decline at the end of the extended night concomitantly with the decline of glucose and fructose contents.

In conclusion, this experiment showed that in ryegrass as in other fructan-grasses, fructan contents remained stable over the diel cycle in leaf blades and leaf sheaths. Fructans represent long-term and emergency C reserve while starch and sucrose act as transitory storage. Indeed, starch and sucrose were submitted to high shifts in their relative contents between light and night periods, with larger amplitude oscillations in leaf blades than in leaf sheaths. Such strong variations over the diel cycle did not induce the transcriptional regulation of the lateral transporter *LpSUT1*, which transcript levels stayed similar. Since glucose and fructose contents also remained stable over the diel cycle, hexoses rather than sucrose are suggested to be putative signal molecules for the regulation of *LpSUT1* in ryegrass. This will be tested in further experiments. Moreover, the spatial and temporal expression pattern of *LpSWEET1* and *LpSWEET13* will be analyzed in ryegrass plant tissues. The lateral transport of sucrose in leaf blades and leaf sheaths did not appear to be the limiting factor for the long-distance transport of sucrose



between organs, at least in standard growth conditions. In apoplastic loading species, the critical step is probably the direct phloem loading of sucrose as demonstrated in previous experiments using mutants of *SUTs* involved in this mechanism (Gottwald *et al.*, 2000; Srivastava *et al.*, 2008; Slewinski *et al.*, 2009).

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

This research received a grant from the Normandy region (France). The authors are grateful to all the staff which allowed this work to be possible with an exceptional contribution of Morvan-Bertrand A., Decau M.L., Pichon J. and Bodereau M. for the biochemical analyses and Fremont J. for the molecular analysis.



## Chapitre 2

---

Les bactéries de la phyllosphère induisent une mobilisation des fructanes et du saccharose ainsi que la régulation transcriptionnelle positive du transporteur latéral de saccharose Lp-SUT1 chez *Lolium perenne*

***Phyllosphere bacteria induce the mobilization of fructans and sucrose and the transcriptional up-regulation of the sucrose lateral transporter Lp-SUT1 in Lolium perenne***



## Transition vers chapitre 2

Pour continuer à étudier la place de la régulation transcriptionnelle du transporteur LpSUT1 des limbes dans le mécanisme de transport du saccharose de la plante, nous avons cherché à moduler les teneurs en glucides solubles en utilisant cette fois un **facteur biotique**. Ces dernières années, il a été montré qu'une régulation transcriptionnelle du transport de glucides existait en réponse à des interactions entre les plantes et les micro-organismes. Ces micro-organismes seraient perçus comme un puits en carbone supplémentaire par la plante au travers de la consommation des glucides de la plante hôte. Cependant, ces études ont été très largement menées sur des micro-organismes pathogènes, qui sont pourtant les moins présents parmi tous les micro-organismes se développant sur la plante hôte, et en particulier au niveau de la rhizosphère.

Parmi ces micro-organismes non-pathogènes, les bactéries sont quantitativement majoritaires. Ces dernières utilisent les glucides de la plante-hôte pour survivre et se développer dans l'environnement hostile représenté par la surface des parties aériennes (la phyllosphère). Le meilleur glucide candidat pour leur approvisionnement pourrait être le saccharose, qui transite dans l'apoplasme au cours du transport latéral. **Les bactéries, en prélevant ce saccharose, pourraient alors être perçues par la plante comme un puits en carbone supplémentaire, et déclencher une régulation transcriptionnelle de LpSUT1. De plus, la plante pourrait contrôler et sélectionner les populations bactériennes à sa surface en jouant sur la disponibilité de ses glucides par la régulation de transporteurs de saccharose.** Or, dans le cadre de la production laitière, la diversité de ces populations bactériennes de la phyllosphère pourrait affecter la digestibilité du ray-grass anglais et la qualité des produits laitiers par l'ingestion de ces bactéries par les bovins.

Pour explorer cette hypothèse, un projet région « Microphyllos » a été créé en collaboration avec l'équipe ABTE (Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements) et le CMABIO3 (Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie) et a permis d'obtenir des souches bactériennes isolées de champs pâturés. Quatre souches ont été pulvérisées au niveau de la phyllosphère de plants de ray-grass anglais pour mimer l'apparition d'un puits en carbone supplémentaire sur les limbes. Les teneurs en glucides solubles et la régulation transcriptionnelle du transporteur LpSUT1 ont alors été suivies après 1 et 7 jours à la fois au niveau des limbes et des gaines foliaires. Ces recherches ont permis la rédaction d'un deuxième article qui sera soumis à *Plant Physiology and Biochemistry*.



## IV. Chapitre 2

### **Les bactéries de la phyllosphère induisent une mobilisation des fructanes et du saccharose ainsi que la régulation transcriptionnelle positive du transporteur latéral de saccharose Lp-SUT1 chez *Lolium perenne***

Lonesang H.<sup>1</sup>, Noiraud-Romy N.<sup>1</sup>, Prud'homme M.-P.<sup>1</sup>, Morvan-Bertrand A.<sup>1</sup>, Ellie N.<sup>2</sup>, Goux D.<sup>2</sup>, Cretenet M.<sup>3</sup>, Dalmasso M.<sup>3</sup>, Chagnot C.<sup>3</sup>, Meuriot F.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, EVA, 14000 Caen, France

<sup>2</sup>Normandie Univ, UNICAEN, SF 4206 ICORE, CMABIO3, 14000 Caen, France.

<sup>3</sup>Normandie Univ, UNICAEN, ABTE, 14000 Caen, France

**Correspondance** : Frédéric Meuriot

Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, EVA, 14000 Caen, France

Esplanade de la Paix, Université de Caen Normandie, 14032 Caen Cedex, France

Courriel : frederic.meuriot@unicaen.fr

---

**Manuscrit d'article à soumettre, préparé pour *Plant Physiology and Biochemistry***



## Résumé

Chez le ray-grass anglais, le transporteur de saccharose *Lp-SUT1* importe le saccharose depuis l'apoplasme et représente alors un des éléments clés pour le transport latéral du saccharose vers le phloème au sein des tissus foliaires de la phyllosphère. La régulation fine de son expression devrait permettre à la plante de réguler le développement des bactéries de la phyllosphère qui consomment les glucides qui fuient depuis l'apoplasme de la plante. Des souches bactériennes (du genre *Curtobacterium* et *Hafnia*) isolées et représentatives de prairies pâturées, consommant des glucides différents, ont été pulvérisées sur les parties aériennes. La densité des populations bactériennes, les teneurs en glucides solubles et les niveaux de transcrits *Lp-SUT1* ont été mesurés après 1 et 7 jours. Les bactéries pulvérisées étaient présentes en de nombreux petits agrégats sur les feuilles, mais pas particulièrement localisées près des nervures, où la concentration interne en saccharose est la plus haute. Indépendamment de la souche bactérienne, leur présence a induit une diminution locale, large et rapide, dès le jour 1, des réserves de fructanes (-50 % en moyenne) et de saccharose dans les tissus de la phyllosphère (principalement les limbes matures), qui était uniquement concomitante avec la régulation positive de *Lp-SUT1* dans les tissus éloignés comme la base des feuilles en croissance. En dépit de la mobilisation massive des fructanes et du saccharose en réponse à toutes les souches bactériennes, qui n'était pas corrélée à une augmentation de la population bactérienne, l'expression du gène *Lp-SUT1* était positivement régulée pour une des souches *Curtobacterium* dans les limbes, dans les gaines (mais à une faible amplitude) et à la base des feuilles en croissance. Ces résultats suggèrent que la mobilisation des fructanes permettrait de compenser le puits supplémentaire que représentent les bactéries et de maintenir l'importation du saccharose dans les tissus puits par la régulation positive de l'expression du gène *LpSUT1*.

## Mots-clés

Bactéries de la phyllosphère, transporteur de saccharose, *Lolium perenne*, fructanes, sucres, glucides



## Abstract

In perennial ryegrass, the sucrose transporter *Lp-SUT1* is retrieving sucrose from the apoplast and is therefore one of the key elements for the efficient lateral transport of sucrose towards the phloem within the leaf tissues of the phyllosphere. The fine tuning of its expression should allow the plant to regulate the growth of phyllosphere bacteria which feed on sugars leaking from the plant apoplast. Strains (from *Curtobacterium* and *Hafnia* genera) isolated and representative of herd-grazed pastures with differential sugar consumptions abilities were sprayed on leaf tissues. Bacteria density, sugar contents and *Lp-SUT1* relative transcript levels were then measured after 1 and 7 days. Sprayed bacteria were present in numerous small aggregates on the leaves but not particularly located near leaf veins, where internal sucrose concentration is the highest. Irrespective of the strain, bacteria induced from day 1 a fast, local, and large mobilization of fructans (-50% on average) and sucrose in phyllosphere tissues (mainly within mature leaf blades), which was solely concomitant with an up-regulation of *Lp-SUT1* in distant tissues like the elongating leaf bases. Despite the massive fructan and sucrose mobilization in response to all bacterial strains which was not correlated with an increase of the bacterial population, *Lp-SUT1* expression was up-regulated for one of the *Curtobacterium* strain in the leaf blades, in the leaf sheaths (but to a lesser extent) and at the base of the young elongating leaves. These results altogether suggest that the fructan mobilization would compensate for the additional sink of carbon created by the bacteria presence and sustain the sucrose import into the sink tissues through the up-regulation of *Lp-SUT1*.

## Keywords

Phyllosphere bacteria, sucrose transporter, *Lolium perenne*, fructans, sugar, carbohydrates



## A. Introduction

Phyllosphere (*i.e.* the surface represented by the shoot of plants) is considered a harsh environment for the plant microbiome because of its exposure to ultraviolet light, rainfalls and daily temperature shifts (Hirano and Upper, 2000). Nevertheless, it provides a habitat for a large diversity of microorganisms like viruses, fungi, archaea and bacteria (Vorholt, 2012). Amongst all the phyllosphere microorganisms, bacteria are by far the most predominant (with up to  $10^7$  cells per  $\text{cm}^2$ ; Lindow and Brandl, 2003), are more present on the lower face of leaves (Beattie and Lindow, 1995) but are yet mostly non-pathogenic (Aragón *et al.*, 2017). Their diversity and numbers can strongly vary between different host plants, within the same plant species or over time during seasonal changes (Thompson *et al.*, 1995). Part of this diversity could also be explained by physical differences between leaf structures like the available surface, the cuticle thickness, UV exposure or the stomata presence. Leaf structures could also allow several metabolites to leak out the plant and hydrosoluble sugars are suggested to be the main factor discriminating the growth of bacteria populations (Leveau and Lindow, 2001; Miller *et al.*, 2001; Monier and Lindow, 2005). For example, sugars recovered after simple water washings of bean leaves (*Phaseolus vulgaris* 'Bush') were estimated to be enough to sustain the *in vitro* development of *Pseudomonas fluorescens* (Mercier and Lindow, 2000). However, the possible involvement of bacteria themselves in the leaking process of plant sugars is nevertheless still poorly documented for most plants and addresses a question that still needs to be evaluated.

Amongst all the soluble sugars, sucrose could represent the main target for bacteria feeding according to its ability to leak out of the plant (Ryffel *et al.*, 2016) and because it has a small molecular weight and a high cytoplasmic concentration, it is quantitatively the most represented plant hydrosoluble sugar and it is also not exclusively compartmentalized in chloroplasts or vacuoles (Lattanzi *et al.*, 2012). Sucrose is a product of photosynthesis in shoot mesophyll cells and it can be used *in situ* to both sustain the cell metabolism and fuel the synthesis and subsequent storage of glucose and fructose polymers like starch and fructans, respectively (Pollock and Cairns, 1991). However, it has been estimated that 80% of the produced sucrose was exported at long distances *via* the phloem (Ainsworth and Bush, 2011). In monocots like ryegrass (*Lolium perenne*), which is of major agro-economic importance in temperate grasslands and which has microorganisms



that largely participate in the quality of raw dairy products (Msalya, 2017; Velázquez-Ordoñez et al., 2019), this requires a step of temporary translocation of the sucrose in the cell walls continuum (the apoplast) prior to a high concentration loading of the phloem (Kühn and Grof, 2010). This is achieved thanks to the presence of active sucrose transporters (SUTs; Weschke et al., 2000; Aoki et al., 2002, 2003; Slewinski et al., 2009). In ryegrass, two *L. perenne* Sucrose Transporters (Lp-SUT1 & Lp-SUT2) have been identified and thoroughly characterized (Berthier et al., 2009; 2014). Interestingly, these transmembrane proteins were localized on the plasmalemma of the cells of all shoot tissues, respectively in the photosynthetic and parenchyma cells of source (*i.e.* the mature leaf blades) and sink tissues (*i.e.* the leaf sheaths and the elongating leaf bases), but not in the companion cells nor the sieve elements which compose the phloem vascular system (Berthier et al., 2014). These two transporters, and more particularly Lp-SUT1, are H<sup>+</sup>-sucrose symporters that actively retrieve sucrose from the apoplast. Moreover, Lp-SUT1 serves a dual purpose. In source tissues like mature leaf blades, it allows to efficiently fuel the lateral transport of this compound towards the phloem for its subsequent loading and distribution amongst the different plant tissues. In sink tissues like elongating leaf bases, it allows the efficient import of sucrose from phloem within the parenchyma cells and then closely support an active growth (Berthier et al., 2009). As such, the fine tuning of the expression of *Lp-SUT1* sucrose transporter must be of utmost importance to sequester sucrose in the plant and avoid its potential leakage towards the phyllosphere, which can allow the plant to regulate bacterial growth. Despite the increased knowledge about the sucrose transport in plants (Chen et al., 2015; Braun et al., 2014; Jeena et al., 2018), the possible link between the colonization of the leaves by phyllosphere bacteria and a transcriptional regulation of leaf sucrose transporters like Lp-SUT1 could be of relevance but was never investigated before.

Our hypothesis is that the plant can influence the bacteria growth on its leaves by up-regulating *Lp-SUT1* expression to avoid or minimize a sucrose leakage towards the apoplast, thus reducing its availability for phyllosphere bacteria and therefore preserving its export towards sink organs. The plant sugar contents and the transcriptional regulation of *Lp-SUT1* were therefore assessed, in relation to phyllosphere bacteria development on the leaves. A metagenomic approach showed that *Curtobacterium* and *Hafnia*, two genera commonly encountered in raw milk, were also present in the grassland phyllosphere (M. Dalmaso, Normandie Univ., Caen, France, unpubl. res.). Two strains from these two genera were then isolated from the samples of the same grassland. Two *Curtobacterium* strain, able to use sucrose or unable to use common plant sugars, and two *Hafnia* strain, unable to use sucrose or able to use common plant sugars, were selected



Each strain was sprayed abundantly on ryegrass phyllosphères (leaves and sheaths) to follow on the evolution of the bacteria density. The potential effects of the four bacteria strains were measured on whole-plant dry weight, total leaf blade surface, sugar contents and *Lp-SUT1* relative transcript levels in both source (*i.e.* mature leaf blades) and sink tissues (*i.e.* leaf sheaths and elongating leaf bases) for sugars. Because of the high turnover of its transcripts as seen before in response to defoliation (Berthier *et al.*, 2009), measurements were performed after 1 day to investigate the short-term effects of the strains on *Lp-SUT1* transcriptional level, and after 7 days to follow up their mid-term effects.

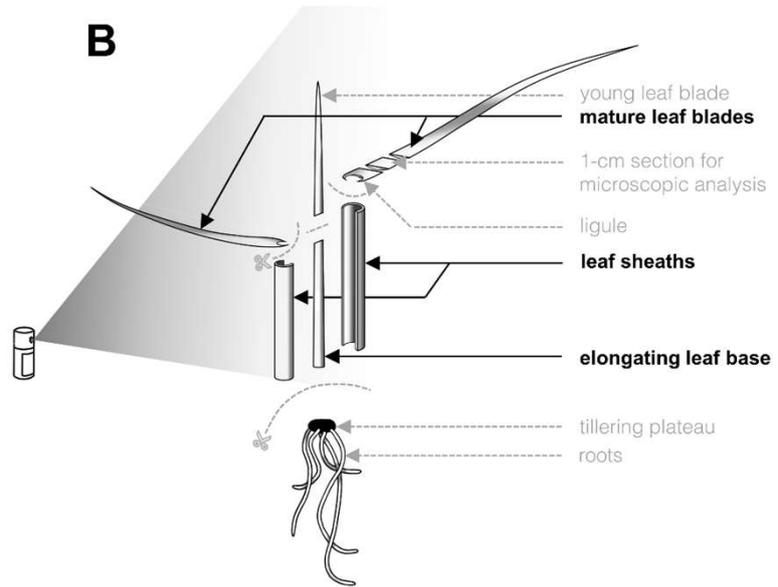
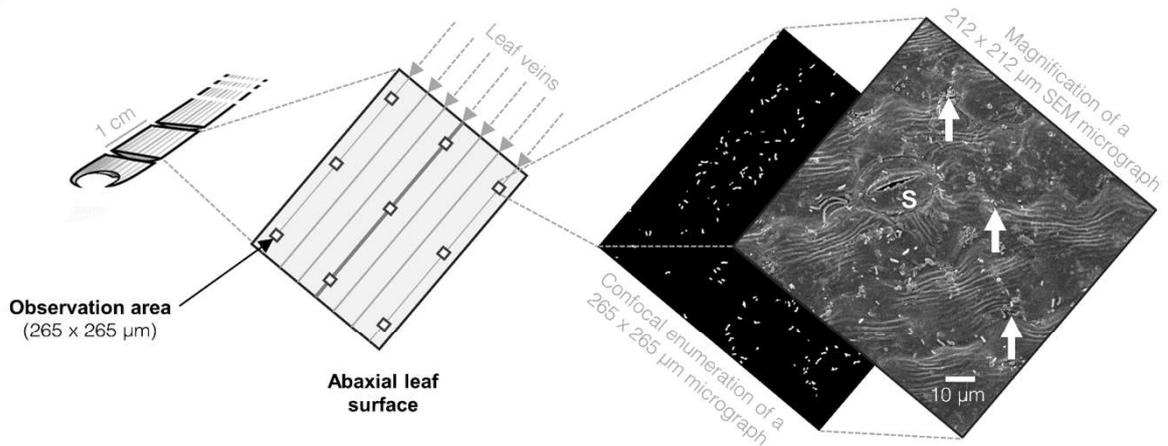
## B. Materials and method

### 1. Bacteria isolation from the field

Bacteria from the field were isolated from samples harvested from grassland plot grazed by dairy cows with a loading of 1 Livestock Unit per hectare (LU ha<sup>-1</sup>) at the INRAE experimental domain of Le-Pin-au-Haras (Normandy, France, 48°43'27.7" N, 0°10'52.2 E). To do so, 30 g of fresh matter from plant leaves were harvested wearing gloves, and using ethanol-cleaned scissors, before being placed in sterile stomacher bags containing 270 mL of phosphate buffer saline (PBS) (ThermoFisher) with 0.1% Tween 20 (ThermoFisher). The samples were shaken at 110 rpm for 5 min before a sonication step of 30 s with 2s-pulses at 40W, and 1s-pauses between pulses to detach bacteria. Bacteria enumeration was performed using 3 mL of the suspensions. Decimal dilutions in tryptone salt (Biokar) were used to enumerate total aerobic microflora on plate count agar (Biokar) at 30°C for 72 h. In parallel, methylobacteria were cultivated on *Methylobacterium* agar supplemented with 0.5% methanol (Delaney *et al.*, 2013) at 25°C for 72 h. Two *Hafnia* and two *Curtobacterium* strains were selected based on their ability to grow with glucose, fructose, sucrose, and fructans (Figure 62A). The first genus selected (*Curtobacterium*) is commonly found at the contact of udders or in relation to cheeses (Gill *et al.*, 2006; Rea *et al.*, 2007). The second genus selected (*Hafnia*) is an opportunistic enterobacteria in animals (Padilla *et al.*, 2015) but is also found in milk (Ercolini *et al.*, 2009) and cheese (Irlinger *et al.*, 2012; Yeluri Jonnala *et al.*, 2018). Each strain was incubated in De Man, Rogosa and Sharpe

**A****In vitro sugar consumption**

Strains	Glucose	Fructans	Fructose	Sucrose
<i>Curtobacterium</i> 1	+	-	-	-
<i>Curtobacterium</i> 2	+	+	+	+
<i>Hafnia</i> 1	+	+	+	+
<i>Hafnia</i> 2	+	+	+	-

**B****C**

**FIGURE 62. (A)** Selection of the four bacteria strains related to dairy production and regarding to their ability to grow on different sugars (*Curtobacterium* 1 & 2: negative and positive control; *Hafnia* 1 & 2: sucrose specificity). **(B)** Schematic representation of a perennial ryegrass (*Lolium perenne*) single tiller, which is composed of mature leaf blades and their associated leaf sheaths, that surrounds an elongating growing leaf with a shoot meristem at its base. Harvested leaf tissues (mature leaf blades, their associated leaf sheaths and the elongating leaf base) are presented in bold. **(C)** Sections of 1 cm length of the last mature leaf blade were harvested 1 cm above the ligule for confocal analysis of the abaxial leaf surface in 9 observations areas (3 on the central vein, and 6 on the sides of the leaf blade), each producing a 265 x 265 μm micrograph. A magnification of a 212 x 212 μm SEM micrograph is shown, with the white arrows pointing to bacteria aggregates in epidermal recesses. S: stomata.

(MRS) broth containing 2% Tween, for 2 days at 30°C. The use of this non-ionic detergent at this concentration was determined as optimal to allow bacteria to stay put on plant material during preliminary testing (C Chagnot, Unicaen - Univ. Rouen, Caen, France, unpubl. res.). Before use, each culture was adjusted at  $OD_{600nm} = 0.6$  using MRS medium and then transferred in separated spraying bottles. Sterile MRS broth with 2% Tween was used as control.

## 2. Plant material and growth conditions

Seeds of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. AberAvon) were sown on perlite and osmotic water and grown hydroponically in a greenhouse using a nutrient solution changed every week as described by Gonzalez *et al.* (1989). The natural light was supplemented with a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 440  $\mu\text{mol}$  of photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at canopy height (16 h/8 h of day/night at 20°C/16°C on average). To increase the effects due to the presence of the bacteria and not the biological variability within the plant material, a clone was created by separating tillers from the same 5 week-old mother plant. After 8 weeks of regrowth, plants with a high discrepancy of tiller count were sampled out 1 week before the start of the experiment. The remaining plants were then separated in individual pots and according to their future treatments ( $n = 4$  plants per treatment). One day before the beginning of the experiment, eight last mature leaf blades were identified with a single and small dot of acrylic water-based paint at the tip of the blade for each plant of the experiment. This was done to be sure to recover the mature leaf blades that were sprayed on day 0 during the whole-course of the experiment.

At the start of the experiment, using 30 mL of the previously prepared solutions of bacteria, plants were successively and abundantly sprayed by the same operator on the upper and lower face of the shoot of the plants, which includes the mature leaf blades, the leaf sheaths and the elongating leave at the center of each tiller (Figure 62B). Samples were harvested immediately ( $t = 0$  day) and after 1 and 7 days and mature leaf blades, their associated leaf sheaths and the elongating leaf bases at the center of each tiller were harvested separately (Figure 62B). Total fresh weight for each organ (mature leaf blades, leaf sheaths, elongating leaf bases and roots) was measured. A fraction of leaf blades was weighted, and the corresponding leaf blade surface was measured using a planimeter (LI 3100 area meter, LI COR, Lincoln, Nebraska, USA). For control and each treatment, samples were harvested in four replicates corresponding to 4 different plants and were immediately frozen in liquid nitrogen to be stored at -80°C until further use.



### **3. Micrograph acquisition using Scanning Electron Microscopy (SEM)**

In parallel to the harvest of plant fresh matter for other analysis, two 1-cm sections were harvested from identified last mature leaf blades (using dots of paint) by cutting 1 cm above the ligule (the morphological thickening which allows the blade to tip over) for every plant used during the experiment. This led to the harvest of 8 sections of 1 cm (*i.e.* 4 replicates of two 1-cm section) per treatment per harvest time. Each time, one of the two sections was fixed with 1% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1 M pH 7.0 during a week at 4°C for SEM analysis while the other was fixed in PFA for immediate use for the bacteria enumeration using confocal microscopy as described later on. Because sections naturally float on liquid, they were sunk with a special tube to maintain them in the fixatives. Samples were rinsed in PBS 0.1 M pH 7.0 and dehydrated in progressive bathes of ethanol (70 to 100%) and dried using critical point drying equipment (CPD 030, LEICA Microsystem). The cells were sputtered with platinum and observed with scanning electron microscope (JEOL 6400F). More than 2200 micrographs were recorded at 500x magnification and each one represented a surface of 212 x 212  $\mu\text{m}$ . It allowed to finely localize the position (near leaf veins or the stomata or in recesses between epidermal plant cells) and the distribution (near the central vein or near the edges of the leaf blade) of the bacteria (Figure 62C).

### **4. Bacteria enumeration on the lower face of blades using confocal microscopy**

To better differentiate bacteria from the leaf blade background, a semi-automated bio-informatic method using the images of confocal microscopy was created. Sections previously fixed in PFA were stained using orange acridine during 6 min and immediately observed with the addition of a mounting medium to reduce the fading of immunofluorescence (Fluorescence Mounting Medium, Agilent Dako). Confocal images were obtained using the Olympus FLUOVIEW FV1000 confocal laser scanning microscope (Olympus, Japan) and the Olympus software FV10-ASW 4.2 (Olympus, Japan) with 63x objective (N.A 1.20) from the lower face of the leaf blade sections, where bacteria were expected to be in higher numbers. For each section, nine observation areas were acquired 1-cm length section of the leaf blade following a specific scheme: three areas on both sides of the central vein and three areas on the central vein itself for a total of 9 observation



areas per section (Figure 62C). For each area, a multi-plane acquisition was performed to compensate for the non-planar ryegrass epidermis. Typical sampling resolution along x, y, and z axis were 265, 265 and 2  $\mu\text{m}$ , respectively. The number of z-planes depended on the thickness of the central vein and the ripple of the samples.

Image processing was performed using ImageJ software (Schneider et al., 2012). For each image, a maximum intensity projection of slices was computed to obtain an image containing all the bacteria on the surface of the leaf. To extract bacteria, two mean filters were applied on each image, and a difference was calculated. The automatic threshold “Maximum Entropy” (Kapur et al., 1985) was applied to keep spots masked. On the binary image (see example given in Figure 62C), a deletion of small and very large spots was achieved. Only oblong objects (morphological criteria for bacteria) were preserved. For each image, three parameters were computed: surface of leaf blade in  $\mu\text{m}^2$ , surface corresponding to bacteria in  $\mu\text{m}^2$  and number of bacteria. All images were lastly eyed-controlled, compared to SEM micrographs when errors could be observed, to remove any errors resulting of a failed automatic image processing.

## 5. Water soluble sugar analysis

Prior to the sugar extraction, samples were freeze dried and ground to dust with ball milling (0.5 mm stainless steel balls, MM400, Retsch, Haan, Germany). Dry weights of 20 to 40 mg g DW<sup>-1</sup> were submitted to 3 cycles of sugar extraction (water, 15 minutes at 80°C, 60°C and 60°C) and centrifugations to isolate the sugar supernatant as described by Lothier et al. (2007). Each sample was purified on ion exchange resins (150  $\mu\text{L}$  COO<sup>-</sup>, 160  $\mu\text{L}$  Pyrovinylpyrrolidone, 250  $\mu\text{L}$  H<sup>+</sup>; Sigma-Aldrich, St Louis, USA) prepared in Mobicol™ columns (MoBiTec, Göttingen, Germany). Purified fractions were then analyzed for their soluble sugar content by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Sugar-Pak-I™ column (Waters®, Milford, USA using 50 mg L<sup>-1</sup> Ca-EDTA as eluent at a flux of 0.5 mL min<sup>-1</sup> at 85 °C). Peak integration was performed using the manufacturer’s software (Breeze™) by comparison with a known sugar standard (inulin, sucrose, glucose and fructose at 1 g L<sup>-1</sup>).

## 6. *Lp-SUT1* transcript level analysis

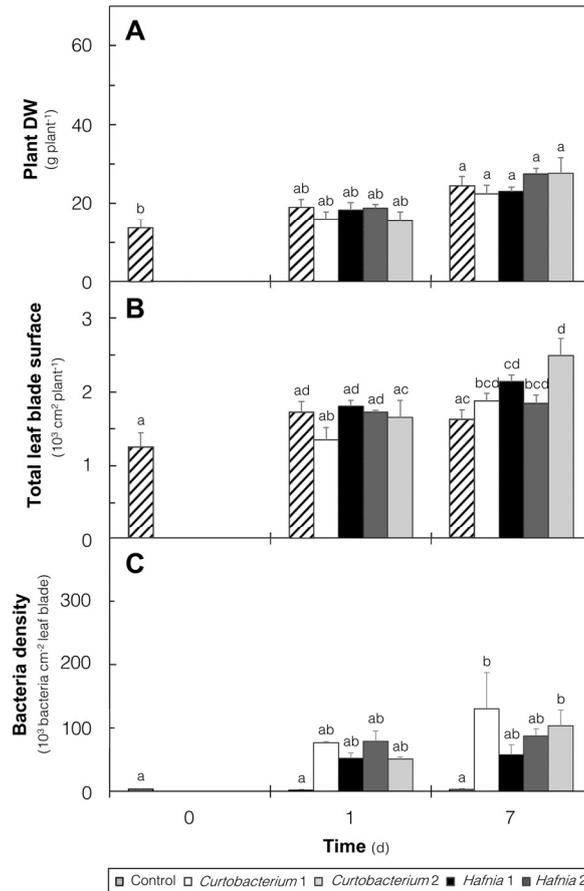
Samples were grown to dust using liquid nitrogen and total RNA were extracted using Qiagen® RNeasy Mini Kit following the provided protocol. RNA integrity was tested against the 260/230 nm ratio (ranging from 1.9 to 2.1) and confirmed with a migration on



a 1.2% agarose gel in a Tris-Acetate-EDTA 0.05X buffer. cDNA was obtained by reverse transcription (5 min at 25°C, 30 min at 42°C and 5 min at 85°C) using 1 µg of total RNA and iScript® cDNA synthesis kit (Bio-Rad®, Marnes La Coquette, France). Normalization of gene expression data of *Lp-SUT1* in Real-time quantitative PCR involved the selection of *25S* (ribosomal RNA) and of *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) as reference genes based on their superior stability compared to *18S* r RNA, *eEF1a* (eukaryotic Elongation Factor 1α) and *eIF4a* (eukaryotic Initiation Factor 4α). The corresponding specific primers used were SUT1F (5'-CAGGCAAGTATGGACCCAGT-3') and SUT1R (5'-ACCAAACACATGCACAGGAA-3') for *Lp-SUT1*, 25SF (5'-CCCAGTGCTCTGAATGTCAA-3') and 25SR (5'-ATGACGACGCATTTGGCTAC-3') for *25S* and GAPDHF (5'-CATCACCATTGTCTCCAACG-3') and GAPDHR (5'-AACCTTCAACGATGCCAAAC-3') for *GAPDH*. Samples were pre-diluted at 1/100 in ultrapure water before performing a quantitative PCR using a mix of 4 µL cDNA, 7.5 µL SYBRGreen®, 0.75 µL forward/reverse primers and 2 µL H<sub>2</sub>O with the following program: 3 min denaturation at 95°C and 35 cycles (10 s at 95°C and 40 s at 60°C) in a dedicated thermocycler (C1000 Thermal Cycler and CFX96 Real-Time System from Bio-Rad®). Fluorescence was measured at 520 nm using the provided Opticon Monitor 3.0 software from Bio-Rad®. Following the results of the amplification, the relative expression ratio of the target gene was calculated considering the efficiency (E) adjusted  $\Delta\Delta C_t$  method as described by Pfaffl (2001). This was done for each sample and normalized against *25S* and *GAPDH* as reference genes.

## 7. Statistical analysis

Results are showed as the mean  $\pm$  SE for  $n = 4$  plants for all measurements involving the plant dry mass, sugar contents and bacteria density and  $n = 3$  for *Lp-SUT1* relative transcript levels in all organs but leaf sheaths ( $n = 4$ ). Statistical analysis was performed using R Software (ver. 3.6.3, R Core Team, 2017) to test the normality law (Shapiro-Wilk) and variance homogeneity (Bartlett) of the data and to perform a 1 factor ANOVA followed by a pairwise comparison (Tukey *t*-test). The harvest time and treatments were considered as a single factor to identify significant differences induced by the bacteria strains by comparing plant lots together without bias with the expected control group sprayed with Tween 2% only. Sugar contents and *Lp-SUT1* relative transcript levels are displayed as the mean  $\pm$  SE of the all values obtained when



**FIGURE 63.** Evolution after 0, 1 and 7 days of the **(A)** total plant dry weight, **(B)** leaf blade surface and **(C)** bacteria density on blades of perennial ryegrass which were initially sprayed with a Tween 2% solution (control; white with lines) or a Tween 2% supplemented with bacteria strain with *Curtobacterium 1* (white), *Curtobacterium 2* (black), *Hafnia 1* (dark grey), *Hafnia 2* (light grey). When larger than symbols, error bars represent  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 4$ . Different letters above bars indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Tukey  $t$ -test or Dunn's test for multiple comparisons), while *n.s.* indicates that all values are not significantly different from each other.

subtracting the values corresponding to the treated plants (bacteria) to the values of the control (Tween 2%) of the same harvest time (day 1 or 7).

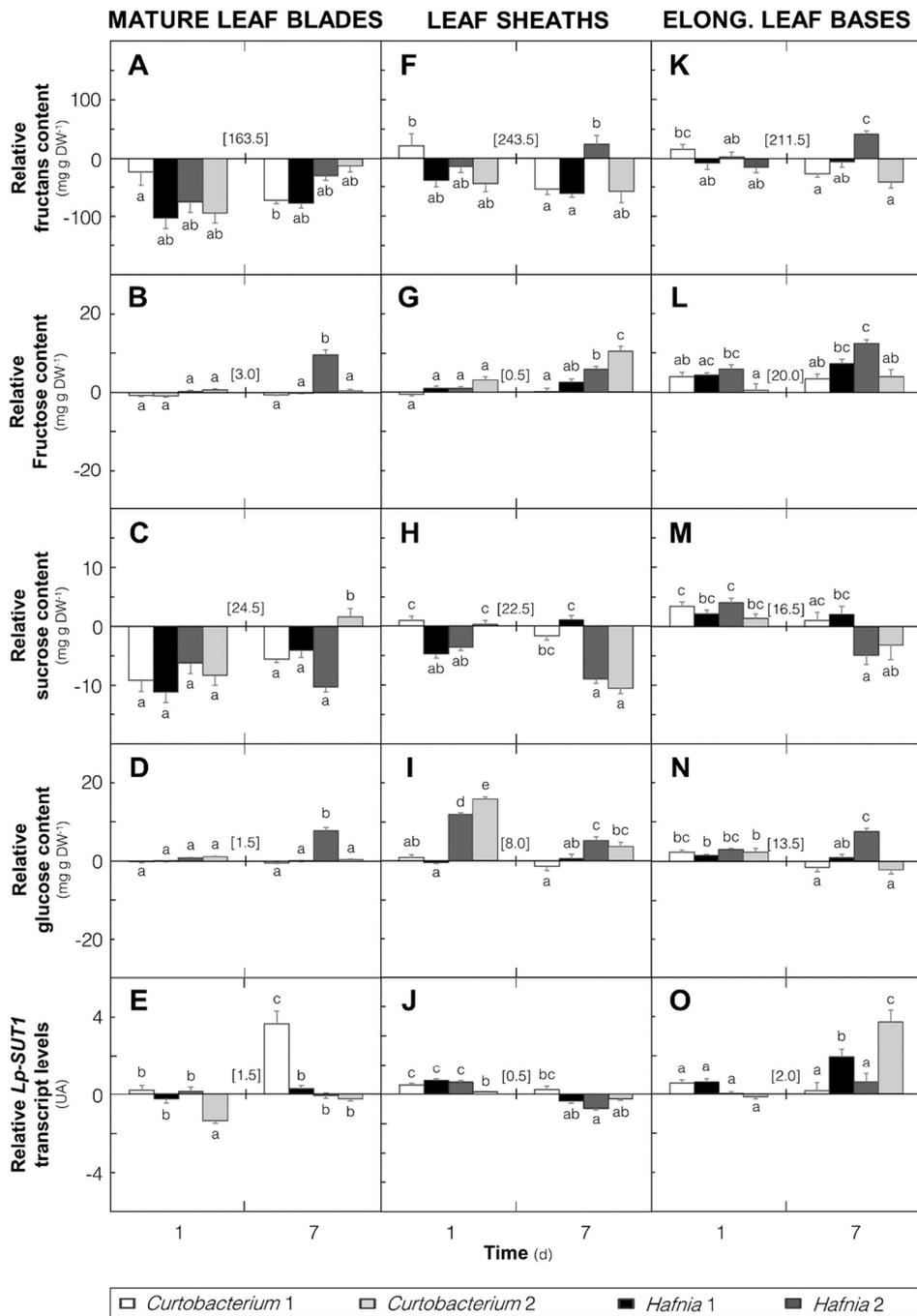
## C. Results

### 1. Plant growth, total leaf blade surface and bacteria density

During the whole experiment, all plants normally grew up with a total dry weight which doubled in 7 days (Figure 63A). The presence of the different strains did not induce any significant difference on the total dry weight whereas the total leaf blade surface increased by an average of 28% (Figure 63A, and 63B). A negligible presence of bacteria on plants that were only sprayed with 2% Tween (*i.e.* the control plants; Figure 63C) was observed with less than  $2.6 \pm 0.5 \cdot 10^3$  bacteria  $\text{cm}^{-2}$  (*i.e.* 3.5 log CFU  $\text{cm}^{-2}$ ) on average during the 7 days of the experiment. On the contrary, the plants that were sprayed with the different bacteria strains showed an average bacteria density 33 times higher than that of the controls, which also remained stable over time (Figure 63C). SEM observations of the distribution of bacteria at the leaf blade surface did not show any significant differences between the bacteria density from each side of the central vein of the leaf nor on this vein itself (data not shown). Bacteria formed small aggregates (from 3 to 7 cells), independently of stomata presence, but they were regrouped in the small recesses created between epidermal cells (Figure 63C).

### 2. Sugar contents and *Lp-SUT1* relative expression in mature leaf blades

All results are displayed as the difference between the plants sprayed with the bacteria and the control, for each harvest time (day 1 then day 7). Numbers between square brackets represent the value of the control as the mean of all its measurements on both day 1 and day 7 (Figure 64). Fructan content decreased by -60% on average considering all bacteria when compared to control. However, this decrease was only measured on day 7 for *Curtobacterium* 1 (Figure 64A). Irrespective of the bacteria strains, fructose and glucose contents did not show significant variations compared to the control, except for *Hafnia* 1 on day 7, which was the only strain where both hexose contents increased by more than 70% (Figure 64B and 64D). Sucrose content was greatly decreased on day 1 by an average 40% compared to the control for all treatments (Figure 64C) but only *Hafnia* 2



**FIGURE 64.** Evolution after 1 and 7 days of the fructans (A,F,K), fructose (B, G, L), sucrose (C, H, M), glucose (D, I, N) contents and *Lp-SUT1* relative transcript levels (E, J, O) in mature leaf blades, leaf sheaths and elongating leaf bases (see columns) of perennial ryegrass in comparison with the control on day 1 and 7 respectively. Plants were initially sprayed with Tween 2% solution only (control) or a bacteria strain with Tween 2% (treatment) such as *Curtobacterium 1* (white), *Curtobacterium 2* (black), *Hafnia 1* (dark grey), *Hafnia 2* (light grey) were used. Results are displayed for each harvest time (1 and 7 days). When larger than symbols, error bars represent  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 4$ . Numbers between square brackets represent the control as the mean of all its measurements on both day 1 and day 7. Different letters above bars indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Tukey *t*-test or Dunn's test for multiple comparisons), while *n.s.* indicates that all values are not significantly different from each other.

sucrose content was not affected anymore on day 7 (Figure 64C). The relative transcript levels of *Lp-SUT1* only showed a 4-fold increase for *Curtobacterium 1* on day 7 and a 2-fold decrease for *Hafnia 2* on day 1 (Figure 64E).

### 3. Sugar contents and *Lp-SUT1* relative expression in leaf sheaths

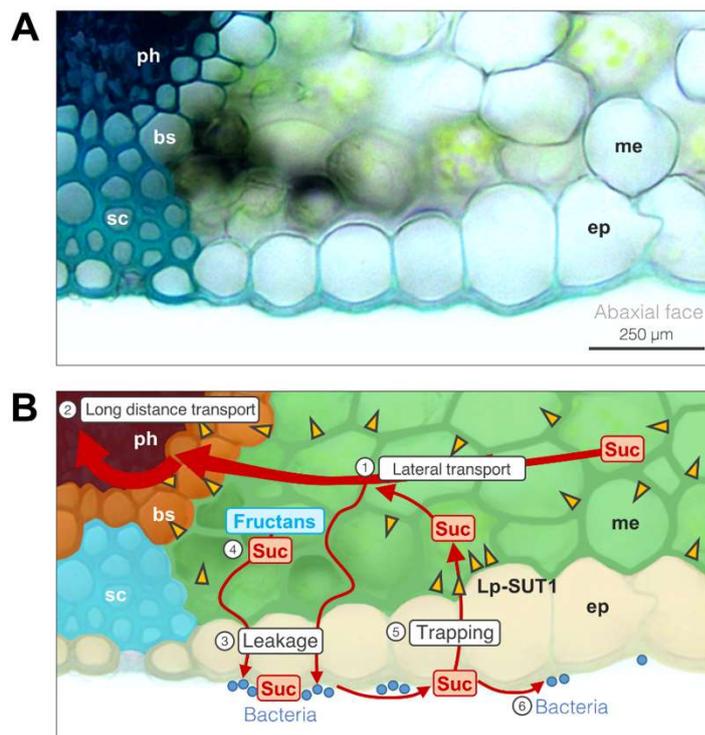
Fructan content followed the same tendencies as observed in the mature leaf blades but to a much lesser extent (Figure 64F). On day 1, fructose content was not affected for all strains, but an increase was only measured for both *Hafnia* strains on day 7 (Figure 64G). Sucrose and glucose contents remained globally steady for both *Curtobacterium* during the whole experiment. However, glucose content was significantly increased since day 1, while sucrose content was largely decreased on day 7 (almost -70%, when compared to control) for both *Hafnia* strains (Figure 64H and 64I) while. On day 1, *Lp-SUT1* transcript levels were significantly but only slightly up-regulated, except for *Hafnia 2*. (Figure 64J). On day 7, *Lp-SUT1* transcript levels were slightly down-regulated except for *Curtobacterium 1* where it remained at levels comparable to the control.

### 4. Sugar content and *Lp-SUT1* relative expression in elongating leaf bases

Except for *Hafnia 1* where there was a significant increase on day 7, fructan content remained rather unchanged during the time-course of the experiment for all strains (Figure 64K). In parallel, a small increase of the fructose and glucose contents were measured on day 1 and 7 for all treatments but *Hafnia 2* (Figure 64L and 64N). Sucrose content also increased by 19% for all strains on day 1, but a significant decrease was also measured on day 7 for both *Hafnia* (Figure 64M). Finally, *Lp-SUT1* relative transcript levels were only slightly increased by both *Curtobacterium* strains on day 1 (Figure 64O) while a 2 and 4-fold increase was respectively measured for *Curtobacterium 2* and *Hafnia 2* on day 7 (Figure 64O).

## D. Discussion

In perennial ryegrass, the transcriptional regulation of the lateral sucrose transporter *Lp-SUT1* may finely optimize the lateral transport of sucrose from the



**FIGURE 65. (A)** Transversal thin (1 μm) section near a mature leaf vein of a mature leaf blade after methyl green staining. phl: phloem; bs: bundle sheath cells; sc: sclerenchyma ; ep: lower epidermis; me: mesophyll. **(B)** Schematic representation of sucrose fluxes in a mature leaf blade. Sucrose is mainly laterally transported (1) towards the phloem where an active loading and subsequent long-distance transport (2) occurs towards other plant tissues. Sucrose can also leak out the plant through the apoplast (3) and can be produced from fructan mobilization in the mesophyll and epidermal areas (4). Sucrose can be actively retrieved from the apoplast by Lp-SUT1 sucrose transporters (5). Sucrose (or hexoses deriving from its catabolism) can finally be used by phyllosphere bacteria (6).

mesophyll photosynthetic cells through the phloem conducting tissues (Berthier et al., 2014). The objective of the experiment was to assess if the plant could control bacteria growth on its leaves by decreasing sucrose leakage to the phyllosphere by a coordinated up-regulation of *Lp-SUT1* expression.

### **1. Bacteria are present in numbers, aggregate in epidermal recesses, but are not bound to phloem conducting tissues**

Bacteria densities were 33 times higher (with up to  $81 \cdot 10^3$  bacteria  $\text{cm}^{-2}$  or 3.9 log CFU  $\text{cm}^{-2}$ ) for sprayed plants when compared to control plants, where very little bacteria were found. On the leaves of *Arabidopsis* plants sown in sterile conditions in a greenhouse, Maignien et al. (2014) reported a stabilization of the phyllosphere bacteria population at  $10^4$  cells  $\text{cm}^{-2}$  after 25 days. Measurements on perennial ryegrass is consistent with previous studies on lettuce (*Lactuca sativa* L.) where plants grown in growth chambers had 10 to 100-folds lower bacteria densities than in the field (Williams and Marco, 2014). Moreover, it can be reasonably thought that the spraying of bacteria on leaves was in greater numbers than what could be found on perennial ryegrass fields from northern England where bacteria density was solely ranging from 10 to 250 colonies  $\text{cm}^{-2}$  (Dickinson et al., 1975).

Confocal and electron microscopy analysis also revealed that no real aggregation of the bacteria was visible, with clusters ranging from single cells to aggregates of 3-7 cells during the whole experiment. Most of the bacteria were also found in the epidermal depressions (*i.e.* recesses) between cells. This is consistent with previous studies using the same analytical techniques (Esser et al., 2015). The spatial aggregation of the bacteria in the recesses could be explained by the fact that, together with gravity, some phyllosphere bacteria could produce biosurfactants, allowing them to move towards nutrients hotspots (Lindow and Brandl, 2003). Moreover, and irrespective of the four sprayed strains, comparisons of the observation areas from the border or the middle of the leaf blades did not show a preferential localization of the bacteria near the main leaf veins (*i.e.* containing the conducting tissues of the phloem). The lignification of the thick sclerenchyma which also helps to physically support the central vein of the blade (Figure 65) could considerably hinder sucrose leakage in the cell walls by the presence of lignin and suberin which are both hydrophobic compounds (Niklas et al., 2017). Nonetheless, bacteria were found in high numbers, wide-spread on the leaf blade and the effects of their sugar consumption could induce a plant response through an expected regulation of *Lp-SUT1* expression.



## 2. *Curtobacterium* locally induces a large and quick mobilization of sugars and a distant up-regulation of *Lp-SUT1* expression in growing tissues

*Curtobacterium* 1 strain was chosen to act as a negative control for the consumption of plant sugars because it could only grow on glucose, by contrast with the other strain (*Curtobacterium* 2) that can grow on most sugars. Both *Curtobacterium* strains induced a large and quick decrease of both the fructan and sucrose contents in the phyllosphere tissues exposed to sprayed bacteria (*i.e.* the mature leaf blades and leaf sheaths). However, fructans are fructose hydrosoluble polymers synthesized and exclusively stored in the vacuoles (Frehner *et al.*, 1984) and bacteria are unlikely to be able to directly feed on them. Moreover, using transgenic potato lines (*Solanum tuberosum*) modified to over-produce fructans in the shoot, no significant difference of phyllosphere bacteria populations was reported (Becker *et al.*, 2008). The mobilization of fructans would also have led to the release of fructose but *Curtobacterium* 1 is also not able to directly feed on it. Fructose is however readily converted into sucrose in the cytoplasm (Lattanzi *et al.*, 2012; Gasperl *et al.*, 2016), which is then known to be mostly exported to the apoplast (Slewinski, 2011) and can further leak out the plant (Figure 65). Therefore, sucrose can be at the origin of apoplastic hexoses which can specifically allow the survival of *Curtobacterium* 2, but also *Curtobacterium* 1, thanks to enzymes such as the cell-wall invertases (CWINV; Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998), or indirectly *via* the cytoplasmic Sucrose Synthase (SuSy; Stein and Granot, 2019). To date, it is not known if SuSy could play a role in a successful interaction of *Curtobacterium* with the host plant as this was demonstrated for the root nodulation symbiosis by rhizobacteria (Baier *et al.*, 2007; Molesini *et al.*, 2014).

Bacteria can also often up-regulate the expression of sugar efflux transporters to increase the sugar export to the apoplast to increase a sugar leaking at their benefit (Chen *et al.*, 2010). This was demonstrated in *Arabidopsis* through the up-regulation of the *At-SWEET11* and *At-SWEET14* glucose transporters and in grape (*Vitis vinifera*) for *Vv-SWEET7* and *Vv-SWEET15* (Breia *et al.*, 2020). However, the weight of the bacteria population on the apoplastic sugar pool could have been too faint to induce any local regulation of the lateral sucrose transporter *Lp-SUT1* in mature leaf blades and leaf sheaths. The lateral transport of sucrose should have been high enough within these tissues to allow a long-distance distribution of excess sucrose (coming from fructans mobilization) because *Lp-SUT1* was up-regulated in distant elongating leaf bases. Except for *Curtobacterium* 2 on day 7, were the depletion of fructan reserves induced the up-



regulation of *Lp-SUT1* expression. Because of the dual purpose of *Lp-SUT1* in source and sink tissues (Berthier et al., 2014), and if *SUTs* relative transcript levels were to be correlated to *SUT* protein abundance and activity, as Xu et al. (2018) already reported it for numerous sucrose transporters and for varied environmental stresses, this enhanced whole-plant competition for sugars then surely led to a greater unloading of sucrose within elongating leaf bases to maintain or increase blade surface production (Figure 65).

### 3. *Hafnia* induced the accumulation of hexoses and the regulation of *Lp-SUT1* expression

*Hafnia* 1 can feed on all sugars like *Curtobacterium* 2, but notable differences were measured. While fructans and sucrose were still mobilized on day 1 towards the elongating leaf bases without requiring a strong transcriptional regulation of the lateral transporter *Lp-SUT1* in all harvested organs, an accumulation of glucose and fructose was observed on day 7 in all harvested tissues and was globally higher in response to *Hafnia* 1. This accumulation raises the hypothesis that a higher conversion rate of sucrose into hexoses might be induced in the leaf blades in the presence of *Hafnia* 1. A compatible interaction might allow the bacteria to alter the plant metabolism to increase the leakage of hexoses or affect their catabolism (Figure 65) possibly using the plant own regulatory pathways like the hexokinase pathway (Sheen, 2014). This enzyme can be found in the cytoplasm and is involved in the first step of glycolysis (Xiao et al., 2000). If *Hafnia* 1 were able to inhibit the plant hexokinase expression or activity, changes in the regulation of numerous genes related to the carbon metabolism, such as the lateral *Lp-SUT1* and the accumulation of glucose would occur after 7 days. However, *Hafnia* 1 density on the leaf blades remained steady and at low levels even after 7 days. The potential increase of a cell wall invertase activity could also trigger the plant defense mechanisms such as the reduction of the photosynthesis, the expression of defense genes, the deposition of callose, the production of reactive oxygen species (ROS), the accumulation of antimicrobial compounds or even the cell death (Siemens et al., 2011; Sonnewald et al., 2012; Tauzin and Giardina, 2014). Compatible bacteria such as *P. syringae* in tomato (*Solanum lycopersicum*) were shown to be able to tune down the up-regulation of the invertase activity to avoid triggering the sugar-dependant defense mechanism of the host plant (Bonfig et al., 2010). Such mechanism could have allowed *Hafnia* 1 to produce the accumulation of hexoses in the mature leaf blades without triggering the plant defense system.



When sprayed with *Hafnia 2*, which is not able to feed on sucrose, fructan content was still greatly decreased in all the harvested tissues which most likely produced sucrose. However, sucrose content and *Lp-SUT1* relative transcript levels showed a stronger decrease on day 1 and only in the mature leaf blades. On day 7, neither fructans nor sucrose were no more mobilized in the mature leaf blades. This was followed by the strong and distant up-regulation of *Lp-SUT1* in the elongating leaf bases which would allow the plant to maintain the sucrose importation to this sink despite the up-stream diminution of sucrose availability. *Hafnia 2* could be considered as a less intense sink of carbon than *Hafnia 1* because of its inability to feed on sucrose, which might not disturb the fructan accumulation after a long period of time. The reduced sucrose availability from the stabilization of fructan reserves could have required the up-regulation of *Lp-SUT1* expression on day 7 to enhance sucrose import to the elongating leaf bases. In other instances, the strong mobilization of fructans, which are not present in most species, could explain that the up-regulation of the expression of the lateral sucrose transporter *Lp-SUT1* might not always be required in perennial ryegrass.

## E. Opening

Bacteria locally altered the plant carbon metabolism by inducing a large mobilization of fructans and sucrose, which was concomitant with a higher competition for sugars in young growing tissues of the plant. The strong effect of the bacteria on the plant fructan content is troublesome. Fructans are well-known for their prebiotic and bifidogenic properties for animals (Kaur and Gupta, 2003) and could play a role in the herd health. Additionally, *Curtobacterium* and *Hafnia* are two genera found commonly at the contact of udders (Gill et al., 2006) or in dairy products such as milk or cheese (Rea et al., 2007; Ercolini et al., 2009) which could affect the animal health and the organoleptic properties of such products. Therefore, a healthy bacterial population and diversity on the phyllosphere should not be underestimated in the future to increase the quality of both the food for cattle and dairy products.



## **Funding and acknowledgements**

This work was supported by the Normandy region (France) through the “Microphyllos” research project. We thank all the staff which allowed this work to be possible with an exceptional contribution of Brée J.M. for the bacteria preparation, Roberge H. for microscopic studies, Ameline A.F., Pichon J. and Bodereau M. for the production and the preparation of plant material and Fremont J. for the molecular analysis.



## Chapitre 3

---

Glucides, hexokinase et régulation transcriptionnelle de l'expression du transporteur latéral Lp-SUT1 chez *Lolium perenne*

***Sugars, hexokinase and transcriptional regulation of the lateral transporter LpSUT1 in Lolium perenne***



## Transition vers chapitre 3

Dans les limbes du ray-grass anglais, les niveaux de transcrits *LpSUT1* ne semblent pas être régulés par le cycle nycthéral ou par la présence de bactéries de la phyllosphère. **Cependant, il pourrait tout de même exister des signaux capables de réguler les niveaux de transcrits *LpSUT1*.**

Les voies de perception du saccharose sont à ce jour peu connues, et les études qui se sont intéressées à son rôle signal vis-à-vis de la régulation transcriptionnelle des SUTs ont donné des résultats contrastés qui dépendaient de l'espèce végétale et du rôle présumé du transporteur. Le glucose en revanche est un signal glucidique capable de réguler l'expression transcriptionnelle des gènes de transporteurs d'hexoses et celui du transporteur de saccharose *AtSUC2* chez *A. thaliana*. Il existe aussi des voies de perception du fructose chez les végétaux mais il n'existe à ce jour que peu d'information quant à son rôle « signal » chez les plantes à fructanes comme le ray-grass anglais. **De ce fait, le deuxième objectif de ce travail doctoral était de déterminer si le saccharose, le glucose ou le fructose étaient des molécules « signal » impliquées dans la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1*.**

De nombreuses études s'accordent à donner à l'hexokinase un rôle majeur dans la perception du signal glucose. Cette enzyme initie la première étape de la glycolyse et de la voie des pentoses-phosphate, en catalysant la phosphorylation du glucose en glucose-6P. Sa fonction de senseur a été particulièrement étudiée grâce à l'utilisation d'analogues structuraux de glucides et d'inhibiteurs de son activité de phosphorylation. Par le passé, Il a ainsi été montré chez le ray-grass anglais que l'hexokinase était responsable de l'inhibition par le glucose de l'activité des fructane-exohydrolases, impliquées dans le catabolisme des fructanes. **Cette approche a été mise en œuvre pour déterminer l'implication ou non de l'hexokinase dans la perception du signal glucidique conduisant à la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1*.**

Pour cela, un dispositif en feuilles excisées a été mis au point et la base des limbes a été immergée dans des solutions de saccharose, de glucose, de fructose, d'analogues de glucides et d'un inhibiteur de l'activité de phosphorylation de l'hexokinase pendant 8 h à l'obscurité. Les teneurs en glucides solubles et les niveaux de transcrits *LpSUT1* ont été suivis pour chaque traitement. Ces recherches ont permis la rédaction d'un troisième article, qui sera soumis dans *Functional Plant Biology*.



## V. Chapitre 3

### **Glucides, hexokinase et régulation transcriptionnelle de l'expression du transporteur latéral Lp-SUT1 chez *Lolium perenne***

Lonesang H.<sup>1</sup>, Noiraud-Romy N.<sup>1</sup>, Prud'homme M.-P.<sup>1</sup>, Meuriot F<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, EVA, 14000 Caen, France

**Correspondance** : Frédéric Meuriot

Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, EVA, 14000 Caen, France

Esplanade de la Paix, Université de Caen Normandie, 14032 Caen Cedex, France

Courriel : frederic.meuriot@unicaen.fr

---

**Manuscrit d'article de thèse, à soumettre chez *Functional Plant Biology***



## Résumé

Chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), le transporteur de saccharose Lp-SUT1 est impliqué dans le transport latéral du saccharose par l'importation de ce dernier de l'apoplasme vers le cytoplasme des cellules, dans les tissus sources et puis de carbone. L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle des glucides comme signaux de régulation transcriptionnelle du gène *Lp-SUT1*. Des limbes excisés de *L. perenne* ont été approvisionnés à l'obscurité avec des glucides métabolisables (saccharose, glucose et fructose), des analogues de glucides (palatinose, 3-*O*-methylglucose, 6-déoxyglucose, 2-déoxyglucose, mannose) ou avec un inhibiteur de l'activité hexokinase (glucosamine) seul ou en parallèle à du saccharose, pour évaluer leurs effets potentiels sur les niveaux relatifs de transcrits *Lp-SUT1* et l'implication d'une voie de signalisation dépendante de l'hexokinase. Le saccharose et le palatinose ont induit une régulation positive des niveaux relatifs de transcrits *Lp-SUT1*. Le glucose mais pas le fructose a inhibé son expression. L'addition de 2-déoxyglucose, qui peut être phosphorylé par l'hexokinase mais qui n'est pas métabolisé par la plante même après phosphorylation a conduit à une inhibition, similaire au glucose. La glucosamine seule levait quant à elle l'inhibition par le glucose de l'expression du gène *Lp-SUT1* et induisait une régulation négative en présence de saccharose. L'ajout de 3-*O*-méthylglucose et de 6-déoxyglucose, qui ne sont pas des substrats de l'hexokinase, régulaient positivement les niveaux de transcrits *Lp-SUT1*. Dans les limbes du ray-grass anglaise, le saccharose et le glucose agissent comment des signaux glucidiques positifs pour la régulation de la transcription du gène *Lp-SUT1*. Le saccharose et le glucose pourraient être perçus au niveau de la membrane plasmique et leurs abondances dans l'apoplasme pourrait être limitée par l'augmentation de l'importation du saccharose au travers de la régulation positive du gène *Lp-SUT1*. Le glucose est aussi un signal négatif de régulation dépendant de la voie de signalisation de l'hexokinase pour le gène *Lp-SUT1*. En réponse à une accumulation du glucose cytoplasmique, la cellule pourrait limiter l'importation supplémentaire de saccharose par la régulation négative de l'expression du gène *Lp-SUT1*.

## Mots-clés

transport du saccharose, ray-grass, *Lolium perenne*, hexokinase, régulation, signal, sucre, glucide



## Abstract

In perennial ryegrass (*Lolium perenne*), the sucrose transporter *Lp-SUT1* is involved in the lateral transport of sucrose by importing sucrose from the apoplast in cells of source and sink tissues. The aim of this study was to assess whether sugars can act as signals to regulate the transcription of *Lp-SUT1*. Excised leaf blades of *L. perenne* were supplied in the dark with metabolizable sugars (sucrose, glucose and fructose), sugar analogs (palatinose, 6-deoxyglucose, 3-*O*-methylglucose, mannose, 2-deoxyglucose) or an inhibitor of hexokinase activity (glucosamine) alone and in combination with sucrose, to evaluate their putative effects on *Lp-SUT1* relative transcript levels and the involvement of an hexokinase-dependent signaling pathway. Sucrose and palatinose up-regulated *Lp-SUT1* relative transcript levels. Glucose but not fructose down-regulated *Lp-SUT1* expression. The supply of 2-deoxyglucose, which is phosphorylated by hexokinase but not or only slowly further degraded, led to the same inhibition as glucose. Glucosamine alone cancelled the repressive effect attributed to glucose and induced the down-regulation of *Lp-SUT1* in presence of sucrose. The supply of 3-*O*-methylglucose and 6-deoxyglucose, which are not substrates of the hexokinase, up-regulated *Lp-SUT1* relative transcript levels. In leaf blades of *L. perenne*, sucrose and glucose act as signal molecules for the up-regulation of *Lp-SUT1* expression. Sucrose and glucose could be perceived at the plasma membrane, and their abundance in the apoplast could be limited through *Lp-SUT1* up-regulation. Glucose is also a negative hexokinase-dependent signal for *Lp-SUT1* transcriptional regulation. In response to glucose accumulation in the cytoplasm, the cell could limit any additional import of sucrose through the down-regulation of *Lp-SUT1* expression.

## Keywords

sucrose transport, ryegrass, *Lolium perenne*, hexokinase, regulation, signal, sugar



## A. Introduction

Plants rely on their photosynthetic activity to produce soluble sugars and sugar reserves, sources of energy and C skeletons for their biomass production (Osorio *et al.*, 2014). Among all these soluble sugars, sucrose ( $\beta$ -D-Fructofuranosyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside) is at the node of multiple metabolisms. At the whole-plant level, about 80% of the sucrose produced in leaves are exported by a long-distance transport towards sink tissues through the phloem conducting tissues (Ainsworth and Bush, 2011). This transport is defined by a decreasing sucrose gradient between source and sink tissues along the phloem path (*i.e.* mass flow; Lacoite and Minchin, 2008; De Schepper *et al.*, 2013). In apoplastic loading species, like most monocots, sucrose is directly loaded in the phloem by active sucrose/H<sup>+</sup> symporters (Braun and Slewinski, 2009). These proteins, called SUCrose Transporters (SUTs) have been identified and characterized for over three decades (for extensive review, please refer to Sauer, 2007; Slewinski *et al.*, 2009; Kühn and Grof, 2010). Their regulation was only recently reported to be a key-mechanism to sucrose partitioning (Lemoine *et al.*, 2013; Durand *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018) to tightly coordinate the C metabolism of each tissue in response to variations of the plant environment. However, other SUTs families with different tissular or sub-cellular locations and functions have been reported (Kühn and Grof, 2010). More specifically, there are SUTs involved in the lateral transport of sucrose, from the mesophyll cells to the phloem surroundings before its direct loading in the phloem in source tissues (Berthier *et al.*, 2014) and involved in the phloem unloading of sucrose in sinks (*et al.e.g.* grain filling in rice, *Oryza sativa*; Aoki *et al.*, 2003; Carpaneto *et al.*, 2005; sucrose accumulation in storage stems of sugarcane (*Saccharum sp.*); Rae *et al.*, 2005; or supply of meristematic tissues in perennial ryegrass; Berthier *et al.*, 2009). Indeed, in apoplastic loading grasses, sucrose must first transit through the apoplast of the bundle sheath surrounding the conducting tissues before being loaded in the phloem (Danila *et al.*, 2016). Therefore, the regulation of SUTs involved in the lateral transport of represent the key steps of the sucrose transport at the whole-plant level because they act upstream and downstream of the sucrose phloem loading and unloading, respectively. For their regulation to be responsive and tightly controlled, the local perception of signal molecules in each tissue is expected to trigger various signaling pathways to coordinate the sucrose lateral transport with its long-distance partitioning and the cell metabolism.

Sugars themselves, as substrates and product of the C metabolism, are excellent candidates. In the past, the use of sugar analogs applied to excised leaves or foliar discs



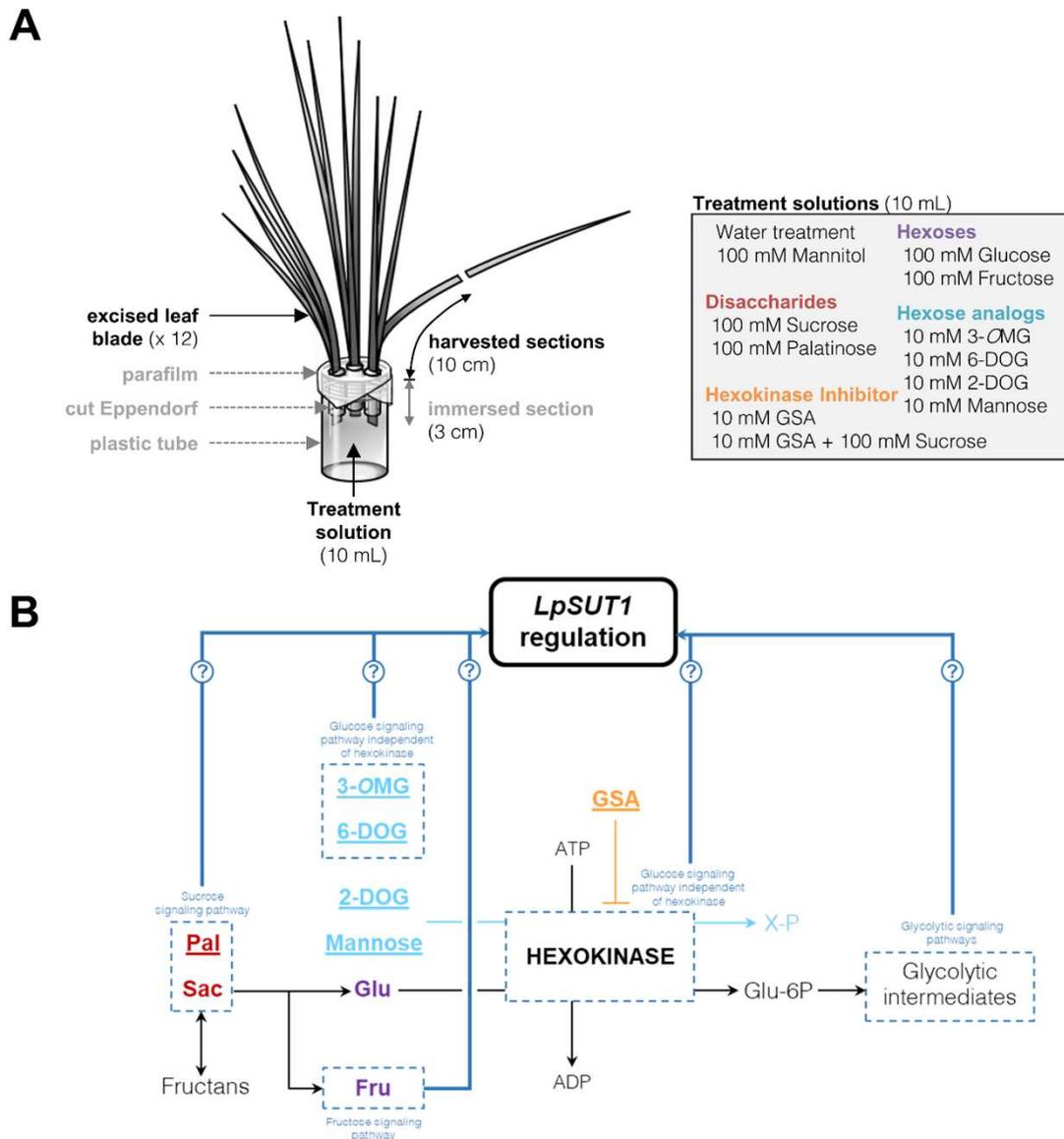
revealed that sugars are signaling molecules (Rolland *et al.*, 2006). Transcriptomic analysis showed that 10% of *Arabidopsis thaliana* genes are sugar responsive (Price *et al.*, 2004; Bläsing *et al.*, 2005). Sucrose could be the signal for the regulation of SUTs (Kühn and Grof, 2010). Bv-SUT1, involved in the phloem loading in sugar beet (*Beta vulgaris*), showed a 70% decrease of its transcript levels in excised leaves fed with increasing sucrose concentrations up to 250 mM (Chiou and Bush, 1998; Vaughn *et al.*, 2002). By contrast, in excised leaves of potato (*Solanum. tuberosum*), *St-SUT2* transcript levels increased in response to 100 mM exogenous sucrose (Barker *et al.*, 2000) and this transporter was suggested to act as a sucrose sensor for SUT regulation (Weise *et al.*, 2000). Sucrose analogs which are not metabolized or only slowly degraded by the plant such as palatinose (*i.e.* isomaltulose; Loreti *et al.*, 2000, Wu and Birch, 2011) are able to mimic sucrose effects while equimolar glucose and fructose could not (Fernie *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2005), which indicate that sucrose could itself be the signal. To our knowledge, the proteins involved in sucrose sensing have not yet been clearly identified, even if their existence is expected (Smeekens *et al.*, 2010; Wind *et al.*, 2010; Lastdrager *et al.*, 2014). A specific SUTs family in parallel to the SUTs involved in the lateral transport of sucrose is suggested to act as a sucrose sensor for SUT regulation (Fan *et al.*, 2009; Kühn and Grof, 2010; Li *et al.*, 2012) but it is still under investigation. Therefore, transcriptional regulation of SUTs in response to sucrose remains unclear and variable depending on the role of the SUT and the sucrose concentration.

Hexoses such as glucose or fructose, the products of sucrose degradation, could also act as signals and must be discriminated from sucrose itself. In *A. thaliana*, the addition of 100 mM glucose to foliar discs induced a 60% decrease of *At-SUC2* transcript levels, involved in phloem loading (Wingenter *et al.*, 2010). Among the glucose signaling pathways, the best characterized and well-known one is the hexokinase-dependent pathway. Present in mitochondria, plastid, nucleus and cytoplasm (for a review, see Aguilera-Alvarado and Sánchez-Nieto, 2017), the hexokinase catalyzes the phosphorylation of hexoses (fructose but more specifically glucose; Saltman, 1953; Granot *et al.*, 2014) into hexose-6-phosphate initiating various glycolytic pathways (Xiao *et al.*, 2000; Veramendi *et al.*, 2002). Moreover, the use of underexpressing and overexpressing hexokinase plants (Jang *et al.*, 1997) and the use of complementation assays in the *A. thaliana gin2-1* mutant with hexokinase proteins (Moore *et al.*, 2003; for a review, see Aguilera-Alvarado and Sánchez-Nieto, 2017) demonstrated that some hexokinases act as glucose sensors. They lead to the photosynthesis retro-inhibition by sugars and are implicated in the regulation of various processes mediated by phytohormones (Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2010; Sheen, 2014).



Using sugar analogs which can be phosphorylated (*e.g.* 2-deoxyglucose, mannose) or not (*e.g.* 6-deoxyglucose, 3-*O*-methylglucose) by hexokinase, or using inhibitors of its activity (*e.g.* glucosamine, mannoheptulose), it was possible to show that glucose could trigger signaling pathways that are dependent or independent of the hexokinase. The fixation of the substrate on the catalytic site was shown to be enough for the signal transduction (Moore *et al.*, 2003). Upstream of the hexokinase, glucose can be sensed at the plasma membrane by RGS1 (Regulator of G-Protein Signaling 1) (Grigston *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2013). Downstream of the hexokinase, glycolytic intermediates might act as sensors (Lejay *et al.*, 2008). While it was recently demonstrated that the hexokinase dependent-pathway was involved in the transcriptional regulation of hexose transporters (Cordoba *et al.*, 2014), its involvement in the regulation of SUTs involved in the lateral transport of sucrose is still unknown and could represent a keystone for the coordination of the sucrose transport with its catabolism. Fructose as a signal is under-studied by comparison with glucose. Fructose as a signal could be of high interest for the 15% of plant species which accumulate and mobilize fructans, polymers of fructose (Hendry and Wallace, 1993), to coordinate reserve mobilization with sucrose long-distance and lateral transport to sink organs.

Among fructan accumulating species (*e.g.* barley, *Hordeum vulgare* and wheat, *Triticum aestivum*), perennial ryegrass is a monocot grass predominant in temperate grasslands (Pollock and Cairns, 1991). In this species, two SUTs were identified and characterized (Lp-SUT1 and LpSUT2; Berthier *et al.*, 2009; 2014). Based on its cellular localization, Lp-SUT1 was suggested to be involved in the lateral transport of sucrose. In response to a severe defoliation, a strong up-regulation of *Lp-SUT1* transcription occurred in elongating leaf bases including the leaf meristems, within 24 h in parallel with the depletion of both sucrose and fructan pools to sustain the regrowth of leaves (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001; Berthier *et al.*, 2009; 2014; Furet *et al.*, 2012). Knowing that SUTs are short-lived proteins (more than 50% decrease in 4 h; Kühn *et al.*, 1997), the transcriptional regulation of *Lp-SUT1* could represent a key-element for a fast and optimized C distribution within the plant tissues and therefore for the plant response to its changing environment. The sugar signal(s) for *Lp-SUT1* transcriptional regulation is (are) still unknown and should be investigated to clarify the mechanisms involved in the



**FIGURE 66. (A)** Schematic representation of the experimental design: excised leaf blades of *Lolium perenne* L. were partially immersed in the treatment solutions for 8 h. Each plastic tube sustained 12 excised leaf blades (corresponding to the last mature leaf blades excised at the ligule from three different mother plants on  $t = 0$  h) and four tubes were prepared per treatment solution. Each leaf blade had a 3-cm length basal section that was immersed in the treatment solutions. After 8 h in darkness, a 10-cm section above the immersed section was harvested for each excised leaf blade and all excised leaf blades were pooled together for each treatment before being dispatched in four sample groups for further analysis. **(B)** Schematic representation of the sugar signaling pathways leading to the transcriptional regulation of the lateral sucrose transporter LpSUT1. Sucrose (Suc) can be produced from fructans or converted into glucose (Glu) and fructose (Fru). Glucose is phosphorylated into glucose-6-phosphate (Glu-6P) by the hexokinase using ATP. Glu-6P can be used for the first step of the glycolysis. 2-deoxyglucose (2-DOG) and mannose are glucose analogues phosphorylated by the hexokinase but whose products are not further used by the plant. Palatinose (Pal) or the hexose analogues 3-*O*-methylglucose (3-OMG) and 6-deoxyglucose (6-DOG) are not metabolized by the hexokinase. Glucosamine (GSA) is an inhibitor of the phosphorylation activity of the hexokinase useful to test if sucrose response involves the hexokinase pathway. Lp-SUT1 transcriptional regulation could occur by the transduction of a signal at multiple levels (dotted rectangles): independently of hexokinase using a disaccharide signal (like sucrose), a hexose signal (like glucose or fructose), after fixation or phosphorylation by hexokinase, or through a glycolytic intermediary further downstream. Sugars (Suc, Pal, Glu, Fru) were prepared at 100 mM while all other sugars were prepared at 10 mM. Underlined sugar are analogues tested during this experimentation.

transcriptional regulation of *SUTs* in coordination with the mobilization of carbon reserves and sucrose catabolism. The hypothesis is that sucrose, glucose and fructose could act as signal molecules for *Lp-SUT1* transcriptional regulation through hexokinase-dependent or -independent pathways. Therefore, the aim of this study was to identify which sugar(s) act as signal and to assess the involvement of hexokinase for the transcriptional regulation of *Lp-SUT1*. Excised leaf blades of perennial ryegrass were fed with metabolizable sugars (sucrose, glucose, fructose), non-metabolizable or slowly degraded hexose analogs (6-deoxyglucose, 3-*O*-methylglucose, 2-deoxyglucose, mannose), a disaccharide analog (palatinose) and an inhibitor of the hexokinase phosphorylation activity (glucosamine) during 8 h in the dark to remove the photosynthesis effect.

## **B. Materials and method**

### **1. Plant material**

Seeds of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. AberAvon) were sown on perlite and osmotic water, then grown hydroponically for 5 weeks in a greenhouse using a weekly-renewed nutrient solution as described by [Gonzalez et al. \(1989\)](#). A photosynthetic photon flux density (PPFD) of 440  $\mu\text{mol}$  of photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at canopy height (16 h/8 h of day/night at 21°C/18°C on average) supplemented the natural light.

### **2. Experimental procedure, treatment and harvest**

Prior to the experiment, 25-mL tubes were prepared using parafilm to hold three 2-mL Eppendorf tubes cut at their base with parafilm surrounding their openings to be able to hold excised leaf blades vertically in the future ([Figure 66A](#)). For each treatment, four 25-mL tubes were prepared and each tube received 10 mL of a treatment solution. Treatments were as follow: water, 100 mM mannitol, 100 mM sucrose, 100 mM palatinose, 10 mM glucosamine, 10 mM glucosamine + 100 mM sucrose, 100 mM glucose, 100 mM fructose, 10 mM 6-deoxyglucose, 10 mM 3-*O*-methylglucose, 10 mM 2-deoxyglucose and 10 mM mannose. The experiment started at 08:00 (2 hours after lights on) and each Eppendorf received 4 youngest mature leaf blades excised at their ligule from the same plant and held vertically by surrounding the tube openings with parafilm with 3-cm of their base immersed in the treatment solutions. This process took 2 h total (until 10:00) going treatment after treatment for a total of 48 leaf blades per treatment ( $n = 12$ ) and 12



treatments. One hour after the beginning of the experiment (09:00), the youngest leaf blades of intact plants were harvested as a control (before both cutting and treating). Each 25-mL tube was transferred for 8 h in the dark as soon as possible, in a growth chamber (20°C, 70% relative humidity) to avoid any influence of the photosynthesis. At the end of the experiment (from 16:00 to 18:00), all the excised leaf blades of the same treatment were pooled together, following the same treatment order as in the morning. The 3-cm sections which were immersed in the treatment solutions were cut to avoid external contamination. The absorption rate of the sugars brought through the immersion of leaf bases in a treatment solution was estimated using methylene blue (1% v/v) and microscopic analysis to be approximately 2 cm h<sup>-1</sup>. As such, only the first 10-cm of leaves above the cut base were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen for future analysis. Evaporation (in g H<sub>2</sub>O lost) was measured weighting the same 25-mL tubes without the excised leaf blades. Transpiration was deduced from the measurements of the total mass of H<sub>2</sub>O lost after 8 hours and the mass of H<sub>2</sub>O lost through simple evaporation in parallel.

### 3. Water soluble sugar analysis

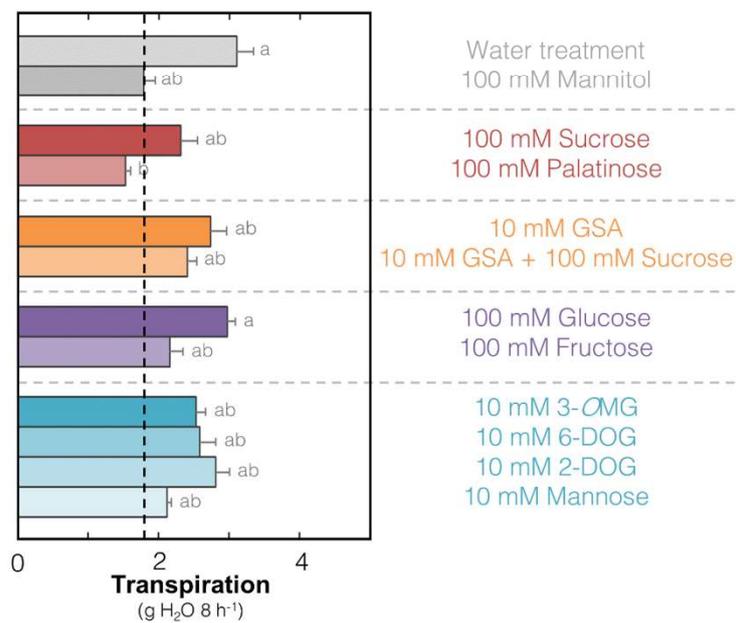
Prior to the sugar extraction, freeze dried samples were grounded to dust with ball milling (0.5 mm stainless steel balls, MM400, Retsch, Haan, Germany). Dry weights of 20 mg were submitted to 3 cycles of sugar extraction (15 minutes at 80°C, 60°C and 60°C) and centrifugations to isolate sugars, and eventually freeze dried as described by [Lothier et al. \(2007\)](#). Each sample was purified on ion exchange resins (150 µL COO<sup>-</sup>, 160 µL Pyrovinylypyrrolidone, 250 µL H<sup>+</sup>; Sigma-Aldrich, St Louis, USA) prepared in Mobicol™ columns (MoBiTec, Göttingen, Germany) to remove pigments and charged compounds since charge compounds co-elute with fructans. Mannitol 2 g L<sup>-1</sup> was used as a purification internal standard to consider the loss of sugar during the purification process. Mannitol treated samples were prepared in two steps: 200 µL from the first batch of samples which was specifically solubilized in 500 µL H<sub>2</sub>O after freeze drying. Then the remaining 300 µL was freeze dried and the remaining was solubilized in a second batch using 300 µL mannitol 2 g L<sup>-1</sup>. Differences between the two batches represented the true mannitol content of mannitol treated samples before purification. All purified fractions were analyzed for their soluble sugar content by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Sugar-Pak-I™ column (Waters®, Milford, USA with 50 mg L<sup>-1</sup> Ca-EDTA as eluent at a flux of 0.5 mL min<sup>-1</sup> at 85 °C). Peak integration was performed using the



manufacturer's software (Breeze™) by comparison with a known sugar standard (inulin, sucrose, glucose and fructose at 1 g L<sup>-1</sup>). Some of the sugar analogs used in the treatment solutions co-eluted with fructans (glucosamine), sucrose (palatinose), glucose (2-deoxyglucose) or fructose (mannose).

#### 4. *Lp-SUT1* transcript level analysis

Samples were grown to dust using liquid nitrogen and total RNA was extracted using Qiagen® RNeasy Mini Kit following the provided protocol. RNA integrity was tested against the 260/230 nm ratio (ranging from 1.9 to 2.1) and confirmed with a migration on a 1.2% agarose gel in a Tris-Acetate-EDTA 0.05X buffer. cDNA was obtained by reverse transcription (5 min at 25°C, 30 min at 42°C and 5 min at 85°C) using 1 µg of total RNA and iScript® cDNA synthesis kit (Bio-Rad®, Marnes La Coquette, France). As markers of constitutive expression, 25S (ribosomal RNA) and of GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) were selected as reference genes based on their superior stability compared to 18S r RNA, eEF1α (eukaryotic Elongation Factor 1α) and eIF4α (eukaryotic Initiation Factor 4α). The corresponding specific primers used were SUT1F (5'-CAGGCAAGTATGGACCCAGT-3') and SUT1R (5'-ACCAAACACATGCACAGGAA-3') for *Lp-SUT1*, 25SF (5'-CCCAGTGCTCTGAATGTCAA-3') and 25SR (5'-ATGACGACGCATTTGGCTAC-3') for 25S and GAPDHF (5'-CATCACCATTGTCTCCAACG-3') and GAPDHR (5'-AACCTTCAACGATGCCAAAC-3') for GAPDH. Samples were pre-diluted at 1/100 in ultrapure water before performing a quantitative PCR using a mix of 4 µL cDNA, 7.5 µL SYBRGreen®, 0.75 µL forward/reverse primers and 2 µL H<sub>2</sub>O with the following program: 3 min denaturation at 95°C and 35 cycles (10 s at 95°C and 40 s at 60°C) in a dedicated thermocycler (C1000 Thermal Cycler and CFX96 Real-Time System from Bio-Rad®). Fluorescence was measured at 520 nm using the provided Opticon Monitor 3.0 software from Bio-Rad®. Following the results of the amplification, the relative expression ratio of the *Lp-SUT1* was normalized following the Pfaffl (2001) method using 25S and GAPDH as reference genes, averaging the results at the latest step possible.



**FIGURE 67.** Excised leaf blades transpiration (net water loss) after 8 h in darkness with the different treatment solutions. Transpiration was calculated by deduction from the total water loss (evaporation + transpiration) of the evaporation measured in tubes without excised leaf blades. When larger than symbols, error bars represent  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 12$ . Different letters above bars indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Tukey  $t$ -test or Dunn's test for multiple comparisons). GSA : glucosamine. 3-OMG : 3-*O*-méthylglucose. 6-DOG : 6-deoxyglucose. 2-DOG : 2-deoxyglucose.

## 5. Statistical analysis

For all measurements, results are showed as the mean  $\pm$  SE measured in the excised blades originating for  $n = 12$ . Statistical analysis was performed using R Software (ver. 3.6.3, [R Core Team, 2017](#)). Data following a normality law (Shapiro-Wilk) and a variance homogeneity (Bartlett) were analyzed through a 1-factor ANOVA followed by a pairwise comparison (Tukey  $t$ -test,  $p < 0.05$ ) while other data sets were submitted to a Kruskal-Wallis analysis followed by a Mann-Whitney using the Bonferroni correction for the post-hoc test and multiple comparisons considering  $p < 0.05$ .

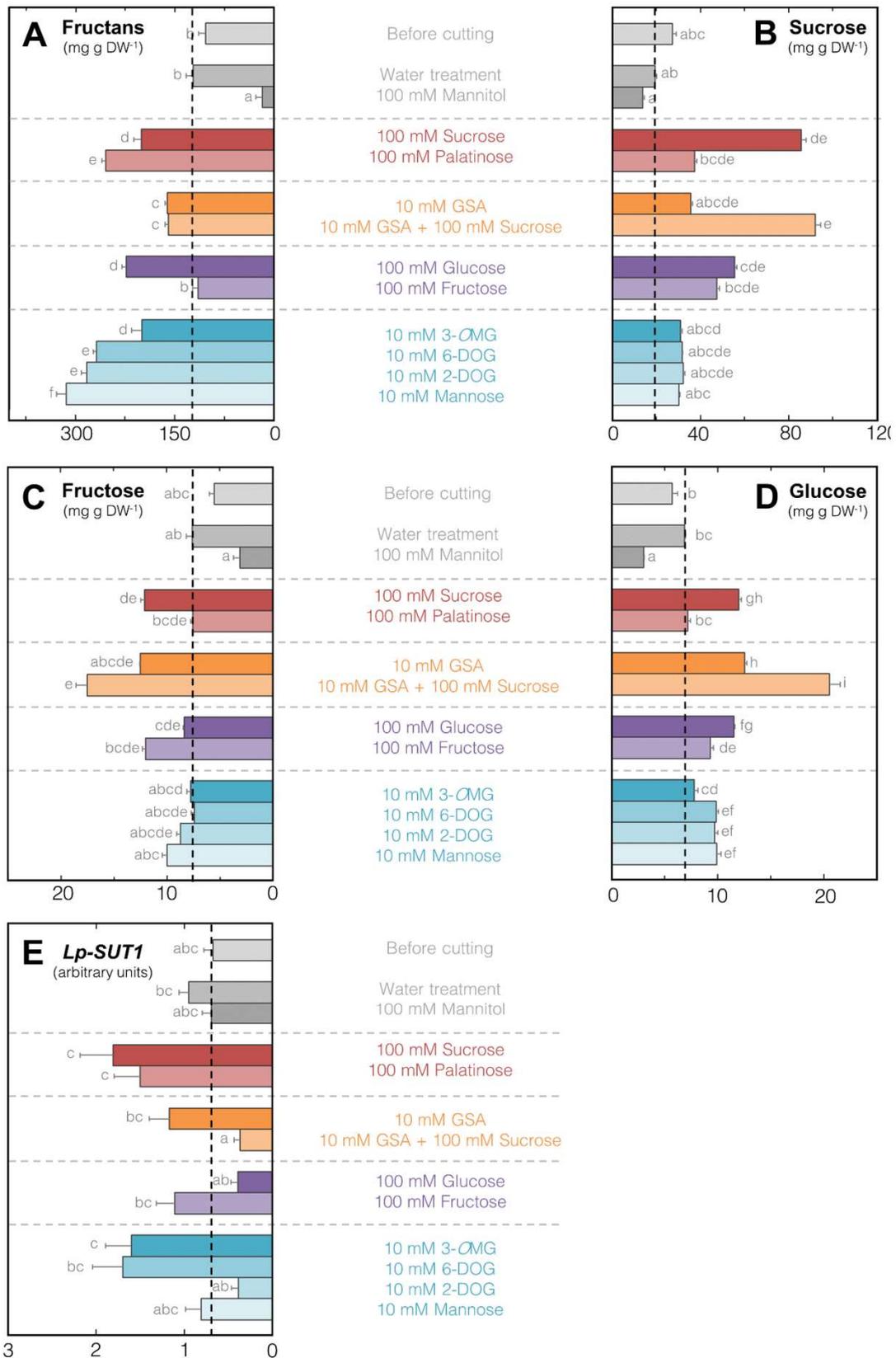
### C. Results

#### 1. Transpiration of excised leaf blades in response to exogenous sugars

The evaporation rate of the experimental device itself was very low and was estimated at 0.4 g of evaporated H<sub>2</sub>O in 8 h in the dark. Transpiration rate was not significantly different across treatments, except with 100 mM palatinose and mannitol 100 mM which led to a reduction of the transpiration ([Figure 67](#)).

#### 2. Sugar contents and *Lp-SUT1* transcript levels in response to exogenous sugars

The 100 mM mannitol treatment was used as an osmotic control to discriminate between sugar effects and sugar-mediated osmotic effects on *Lp-SUT1* transcript levels. Since the supply of mannitol did not induce the regulation of *Lp-SUT1* transcript levels in the excised leaf blades compared to the initial plants, effect of exogenously supplied sugars on *Lp-SUT1* expression was compared to that of the mannitol treatment. In response of the mannitol treatment, fructans, glucose and fructose contents strongly decreased while the decline of sucrose content was not significant. Since this response might be specific to the mannitol when it enters the cells (reaching 13,5 mg gDW<sup>-1</sup> on average in the excised blades, *unpubl. data*) and since its compartmentation (exclusively cytoplasmic, [ref](#)) and metabolism is different to that of fructans, sucrose and hexoses ([Patel and Williamson, 2016](#)), effect of exogenously supplied sugars on sugar contents in the cells was rather compared to that of the water treatment.



**FIGURE 68.** Evolution after 8 hours in darkness of the **(A)** fructans, **(B)** sucrose, **(C)** fructose, **(D)** glucose contents and **(E)** *Lp-SUT1* relative transcript levels in excised leaf blades of *L. perenne* whose bases were immersed in different sugar solutions. When larger than symbols, error bars represent  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 12$ . Different letters above bars indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Tukey  $t$ -test or Dunn's test for multiple comparisons). GSA : glucosamine. 3-OMG : 3-*O*-méthylglucose. 6-DOG : 6-deoxyglucose. 2-DOG : 2-deoxyglucose.

When supplied with 100 mM sucrose, fructan, fructose and glucose contents significantly increased by 40% in the excised leaf blades compared to the water treatment (Figure 68A, 68C and 68D). Sucrose accumulated to higher levels, exceeding 80 mg g DW<sup>-1</sup> (3-fold increase) at 8 h (Figure 68B). *Lp-SUT1* transcript levels were up-regulated, showing a tendency for a 60% increase at the end of the experiment by comparison with the mannitol treatment (Figure 68E).

Replacing sucrose with 100 mM palatinose, a sucrose analogue which is not metabolized by the plant, fructan content further increased by 20%, reaching levels up to 275 mg g DW<sup>-1</sup> (Figure 68A). However, sucrose only tended to accumulate compared to the water treatment (+ 50%) (Figure 68B) while fructose and glucose levels remained steady, both at 7 mg g DW<sup>-1</sup> (Figure 68C and 68D). *Lp-SUT1* relative transcript levels were also up-regulated, but only showing a tendency of a 50% increase when compared to the mannitol treatment, 10% less than in response to 100 mM sucrose (Figure 68E).

By feeding the excised leaf blades with 10 mM glucosamine, an inhibitor of the hexokinase phosphorylation activity, a small (25%) but significant increase of the fructan content was measured (Figure 68A). Sucrose content also significantly increased by 2 folds, reaching 40 mg g DW<sup>-1</sup>, like the palatinose treatment (Figure 68B). However, fructose and glucose both increased by 40%, accumulating to 13 mg g DW<sup>-1</sup>, similarly, this time, to the sucrose treatment (Figure 68C and 68D). The addition of 100 mM sucrose in parallel with glucosamine only affected sucrose, fructose and glucose contents. As expected, sucrose accumulated to similar levels than 100 mM sucrose alone (Figure 68B), but fructose and glucose contents further increased by 35% (reaching 18 mg g DW<sup>-1</sup>) and 25% (20 mg g DW<sup>-1</sup>) respectively (Figure 68C and 68D). *Lp-SUT1* transcript levels showed a tendency of a 35% increase in response to 10 mM glucosamine alone, but a 50% decrease in response to glucosamine in presence of sucrose (Figure 68E).

Using 100 mM glucose or 100 mM fructose did not lead to the same results as 100 mM sucrose. In response to glucose, fructans significantly increased by 45% compared to H<sub>2</sub>O, to a slightly higher level than in response to sucrose (Figure 68A and 68B). Sucrose content increased by 65% and reached 57 mg g DW<sup>-1</sup>, which was a third lower than the 100 mM sucrose or the glucosamine and sucrose treatments (Figure 68B). Fructose content significantly increased by 10% and glucose content by 40% when compared to H<sub>2</sub>O (Figure 68C and 68D). In response to fructose, fructan levels remained steady, while sucrose significantly accumulated with a 60% increase close to the 100 mM glucose treatment (Figure 68A and 68B). Fructose significantly increased by 40% and glucose by 20% (Figure



68C and 68D). Meanwhile, the glucose treatment tended to decrease *Lp-SUT1* transcript levels by a half, while the fructose treatment had no effect (Figure 68E).

When the excised leaf blades were submitted to 3-*O*-methylglucose or 6-deoxyglucose, two sugars which are not metabolized by the plant, fructan contents significantly increased by 30 to 55% respectively, by comparison with the water treatment (Figure 68A). Sucrose content only tended to increase by a third (Figure 68B), while, overall, fructose and glucose content remained steady (Figure 68C and 68D). However, *Lp-SUT1* transcript levels showed a tendency for a 2-fold increase which was comparable to the sucrose and palatinose treatments (Figure 68E).

Finally, in response to 10 mM 2-deoxyglucose or 10 mM mannose, fructan contents also increased by up to 65% (Figure 68A). Sucrose and fructose contents tended to increase by less than a quarter than the water treatment (Figure 68B and 68C). Glucose content significantly increased by 25% for both 2-deoxyglucose and mannose (Figure 68D). *Lp-SUT1* transcript levels tended to decrease by a half for 2-deoxyglucose and remained steady for mannose (Figure 68E).

## D. Discussion

To date, the sugar signal(s) for *Lp-SUT1* transcriptional regulation is (are) still unknown. Therefore, the aim of this study was to identify **i**) which sugar(s) act as signal(s) and **ii**) whether hexokinase dependent and independent signaling pathways could mediate the transcriptional regulation of *Lp-SUT1*. Young excised mature leaf blades were supplied with various sugars in the dark to avoid influence of photosynthesis while maintaining a relative tissue integrity regarding the sucrose lateral transport.

### 1. Sucrose is an up-regulating signal for *Lp-SUT1* expression

Similarly to the previous study focused on dial variation of sugars in leaves of intact plants (Lonesang *et al.*, submitted), fructans content did not vary significantly in excised leaf blades treated with water during 8 h of darkness. However, because of sink tissue removal and in contrast to what happened in leaves of intact plants, sucrose content only slightly decreased in detached leaves. In absence of sink tissues, the long distance sucrose transport was probably interrupted and *Lp-SUT1* relative transcript levels were barely affected in this condition.



When excised leaves were fed with sucrose, *Lp-SUT1* relative transcript levels increased together with sucrose content. Interestingly, the sucrose analog palatinose, which is not synthesized, cleaved or transported by transporters in higher plants (Loreti et al., 2000; Fernie et al., 2001), also increased *Lp-SUT1* relative transcript levels. This result should be carefully considered since the supply of palatinose increased the sucrose content in leaf blades. Sucrose might be further metabolized into monosaccharides which could in turn act as signals. However, the increase of sucrose content might correspond to palatinose knowing that palatinose it co-eluted with sucrose in the HPLC system used. This will be checked in the next future. More importantly, the supply of palatinose did not result in an increase in the glucose or fructose contents, ruling out the possibility that *Lp-SUT1*-inducing effect of palatinose was triggered by hexose signaling pathways. Altogether, these results strongly suggest that sucrose itself functions as a signal that up-regulated *Lp-SUT1* expression. In the past, up-regulation of lateral transport of sucrose was suggested to occur in the remaining leaf sheaths of defoliated plants (Berthier et al., 2009; 2014; Furet et al., 2012). During the first hours of regrowth, fructans were quickly degraded and converted into sucrose in leaf sheaths to supply the foliar meristems located in the basal part of elongating leaves (Morvan-Bertrand et al., 1999; 2001; Amiard et al., 2004), through lateral and long-distance transport of sucrose in leaf sheaths. The increase of *Lp-SUT1* relative transcript levels in leaf sheaths (Berthier et al., 2009; 2014; Furet et al., 2012) could be triggered by the sucrose provided by the fructan degradation.

Sucrose sensors are still unknown. Using non-metabolizable disaccharides, evidence for extracellular sugar sensing mechanisms has been obtained in barley embryos (Loreti et al., 2000), potato tubers (Fernie et al., 2001) and grape cell culture (Atanassova et al., 2003). Sucrose sensors might correspond to sucrose transporters located at the plasma membrane or at the tonoplast (Lalonde et al., 1999; Barker et al., 2000; Li et al., 2012), to receptor located at the plasma membrane (Phan et al., 2013) or to intracellular enzymes (Rolland et al., 2006; Wind et al., 2010). If palatinose itself rather than palatinose-induced increase of sucrose triggered *Lp-SUT1* expression, it could be hypothesized that the sucrose sensor was located at the plasma membrane.

After feeding leaf blades with sucrose, the natural substrate of fructan synthesis, fructans were produced. Accumulation of fructans has been already reported in response to sucrose treatment in the dark, in detached leaves of barley (Müller et al., 2000; Jin et al., 2017) and wheat (Martinez-Noël et al., 2001; 2009). In barley leaves, sucrose specifically stimulates the fructan synthesis by inducing the expression of the sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT), one of the key enzymes of fructan metabolism (Müller et al.,



2000; Nagaraj *et al.*, 2001). Trehalose, another sucrose analog, had the same effect as sucrose, while monosaccharides phosphorylated by hexokinase but not or weakly metabolized, such as mannose and 2-deoxyglucose, had no stimulating effects on fructan synthesis and 6-SFT activity. This indicates that the regulation of fructan synthesis was based on the sensing of sucrose and occurred independently of hexokinase (Müller *et al.*, 2000). 6-SFT is also one of the key enzymes of fructan synthesis in *L. perenne* (Lasseur *et al.*, 2011) and it can be speculated that its regulation is also mediated by sucrose. In detached barley leaves, trehalose had a stimulatory effect on 6-SFT activity and 6-SFT mRNA but did not stimulate fructan accumulation (Müller *et al.*, 2000). By contrast with this result, palatinose stimulated fructan accumulation in detached leaves of *L. perenne*. The required source of carbon to sustain fructan accumulation is unknown. Since sucrose also functions as a signal to stimulate starch synthesis in many species (Yoon *et al.*, 2021), it is unlikely that starch degradation occurred and was the source of carbon. In line with this assumption, Jin *et al.* (2017) reported a synthesis of starch and fructans in excised leaves of barley fed with sucrose.

## **2. Glucose is a signal for *Lp-SUT1* transcriptional regulation but not fructose**

Hexose analogs were used to assess whether they act as signals for the regulation of *Lp-SUT1* expression. The effect of 2-deoxyglucose and mannose, which are transported into the cells and phosphorylated by hexokinase but further poorly metabolized are considered to be indicative of the involvement of hexokinase signaling pathway (Roitsch *et al.*, 1995; Umemura *et al.*, 1998; Pego *et al.*, 1999). 3-*O*-methylglucose and 6-deoxyglucose are glucose analogs which are imported by the cell but not phosphorylated by hexokinase (Villadsen and Smith, 2004), their effect indicates a hexose-independent signaling pathway (Cortès *et al.*, 2003). Glucosamine is a weak inhibitor of hexokinase activity. When applied at 10 mM in the incubation medium, it reduced hexokinase activity by 25% (Hofmann and Roitsch, 2000). Glucosamine also inhibited hexokinase activity in detached leaves of *L. perenne* as shown by their greater content of glucose and fructose.

Glucose and 2-deoxyglucose lowered *Lp-SUT1* relative transcript levels by about a half. When hexokinase activity was inhibited by glucosamine, *Lp-SUT1* expression was not affected. Together, these results strongly suggest that glucose acts as a signal hexokinase-dependent that down-regulated *Lp-SUT1* expression.



3-*O*-methylglucose and 6-deoxyglucose increased the level of *Lp-SUT1* expression as much as sucrose and palatinose. They both stimulated the accumulation of sucrose so that their effect could be due to sucrose signaling. However, this accumulation is much lower than that induced by glucose which down-regulated *Lp-SUT1* expression. Together with sucrose, glucose might therefore act as an up-regulating signal for *Lp-SUT1* expression through hexokinase-independent signaling pathway. According to present knowledge, this glucose signal could be sensed at the plasma membrane by hexose transporters (Lalonde *et al.*, 1999) or by receptors such as RGS1 (regulator of G-protein signaling protein 1) (Grigston *et al.*, 2008; Phan *et al.*, 2013). We hypothesize that this specific glucose signal for *Lp-SUT1* up-regulation independent of the hexokinase pathway is linked to the cell-wall invertase activity which converts sucrose into glucose and fructose, producing a glucose signal in parallel to the apoplastic sucrose signal.

Since glucosamine was a specific inhibitor of hexokinase activity, the expected effect of glucosamine and sucrose co-supply was to measure more *Lp-SUT1* transcripts than with sucrose alone. 10 mM Glucosamine combined with 100 mM sucrose not only suppressed the inducing effect of sucrose but also decreased the expression of *Lp-SUT1*. It is puzzling to see a glucose-like response (inhibition of *Lp-SUT1* transcript levels) when the hexokinase activity is supposed to be inhibited by glucosamine. In fact, glucosamine is not a specific inhibitor of hexokinase. It also modulates the activity of MAPKs by activating them (at concentrations between 0.01 mM and 10 mM with a maximum at 1 mM) or inhibiting them (at concentrations greater than 10 mM) depending on its concentration (Hofmann and Roitsch, 2000). MAPKs belonged to numerous signaling pathways involved in response to environmental stress and phytohormones (Bigard and Hirt, 2018; Jagodzik *et al.*, 2018). Glucosamine could have inhibited sucrose up-regulated effect on *Lp-SUT1* transcript level through the regulation of MAPKs activity of the glucose and/or sucrose signaling pathways involved in *Lp-SUT1* transcriptional regulation.

The four structural analogs of glucose increased the fructan content in detached leaf blades by unknown mechanisms and from unknown carbon sources. Glucose but not fructose induced fructan accumulation. This has been previously reported in detached leaves of barley (Müller *et al.*, 2000). Several hypothesis might explain this result : **i**) despite the fact that diverse sugar transporters are known to transport fructose across membranes (Wingenter *et al.*, 2010; Jeena *et al.*, 2018), the mobility of fructose out- and inside the cells was lower than that of glucose, **ii**) fructose was not used for sucrose synthesis required for fructan accumulation, **iii**) fructose was a signal that repressed the fructosyltransferases expression and/or induced the fructan degrading enzymes expression. By using <sup>13</sup>C-



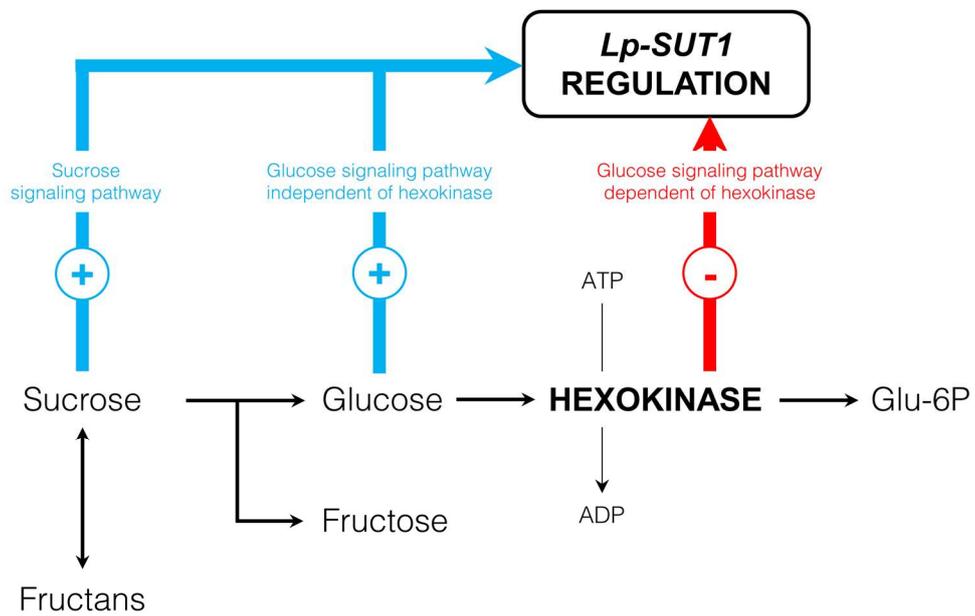
fructose, [Amiard et al. \(2003\)](#) demonstrated, however, that fructose was converted into sucrose in leaf sheaths before being transported to leaf meristems to sustain regrowth. Fructose can be used for sucrose synthesis, refuting therefore the second hypothesis.

As far as the regulation of *Lp-SUT1* is concerned, fructose only slightly increased the level of transcripts. Since fructose increased the sucrose content, it is possible that the fructose effect was in fact a sucrose-mediated effect. Therefore, fructose did not seem to act as a signal that regulates *Lp-SUT1* expression.

Fructan synthesis by fructosyltransferases releases glucose ([Gallagher et al., 2007](#)). Upon supply of sucrose, glucose and fructose contents increased to similar extent, suggesting that glucose released by the synthesis of fructans in the vacuole was recycled for the synthesis of fructans via the formation of sucrose in the cytoplasm, which required the phosphorylation of glucose by hexokinase ([Lattanzi et al., 2012](#)). Since glucose is a negative signal for *Lp-SUT1* expression when it is sensed by hexokinase, this suggests that glucose may attenuate the inducing effect of sucrose. In support with this assumption, the increase of *Lp-SUT1* relative transcript levels that occurred in the remaining leaf sheaths (source tissues) as a response to defoliation ([Berthier et al., 2009; 2014; Furet et al., 2012](#)) was of 10-fold higher amplitude than in detached leaf blades (sink tissues) fed with sucrose. The difference between the two physiological conditions is that fructans were degraded in the remaining leaf sheaths and accumulated in detached leaf blades. Degradation of fructans produces essentially fructose which conversion into sucrose requires its phosphorylation. Fructose phosphorylation was probably not catalyzed by hexokinase with sensing function and subsequent down-regulating effect. In line with this assumption, [Kato-Noguchi et al. \(2005\)](#) showed in lettuce, a fructan accumulating species, that fructose acted as a signal through a hexokinase-independent signaling pathway. They used psicose, a fructose analog phosphorylated by hexokinase and fructokinase but not further metabolized, in combination with mannoheptulose, a specific competitive inhibitor of hexokinase. Interestingly, their results open the possibility for fructokinase to be a fructose sensor.

### **3. Different sugar signaling pathways for *Lp-SUT1* regulation**

Our results strongly suggest that sucrose acts as a signal for *Lp-SUT1* transcriptional up-regulation ([Figure 69](#)). We hypothesize that sucrose would be sensed at the plasma membrane by yet unknown sucrose sensors and would be indicative of apoplastic sucrose availability for its further import within the cells ([Sakr et al., 2018](#)). In



**FIGURE 69.** Signaling pathways for *Lp-SUT1* transcriptional regulation. Both sucrose and glucose hexokinase-independent pathways (in blue) upregulate *Lp-SUT1* transcription whereas a glucose hexokinase-dependent pathway (in red) down-regulates it.

source tissues, the retrieval of sucrose from the apoplast would increase the lateral sucrose flux. In sink tissues, the retrieval of sucrose from the apoplast would allow its further use and/or conversion into fructan reserves. In plants, specific SUTs are investigated as putative sugar sensor (Barker *et al.*, 2000; Kühn and Grof, 2010; Sakr *et al.*, 2018). In *L. perenne*, LpSUT2 could be one of them (Berthier *et al.*, 2014). We also identified a glucose signal independent of the hexokinase pathway for *Lp-SUT1* transcriptional up-regulation (Figure 69), and thus by contrast with the results of Villadsen and Smith (2004) who showed no transcriptional regulation of 200 *A. thaliana* genes tested in response to 3-O-methylglucose and 6-deoxyglucose. Similarly to the sucrose signal, this glucose signal would be representative of apoplastic carbon available for its further import in the cytoplasm, thus increasing *Lp-SUT1* transcript levels (and possibly protein abundance and activity) to retrieve sucrose from the apoplast (Kühn *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012).

Finally, a glucose signal dependent of hexokinase but for *Lp-SUT1* down-regulation was also highlighted (Figure 69). The sensitivity of the transcriptional regulation of *Lp-SUT1* to cytoplasmic glucose could allow the plant to detect an excess of glucose within the cell, thus decreasing *Lp-SUT1* transcript levels (and possibly protein abundance and activity) to decline or stop the retrieval of sucrose from the apoplast. This signal would be complementary to the sucrose and glucose signals at the cell membrane for the plant to assess both the state of external and internal sugar availability. This complex interaction between sugar signals resulting in the overall regulation of *Lp-SUT1* transcript levels would allow the plant to tightly control the apoplastic sugar concentration in the tissue and sucrose importation rate in the cell cytoplasm.

## Acknowledgements

We thank all the staff which allowed this work to be possible with an exceptional contribution of Ameline A.F., Pichon J. and Bodereau M. for plant material production and preparation and Fremont J. for the molecular analysis.



## **Discussion générale**

---



## VI. Discussion générale

Ce travail doctoral s'inscrit dans le champ des travaux du département AgroEcoSystem de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) et dans le projet de l'équipe Fructanes, Environnement et Transport des glucides (FEAST). Cette équipe s'intéresse à la fixation du carbone, sa mise en réserve sous la forme de fructanes et sa redistribution par le transport des glucides en réponse à des modifications de l'environnement prairial. Ses objectifs sont de produire de nouvelles connaissances relatives à l'utilisation du carbone par les plantes prairiales tel que le ray-grass anglais pour la gestion durable des prairies normandes.

Chez le ray-grass anglais, une mobilisation massive et rapide des fructanes favorise la repousse après coupe par fauche ou pâturage de nouveaux limbes et implique la biosynthèse de saccharose, qui doit être exporté à longue distance au travers du phloème vers les méristèmes foliaires situées à la base des feuilles. Dans les gaines, qui sont épargnées par la coupe et qui deviennent un tissu source de glucides, ce saccharose est préalablement transporté latéralement depuis les cellules du parenchyme jusqu'aux abords du phloème, en passant par les cellules de la gaine périfasciculaire. Il a aussi été démontré que le chargement du phloème était de nature apoplasmique. Le transporteur *LpSUT1* est un symporteur  $H^+$ /saccharose qui a été localisé dans le mésophylle des limbes et le parenchyme des gaines. Il est aussi présent dans la gaine périfasciculaire de ces deux tissus, mais absent des cellules compagnes et des tubes criblés du phloème. Ce transporteur permet l'importation active du saccharose apoplasmique vers le cytoplasme des cellules et représente donc un acteur majeur de la distribution du carbone au sein des cellules et des tissus dans lequel il est exprimé. En parallèle à la mobilisation des fructanes observée lors de la défoliation, l'expression transcriptionnelle du gène *LpSUT1* est fortement augmentée. De ce fait, **il a été proposé que la régulation transcriptionnelle de *LpSUT1* soit un élément important pour la régulation du transport latéral du saccharose dans les sources et dans les puits.**

**Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à perturber les relations entre les sources et les puits de glucides par des facteurs biotiques et abiotiques susceptibles de provoquer une modification de la disponibilité en glucides, comme dans le cadre de la**



défoliation, et nous avons suivi leurs effets sur la régulation transcriptionnelle du transporteur *LpSUT1*.

Les glucides sont aussi des molécules « signal » capables de percevoir les modifications des relations source-puits et de moduler l'expression de gènes. **Nous avons donc recherché l'existence d'un ou plusieurs signaux glucidiques responsables de la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* et nous avons testé l'implication de l'hexokinase.**

**La discussion des résultats obtenus s'articule en trois points :**

- L'importance de la régulation transcriptionnelle du transporteur *LpSUT1* vis-à-vis de la répartition des ressources glucidiques et du transport du saccharose en réponse à des modulations de l'environnement impactant les sources et/ou les puits (**correspondant aux chapitres 1 et 2**) ;
- La régulation transcriptionnelle de *LpSUT1* par des signaux glucidiques et l'implication de voies de signalisation dépendantes ou indépendantes de l'hexokinase (**chapitre 3**) ;
- La physiologie du transport du saccharose du ray-grass anglais au regard des nouveaux résultats acquis dans le cadre de ce travail doctoral.

**A. Importance de la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* en réponse à une modulation des sources et puits**

Il était nécessaire au début de ce travail doctoral de choisir des facteurs abiotiques et biotiques pertinents qui affecteraient les organes sources ou puits du ray-grass anglais. **Il existait par ailleurs des lacunes à combler sur la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* dans les limbes.** En effet, les études menées jusqu'à présent par l'équipe FEAST concernaient principalement les réponses de la plante à la défoliation ; elles étaient donc focalisées sur les tissus autres que les limbes éliminés par la coupe (Berthier et al., 2009, 2014 ; Furet et al., 2012).



## 1. Le cycle nycthéral et le rythme circadien pour les sources

La succession de périodes de jour et de nuit (le cycle nycthéral) modifie les concentrations d'amidon et de saccharose disponible à l'export dans les limbes de nombreuses espèces végétales (Bläsing et al., 2005; Borland et Farrar, 1985 ; 1989; Johnson, 2016). **Chez le ray-grass anglais, les fructanes sont les réserves de carbone majoritaires et leur variation nycthérale est inconnue.** Dans les limbes d'une espèce proche comme le pâturin annuel (*Poa annua* L.), Borland et Farrar (1985) ont démontré une mobilisation immédiate de l'amidon dès le début de la nyctipériode avec en parallèle une augmentation progressive de la mobilisation du saccharose et une diminution de son exportation. Les teneurs en fructanes, quant à elles, restaient stables au cours du cycle nycthéral. A l'inverse chez *L. multiflorum*, Sandrin et al. (2013) ont montré que les teneurs en fructanes dans les gaines augmentaient l'après-midi et suggéré qu'elles restent stables pendant la nuit, contrairement à l'amidon. De plus, les niveaux de transcrits des SUTs impliqués dans le chargement direct du phloème montraient une variation périodique de leurs niveaux de transcrits avec un maximum et un minimum mesurés au milieu ou à la fin de l'héméroperiode et de la nyctipériode (Shakya and Sturm, 1998 ; Kühn et al., 1997 ; Leach et al., 2017). Chez le ray-grass anglais, l'expression du gène *LpSUT1* apparaît indépendante de l'intensité lumineuse pour des plantes soumises ou non à un ombrage (Furet et al., 2012). Cependant, dans cette étude, les plantes ont été récoltées à la même heure, au cours de jours différents, si bien qu'**une régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* au cours du cycle nycthéral pourrait être passée inaperçue.** Par ailleurs, l'expression des SUTs phloémiens de la pomme de terre comme *StSUT1* et *StSUT4* est modulée par l'horloge génétique interne des plantes, le rythme circadien (Chincinska et al., 2008). **Etudier la régulation transcriptionnelle du transporteur *LpSUT1* en réponse au cycle nycthéral et du rythme circadien semblait donc importante pour 1) étudier l'importance du transport latéral dans la gestion quotidienne des ressources carbonées du ray-grass anglais, 2) élargir les connaissances actuelles quant à la régulation de l'expression du gène *LpSUT1* dans le limbe et 3) acquérir de nouvelles connaissances quant à la régulation des réserves de fructanes au regard de celles d'amidon.**

Les résultats ont montré une stabilité relative des teneurs en fructanes dans les limbes et dans les gaines au cours du cycle nycthéral. Dans ces mêmes organes, les teneurs en amidon et en saccharose augmentaient durant l'héméroperiode, et diminuaient comme attendu pendant la nyctipériode. La nuit, la plante utilise donc en priorité l'amidon et le saccharose pour subvenir aux besoins en carbone de son métabolisme en l'absence de photosynthèse. Les gaines, accumulatrices de réserves de fructanes, ne deviennent pas



des sources temporaires importantes de carbone durant la nuit, comme c'est le cas pour permettre la refoliation après coupe (Morvan-Bertrand et al., 2001). De ce fait, la relative stabilité des niveaux de transcrits *LpSUT1* observée au cours de cette expérimentation semble cohérente avec l'idée qu'une régulation en continu du transport latéral du saccharose soit inutile en conditions physiologiques pour qu'il soit chargé dans le phloème pour approvisionner les organes puits. L'amidon et le saccharose sont aussi utilisés sur place au sein des cellules des limbes et des gaines matures, réduisant la nécessité d'un approvisionnement à longue distance aussi important qu'au cours de l'héméropériode. Chez d'autres espèces végétales, de nombreuses études ont démontré par le passé que la régulation des niveaux de transcrits d'un autre groupe de SUTs (responsables du chargement direct du saccharose) était positivement corrélée à l'intensité lumineuse (Kühn et al., 1997; Shakya and Sturm, 1998; Chincinska et al., 2008; Xu et al., 2018). De ce fait, la régulation transcriptionnelle du transporteur *LpSUT1* pourrait être de moindre importance en comparaison de celle du transporteur responsable du chargement direct du phloème en saccharose, qui n'a pas encore été identifié à ce jour.

## 2. Les bactéries de la phyllosphère comme puits supplémentaire de carbone

La régulation de transporteurs des glucides a été mise en évidence chez de nombreux végétaux dans le cadre d'interactions entre plantes et micro-organismes (champignons, bactéries) (Chen et al., 2010) et le plus souvent, au niveau de la rhizosphère. Ces dernières années, un nouveau champ de recherche fait l'objet de nombreuses études portées sur les micro-organismes présents à l'interface plante-atmosphère (*i.e* la phyllosphère) et plus particulièrement vis-à-vis de ceux qui ne sont pas pathogènes. Parmi l'ensemble des micro-organismes, les bactéries sont de loin les plus majoritaires et leurs populations peuvent atteindre  $10^6$  à  $10^7$  cellules par  $\text{cm}^2$  ; (Andrews et Harris, 2000). Bien que la phyllosphère soit considérée comme un environnement hostile pour la survie et le développement des bactéries, une petite partie des glucides de la plante sont retrouvés au niveau de la phyllosphère. Ces derniers peuvent constituer une source de carbone et d'énergie. Chez le maïs, par lessivage des surfaces foliaires, il a pu être mesuré jusqu'à  $0,3 \text{ mg m}^{-2}$  de glucose, fructose et jusqu'à  $1,1 \text{ mg m}^{-2}$  de saccharose (Fiala et al., 1990). Chez le peuplier (*Populus tremuloides*), ces concentrations pouvaient atteindre à la surface des



feuilles matures 300  $\mu\text{g g MS}^{-1}$  de fructose, 42  $\mu\text{g g MS}^{-1}$  de glucose et 86  $\mu\text{g g MS}^{-1}$  de saccharose (Wildman et Parkinson, 1979). Pour leur survie et leur développement, **les bactéries sont donc en compétition constante avec leur plante-hôte pour les glucides (Mercier et Lindow, 2000), si bien qu'elles représenteraient un puits de carbone supplémentaire pour la plante.** Chez le ray-grass anglais, ce carbone pourrait être le saccharose (ou les produits de son hydrolyse par l'invertase pariétale) qui transite dans l'apoplasme pendant son transport latéral et qui fuirait vers la surface des feuilles (Ryffel et al., 2016). L'hypothèse testée était qu'une diminution de la transcription du gène *LpSUT1* induite par les bactéries pourrait favoriser la fuite du saccharose (et plus généralement de glucides) depuis les limbes, en faveur des bactéries et aux dépens des organes puits de la plante-hôte. A l'inverse, une augmentation de la transcription du gène *LpSUT1* permettrait à la plante de séquestrer le saccharose dans le cytoplasme des cellules. Cette possibilité était intéressante pour l'équipe ABTE (Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements) car les bactéries de la phyllosphère du ray-grass anglais, après avoir été ingérées par les bovins, pourraient affecter la santé des troupeaux et la qualité des produits laitiers (Msalya, 2017; Velázquez-Ordoñez et al., 2019). Un partenariat préexistant dans le cadre du projet régional « Microphyllos » a ouvert l'opportunité de tester cette hypothèse avec l'appui technique de la plate-forme de microscopie du CMABIO3 (Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie) de l'Université de Caen Normandie. **Dans le cadre de ce travail doctoral, étudier la régulation transcriptionnelle du transporteur LpSUT1 en réponse à la présence de bactéries de la phyllosphère semblait donc une opportunité innovante pour 1) évaluer l'importance du transport latéral du saccharose dans les relations plante-bactéries non-pathogènes de la phyllosphère et 2) la place de la régulation transcriptionnelle du transporteur LpSUT1 lors de l'addition d'un puits supplémentaire de carbone.**

Des souches bactériennes (*Curtobacterium* et *Hafnia*) en lien avec la production laitière ont été isolées à partir de champs pâturés par des bovins et sélectionnées vis à vis de leurs consommations en glucides végétaux par l'équipe ABTE. Les analyses microscopiques ont révélé une densité bactérienne plus de 30 fois supérieure à celle initialement présente sur des plantes cultivées en serre, si bien que tout effet observé par la suite pouvait être associé à la présence des bactéries pulvérisées à la surface des feuilles (*i.e.* sur la phyllosphère). Les bactéries formaient des petits agrégats dans les creux de l'épiderme mais indépendamment des nervures. La présence d'un sclérenchyme lignifié sur la face inférieure des feuilles du ray-grass anglais pourrait être un facteur qui limite la fuite du saccharose vers l'épiderme **si bien que l'hypothèse d'une fuite accrue du saccharose à proximité du phloème semble peu probable.** Malgré la stabilité des



populations bactériennes au cours des 7 jours suivant la pulvérisation des bactéries, de nombreux effets ont été mesurés sur les teneurs en glucides de la plante. Une diminution généralisée des réserves de fructanes a notamment été mesurée dans les limbes et les gaines pour les quatre souches testées. Cette diminution était accompagnée d'une perturbation de leurs teneurs en saccharose en faveur d'une répartition accrue des glucides à la base des feuilles en croissance où se trouvent les méristèmes foliaires. Une augmentation des niveaux de transcrits *LpSUT1* a été mesurée au jour 1, principalement à la base des feuilles en croissance, mais pas au niveau des limbes, excepté pour *Curtobacterium* 1 à 7 jours. Cette induction positive dans ce puits éloigné permettrait l'augmentation de l'importation du saccharose dans le symplasme des cellules et son utilisation pour la croissance foliaire. La consommation différente en glucides des souches bactériennes ne semble pas non plus avoir eu d'effet sur la régulation transcriptionnelle du transporteur *LpSUT1*. De ce fait, **l'existence d'une voie de signalisation déclenchée par la présence de la bactérie pour réguler directement les niveaux de transcrits *LpSUT1* à son profit semble peu probable.**

Le dénominateur commun des résultats obtenus au cours de cette expérimentation est la mobilisation partielle des fructanes en parallèle de la favorisation de l'importation du saccharose à la base des feuilles en croissance observée au jour 1 au travers de l'augmentation des niveaux de transcrits *LpSUT1* mesurée. Cette réponse, bien que de moindre amplitude, est très comparable à celle observée en réponse à la défoliation (Berthier et al., 2009, 2014 ; Furet et al., 2012). Encore une fois, le flux d'exportation du saccharose dans les sources semble être suffisant pour ne pas nécessiter systématiquement une augmentation transcriptionnelle du gène *LpSUT1*, ce qui contribue à suggérer un rôle mineur de ce transporteur dans le transport latéral du saccharose depuis les sources, comme le limbe. **Un lien semble exister dans les tissus puits entre le métabolisme des fructanes et la régulation du transport latéral de saccharose par le biais de l'expression des niveaux de transcrits *LpSUT1*. Ce lien pourrait être établi par les glucides eux-mêmes ou par leur rôle signal.**

## **B. Recherche de signaux glucidiques et Implication de la voie de signalisation de l'hexokinase**

C'est dans les limbes que les niveaux de transcrits *LpSUT1* sont les plus élevés (Berthier et al., 2009) et les plus stables (Chapitre 1 et 2), en dépit de fortes variations des teneurs en saccharose en réponse au cycle nyctéméral (Chapitre 1) et de fructanes en



présence de bactéries de la phyllosphère (Chapitre 2). Ce résultat n'est pas en faveur du saccharose agissant comme une molécule signal qui modulerait l'expression du gène *LpSUT1*. Il est néanmoins possible que l'amplitude de ces variations de teneurs en glucides n'ait pas été assez forte, ou que le seuil au-delà duquel la variation de la concentration en saccharose puisse être perçue n'ait pas été atteint. Il n'existait au début de la thèse aucune donnée portant sur la régulation transcriptionnelle de *LpSUT1* en réponse au glucose, fructose et saccharose. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation transcriptionnelle des SUTs sont encore peu connues (Wind et al., 2010 ; Tognetti et al., 2013 ; Li et Sheen, 2016). Un apport exogène de glucides, d'analogues de glucides et d'inhibiteurs de l'activité de phosphorylation de l'hexokinase permet de savoir si le glucide cible est un signal et si sa perception, pour la régulation de gènes de réponse, est dépendante ou non de l'hexokinase. Par le passé, la régulation par le glucose de l'activité de fructanes-exohydrolases (impliquées dans la mobilisation des fructanes) par le biais de l'hexokinase a été démontré chez le ray-grass anglais (Lothier et al., 2010). Il semblait donc essentiel d'acquérir de nouvelles connaissances dans ce domaine pour mieux comprendre les enjeux de la régulation transcriptionnelle et commencer à identifier les voies possibles de régulation des SUTs en réponse aux glucides. **Il semblait important dans le cadre de ce travail doctoral d'évaluer aussi l'implication de l'hexokinase dans le mécanisme de régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* en réponse à un signal glucose, fructose ou saccharose.**

Plusieurs systèmes expérimentaux ont été utilisés par le passé pour permettre l'apport de glucides exogènes à des végétaux. Un modèle en vésicules de plasmalemmes, bien que direct, a le désavantage de ne pas pouvoir conserver ni la structure tissulaire des limbes, ni l'intégrité du transport latéral du saccharose vers le phloème. L'utilisation de disques foliaires est peu pratique pour une étude menée chez des Poacées comme le ray-grass anglais, à cause de l'étroitesse des limbes et la difficulté à produire une biomasse suffisante pour les analyses ultérieures. D'un autre côté, l'utilisation de plantes entières ouvrait la possibilité d'interactions nombreuses avec d'autres molécules signal, comme les phytohormones par exemple, tout en présentant des difficultés pour l'approvisionnement homogène des glucides exogènes au sein des tissus. De ce fait, c'est le modèle en feuilles excisées qui a été retenu en tant que bon compromis des deux extrêmes. Il s'agit d'un dispositif qui a déjà été utilisé avec succès chez le ray-grass d'Italie, l'orge et le blé pour l'étude du métabolisme du saccharose, des fructanes et de l'amidon (Wagner et al., 1986 ; Carpita et al., 1989 ; Simmen et al., 1993 ; Müller et al., 2000 ; Cairns et al., 2002). Avec la croissance végétative du ray-grass anglais aboutissant à la formation de talles, il est



également facile de générer suffisamment de biomasse même en ne récoltant que les derniers limbes matures. Un dispositif expérimental permettant l'incubation de la base de centaines de limbes à des temps rapprochés a été mis au point pour limiter la variation biologique et la quantité de glucides exogènes à fournir pour la préparation des solutions. Il a été décidé d'incuber les limbes excisés à l'obscurité pour éliminer les interférences de la photosynthèse conformément aux études antérieures de Müller *et al.* (2000) et de Martinez-Noël *et al.* (2001, 2009). Ces études visaient à étudier la signalisation glucidique pour la synthèse de fructanes dans les limbes d'orge et de blé. Il aurait également été possible d'étudier la réponse des gaines aux glucides exogènes, mais l'objectif de cette expérimentation consistait à mettre en évidence un effet direct des glucides de façon indépendante des relations sources-puits existantes au sein de la plante.

Les résultats obtenus montrent que le saccharose et le glucose agissent sur la régulation de l'expression du gène *LpSUT1*. Le traitement saccharose a pour effet d'augmenter les niveaux de transcrits *LpSUT1*. Le fait que le palatinose ait le même effet que le saccharose suggère que **le saccharose est un signal qui augmente l'expression de *LpSUT1***. Le traitement fructose n'a pas d'effet significatif sur les niveaux de transcrits *LpSUT1* si bien que **le fructose ne semble pas être un signal pour son expression**. Le traitement glucose a pour effet de diminuer le niveau de transcrits *LpSUT1*, de même que le 2-deoxyglucose, un analogue du glucose, phosphorylé par l'hexokinase mais pas ou peu métabolisé par la suite. **Le glucose est donc un signal dépendant de l'hexokinase qui diminue l'expression de *LpSUT1***. Ce résultat est corroboré par le fait que la glucosamine, un inhibiteur de l'hexokinase (Hofmann et Roitsch, 2000), annule l'effet négatif du glucose sur l'expression de *LpSUT1*. Le fait que le 3-*O*-méthylglucose et le 6-deoxyglucose augmentent les niveaux de transcrits *LpSUT1* alors qu'ils ne sont pas phosphorylés par l'hexokinase, montre que **le glucose peut aussi déclencher une voie de transmission de signal indépendante de l'hexokinase aboutissant à une augmentation de l'expression de *LpSUT1***. **Le glucose est donc un signal qui module l'expression transcriptionnelle de *LpSUT1*, négativement quand il est perçu par l'hexokinase et positivement quand il est perçu par un système différent de l'hexokinase**. Au vu des connaissances actuelles relatives aux modes de perception du saccharose et du glucose (Sakr *et al.*, 2018), nous faisons l'hypothèse **1)** que le saccharose est perçu au niveau de la membrane plasmique et que c'est le saccharose présent dans l'apoplaste qui est perçu, **2)** que le glucose, issu de la dégradation du saccharose par l'invertase apoplastique, est perçu au niveau de la membrane plasmique et **3)** que le glucose intracellulaire est perçu par l'hexokinase. Saccharose et glucose apoplastiques déclencheraient alors des voies de transmission de



signal indépendantes de l'hexokinase aboutissant à l'augmentation de l'expression de *LpSUT1* tandis que le glucose intracellulaire déclencherait une voie de transmission de signal dépendante de l'hexokinase aboutissant à la diminution de l'expression de *LpSUT1*.

Au regard des résultats obtenus tout au long de ce travail doctoral, un nouveau cadre conceptuel du transport du saccharose peut être. La place de la régulation transcriptionnelle du transporteur *LpSUT1* dans le mécanisme de transport de saccharose du ray-grass anglais peut être précisée au regard de l'implication des signaux saccharose et glucose traduisant l'état physiologique des cellules.

### **C. Nouveau cadre conceptuel du transport du saccharose**

Les limbes, les gaines et la partie apicale des bases de feuilles en croissance du ray-grass anglais dont les cellules sont différenciées ont une structure histologique homogène avec principalement un mésophylle positionné autour d'une gaine périfasciculaire qui entoure les tissus conducteurs. En raison de l'absence de plasmodesmes, il existe une discontinuité symplasmique entre les cellules du parenchyme phloémien et celles du complexe formé par les cellules compagne et les tubes criblés du phloème (SE/CC, [Berthier et al., 2009](#)). Afin de pouvoir être exporté à longue distance depuis les tissus sources, le saccharose doit donc passer par l'apoplasme avant d'être chargé activement, et contre son gradient de concentration, dans le complexe SE/CC. Cette étape nécessite des transporteurs de saccharose spécifiques (*LpSUTx*) non identifiés à ce jour chez le ray-grass anglais.

En amont du chargement direct du phloème en saccharose, pendant son transport latéral (*i.e.* des cellules du mésophylle vers les tissus conducteurs), ce composé circule de cellule en cellule au travers des plasmodesmes formant un symplasma unique. Le passage du saccharose dans l'apoplasme est réalisée grâce aux transporteurs SWEETs, qui transportent passivement le saccharose par diffusion facilitée selon son gradient de concentration. En effet, il existe un gradient décroissant de saccharose entre le symplasma et l'apoplasme au niveau de chaque cellule. L'existence probable d'une couche subérisée, entre la gaine parenchymateuse et la gaine mestomatique de la gaine périfasciculaire, empêcherait un retour du saccharose apoplasmique vers les cellules du mésophylle, et concentrerait de ce fait le saccharose aux abords du phloème. Le saccharose apoplasmique peut être activement importé par des SUTs (symporteurs H<sup>+</sup>/saccharose ; ATPase dépendants). Chez le ray-grass anglais, deux transporteurs de saccharose ont été identifiés (*LpSUT1* et *LpSUT2*) mais seul le premier semble impliqué dans ce flux de saccharose,



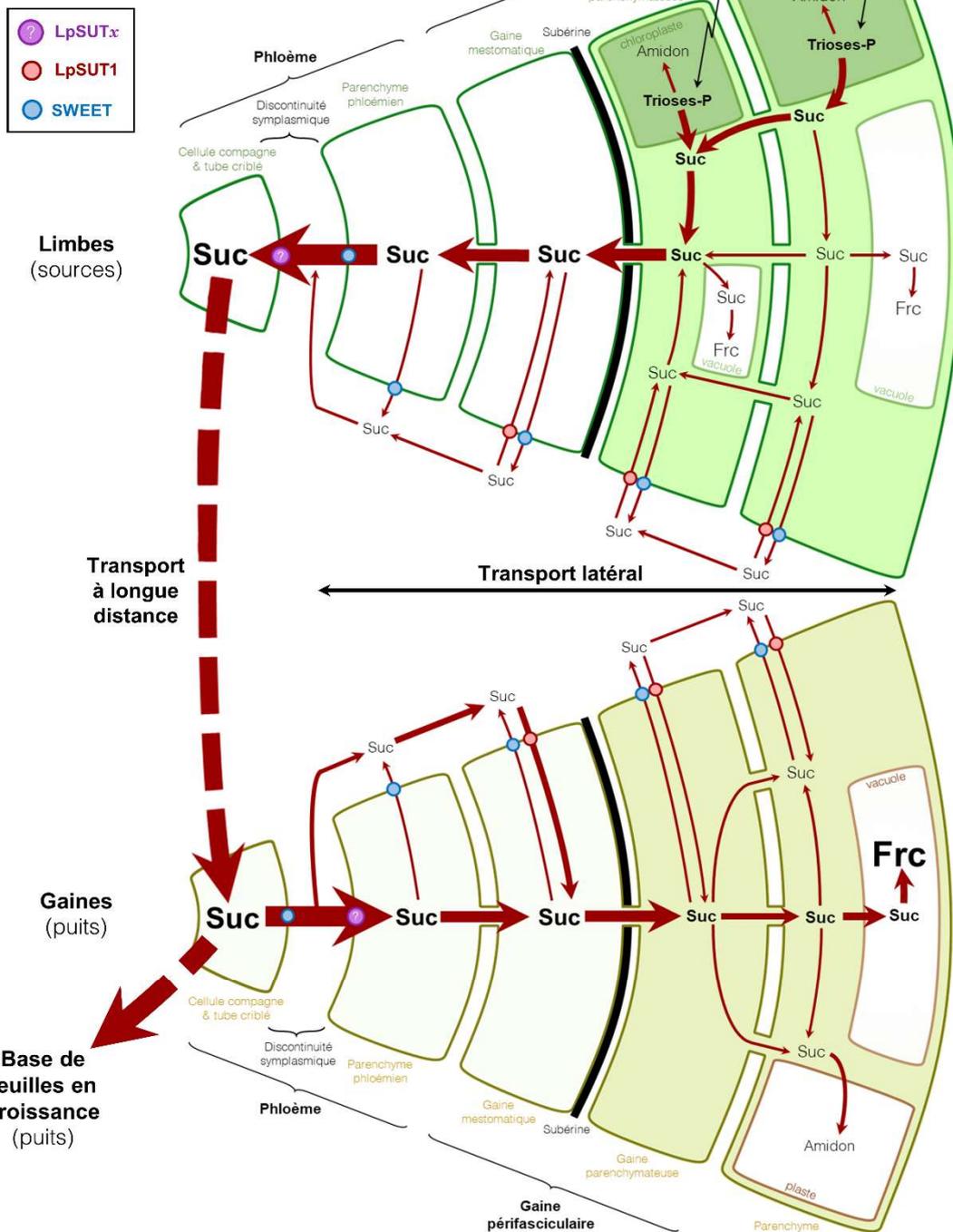
LpSUT2 ayant plutôt un rôle senseur de la concentration en glucides (Berthier et al., 2014). LpSUT1 a été localisé dans les cellules du mésophylle et de la gaine périfasciculaire (Berthier et al., 2014). Tout au long du transport latéral du saccharose et jusqu'à la gaine mestomatique, LpSUT1 permettrait à la plante de disposer d'une plus grande quantité de saccharose intracellulaire à acheminer vers les tissus conducteurs en récupérant du saccharose apoplasmique. L'action de LpSUT1 serait plus particulièrement importante dans la zone située en amont de la couche de subérine (mésophylle et gaine parenchymateuse de la gaine périfasciculaire). Cela aurait pour effet d'amplifier le gradient de saccharose et donc d'augmenter le flux de saccharose transporté à longue distance au profit des tissus puits, tels que les bases des feuilles en croissance.

A la lumière, l'activité photosynthétique des cellules chlorophylliennes (majoritairement les cellules du mésophylle ainsi que les cellules de la gaine parenchymateuse) produit du saccharose qui est acheminé vers les tissus conducteurs (Figure 70A). Le ray-grass anglais répond à un excès de saccharose produit par sa mise en réserve sous forme d'amidon dans les plastides et de fructanes dans les vacuoles, dans les limbes mais surtout dans les gaines pour les fructanes (Figure 70A) (Lasseur et al., 2011). Dans les limbes excisés, l'apport de saccharose augmente la teneur en saccharose interne des limbes (de 16 à 85 mg g MS<sup>-1</sup>) et l'expression du gène *LpSUT1* tandis que le glucose perçu par l'hexokinase la diminue. Les fructanes ne sont ni massivement synthétisés, ni hydrolysés au cours du cycle nycthéral contrairement à ce qui se passe dans les gaines en réponse à la défoliation (Figure 70A) (Berthier et al., 2009 ; 2014). Les flux de glucose et de fructose intracellulaires générés respectivement par la synthèse et la dégradation des fructanes sont donc peu importants et sans doute insuffisants pour déclencher les voies de signalisation dépendantes ou indépendantes de l'hexokinase. Dans ces conditions, l'effet du saccharose sur l'expression de *LpSUT1* n'est pas atténué par l'effet contraire du glucose perçu par l'hexokinase. Et pourtant dans les gaines et surtout dans les limbes, les transcrits *LpSUT1* varient très peu au cours du cycle nycthéral contrairement aux teneurs en saccharose qui oscillent de 1,2 à 42 mg g MS<sup>-1</sup>. Il est possible que l'expression de *LpSUT1* ne soit induite par le saccharose qu'au-delà d'un seuil critique et/ou qu'elle ne réponde qu'au saccharose apoplasmique qui ne représente qu'une partie du saccharose des tissus (1 à 10%, Livingston et Henson, 1998) et dont les variations nycthérales ne sont pas connues.

Dans les limbes excisés, le glucose diminue l'expression du gène *LpSUT1* en déclenchant une voie de transmission de signal dépendante de l'hexokinase. Dans les tissus photosynthétiques, il est connu que le glucose exerce un rétrocontrôle négatif sur la

## Transport du saccharose

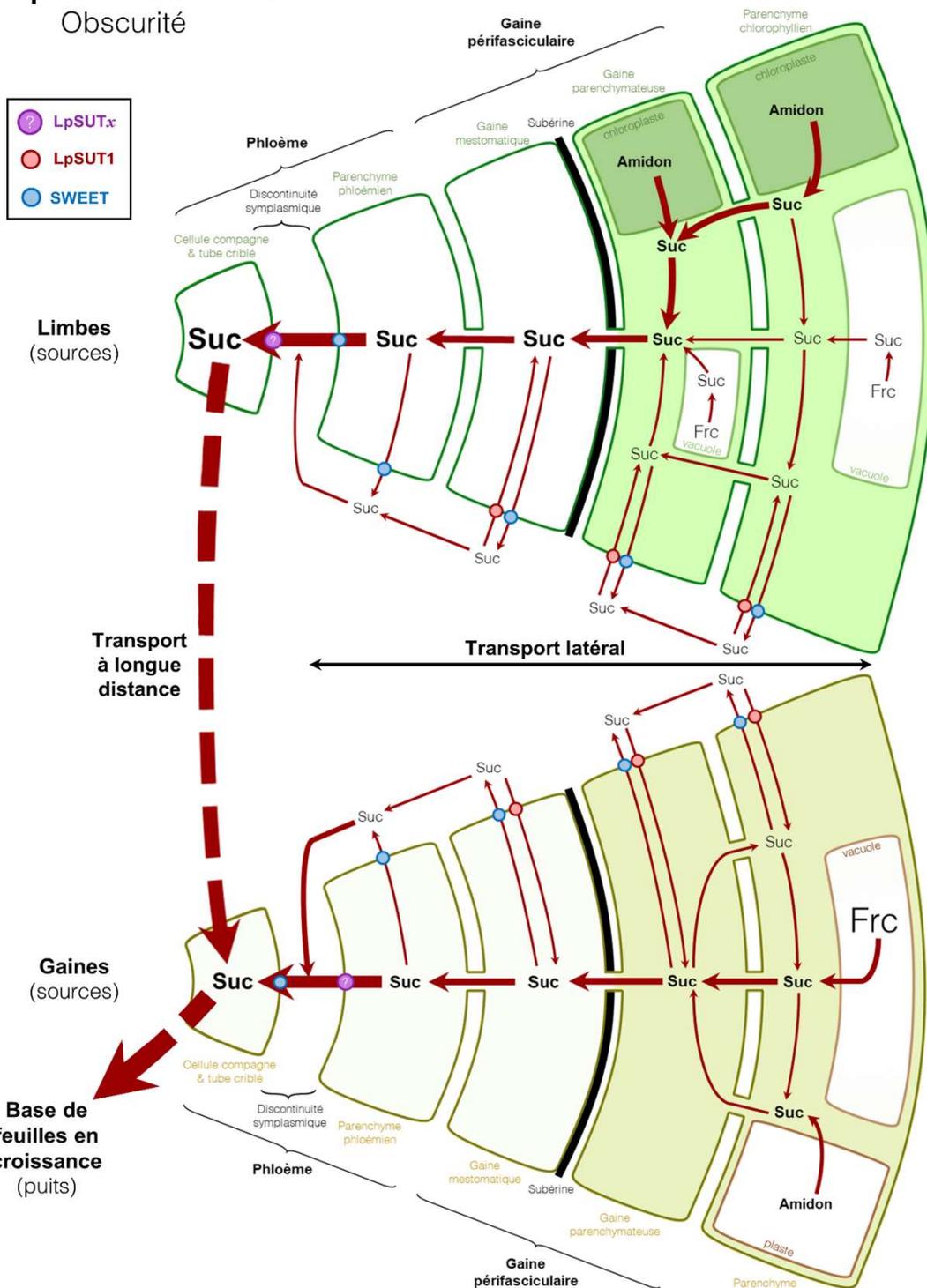
Lumière



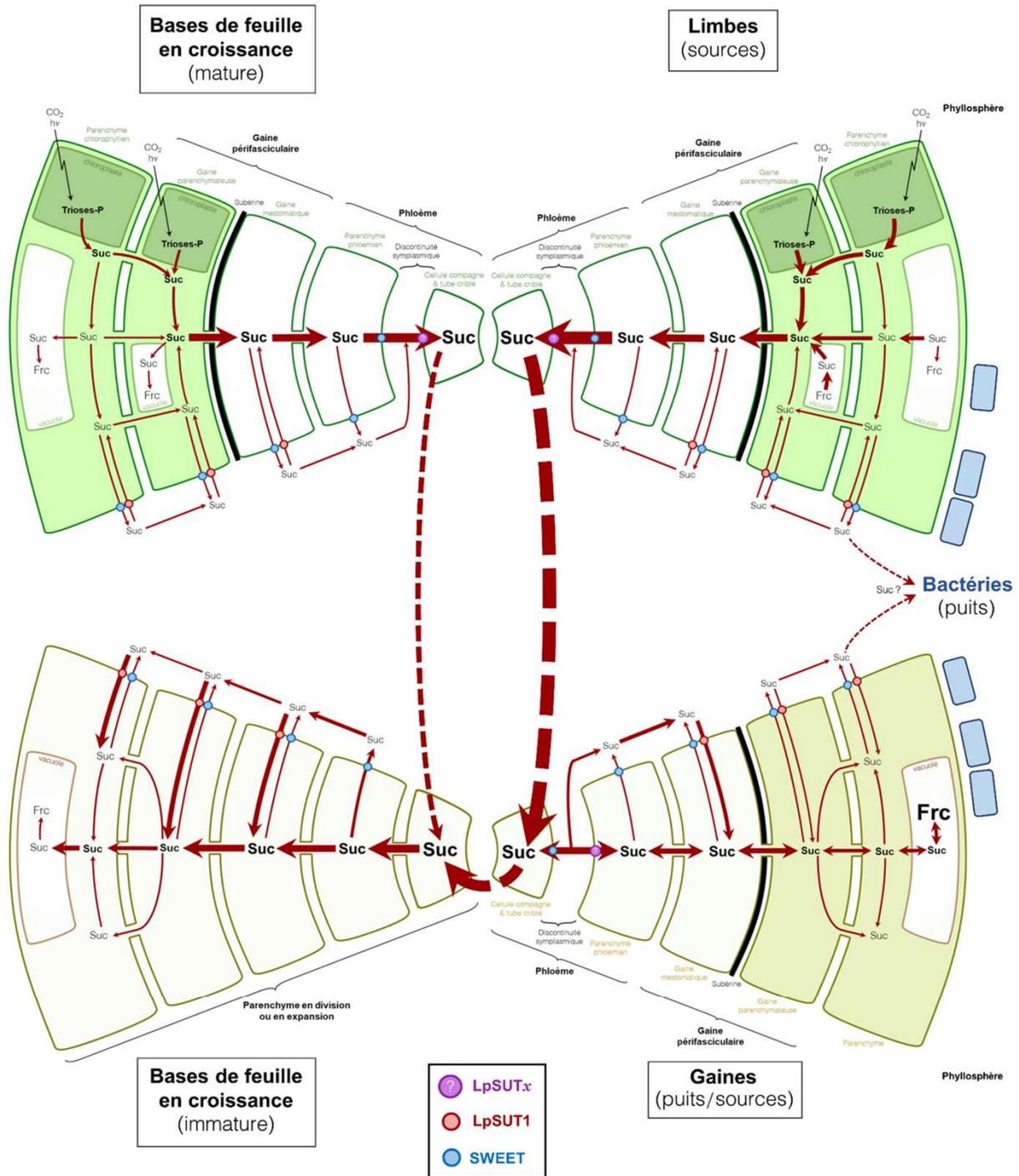
**FIGURE 70. (A)** Le transport du saccharose au sein des compartiments tissulaires des limbes et des gaines du ray-grass anglaise (*Lolium perenne* L.) pendant l'héméropériode. Les chloroplastes produisent des trioses-P qui sont convertis localement en amidon. Cependant, la majorité des trioses-P est utilisée pour la synthèse cytoplasmique du saccharose. Ce dernier peut être stocké dans les vacuoles ou converti en fructanes. Il emprunte aussi les plasmodesmes, et peut effluer vers l'apoplasme par le biais des facilitateurs SWEET. Le saccharose apoplasmique est activement importé dans le symplasma par le transporteur LpSUT1, localisé dans le mésophylle, le parenchyme et la gaine périfasciculaire. Le saccharose atteint le phloème par la voie apoplasmique. Il emprunte d'abord un SWEET pour son passage apoplasmique, puis un LpSUT<sub>x</sub> (non-identifié) pour son chargement dans le complexe cellule compagne et tube criblé. Il est alors transporté à longue distance vers les organes puits de carbone. Les flèches rouges représentent une estimation arbitraire du flux de saccharose. Frc : fructanes. Suc : saccharose.

## Transport du saccharose

Obscurité



**(B)** Le transport du saccharose au sein des compartiments tissulaires des limbes et des gaines du ray-grass anglaise (*Lolium perenne* L.) pendant la nyctipériode. A l'obscurité, l'amidon et le saccharose sont mobilisés pour servir de source de carbone et subvenir aux besoins locaux des cellules. Le saccharose produit est également transporté à longue distance pour alimenter les organes puits, mais de façon moindre comparé au transport du saccharose se produisant pendant l'héméropériode. Les fructanes constituent une réserve de carbone d'urgence qui n'est pas mobilisée en conditions physiologiques. Les flèches rouges représentent une estimation arbitraire du flux de saccharose. Frc : fructanes. Suc : saccharose.



**FIGURE 71.** Le transport du saccharose au sein des compartiments tissulaires du ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) est perturbé en présence de souches bactériennes (en bleu) dans sa phyllosphère. Les limbes sont des organes sources produisant du saccharose, de l'amidon et des fructanes. Les gaines sont des organes puits qui accumulent des fructanes. Les bases de feuilles en croissance, comprenant les méristèmes foliaires, se composent d'une zone immature (division, élongation et différenciation) et d'une zone mature (photosynthétique). Les quatre souches bactériennes testées provoquaient une diminution des teneurs en fructanes et de saccharose dans les limbes (sources), et seulement partiellement dans les gaines (restant majoritairement puits). En parallèle, les niveaux de transcrits *LpSUT1* augmentaient en présence de *Curtobacterium 1* dans les limbes et avec une faible amplitude dans les gaines. Il n'y a que dans les bases de feuilles en croissance que ces derniers ont été positivement et plus fortement régulés, ce qui suggère une augmentation de l'importation du saccharose dans ce tissu par l'augmentation de la transcription du gène *LpSUT1*.

photosynthèse par le biais de la voie de l'hexokinase (Dai et al., 1999 ; Xiao et al., 2000 ; Granot et al., 2014). De ce fait, l'activité photosynthétique diminue en réponse à un excès de glucides dans les tissus source, signe d'une offre en carbone supérieure à la demande à l'échelle de la plante. Dans ces conditions, la diminution de l'expression transcriptionnelle de *LpSUT1* (sous réserve qu'elle s'accompagne d'une diminution de l'expression protéique et de l'activité de transport) pourrait contribuer à limiter la concentration intracellulaire des glucides en limitant la capture active du saccharose apoplasmique.

Il est possible que ce soit aussi le saccharose qui induise l'expression du gène *LpSUT1* dans les gaines lorsqu'elles se comportent comme des puits. Si l'augmentation des transcrits est positivement corrélée à une augmentation de l'expression protéique et de l'activité enzymatique du transporteur (comme suggéré pour de nombreux SUTs par Xu et al., 2018), elle permettrait un déchargement plus important de saccharose dans ces tissus. En effet, dans les tissus puits comme les gaines présentent probablement un déchargement apoplastique du phloème, le transporteur *LpSUT1* est idéalement positionné dans le sens d'une capture active du saccharose déchargé dans l'apoplasme entre le complexe SE/CC et le parenchyme phloémien. Lorsque les conditions physiologiques sont en faveur d'une mise en réserve du carbone sous la forme de fructanes dans les gaines, et sachant que chez l'orge (Müller et al., 2000 ; Nagaraj et al., 2001), il a été montré que le saccharose induit l'expression de gènes de synthèse, le signal saccharose permettrait de coordonner l'importation du saccharose avec son utilisation au sein des cellules.

La nuit, l'arrêt de la photosynthèse s'accompagne d'une forte hydrolyse de l'amidon et d'une forte diminution de la teneur en saccharose, mais sans une mobilisation significative des fructanes, à la fois dans les limbes et dans les gaines (Figure 70B). Cette mobilisation des réserves glucidiques doit permettre d'entretenir la respiration de maintenance et/ou de croissance au niveau tissulaire local, mais aussi et surtout de maintenir un flux latéral de saccharose vers les tissus conducteurs pour son transport à longue distance vers les tissus puits tels que les méristèmes foliaires situés à la base des feuilles en croissance (Figure 70B). Les gaines, qui étaient des tissus puits à la lumière, peuvent devenir des tissus source de glucides la nuit. La mobilisation de l'amidon et du saccharose ne s'accompagne pas dans ces tissus d'une augmentation de des niveaux relatifs de transcrits *LpSUT1*. Une induction est observée dans les limbes et dans les gaines lorsque des bactéries sont pulvérisées au niveau de la phyllosphère . En effet, et quelle que soit la souche bactérienne pulvérisée, les micro-organismes semblent agir



comme un puit supplémentaire vis-à-vis des glucides dans la mesure où une mobilisation du saccharose et des fructanes est observée dans les limbes et dans les gaines (Figure 71). L'induction de l'expression du gène *LpSUT1*, doit permettre à la plante d'augmenter la capture du saccharose à partir de l'apoplasme pour limiter le prélèvement de ce composé par les bactéries (Figure 71).



## **Conclusion et perspectives de recherche**

---



## VII. Conclusion et perspectives de recherche

Au commencement de ce travail doctoral, l'hypothèse de travail était que le transporteur LpSUT1, par ses caractéristiques de transcription et sa localisation ubiquiste dans les tissus sources et puits présente une régulation transcriptionnelle répondant à des variations des concentrations en glucides et qui peut être modulée en quelques minutes. Dans les sources, il permettrait de concentrer le saccharose du tissu aux abords du phloème pour qu'il soit pris en charge par le transporteur responsable du chargement direct du saccharose encore inconnu à ce jour chez le ray-grass anglais. Dans les puits, il permettrait d'augmenter l'importation du saccharose dans le symplasme des cellules et d'augmenter ainsi activement le statut puits de l'organe. **Cependant, les différentes expérimentations menées au cours de ce travail doctoral ne vont pas dans le sens d'un rôle majeur de LpSUT1 dans le transport latéral du saccharose dans les limbes, source principale de carbone pour la plante en réponse à une modulation des relations sources/puits par des facteurs biotiques et abiotiques. En revanche, son rôle semble important dans les organes puits pour répondre à des stress induisant la mobilisation rapide des fructanes et nécessitant un transport conséquent de saccharose.** De ce fait, pour mieux comprendre le rôle physiologique du transporteur LpSUT1 dans les tissus sources et les puits chez le ray-grass anglais, il semble nécessaire de compléter l'analyse histologique de la morphologie des tissus, notamment celle des limbes. Cela devrait permettre de préciser les obstacles au transport latéral du saccharose dans ces tissus.

### A. Confirmation de la place de LpSUT1 dans le transport latéral du saccharose dans les limbes

#### 1. Utilisation de mutant *lpsut1* et histologie

Par le passé, en parallèle de l'identification et la caractérisation du transporteur LpSUT1, une première étude de l'anatomie des tissus de limbes et de sensibilité de plasmolyse de ses cellules a été réalisée (Berthier et al., 2009). Les cellules de mésophylle étaient les plus rapides à être plasmolysées avec l'apport externe d'une solution de sorbitol à 800 mOsm et les cellules du phloème commençaient à montrer un état de plasmolyse à partir de 1000 mOsm (Amiard et al., 2004). Le transport du saccharose vers le phloème s'effectue donc contre son gradient de concentration, et doit nécessiter l'existence d'un



procédé de transport actif et apoplasmique du saccharose chez le ray-grass anglais. **La production et le suivi de lignées mutantes par ARN d'interférence spécifique du gène *LpSUT1* par exemple, devraient être réalisés afin de mieux appréhender le rôle de *LpSUT1* dans le transport latéral du saccharose.** La production de ces lignées pourrait être réalisée en partenariat avec l'équipe de P. Coutos-Thévenot (Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Poitiers, France). En combinant cette méthode avec du marquage isotopique  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ , comme réalisé chez le ray-grass anglais par [Lattanzi et al. \(2012\)](#), il serait également possible (en comparant des lignées sauvages avec les lignées mutantes *lpsut1*) de quantifier pour la première fois l'importance du transporteur *LpSUT1* vis-à-vis du transport du saccharose en général au sein du ray-grass anglais. Par exemple, une impulsion de  $^{13}\text{C}$  pourrait être réalisée pendant 15 minutes sur des plantes entières lors du passage de la nyctipériode à l'héméropériode. Cette impulsion, suivie d'une chasse par du  $^{12}\text{C}$  et des récoltes en cinétique courte (8 premières heures) devrait permettre de suivre l'assimilation du  $^{13}\text{C}$  en glucides et son allocation vers les tissus puits comme la base des feuilles en croissance, la gaine et les racines. L'estimation des flux de saccharose devrait donc pouvoir être corrélée avec les niveaux d'expression de *LpSUTs*. Cette approche isotopique peut être menée au laboratoire EVA qui dispose d'une chambre de marquage et d'une plateforme d'analyse de Spectrométrie de Masse Ratio Isotopique (IRMS). Elle pourrait contribuer à donner de nouveaux éléments de réflexion vis-à-vis de l'implication du transporteur *LpSUT1* dans le transport général du saccharose chez le ray-grass anglais.

La présence de plasmodesmes serait faible à l'interface entre les cellules de parenchyme phloémien et les cellules compagnes (parfois 1 à 2 plasmodesmes seulement ; [Berthier et al., 2009](#)), mais leur nombre n'a jamais été précisément suivi en microscopie confocale ou électronique. De plus, l'anatomie fine des tissus du ray-grass anglais est plutôt mal connue et ne permet pas de connaître à ce stade la présence d'obstacles qui s'opposeraient au transport symplasmique du saccharose (nombre et localisation des plasmodesmes) ou qui altèreraient la voie apoplasmique. Chez le blé, il a par exemple été démontré par marquage à l'hexamine d'argent qu'une couche de subérine, rendant la paroi cellulaire hydrophobe, existait entre la couche interne (mestomatique) et externe (parenchymateuse) de la gaine périfasciculaire, sans toutefois interrompre les plasmodesmes ([O'Brien et Carr, 1969](#)). Chez de nombreuses monocotylédones, une telle subérisation a aussi été observée ([Mertz et Brutnell, 2014](#)), mais pas encore démontrée chez le ray-grass anglais, qui possède lui aussi une gaine périfasciculaire. La présence de cette couche subérisée conférerait un rôle important au transporteur *LpSUT1*, qui a été localisé



dans le mésophylle mais aussi au niveau de la gaine périfasciculaire. Dans le transport latéral du saccharose, il pourrait en effet permettre de concentrer activement le saccharose dans un premier compartiment (la gaine périfasciculaire), pour qu'il soit, dans un deuxième temps, pris en charge par un autre transporteur impliqué dans le chargement direct du phloème. **Une analyse microscopique approfondie des tissus du ray-grass anglais est donc nécessaire. Elle impliquerait l'utilisation d'hexamine d'argent comme marqueur de subérisation et de microscopie électronique à transmission pour localiser et dénombrer les plasmodesmes. L'utilisation de colorants par un apport ponctuel à la base d'un limbe excisé, comme le diacétate de 6-carboxyfluorescéine (6-CFDA), permettrait de visualiser le symplasme des cellules, tandis que celle d'iodide de propidium (Alassimone et al., 2010) permettrait de visualiser la voie apoplasmique.**

L'évolution de l'abondance du transporteur LpSUT1 est mal connue dans le temps et dans l'espace en réponse à une modulation relations sources et puits notamment entre les cellules du mésophylle et celles de la gaine périfasciculaire. Or, une méthode de dénombrement assistée par ordinateur a été mise au point au cours de l'expérimentation du chapitre 2 de ce manuscrit, qui pourrait s'appliquer à de l'immunolocalisation spécifique non plus aux bactéries, mais au transporteur LpSUT1. Cette technique de microscopie confocale pourrait permettre d'approfondir les résultats obtenus par [Berthier et al. \(2014\)](#), évaluer l'hypothèse précédente du rôle de LpSUT1 pour la concentration du saccharose dans la gaine périfasciculaire, et être réalisée en parallèle de l'étude de l'histologie des tissus du ray-grass anglais proposée précédemment. De ce fait, **une étude confocale de l'évolution fine de l'abondance protéique du transporteur LpSUT1 pourrait être menée, par exemple en réponse à défoliation, pour examiner son rôle tissulaire vis-à-vis de la gaine périfasciculaire tout en permettant de pondérer l'importance de sa régulation transcriptionnelle vis-à-vis de régulations post-transcriptionnelles.**

## 2. Identification et caractérisation des SUTs inconnus

Sur les quatre SUTs attendus chez le ray-grass anglais, seuls 2 ont été identifiés et caractérisés à ce jour, LpSUT1 et LpSUT2. Les connaissances portant sur le transporteur LpSUT1 ont évolué à l'issu de ce travail doctoral. Il jouerait désormais un rôle plus spécifique dans l'importation du saccharose de l'apoplasme vers le cytoplasme des cellules. Sa régulation transcriptionnelle dans les puits permettrait le rétablissement d'un gradient de saccharose favorable dans le phloème pour son transport des organes sources vers les organes puits en réponse à des modulations des relations sources/puits par des facteurs biotiques et abiotiques. L'autre transporteur identifié à ce jour est LpSUT2. Il possède



cependant des niveaux de transcrits et de protéines très faibles, rendant son étude à l'échelle transcriptionnelle ou de la protéine difficile. Cependant, il possède une boucle cytoplasmique caractéristique des SUTs du groupe 2 dont la fonction serait d'être des senseurs de glucides. Tout comme il serait possible d'évaluer l'importance du transporteur LpSUT1 à l'échelle de la plante par le suivi de lignées mutantes, **il serait possible grâce à des lignées mutantes spécifiques du gène LpSUT2 de comprendre quel serait son rôle vis-à-vis du transport du saccharose, ou pour la régulation transcriptionnelle du gène LpSUT1 en soumettant ces lignées mutantes à la défoliation.** Une zone d'ombre importante existe également à l'heure actuelle au sujet du troisième SUT, attendu comme phloémien et responsable du chargement direct du saccharose, qui pourrait être l'élément limitant du transport du saccharose, de la vitesse de refoliation ou d'établissement des réserves de fructanes chez le ray-grass anglais et constituer une cible pour les sélectionneurs. Le quatrième SUTs serait quant à lui tonoplastique et permettrait de faire le lien entre la mobilisation vacuolaire des fructanes observée en réponse à la défoliation et à la présence de bactéries dans sa phyllosphère et le passage du saccharose vers le cytoplasme. Cette distribution devrait être coordonnée avec le transport latéral du saccharose et son importance vis-à-vis de LpSUT1 qui est présent sur le plasmalemma serait à évaluer. Les deux transporteurs LpSUTs manquants sont actuellement en cours d'identification. Leur découverte constituera une avancée majeure dans la connaissance globale du système de transport du saccharose chez le ray-grass anglais. **Il faudra poursuivre l'identification, la caractérisation et l'immunolocalisation de ces transporteurs dans les tissus du ray-grass anglais, et étendre l'étude de leur régulation de façon rétroactive en réponse aux facteurs testés précédemment chez le ray-grass anglais pour comparer leur régulation transcriptionnelle à celle du transporteur LpSUT1.**

### **3. Place de la régulation post-transcriptionnelle de LpSUT1**

Outre la régulation transcriptionnelle des LpSUTs, qui pourrait être le niveau primaire de régulation du transport de saccharose de la plante, il existe de nombreuses voies de régulations post-transcriptionnelles suggérées par la littérature, notamment pour l'induction positive des SUTs (Xu et al., 2018). Sans passer par une analyse microscopique, plus lourde, il est possible d'étendre le suivi transcriptionnel des transporteurs LpSUTs à un suivi protéique, par SDS-PAGE et Western blots. L'utilisation d'inhibiteurs de la transcription ( $\alpha$ -amanitine, inhibiteur de la transcription bloquant l'ARN polymérase II) ou de la traduction (cycloheximide) pourrait permettre d'estimer la demi-vie de l'ARNm et des transporteurs dans des conditions physiologiques. Le suivi de l'évolution de l'activité



des transporteurs de saccharose ne doit pas être négligé, puisqu'il permettrait de savoir si une augmentation de l'activité de transport du saccharose serait corrélée à une augmentation de la traduction des protéines SUTs. Elle permettrait aussi de comparer les niveaux de transcrits, ceux de protéines et d'activité de transport, et d'émettre des hypothèses sur le niveau de régulation le plus important pour les SUTs du ray-grass anglais. **La régulation post-transcriptionnelle des LpSUTs devrait donc être prise en compte et étudiée, si possible de façon systématique.**

## **B. Poursuivre l'identification de signaux glucidiques et leurs mécanismes de perception**

Les mécanismes de régulation de l'expression des *SUTs* en réponse à des signaux glucidiques sont encore mal connus et l'existence de plusieurs voies de régulation reste possible (Sakr *et al.*, 2018). La mise au point du dispositif en feuilles excisées pour l'étude des signaux glucidiques responsables de la régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* a permis de préciser l'implication d'un signal sucrose et d'un signal glucose indépendant de l'hexokinase pour la régulation positive du transporteur, ainsi que de celle de la voie de l'hexokinase pour l'inhibition de son expression. Il existe néanmoins d'autres signaux glucidiques qui seraient susceptibles d'agir sur l'expression du gène *LpSUT1*, et des *SUTs* en général.

### **1. Utilisation d'autres analogues de glucides**

Le tréhalose-6P est un intermédiaire de la voie de biosynthèse du tréhalose synthétisé à partir d'UDP-glucose et de Glucose-6P par la Tréhalose-6P Synthase (TPS) (Avonce *et al.*, 2006). Il est connu que sa concentration est positivement corrélée à celle du saccharose avec un décalage de seulement 15 minutes (Lunn *et al.*, 2006), y compris en réponse au cycle nyctéméral (Carillo *et al.*, 2013 ; Martins *et al.*, 2013). Il représente un signal de disponibilité en saccharose pour la plante, mais il jouerait également un rôle répresseur sur la voie de biosynthèse du saccharose s'il se trouve lui-même en excès (se référer au modèle « *nexus* » de la relation tréhalose-6P et saccharose, proposé par Yadav *et al.*, 2014). Dans le contexte des relations sources-puits, le tréhalose-6P aurait tendance à s'accumuler lorsque la concentration en saccharose augmente dans la source en conséquence d'une demande affaiblie dans les puits. Il est attendu que cette augmentation de la concentration en tréhalose-6P dévie le flux de carbone en faveur des voies de biosynthèse des acides



organiques et acides aminés plutôt que vers celle de biosynthèse de saccharose (Figueroa et Lunn, 2016). Il serait néanmoins très intéressant de vérifier si le tréhalose-6P joue en parallèle un rôle de régulation de la transcription des gènes *SUTs*. Il est néanmoins présent à une très faible concentration dans les cellules (entre 10 et 1000 pmol g FW<sup>-1</sup> chez *A. thaliana*; Lunn et al., 2014). La détection des concentrations physiologiques en tréhalose-6P est donc difficile. Grâce aux travaux de Lunn, il est désormais possible de le mesurer à un seuil limite de détection de 2 fmol (2 10<sup>-15</sup> mole) à l'aide d'une HPLC couplée à un spectromètre de masse (Lunn et al., 2006, 2014 ; Figueroa et Lunn, 2016). Cependant une certaine expérience est requise pour connaître les enjeux susceptibles d'altérer la précision des mesures, comme le choix de standards internes isotopiques, et éviter des erreurs techniques. **De ce fait, l'étude du rôle signal du tréhalose-6P sur la transcription des gènes *LpSUTs* pourrait être effectuée en partenariat avec l'équipe de J.E. Lunn (Max Plank Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Allemagne).**

Le fructose ne semble pas avoir d'effet sur la régulation transcriptionnelle de *LpSUT1*, malgré un effet inhibiteur démontré sur l'activité du transporteur *LpSUT2* (Berthier et al., 2014). Il représenterait un lien direct avec la mobilisation vacuolaire des fructanes, si bien qu'il pourrait être un glucide « signal » pour la régulation transcriptionnelle d'un *LpSUT* vacuolaire. La voie des fructokinases (Kato-Noguchi et al., 2005) pourrait jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle de *SUTs*, dont peut-être, *LpSUT2*. Une culture à l'ombrage (25% PPF) serait préférable pour induire les niveaux constitutifs de *LpSUT2*, qui sont en conditions physiologiques, trop faibles pour être mesurées de façon fiable (Furet et al., 2012). **Le psicose, un analogue du fructose, pourrait être testé parallèlement au fructose et combiner à un inhibiteur de l'activité hexokinase, pour tester le rôle signal du fructose et l'implication de fructokinases comme senseurs dans les mécanisme de transport de saccharose du ray-grass anglais.**

L'effet inhibiteur de l'activité de phosphorylation de l'hexokinase de la glucosamine a aussi été démontré pour le N-acétyl-glucosamine et le mannoheptulose par Hofmann et al. (2000). **Il sera nécessaire dans le futur de confirmer les résultats obtenus en réponse à la glucosamine dans le chapitre 3 de ce travail doctoral. par l'utilisation de N-acétyl-glucosamine ou de mannoheptulose.**

## 2. La comparaison avec des plantes entières

L'amplitude de la réponse des limbes excisés aux glucides exogènes au cours de l'expérimentation hexokinase était également bien inférieure à celle observée chez des plantes matures et intactes. De ce fait, il est possible que non seulement il existe d'autres



signaux de régulation ou d'amplification de cette dernière, mais aussi que l'intégrité de la plante puisse influencer la régulation transcriptionnelle des *SUTs*. Chez l'orge, [Wei et al., \(2001\)](#) avaient spécifiquement démontré une différence significative des niveaux de transcrits *6-SFT* (biosynthèse des fructanes) mesurés entre feuilles excisées (accumulation) et plante entière (pas d'effets). La réponse des gènes *LpSUTs* pourrait également être très différente selon le statut source ou puits de l'organe et ne saurait être appréciée seulement au regard des limbes matures. **Il sera donc crucial à l'avenir d'étoffer les études en feuilles excisées par plusieurs lots parallèles en plante entière, dont les racines sont excisées par exemple.**

### 3. L'étude de la réponse aux phytohormones

D'autres composés pourraient également jouer le rôle de molécules signal, comme les phytohormones. Les cytokinines, comme hormone impliquée dans la division cellulaire pourrait induire une augmentation des niveaux de transcrits *SUTs* pour augmenter l'importation du saccharose dans l'organe en croissance. L'éthylène est produit en réponse aux blessures physiques (*e.g.* attaques de pucerons, phytophages) mais également lors de la sénescence foliaire. Cette sénescence induit une remobilisation de l'ensemble des réserves de carbone et d'azote de la feuille ([Borrego et Kolomiets, 2016](#)) et devrait induire l'expression transcriptionnelle des *SUTs* ([Wasternack et Hause, 2013](#)) afin d'augmenter le flux de saccharose vers les tissus puits. Chez le coton (*G. hirsutum*), il a été démontré l'existence dans les séquences promotrices de *GhSUTs* l'existence d'éléments répondant aux phytohormones ([Li et al., 2018](#)). **Il serait donc intéressant, une fois les séquences des gènes des quatre *LpSUTs* du ray-grass anglais connues, de tester l'apport exogène de phytohormones dans un dispositif en feuilles excisées et en plantes entières.**



## Références bibliographiques

---



## VIII. Références bibliographiques

### A

- Abeynayake SW, Etzerodt TP, Jonavičienė K, Byrne S, Asp T, Boelt B (2015)** Fructan metabolism and changes in fructan composition during cold acclimation in perennial ryegrass. *Front Plant Sci* **6**:329
- Agriscopie (2019)** L'agriculture et l'agroalimentaire en Normandie. *Observatoires données 2017-2018*
- Aguilera-Alvarado GP, Sánchez-Nieto S (2017)** Plant hexokinases are multifaceted proteins. *Plant Cell Physiol* **58**(7):1151
- Ainsworth EA, Bush DR (2011)** Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology* **155**:64
- Alassimone J, S Naseer, N Geldner (2010)** A developmental framework for endodermal differentiation and polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(11):5214
- Allard G, Nelson CJ (1991)** Photosynthate partitioning in basal zones of tall fescue leaf blades. *Plant Physiology* **95**:663
- Amiard V, Morvan-Bertrand A, Cliquet J, Billard J, Huault C, Sandström J, Prud'homme M (2004)** Carbohydrate and amino acid composition in phloem sap of *Lolium perenne* L before and after defoliation. *Canadian Journal of Botany* **82**:1594
- Andrews JH, Harris RF (2000)** The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol* **38**:145
- Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B (2010)** Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell* **22**(11):3864
- Aoki N, Hirose T, Takahashi S, Ono K, Ishimaru K, Ohsugi R (1999)** Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiol* **40**(10):1072
- Aoki N, Whitfeld P, Hoeren F, Scofield G, Newell K, Patrick J, Offler C, Clarke B, Rahman S, Furbank RT (2002)** Three sucrose transporter genes are expressed in the developing grain of hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology* **50**:453
- Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfeld PR, Furbank RT (2003)** The sucrose transporter gene family in rice. *Plant cell Physiol* **44**:223
- Aoki N, Scofield GN, Wang XD, Patrick JW, Offler CE, Furbank RT (2004)** Expression and localisation analysis of the wheat sucrose transporter TaSUT1 in vegetative tissues. *Planta* **219**:176
- Aragón W, Reina-Pinto JJ, Serrano M (2017)** The intimate talk between plants and microorganisms at the leaf surface. *J Exp Bot* **68**(19):5339
- Asai Y, Kobayashi Y, Kobayashi I (2016)** Increased expression of the tomato *SISWEET15* gene during grey mold infection and the possible involvement of the sugar efflux to apoplasm in the disease susceptibility. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* **07**
- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thévenot P, Delrot S (2003)** Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiol* **131**(1):326
- Aubry E, Dinant S, Vilaine F, Bellini C, Le Hir R (2019)** Lateral transport of organic and inorganic solutes. *Plants (Basel)* **8**(1):20
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G (2006)** Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol Biol* **6**:109

**Ayre, BG (2011)** Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Mol Plant* 4:377

## B

**Bagnall N, Wang X-D, Scofield GN, Furbank RT, Offler CE, Patrick JW (2000)** Sucrose transport-related genes are expressed in both maternal and filial tissues of developing wheat grains. *Aust J Plant Physiol* 27:1009

**Baier MC, Barsch A, Küster H, Hohnjec N (2007)** Antisense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome. *Plant Physiology* 145:1600

**Baker RF, Leach KA, Braun DM (2012)** SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Mol Plant* 5(4):766

**Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB (2000)** SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12:1153

**Beattie GA, Lindow SE (1995)** The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology* 33:145

**Becker R, Behrendt U, Hommel B, Kropf S, Ulrich A (2008)** Effects of transgenic fructan-producing potatoes on the community structure of rhizosphere and phyllosphere bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 66:411

**Berthier A, Desclos M, Amiard V, Morvan-Bertrand A, Demmig-Adams B, Adams III WW, Turgeon R, Prud'homme M-P, Noiraud-Romy N (2009)** Activation of sucrose transport in defoliated *Lolium perenne* L: an example of apoplastic phloem loading plasticity. *Plant and Cell Physiology* 50:1329

**Berthier A, Meuriot F, Dédaldéchamp F, Lemoine R, Prud'homme M-P, Noiraud-Romy N (2014)** Identification of a new sucrose transporter in rye-grass (LpSUT2): Effect of defoliation and putative fructose sensing. *Plant Physiology and Biochemistry* 84:32

**Bhowmik PK, Tamura K, Sanada Y, Tase K, Yamada T (2006)** Sucrose metabolism of perennial ryegrass in relation to cold acclimation. *Z Naturforschung* 61c:99

**Bigeard J, Hirt H (2018)** Nuclear signaling of plant MAPKs. *Front Plant Sci* 9:469

**Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible WR, Stitt M (2005)** Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17:3257

**Boldt-Burisch K, Pörs Y, & Haupt B, Bitterlich M, Kühn C, Grimm B, Franken P (2011)** Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *Journal of plant physiology* 168:1256

**Bonfig KB, Gabler A, Simon UK, Luschin-Ebengreuth N, Hatz M, Berger S, Muhammad N, Zeier J, Sinha AK, Roitsch T (2010)** Post-translational derepression of invertase activity in source leaves via down-regulation of invertase inhibitor expression is part of the plant defense response. *Mol Plant* 3(6):1037

**Borland AM, Farrar JF (1985)** Diel pattern of carbohydrate metabolism in leaf blades and leaf sheaths of *Poa annua* L and *Poa x Jemtlandica* (Almq). *Richt New Phytologist* 100:519

**Borland AM, Farrar JF (1988)** Compartmentation and fluxes of carbon in leaf blades and leaf sheaths of *Poa annua* L and *Poa x Jemtlandica* (Almq). *Richt Journal of Experimental Botany* 40:1247

**Borland AM, Farrar JF (1989)** The partitioning of photosynthetically fixed carbon in the leaf blade and leaf sheath of *Poa pratensis* L. *Journal of Experimental Botany* 40:1247

- Borrego EJ, Kolomiets MV (2016)** Synthesis and functions of jasmonates in Maize. *Plants (Basel)* **5**(4):41
- Botha CE (2013)** A tale of two neglected systems-structure and function of the thin- and thick-walled sieve tubes in monocotyledonous leaves. *Front Plant Sci* **4**:297
- Braun DM, Wang L, Ruan YL (2014)** Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *J Exp Bot* **65**(7):1713
- Braun DM, Slewinski TL (2009)** Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiol* **149**:71
- Breia R, Conde A, Pimentel D, Conde C, Fortes AM, Granell A, Gerós H (2020)** VvSWEET7 is a mono- and disaccharide transporter up-regulated in response to *Botrytis cinerea* infection in grape berries. *Front Plant Sci* **10**:1753
- Bürkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kuhn C, Hirner B, Frommer WB (1998)** The H<sup>+</sup>-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* **118**:59
- Bush DR (1989)** Proton-coupled sucrose transport in plasmalemma vesicles isolated from sugar beet leaves. *Plant Physiology* **68**:706

### C

- Cairns AJ, Cookson A, Thomas BJ, Turner LB (2002)** Starch metabolism in the fructan-grasses: patterns of starch accumulation in excised leaves of *Lolium temulentum* L. *Journal of Plant Physiology* **159**:293
- Carillo P, Feil R, Gibon Y, Satoh-Nagasawa N, Jackson D, Bläsing OE, Stitt M, Lunn JE (2013)** A fluorometric assay for trehalose in the picomole range. *Plant Methods* **9**:21
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005)** Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmsUt1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *J Biol Chem* **280**:21437
- Carpita NC, Kanabus J, Housley TL (1989)** Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinaceae* leaves. *J Plant Physiol* **134**:162
- Casu RE, Grof CP, Rae AL, McIntyre CL, Dimmock CM, Manners JM (2003)** Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant Molecular Biology* **52**:371
- Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens PA, Spinner L, Clement G, Chietera G, Léran S, Ferrand M, Lacombe B, Loudet O, Dinant S, Bellini C, Neuhaus HE, Daniel-Vedele F, Krapp A. (2013)** Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **23**(8):697
- Chalmers J, Johnson X, Lidgett A, Spangenberg G (2003)** Isolation and characterisation of a sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Plant Physiology* **160**:1385
- Charles-Edwards DA, Charles-Edwards J, Sant FI (1972)** Models for mesophyll cell arrangement in leaves of ryegrass (*Lolium perenne* L). *Planta* **104**(4):297
- Chatterton NJ, Harrison PA, Bennett JH, Asay KH (1989)** Carbohydrate partitioning in 185 accessions of gramineae grown under warm and cool temperatures. *Journal of Plant Physiology* **137**:169
- Chen S, Li XQ, Zhao A, Wang L, Li X, Shi Q, Chen M, Guo J, Zhang J, Qi D, Liu G (2009)** Genes and pathways induced in early response to defoliation in rice seedlings. *Curr Issues Mol Biol* **11**(2):81
- Chen L, Hou B, Lalonde S, Takanaga H, Hartung M, Qu X, Guo W, Kim J, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White F, Somerville S, Mudgett MB, Frommer W (2010)** Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**:527

- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, and Frommer WB (2012)** Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**:207
- Chen LQ, Lin IW, Qu XQ, Sosso D, McFarlane HE, Londoño A, Samuels AL, Frommer WB (2015)** A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell Mar* **27**(3):607
- Chincinska IA, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C (2008)** Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* **146**:515
- Chiou TJ, Bush DR (1998)** Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:4784
- Cho YH, Sheen J, Yoo SD (2010)** Low glucose uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from stress and defense hormone abscisic acid and C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**(3):1180
- Cho YH, Yoo SD (2011)** Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **7**(1):e1001263
- Comparot-Moss S, Denyer K (2009)** The evolution of the starch biosynthetic pathway in cereals and other grasses. *J Exp Bot* **60**(9):2481
- Comtet J, Turgeon R, Stroock AD (2017)** Phloem loading through plasmodesmata: a biophysical analysis. *Plant Physiol* **175**(2):904
- Cordoba E; Aceves-Zamudio DL; Hernández-Bernal AF; Ramos-Vega M; León P (2014)** Sugar regulation of *SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1)* expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **66**:147
- Cortès S, Gromova M, Evrard A, Roby C, Heyraud A, Rolin DB, Raymond P, Brouquisse RM (2003)** In plants, 3-O-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiology* **131**:824

## D

- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D (1999)** Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* **11**(7):1253
- Danila FR, Quick WP, White RG, Furbank RT, von Caemmerer S (2016)** The metabolite pathway between bundle sheath and mesophyll: quantification of plasmodesmata in leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> monocots. *Plant Cell* **28**(6):1461
- Dasgupta K, Khadilkar AS, Sulpice R, Pant B, Scheible W-R, Fisahn J, Stitt M, Ayre BG (2014)** Expression of sucrose transporter cDNAs specifically in companion cells enhances phloem loading and long-distance transport of sucrose but leads to an inhibition of growth and the perception of a phosphate limitation. *Plant Physiol* **165**:715
- De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K (2013)** Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* **64**:4839
- De Souza A, Sandrin CZ, Moraes MG, Figueiredo-Ribeiro RCL (2005)** Diurnal variations of non-structural carbohydrates in vegetative tissues of *Melinis minutiflora*, *Echinolaena inflexa* and *Lolium multiflorum* (Poaceae). *Brazilian Journal of Botany* **28**:755
- Delaney NF, Kaczmarek ME, Ward LM, Swanson PK, Lee M-C, Marx CJ (2013)** Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*. *PLoS ONE* **8**:e62957
- Delrot S (1981)** Proton fluxes associated with sugar uptake in *Vicia faba* leaf tissues. *Plant Physiology* **68**:706

- Dickinson CH, Austin B, Goodfellow M (1975)** Quantitative and qualitative studies of phylloplane bacteria from *Lolium perenne*. *Journal of General Microbiology* **91**:157
- 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
- DRAAF Normandie (2006)** Prairies permanentes - Renouvellement. *Agreste Les Dossiers* **8**:77
- DRAAF Normandie (2017)** Mémento de la statistique agricole. *Agreste Normandie Mémento* **11**
- Durand M, Mainson D, Porcheron B, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N (2018)** Carbon source-sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. *Planta* **247**:587

## E

- Eckardt NA (2003)** The function of SUT2/SUC3 sucrose transporters: the debate continues. *Plant Cell* **15**(6):1259
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG. (2006)** Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* **141**(1):196
- Eom JS, Cho JI, Reinders A, Lee SW, Yoo Y, Tuan PQ, Choi SB, Bang G, Park YI, Cho MH, Bhoo SH, An G, Hahn TR, Ward JM, Jeon JS. (2011)** Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, OsSUT2, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth. *Plant Physiol* **157**(1):109
- Eom JS, Chen LQ, Sosso D, Julius BT, Lin IW, Qu XQ, Braun DM, Frommer WB (2015)** SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr Opin Plant Biol* **25**:53
- Ercolini D, Russo F, Ferrocino I, Villani F (2008)** Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol* **26**(2):228
- Esser DS, Leveau JHJ, Meyer KM, Wiegand K (2015)** Spatial scales of interactions among bacteria and between bacteria and the leaf surface. *FEMS Microbiol Ecol* **91**:fiu034
- Evert RF, Russin WA, Botha CEJ (1996)** Distribution and frequency of plasmodesmata in relation to photoassimilate pathway and phloem loading in the barley leaf. *Planta* **198**:572

## F

- Fan RC, Peng CC, Xu YH, Wang XF, Li Y, Shang Y, Du SY, Zhao R, Zhang XY, Zhang LY, Zhang DP (2009)** Apple sucrose transporter SUT1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars. *Plant Physiol* **150**(4):1880
- Fernie AR, Roessner U, Geigenberger P (2001)** The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiology* **125**:1967
- Fernie AR, Stitt M (2012)** On the discordance of metabolomics with proteomics and transcriptomics: Coping with increasing complexity in logic, chemistry, and network interactions scientific correspondence. *Plant Physiol* **158**:1139
- Fiala V, Glad C, Martin M, Jolivet E, Derridj S (1990)** Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L): variations in relation to leaf Heterogeneity and position on the plant. *The New Phytologist* **115**(4):609
- Figueroa CM, Lunn JE (2016)** A tale of two sugars: trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiol* **172**(1):7

- Frehner M, Keller F, Wiemken A (1984)** Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L). *Journal of Plant Physiology* **116**:197
- Fritz E, Evert RF, Heyser W (1983)** Microautoradiographic studies of phloem loading and transport in the leaf of *Zea mays* L. *Planta* **159**(3):193
- Furet PM, Berthier A, Decau ML, Morvan-Bertrand A, Prud'homme M-P, Noiraud-Romy N, Meuriot F (2012)** Differential regulation of two sucrose transporters by defoliation and light conditions in perennial ryegrass. *Plant Physiology and Biochemistry* **61**:88

## G

- Gahrtz M, Stolz J, Sauer N (1994)** A phloem-specific sucrose-H<sup>+</sup> symporter from *Plantago major* L supports the model of apoplast phloem loading. *The Plant Journal* **6**:697
- Gallagher JA, Turner L, Cairns AJ (2007)** Fructan in temperate forage grasses; Agronomy, physiology and molecular biology, in *Recent Advances in Fructooligosaccharides*, eds Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S (*Kerala: Research Signpost*) 15
- Garcia K, Doidy J, Zimmermann SD, Wipf D, Courty P-E (2016)** Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends Plant Sci* **21**:937
- Gasperl A, Morvan-Bertrand A, Prud'homme M-P, van der Graaff E, Roitsch T (2016)** Exogenous classic phytohormones have limited regulatory effects on fructan and primary carbohydrate metabolism in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L). *Front Plant Sci* **6**:1251
- Gill JJ, Sabour PM, Gong J, Yu H, Leslie KE, Griffiths MW (2006)** Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* **56**:471
- GNIS (2012)** Le ray-grass anglais. *Les petits guides prairies*
- GNIS (2018)** [23 Oct (2020)] Surfaces prairiales : comment optimiser leur exploitation ?
- Gonzalez B, Boucaud J, Salette J, Langlois J, Duyme M (1989)** Changes in stubble carbohydrate content during regrowth of defoliated perennial ryegrass (*Lolium perenne* L) on two nitrogen levels. *Grass and Forage Science* **44**:411
- Gonzali S, Alpi A, Blando F, De Bellis L (2002)** *Arabidopsis* (HXK1 and HXK2) and yeast (HXK2) hexokinases overexpressed in transgenic lines are characterized by different catalytic properties. *Plant Science* **163**:943
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR (2000)** Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:13979
- Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM (2010)** Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:9458
- Granot D, Kelly G, Stein O, David-Schwartz R (2014)** Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *Journal of Experimental Botany* **65**(3):809
- Grigston JC, Osuna D, Scheible WR, Liu C, Stitt M, Jones AM (2008)** D-Glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, AtRGS1. *FEBS Lett* **582**:3577
- Grof CPL, Byrt CS, Patrick JW (2014)** Phloem transport of resources. In: Moore P, Botha F, eds, *Sugarcane: Physiology, Biochemistry & Functional Biology*. *John Wiley & Sons* **267**:305

## H

- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie A, Grimm B, Kühn C (2006)** Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant J* **45**:180
- Hannah L, James M (2008)** The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms. *Current opinion in biotechnology* **19**(1):60
- Harmer SL, Kay SA (2005)** Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**:1926
- He H, Chincinska I, Hackel A, Grimm B, Kühn C (2008)** Phloem mobility and stability of sucrose transporter transcripts. *Open Plant Sci J* **2**:15
- Hendry GAF, Wallace RK (1993)** The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki M, Chatterton NJ, eds Science and technology of fructans. Boca Raton, FL: CRC Press **119**
- Hincha DK, Hellwege EM, Heyer AG and Crowe JH (2000)** Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *European Journal of Biochemistry* **267**:535
- Hirano SS, Upper CD (2000)** Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:624
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT Ohsugi R (1997)** cDNA cloning and tissue-specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L). *Plant Cell Physiol* **38**:1389
- Hofmann M, Roitsch T (2000)** The hexokinase inhibitor glucosamine exerts a concentration dependent dual effect on protein kinase activity in vitro. *Journal of Plant Physiology* **157**:13
- Hu W, Hua X, Zhang Q, Wang J, Shen Q, Zhang X Wang K, Yu Q, Lin YR, Ming R, Zhang J (2018)** New insights into the evolution and functional divergence of the SWEET family in *Saccharum* based on comparative genomics. *BMC Plant Biology* **18**:270

## I

- Irlinger F, Yung SA, Sarthou AS, Delbès-Paus C, Montel MC, Coton E, Coton M, Helinck S (2012)** Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *Int J Food Microbiol* **153**(3):332
- Ishimaru, K, Hirose, T, Aoki, N, Takahashi, S, Ono, K, Yamamoto, S, Wu, J, Saji, S, Baba, T, Ugaki, M, Matsumoto, T and Ohsugi, R (2001)** Antisense expression of a rice sucrose transporter OsSUT1 in rice (*Oryza sativa* L). *Plant Cell Physiol* **42**:1181

## J

- Jagodzik P, Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M, Ludwikow A (2018)** Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Front Plant Sci* **9**:1387
- Jang J-C, León P, Zhou L, Sheen J (1997)** Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**:5
- Jeena GS, Kumar S, Shukla RK (2018)** Structure, evolution and diverse physiological roles of SWEET sugar transporters in plants. *Plant Molecular Biology* **100**:351
- Jin Y, Fei M, Rosenquist S, Jin L, Gohil S, Sandström C, Olsson H, Persson C, Höglund AS, Fransson G, Ruan Y, Åman P, Jansson C, Liu C, Andersson R, Sun C (2017)** A dual-promoter gene orchestrates the sucrose-coordinated synthesis of starch and fructan in barley. *Mol Plant* **10**(12):1556
- Johnson MP (2016)** Photosynthesis. *Essays in Biochemistry* **60**:255
- Jones TWA (1990)** Use of a flowering mutant to investigate changes in carbohydrates during floral transition in red clover. *Journal of Experimental Botany* **41**:1013

## K

- Kadi SA (2007)** Alimentation de la vache laitière : étude dans quelques élevages d'Algérie. Thèse Université Saad Dahlab de Blida, Blida
- Kapur JN, Sahoo PK, Wong ACK (1985)** A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Graphical Models and Image Processing* **29**:273
- Kato-Noguchi H, Takaoka T, Izumori K (2005)** Psicose inhibits lettuce root growth via a hexokinase-independent pathway. *Physiologia Plantarum* **125**:293
- Kaur N, Gupta A (2003)** Application of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of biosciences* **27**:703
- Kawakami A, Yoshida M, Van den Ende W (2005)** Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* **358**:93
- Komor E (1977)** Sucrose uptake by cotyledons of *Ricinus communis* L. *Planta*, **137**:119
- Krasensky J, Jonak C (2012)** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot* **63**(4):1593
- Kryvoruchko IS, Sinharoy S, Torres-Jerez I, Sosso D, Pislariu CI, Guan D, Murray J, Benedito VA, Frommer WB, Udvardi MK (2016)** MtSWEET11, a Nodule-Specific Sucrose Transporter of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **171**(1):554
- Krügel U, Veenhoff LM, Langbein J, Wiederhold E, Liesche J, Friedrich T, Grimm B, Martinoia E, Poolman B, Kühn C (2008)** Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *The Plant Cell* **20**:2497
- Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB (1997)** Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275**:1298
- Kühn C, Grof CPL (2010)** Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**:288

## L

- Lacointe A, Minchin PEH (2008)** Modelling phloem and xylem transport within a complex architecture. *Functional Plant Biology* **35**:772
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999)** The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing. *Plant Cell* **11**(4):707
- Lasseur B, Lothier J, Djoumad A, De Coninck B, Smeekens S, Van Laere A, Morvan-Bertrand A, Van den Ende W, Prud'homme M-P (2006)** Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6GFFT)/fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L). *Journal of Experimental Botany* **57**:2719
- Lasseur B, Lothier J, Wiemken A, Van Laere A, Morvan-Bertrand A, Van den Ende W, Prud'homme MP (2011)** Towards a better understanding of the generation of fructan structure diversity in plants: molecular and functional characterization of a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J Exp Bot* **62**(6):1871
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S (2014)** Sugar signals and the control of plant growth and Development. *J Exp Bot* **65**:799
- Lattanzi FA, Ostler U, Wild M, Morvan-Bertrand A, Decay M-L, Lehmeier CA, Meuriot F, Prud'homme M-P, Schäufele R, Schnyder H (2012)** Fluxes in central carbohydrate metabolism of source leaves in a fructan-storing C3 grass: rapid turnover and futile cycling of sucrose in continuous light under contrasted nitrogen nutrition status. *J Exp Bot* **63**:2363
- Le Hir R (2020)** Les sucres : entre nutrition et développement. Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches Université Paris-Saclay, Versailles

- Leach KA, Tran TM, Slewinski TL, Meeley RB, Braun DM (2017)** Sucrose transporter 2 contributes to maize growth, development, and crop yield. *Journal of Integrative Plant Biology* **59**:390
- Le Cain DR, Morgan J, Schuman GE, Reeder JD, Hart RH (2002)** Carbon exchange and species composition of grazed pastures and exclosures in the shortgrass steppe of Colorado. *Agric Ecosyst Environ* **93**:421
- Lecote D, Simon JC, Stilmant D (2004)** Diversité floristique des prairies permanentes normandes Liens avec les caractéristiques des produits laitiers dérivés. *Fourrages* **178**:265
- Lecote D (2010)** Etude des communautés végétales des prairies permanentes normandes. *INRA Le Pin au Haras*
- Lee JM, Sathish P, Donaghy DJ, Roche JR (2011)** Impact of defoliation severity on photosynthesis, carbon metabolism and transport gene expression in perennial ryegrass. *Funct Plant Biol* **38**(10):808
- Leegood, Richard (2008)** Roles of the bundle sheath cells in leaves of C3 plants. *Journal of experimental botany* **59**:1663
- Lejay L, Wirth J, Pervent M, Cross JMF, Tillard P, Gojon A (2008)** Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiol* **146**:2036
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M (2013)** Source-to-sink transport of sugar and regulation by environment factors. *Frontiers in Plant Science* **4**:1
- Leveau JH, Lindow SE (2001)** Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(6):3446
- Li L, Sheen J (2016)** Dynamic and diverse sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* **33**:116
- Li P, Wind JJ, Shi X, Zhang H, Hanson J, Smeekens SC (2011)** Fructose sensitivity is suppressed in *Arabidopsis* by the transcription factor ANAC089 lacking the membrane-bound domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:3436
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012)** High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology* **30**:390
- Li W, Sun K, Ren Z, Song C, Pei X, Liu Y, Wang Z, He K, Zhang F, Zhou X, Ma X, Yang D (2018)** Molecular evolution and stress and phytohormone responsiveness of SUT genes in *Gossypium hirsutum*. *Frontiers in Genetics* **9**
- Liesche, J (2017)** Sucrose transporters and plasmodesmal regulation in passive phloem loading. *J Integr Plant Biol* **59**:311
- Lindow SE, Brandl MT (2003)** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:1875
- Liu Q, Yuan M, Zhou YAN, Li X, Xiao J, Wang S (2011)** A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant, Cell and Environment* **34**:1958
- Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Muehling KH (2001)** Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* **111**:457
- Loreti, E, Alpi, A & Perata, P (2000)** Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. *Plant Physiology* **123**(3):939
- Loreti E, Bellis LD, Alpi A, Perata P (2001)** Why and how do plant cells sense sugars? *Annals of Botany* **88**:803

- Lothier J, Lasseur B, Djoumad A, Le Roy K, Van Laere A, Prud'homme M-P, Barre P, Van den Ende W, Morvan-Bertrand A (2007a)** Cloning, gene mapping and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* rather implicated in fructan synthesis than in fructan mobilization. *Journal of Experimental Botany* **58**:1969
- Lothier (2007b)** Métabolisme des fructanes chez *Lolium perenne* L.: Identification de deux gènes codant des fructane exohydrolases (FEHs) et étude de la régulation de l'activité FEH par les sucres solubles. Thèse Université de Caen Basse-Normandie, Caen
- Lothier J, Lasseur B, Prud'homme M-P, Morvan-Bertrand A (2010)** Hexokinase-dependent sugar signaling represses fructan exohydrolase activity in *Lolium perenne*. *Funct Plant Biol* **37**:1151
- Lothier J, Van Laere A, Prud' Homme M-P, Van den Ende W, Morvan-Bertrand A (2014)** Cloning and characterization of a novel fructan 6-exohydrolase strongly inhibited by sucrose in *Lolium perenne*. *Planta* **240**:629
- Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav SR, Helariutta Y, He XQ, Fukuda H, Kang J, Brady SM (2013)** The plant vascular system: evolution, development and functions. *J Integr Plant Biol* **55**:294
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible W-R, Carillo P, Hajirezaei M-R, Stitt M (2006)** Sugar induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* **397**:139
- Lunn JE, Delorge I, Figueroa CM, Van Dijck P, Stitt M (2014)** Trehalose metabolism in plants. *Plant J* **79**:544

## M

- Maciejewski J, Osson B (2015)** Productions fourragères. *Lavoisier Tec & Doc Chapitre 1 : Typologie et phytoécologie des prairies permanentes*
- Maignien L, DeForce EA, Chafee ME, Eren AM, Simmons SL (2014)** Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *mBio* **5**:e00682
- Martínez-Noël GM, Tognetti JA, Pontis HG (2001)** Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. *Planta* **213**(4):640
- Martínez-Noël GM, Tognetti JA, Salerno GL, Wiemken A, Pontis HG (2009)** Protein phosphatase activity and sucrose-mediated induction of fructan synthesis in wheat. *Planta* **230**(5):1071
- Martins MC, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Arrivault S, Vosloh D, Figueroa CM, Ivakov A, Yadav UP, Piques M, Metzner D, Stitt M, Lunn JE (2013)** Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol* **163**(3):1142
- Matsukura C, Saitoh T, Hirose T, Ohsugi R, Perata P, Yamaguchi J (2000)** Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (*OsSUT1*) induced by sugar and light. *Plant Physiol* **124**:85
- McClung CR (2006)** Plant Circadian Rhythms. *The Plant Cell* **18**:792
- McCurdy DW, Dibley S, Cahyanegara R, Martin A, Patrick JW (2010)** Functional characterization and RNAi-mediated suppression reveals roles for hexose transporters in sugar accumulation by tomato fruit. *Molecular Plant* **3**:1049
- Mercier J, SE Lindow (2000)** Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Appl Environ Microbiol* **66**:369
- Mertz RA, Brutnell TP (2014)** Bundle sheath suberization in grass leaves: multiple barriers to characterization. *J Exp Bot* **65**:3371

- Meuriot F, Morvan-Bertrand A, Noiraud-Romy N, Decau M-L, Escobar-Gutiérrez AJ, Gastal F, Prud'homme M-P (2013)** Short-term effects of defoliation intensity on sugar remobilization and N fluxes in ryegrass. *Journal of Experimental Botany* **69**:3975
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N (2000)** *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* **24**(6):869
- Miller, LA, Neville, MA, Baker, DH, Evans, RT, Theodorou, MK, MacRae, JC, Humphreys, MO and J M Moorby (1999)** Milk production from dairy cows offered perennial ryegrass selected for high water soluble carbohydrate concentrations compared to a control grass. *Proceedings of the British Society of Animal Science, Annual Meeting, Scarborough, 208*
- Miller, LA, Scollan, ND, MacRae, JC, Humphreys, MO, Baker, DH, Theodorou, MK & Moorby, JM (2001)** Efficiency of nitrogen use in dairy cows grazing ryegrass with different water soluble carbohydrate concentrations **10**
- Minchin PEH, Thorpe MR (1987)** Measurement of unloading and reloading of photo-assimilate within the stem of bean. *Journal of Experimental Botany* **38**:211
- Miyoshi Y, Hidaka T, Hidaka K, Okayasu T, Yasutake D, Kitano M (2017)** Dynamics of photosynthate loading in strawberries affected by light condition on source leaves. *Environmental Control in Biology* **55**:53
- Molesini B, Cecconi D, Pii Y, Pandolfini T (2014)** Local and systemic proteomic changes in *Medicago truncatula* at an early phase of *Sinorhizobium meliloti* infection. *J Proteome Res* **13**(2):408
- Monier JM, Lindow SE (2005)** Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. *Microb Ecol* **49**(3):343
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng Wh, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003)** Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**:332
- Morvan-Bertrand A, Boucaud J, Prud'homme MP (1999a)** Influence of initial levels of carbohydrates, fructans, nitrogen, and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L cv Bravo following defoliation. *Journal of Experimental Botany* **50**:1817
- Morvan-Bertrand A, Pavis N, Boucaud J, Prud'homme MP (1999b)** Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after defoliation: assessment by <sup>13</sup>C steady-state labelling and carbohydrate analysis. *Plant, Cell and Environment* **22**:1097
- Morvan-Bertrand A, Boucaud J, Le Saos J, Prud'homme M-P (2001)** Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. *Planta* **213**:109
- Msalya G (2017)** Contamination levels and identification of bacteria in milk sampled from three regions of tanzania: evidence from literature and laboratory analyses. *Veterinary Medicine International*
- Müller J, Aeschbacher RA, Sprenger N, Boller T, Wiemken A (2000)** Disaccharide mediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiology* **123**:265
- Münch E (1930)** Die Stoffbewegungen in der Pflanze Gustav Fisher, Jena

## N

- Nagaraj V, Riedl R, Boller T, Wiemken A, Meyer A (2001)** Light and sugar regulation of the barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase promoter. *Journal of Plant Physiology* **158**:1601
- Neuhaus HE, Wagner R (2000)** Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. *Biochim Biophys Acta* **1465**:307

**Niklas KJ, Cobb ED, Matas AJ (2017)** The evolution of hydrophobic cell wall biopolymers: from algae to angiosperms. *Journal of Experimental Botany* **68**:5261

## O

**Okubo-Kurihara E, Higaki T, Kurihara Y, Kutsuna N, Yamaguchi J, and Hasezawa S (2011)** Sucrose transporter NtsUt4 from tobacco BY-2 involved in plant cell shape during miniprotoplast culture. *J Plant Res* **124**:395

**Oparka KJ, Turgeon R (1999)** Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* **11**(4):739

**OpenStax (2016)** [23 Oct 2020] Carbohydrates Biologie 2e. url : <https://openstaxorg/books/biology-2e/pages/3-2-carbohydrates>

**Osorio S, Ruan YL, Fernie AR (2014)** An update on source-to-sink carbon partitioning in tomato. *Frontiers in Plant Science* **5**(516):1

**Ould-Ahmed M, Decau ML, Morvan-Bertrand A, Prud'homme M-P, Lafrenière C, Drouin P (2015)** Fructan, sucrose and related enzyme activities are preserved in timothy (*Phleum pratense* L) during wilting. *Grass and Forage Science* **72**:64

**O'Brien TP, Carr DJ (1969)** A suberized layer in the cell walls of the bundle sheath of grasses. *Aust J biol Sci* **23**:275

## P

**Padilla D, Acosta F, Ramos-Vivas J, Grasso V, Bravo J, El Aamri F, Real F (2015)** The pathogen *Hafnia alvei* in veterinary medicine: a review. *Journal of Applied Animal Research* **43**:231

**Palacio-Rabaud V (2000)** La conduite des prairies en France : pratiques intensives et rendements élevés dans le Nord-Ouest. *Agreste Cahiers* **4**:15

**Patel TK, Williamson JD (2016)** Mannitol in plants, fungi, and plant-fungal interactions. *Trends Plant Sci* **21**(6):486

**Patil, G, Valliyodan, B, Deshmukh, R, Prince S, Nicander B, Zhao M, Sonah H, Song L, Lin L, Chaudhary J, Liu Y, Joshi T, Xu D, Nguyen HT (2015)** Soybean (*Glycine max*) *SWEET* gene family: insights through comparative genomics, transcriptome profiling and whole genome re-sequencing analysis. *BMC Genomics* **16**:520

**Patrick JW (2013)** Does Don Fisher's high-pressure manifold model account for phloem transport and resource partitioning? *Frontiers in Plant Science* **4**:184

**Pavis N, Boucaud J, Prud'homme MP (2001)** Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytologist* **150**:97

**Pearson Education (2012)** Chapter 7 : Photosynthesis : using light to make food. *Campbell Biology : Concepts & Connections Seventh Edition*

**Pego JV, Smeekens SCM (2000)** Plant fructokinases: a weet family get-together. *Trends in Plant Science* **8**:531

**Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SC (1999)** Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology* **119**:1017

**Peshev D, Vergauwen R, Moglia A, Hideg E, Van den Ende W (2013)** Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *J Exp Bot* **64**(4):1025

**Pfaffl MW (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45

**Phan T, Ishibashi Y, Miyazaki M, Tran H, Okamura K, Tanaka S, Nakamura J, Yuasa T, Iwaya-Inoue M (2013)** High Temperature-induced repression of the rice sucrose transporter (*OsSUT1*) and starch synthesis-related genes in sink and source organs at milky ripening stage causes chalky grains. *Journal of Agronomy and Crop Science* **199**

**Pollock CH, Cairns AJ (1991)** Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **42**:77

- Price J, Laxmi A, St Martin SK, Jang JC (2004)** Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**(8):2128
- Prud'homme M-P, Morvan-Bertrand A, Lasseur B, Lothier J, Meuriot F, Decau ML, Noiraud-Romy N (2007)** *Lolium perenne*, backbone of sustainable development, source of fructans for grazing animals and potential source of novel enzymes for biotechnology. In: Shiomi N., Benkeblia N., Onodera S. (eds) *Recent advances in fructooligosaccharides research*. Research Signpost Publisher, Kerala. Chapitre 12:231

## R

- R Core Team (2017)** R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria url : <https://www.R-project.org/>
- Rae AL, Perroux JM, Grof CPL (2005)** Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role of the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta* **220**:817
- Rasmussen S, Parsons A, Xue H, Liu Q, Jones C, Ryan G, Newman J (2014)** Transcript profiling of fructan biosynthetic pathway genes reveals association of a specific fructosyltransferase isoform with the high sugar trait in *Lolium perenne*. *Journal of plant physiology* **171**:475
- Rea MC, Gorges S, Gelsomino R, Brennan NM, Mounier J, Vancanneyt M, Scherer S, Swings J, Cogan TM (2007)** Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *J Dairy Sci* **90**:2200
- Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI, Saier, MH Jr (2012)** The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *The FEBS Journal* **279**:2022
- Reinders A, Sivitz AB, Hsi A, Grof CPL, Perroux JM, and Ward JM (2006)** Sugarcane ShSUT1: analysis of sucrose transport activity and inhibition by sucralose. *Plant Cell Env* **29**:1871
- Riesmeier, JW, Willmitzer, L, and Frommer, WB (1992)** Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *eMBO J* **11**:4705
- Riesmeier, JW, Willmitzer, L, and Frommer, WB (1994)** Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *eMBO J* **13**:1
- Ritsema T, Smeekens S (2003)** Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:223
- Roitsch T, Bittner M, Godt DE (1995)** Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology* **108**:285
- Roitsch T (1999)** Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* **23**:198
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006)** Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**:675
- Rottmann T, Zierer W, Subert C, Sauer N, Stadler R (2016)** *STP10* encodes a high-affinity monosaccharide transporter and is induced under low-glucose conditions in pollen tubes of *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **67**:2387
- Ruan Y-L, Jin Y, Yang Y-J, Li G-J, Boyer JS (2010)** Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant* **3**:942
- Ryffel F, Helfrich EJ, Kiefer P, Peyriga L, Portais JC, Piel J, Vorholt JA (2016)** Metabolic footprint of epiphytic bacteria on *Arabidopsis thaliana* leaves. *ISME J* **10**(3):632

## S

- Sager RE, Lee JY (2018)** Plasmodesmata at a glance. *J Cell Sci* **131**(11):jcs209346
- Saier MH Jr (2000)** Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molec Micro* **35**:699
- Sakr S, Noubahni M, Bourbouloux A, Riesmeier J, Frommer WB, Sauer N, and Delrot S (1997)** Cutting, ageing and expression of plant membrane transporters. *Biochim Biophys Acta Biomem* **1330**:207
- Sakr S, Wang M, Dédaldéchamp F, Perez-Garcia MD, Ogé L, Hamama L, Atanassova R (2018)** The sugar-signaling hub: overview of regulators and interaction with the hormonal and metabolic network. *Int J Mol Sci* **19**(9):2506
- Saltman P (1953)** Hexokinase in higher plants. *J Biol Chem* **200**(1):145
- Sandrin C, Figueiredo-Ribeiro R, Delitti W, Domingos M (2013)** Short-term changes of fructans in ryegrass (*Lolium multiflorum* 'Lema') in response to urban air pollutants and meteorological conditions. *Ecotoxicology and environmental safety* **96**
- Sauer N (2007)** Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**:2309
- Sauer N, Stolz J (1994)** SUC1 and SUC2 - two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana* - expression and characterization in bakers yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J* **6**:67
- Schmitt B, Stadler R, Sauer N (2008)** Immunolocalization of solanaceous SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: new perspectives for phloem loading and transport. *Plant Physiol* **148**:187
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012)** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**:671
- Scialdone A, Mugford ST, Feike D, Skeffington A, Borrill P, Graf A, Smith AM, Howard M (2013)** *Arabidopsis* plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. *eLife* **2**:1
- Scialdone A, Howard M (2015)** How plants manage food reserves at night: quantitative models and open questions. *Frontiers in Plant Science* **6**:1
- Scofield GN, Hirose T, Gaudron JA, Upadhyaya NM, Ohsugi R, and Furbank RT (2002)** Antisense suppression of the rice sucrose transporter gene, *OsSUT1*, leads to impaired grain filling and germination but does not affect photosynthesis. *Funct Plant Biol* **29**:815
- Seïté S (2015)** [23 Oct 2020] En savoir plus sur les Fromages AOP. *Turbigo Gourmandises*. url : <https://turbigo-gourmandisesfr/en-savoir-plus-sur-les-fromages-aop/>
- Shakya R, Sturm A (1998)** Characterization of source- and sink-specific sucrose/H<sup>+</sup> symporters from carrot. *Plant Physiology* **118**:1473
- Sheen J (2014)** Master regulators in plant glucose signaling networks. *J Plant Biol* **57**:67
- Siemens J, González M-C, Wolf S, Hofmann C, Geiner S, Y Du, Rausch T, Ludwig-Müller J (2010)** Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology* **12**:247
- Simmen U, Obenland D, Boller T, Wiemken A (1993)** Fructan synthesis in excised barley leaves (identification of two sucrose-sucrose fructosyltransferases induced by light and their separation from constitutive invertases). *Plant Physiol* **1**(2):459
- Sivitz AB, Reinders A, and Ward JM (2005)** Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter HvSUT1. *Plant Cell Physiol* **46**:1666
- Slewinski T, Meeley R, Braun D (2009)** Sucrose transporter 1 functions in phloem loading in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **60**:881
- Slewinski T (2011)** Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. *Mol Plant* **4**:641
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010)** Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* **13**:274

- Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM (2003)** Starch mobilization in leaves. *J Exp Bot* 54:577
- Sonnewald S, Priller JP, Schuster J, Glickmann E, Hajirezaei M-R, Siebig S, Mudgett MB, Sonnewald U (2012)** Regulation of cell wall-bound invertase in pepper leaves by *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* type three effectors. *PLoS One* 7:e51763
- Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG (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 Physiology* 148:200
- Stadler R, Sauer N (1996)** The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta* 109:299
- Stein O, Granot D (2019)** An overview of sucrose synthases in plants. *Front Plant Sci* 10:95
- Stoyanova S, Geuns J, Hideg E and Van den Ende W (2010)** The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 0:1
- Sturm A (1999)** Invertases primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121:1
- Sun Y, Reinders A, LaFleur KR, Mori T, Ward JM (2010)** Transport activity of rice sucrose transporters OsSUT1 and OsSUT5. *Plant Cell Physiology* 51(1):114
- Séguin V, Lemauiel-Lavenant S, Garon D, Bouchart V, Gallard Y, Blanchet B, Diquélou S, Personeni E, Gauduchon P, Ourry A (2010)** An evaluation of the hygienic quality in single-species hays and commercial forages used in equine nutrition. *Grass and Forage Sciences* 65:304

## T

- Taiz L, Zeiger E, Moller IE, Murphy A (2014)** Chapitre 8: Photosynthesis: the carbon reactions In: *Plant Physiology and Development*, *Sinauer Associates* 6:231
- Tasset E (2019)** Services écosystémiques rendus par les prairies de marais et les prairies mésophiles : diversité floristique, qualité fourragère et stock de carbone. Thèse Université de Caen Normandie, Caen
- Tauzin AS, Giardina T (2014)** Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Front Plant Sci* 5
- Teng S, Keurentjes J, Bentsink L, Koornneef M, Smeekens S (2005)** Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the *MYB75/PAP1* gene. *Plant Physiol* 139:1840
- Thompson IP, Bailey MJ, Ellis RJ, Lilley AK, McCormack PJ, Purdy KJ, Rainey PB (1995)** Short-term community dynamics in the phyllosphere microbiology of the field-grown sugar beet. *FEMS Microb Ecol* 16:205
- Tiessen A, Padilla-Chacon D (2013)** Subcellular compartmentation of sugar signaling: links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning. *Front Plant Sci* 18:3
- Tognetti JA, Pontis HG, Martínez-Noël GM (2013)** Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signal Behav* 8(3):e23316
- Trevanion SJ (2000)** Photosynthetic carbohydrate metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L) leaves: optimization of methods for determination of fructose 2,6-bisphosphate. *Journal of Experimental Botany* 51:1037
- Truernit E and Sauer N (1995)** The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs gene expression of beta-glucuronidase to the phloem-evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196:564
- Tymowska-Lalanne Z, Kreis M (1998)** Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* 207:259

## U

- Umemura T, Perata P, Futsuhara Y, Yamaguchi J (1998)** Sugar sensing and alpha-amylase gene repression in rice embryos. *Planta* **204**:420
- Usha B, Bordoloi D, Parida A (2015)** Diverse expression of sucrose transporter gene family in *Zea mays*. *J Genet* **94**(1):151

## V

- Van Bel AJ (1996)** Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *J Exp Bot* **47**:1129
- Van den Ende W (2018)** Novel fructan exohydrolase: unique properties and applications for human health. *J Exp Bot* **69**(18):4227
- Vaughn MW, Harrington GN, and Bush DR (2002)** Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proc Nat Acad Sci USA* **99**:10876
- Velázquez-Ordoñez V, Valladares-Carranza B, Tenorio-Borroto E, Talavera-Rojas M, Varela-Guerrero JA, Acosta-Dibarrat J, Puigvert F, Grille L, González Revello, Pareja L (2019)** Microbial contamination in milk quality and health risk of the consumers of raw milk and dairy products. *IntechOpen, Nutrition in Health and Disease - Our Challenges Now and Forthcoming Time*.
- Veramendi J, Fernie AR, Leisse A, Willmitzer L, Trethewey RN (2002)** Potato hexokinase 2 complements transgenic *Arabidopsis* plants deficient in hexokinase 1 but does not play a key role in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Mol Biol* **49**:491
- Vijn I, Van Dijken A, Sprenger N, Van Dun K, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S (1997)** Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L) harbouring onion (*Allium cepa* L) fructan:fructan 6Gfructosyl-transferase. *The Plant Journal* **11**:387
- Villadsen D, Smith SM (2004)** Identification of more than 200 glucose-responsive *Arabidopsis* genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. *Plant Mol Biol* **55**:467
- Vorholt J (2012)** Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **10**:828

## W

- Wagner W, Wiemken A, Matile P (1986)** Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L cv Gerbel). *Plant Physiology* **81**:444
- Wagner W, Wiemken A (1989)** Fructan metabolism in expanded primary leaves of barley (*Hordeum vulgare* L cv Gerbel): change upon ageing and spatial organization along the leaf blade. *Journal of Plant Physiology* **134**:237
- Wang L, Lu Q, Wen X, Lu C (2015)** Enhanced sucrose loading improves rice yield by increasing grain size. *Plant physiology* **169**
- Wang W, Fang J (2009)** Soil respiration and human effects on global grassland. *Global and Planetary Change* **67**(20):2
- Wang W, Zhou H, Ma B, Owiti A, Korban SS, Han Y (2016)** Divergent evolutionary pattern of sugar transporter genes is associated with the difference in sugar accumulation between grasses and eudicots. *Sci Rep* **6**:29153
- Wasternack C, Hause B (2013)** Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *An update to the review in Annals of Botany Ann Bot* **111**(6):1021
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U (1997)** A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *The Plant Cell* **9**:895

- Wei JZ, Chatterton NJ, Larson SR (2001)** Expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) and myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) genes in barley (*Hordeum vulgare*) leaves. *Journal of plant Physiology* **158**:635
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM (2000)** A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**(8):1345
- Wenzler H, Mignery G, Fisher L, Park W (1989)** Sucrose-regulated expression of a chimeric potato tuber gene in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* **13**(4):347
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, and Wobus U (2000)** Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant J* **21**:455
- Wildman HG, Parkinson D (1979)** Microfungal succession on living leaves of *Populus tremuloides*. *Canadian Journal of Botany* **57**(24):2800
- Williams TR, Marco ML (2014)** Phyllosphere microbiota composition and microbial community transplantation on lettuce plants grown indoors. *American Society for Microbiology* **5**:e01564
- Wind J, Smeekens S, Hanson J (2010)** Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* **71**(14-15):1610
- Wingenter K, Schulz A, Wormit A, Wic S, Trentmann O, Hoermiller II, Heyer AG, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE (2010)** Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**(2):665-77
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA (2000)** Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**(1):105
- Wright KM, Roberts AG, Martens HJ, Sauer N, Oparka KJ (2003)** Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to *AtSUC2* promoter activity. *Plant Physiol* **131**(4):1555
- Wu L, Birch RG (2007)** Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. *Plant Biotechnol J* **5**(1):109
- Wu L, Birch RG (2011)** Isomaltulose is actively metabolized in plant cells. *Plant Physiol* **157**(4):2094

## X

- Xiao W, Sheen J, Jang JC (2000)** The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol* **44**:451
- Xu Q, Chen S, Yunjuan R, Chen S, Liesche J (2018)** Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues. *Plant Physiology* **176**:930

## Y

- Yadav UP, Ivakov A, Feil R, Duan GY, Walther D, Giavalisco P, Piques M, Carillo P, Hubberten HM, Stitt M, Lunn JE (2014)** The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *J Exp Bot* **65**(4):1051
- Yamada K, Saijo Y, Nakagami H, Takano Y (2016)** Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. *Science* **354**:1427
- Yang B, Sugio A, White FF (2006)** *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:10503
- Yeluri Jonnala BR, McSweeney PLH, Sheehan JJ, Cotter PD (2018)** Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Front Microbiol* **9**:1020
- Yoon J, Cho L, Tun W, Jeon J, An, G (2021)** Sucrose signaling in higher plants. *Plant Science* **302**:110703

**Yu Y, Streubel J, Balzergue S, Champion A, Boch J, Koebnik R, Feng J, Verdier V, Szurek B (2011)** Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice nodulin-3 *Os11N3* gene. *Mol Plant Microbe Interact* **24**:1102

## **Z**

**Zhang C, Turgeon R (2018)** Mechanisms of phloem loading. *Curr Opin Plant Biol* **43**:71

**Zhang C, Han L, Slewinski TL, Sun J, Zhang J, Wang ZY, Turgeon R (2014)** Symplastic phloem loading in poplar. *Plant Physiology* **166**:306

# **Annexes**

---



# IX. Annexes



**Hans LONE SANG**  
PhD Student  
UMR INRA-UCR 950 EVA  
Université de Caen Normandie

## PHYLLOSPHERE

### A CROSS-TALK BETWEEN BACTERIA & LEAF SUGARS ?

---

**BACTERIA COULD GROW ON LEAF SURFACE...**

In Normandy, Rye-grass (*Lolium perenne* L.) is the most predominant grass. Even if its leaves are a harsh environment for phyllosphere bacteria, their shading constitute a protection from UV light and the leaf laminar layer could alleviate water stress (Lindow and Brandl, 2003).

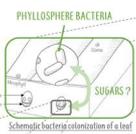


Normandy grazing in a Rye-grass dominant grass field

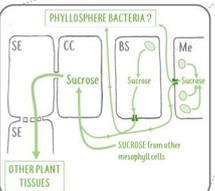
**...AND CAN USE PLANT SUGARS**

Moreover, sugars such as sucrose were shown to be available for phyllosphere bacteria, but they may act as a limiting factor for growth and diversity (Mercier and Lindow, 2000), which can impact dairy products quality.

**KEY ROLE OF SUCROSE TRANSPORTERS ?**



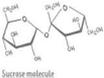
Schematic bacteria colonization of a leaf



Phloem sucrose loading  
SE: Sieve Elements  
CC: Companion Cell  
BS: Bundle Sheath Cell  
Me: Mesophyll Cell  
LpSUT1

SUCROSE from other mesophyll cells

**SUCROSE IS THE MAIN TRANSPORT MOLECULE OF PHOTO-ASSIMILATED CARBON AND COULD BE AVAILABLE TO PHYLLOSPHERE BACTERIA BEFORE BEING LOADED TO THE PHLOEM BY SUCROSE TRANSPORTERS, LIKE LpSUT1 (BERTHIER ET AL., 2009).**



Sucrose molecule

**HYPOTHESIS & OBJECTIVE**

Leaf sugar composition and sucrose transport might influence phyllosphere bacteria growth and diversity. In the present study, we wanted to assess the effects of different bacterial strains from the field on both sugar content and sucrose transport in Rye-grass.

**MATERIAL & METHODS**

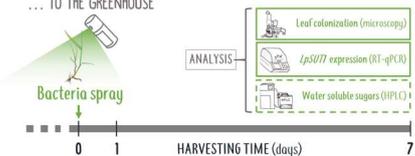
**SPRAYING BACTERIAL STRAINS ON RYE-GRASS**

**FROM THE FIELD ...**

STRAIN	SUGARS CONSUMPTION		
	SUCROSE	TRICHALS	OTHER SUGARS
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (C273)	●●●●	●●●●	●●●●
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (C275)	●●●●	●●●●	●●●●
<i>Halfnia alvei</i> (H275)	●●●●	●●●●	●●●●
<i>Halfnia alvei</i> (H277)	●●●●	●●●●	●●●●

Bacterial strains were isolated from grazed meadows in 2016 (Haras du Pin, Orne)  
4 strains were chosen based on their sugar consumption (from low (α) to high (ααα), see Table)

**... TO THE GREENHOUSE**



Bacteria spray

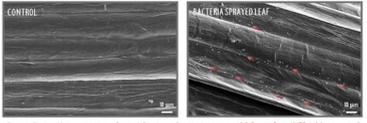
ANALYSIS

- Leaf colonization (microscopy)
- LpSUT1 expression (RT-qPCR)
- Water soluble sugars (HPLC)

**HARVESTING TIME (days)**

0      1      7

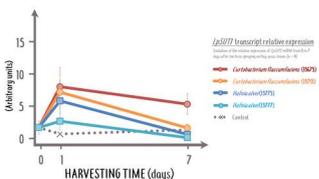
**(1) BACTERIA COLONIZED LEAVES...**



- An efficient bacterial colonization was found near stomata and in clusters near leaf veins (phloem)

Scanning Electron Microscopy pictures of control (blank spray) and bacteria sprayed (*C. flaccumfaciens* C275) Rye-grass leaf

**(2) ... AND LpSUT1 TRANSCRIPTION WAS INDUCED**



- Irrespective of the bacterial strain, LpSUT1 transcript relative expression was induced one day after spraying.
- *Curtobacterium flaccumfaciens* had a greater effect than *Halfnia alvei*.

**CONCLUSION**

(1) Bacterial colonization was observed near leaf veins where sucrose is potentially available to bacteria

(2) Sucrose transport in the leaves might be differentially affected by bacterial strains

**THE CROSS-TALK BETWEEN THE PLANT & BACTERIA EXISTS AND COULD AFFECT THE BACTERIAL DIVERSITY AND, ULTIMATELY, THE RELATED MILK PRODUCT QUALITY**

- But further analysis remain to be done (water soluble sugars content within the leaves, semi-quantification of bacterial colonization)

**Annexe I.** Poster scientifique présenté aux 2<sup>èmes</sup> journées scientifiques de la fédération de recherche NORVEGE le 17 & 18 Mai 2018 à Deauville (deuxième prix du jury).









**Variation des teneurs en glucides et régulation des niveaux relatifs de transcrits du gène du transporteur de saccharose LpSUT1 par les glucides et en réponse à la modulation des relations sources-puits chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.).**

Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement. Thèse de Doctorat de l'Université de Caen Normandie. 251 p.

**Résumé.** Chez le ray-grass anglais, espèce fourragère prédominante des prairies Normandes, il existe des transporteurs de saccharose (LpSUTs) responsables du transport latéral de ce composé pour permettre son chargement dans le phloème dans les tissus sources de carbone ou son déchargement dans les tissus puits. Ces transporteurs sont d'excellents candidats pour la gestion fine et efficace de la distribution des ressources glucidiques de la plante, notamment en réponse aux variations de l'environnement. Les caractéristiques biochimiques et la localisation tissulaire spécifique du transporteur LpSUT1 suggèrent qu'il est le principal responsable du transport latéral du saccharose.

Nous avons cherché à moduler la disponibilité du saccharose en perturbant les relations sources et puits des tissus par des facteurs abiotiques (*e.g.* cycle nyctéméral) et biotiques (*e.g.* pulvérisation de bactéries au niveau de la phyllosphère). Dans ces deux conditions, l'expression du gène *LpSUT1* dans les organes sources que sont les limbes est peu affectée, malgré une perturbation importante des teneurs en saccharose. L'apport de glucides, d'analogues structuraux et d'un inhibiteur de l'activité de l'hexokinase à des limbes excisés montre que le saccharose reste cependant un signal glucidique capable d'augmenter l'expression transcriptionnelle de *LpSUT1*. Le glucose est aussi un signal qui module négativement l'expression de *LpSUT1* quand il est perçu par l'hexokinase, et positivement lorsqu'il est perçu indépendamment de cette dernière. Un excès de saccharose et de glucose apoplasmique pourrait être détecté au niveau membranaire ce qui régulerait positivement l'expression du gène *LpSUT1* pour augmenter l'importation du saccharose vers le cytoplasme. A l'inverse, l'accumulation cytoplasmique de glucose provoquerait l'inhibition de l'expression du gène *LpSUT1* pour y limiter l'accumulation de glucides.

La régulation transcriptionnelle du gène *LpSUT1* fait appel à des voies de signalisation complexes, sensibles en partie aux signaux glucidiques, mais d'autres LpSUTs et facteurs de régulation devront encore être identifiés pour mieux comprendre les enjeux du transport de saccharose dans la gestion du carbone chez le ray-grass anglais.

**Variation of sugar contents and regulation of the relative transcript levels of the sucrose transporter LpSUT1 gene by sugars as a response to the modulation of source-sink relationships in rye-grass (*Lolium perenne* L.).**

Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement. Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée. Université de Caen Normandie PhD.

**Abstract.** In the perennial ryegrass, the predominant forage species of Normand meadows, sucrose transporters (LpSUTs) are involved in the lateral transport of this compound to load sucrose in the phloem of the source tissues and its unloading in sink tissues. These transporters are excellent candidates for the tight and efficient management of the plant sugars, particularly in response to environmental variations. The biochemical properties and specific tissular localization of the sucrose transporter LpSUT1 suggest that it is the main actor of the lateral transport of sucrose.

We induced a modulation of the sucrose availability in the tissues through the disruption of the source/sink relationships using abiotic (*e.g.* diel cycle) and biotic factors (*e.g.* spraying bacteria abundantly on the phyllosphere). In both conditions, *LpSUT1* expression in source tissues like the leaf blades was not too much affected, despite the important disruption of the sucrose content. By supplying excised leaf blades with sugars, sugar analogs and an inhibitor of the hexokinase activity, we showed that sucrose was still a sugar signal which could up-regulate *LpSUT1* expression. Glucose is also a signal for *LpSUT1* down-regulation when perceived by the hexokinase and for its up-regulation when perceived in a way independent of the hexokinase. The excess of apoplasmic sucrose and glucose could be detected at the plasmalemma which could induce *LpSUT1* up-regulation to increase the sucrose import to the cytoplasm. Conversely, the cytoplasmic accumulation of glucose could down-regulate *LpSUT1* expression to limit the accumulation of cytoplasmic sugars.

The transcriptional regulation of *LpSUT1* involved complex signaling pathways partially responding to sugar signals, but other regulation factors should be identified to further comprehend the implications of the sucrose transport for the perennial ryegrass carbon management.

**Spécialité :** Physiologie et biologie des organismes, populations, interactions

**Mots-clés RAMEAU :** Plantes, *Lolium*, Transport, Ecophysiologie, Métabolisme -- Régulation.

**Mots-clés libres :** *Lolium perenne* L., transporteur de saccharose, nyctéméral, phyllosphère, glucides, hexokinase.

**UMR INRAE-Unicaen 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N, C, S. Esplanade de la Paix, 14032 Cedex Caen, France.**