HAL open science

Rôle des transporteurs de sucres tonoplastiques de type SWEET dans le développement du xylème chez Arabidopsis thaliana

Deyan Markovic

To cite this version:

Deyan Markovic. Rôle des transporteurs de sucres tonoplastiques de type SWEET dans le développement du xylème chez Arabidopsis thaliana. Biologie végétale. 2022. hal-03731764

HAL Id: hal-03731764

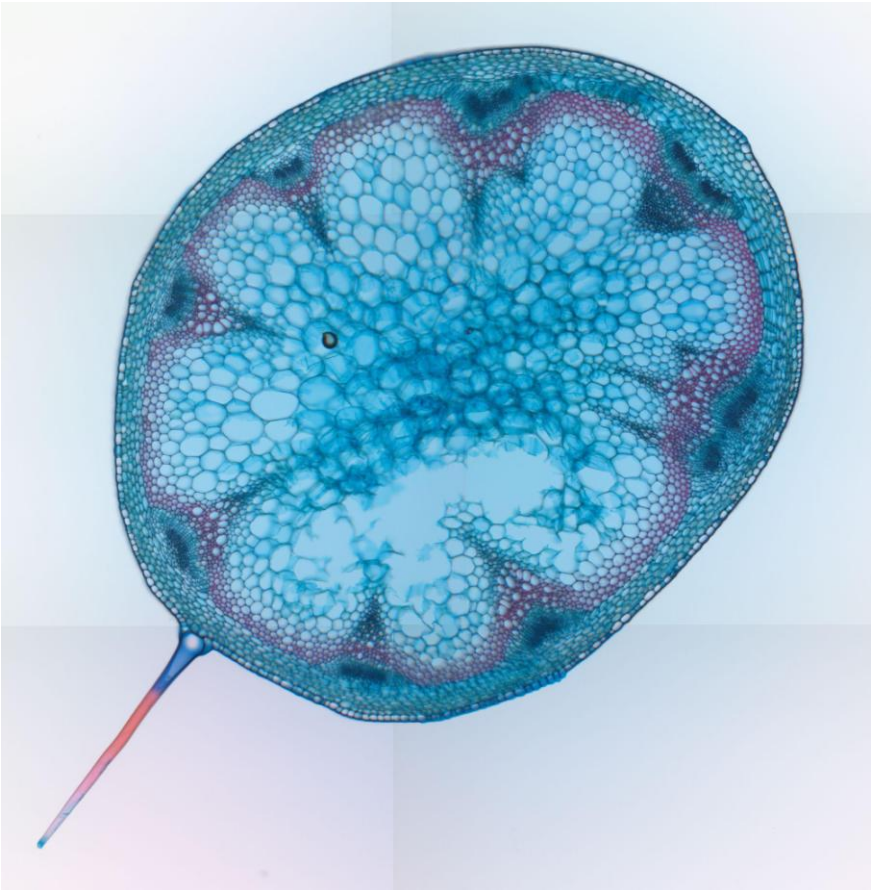
https://hal.inrae.fr/hal-03731764v1

Submitted on 21 Jul 2022

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

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

Rôle des transporteurs de sucres tonoplastiques de type SWEET dans le développement du xylème chez *Arabidopsis thaliana*.



Deyan Markovic

M1 Biologie Intégrative et Physiologie Végétale

Encadrante : Dr. Rozenn Le Hir

Equipe CATS, INRAe de Versailles

Route de Saint-Cyr, 78 000 Versailles

Abstract

Plant sugars, produced during photosynthesis, are transported at intercellular and intracellular levels by numerous proteins. Among these transporters, it was previously shown that the sugar transport between cytosol and vacuole, mediated by both SWEET16 and SWEET17, is important for the vascular system development in *Arabidopsis thaliana*. In this species, 3 tonoplastic sugar transporters have been identified so far: SWEET2, SWEET16 and SWEET17. The goal of this internship was to go deeper into the role of the tonoplastic sugar transporters in the vascular system development of the Arabidopsis inflorescence stem. To do this, I studied lines mutated in the expression of genes coding for the SWEET2, SWEET16 and/or SWEET17 transporters. First, our results show that SWEET2 is expressed in the interfascicular fibres, in the phloem and the xylem. Then, we show that the different mutant lines accumulate soluble sugars in the inflorescence stem. The results also suggest that the homodimer SWEET17/SWEET17 and the heterodimers SWEET2/SWEET17 and SWEET16/SWEET17 are needed for the correct development of the interfascicular fibres and the xylem tissue. Finally, the results obtained on the triple mutant suggest possible functional complementation by other members of the SWEET family, yet to identify.

Résumé

Les sucres, produits lors de la photosynthèse, sont transportés au niveau intercellulaire et intracellulaire par de nombreuses protéines. Parmi ces transporteurs, il a notamment été montré que le transport des sucres entre la vacuole et le cytosol, médiés par les transporteurs SWEET16 et SWEET17, a un rôle important dans le développement du système vasculaire chez *Arabidopsis thaliana*. Chez cette espèce, trois transporteurs tonoplastiques ont été décrit jusqu'à présent : SWEET2, SWEET16 et SWEET17. Le but de ce stage était donc d'approfondir le rôle des transporteurs de sucres tonoplastiques dans le développement du système vasculaire de la hampe florale chez *Arabidopsis thaliana*. Pour se faire, j'ai analysé des lignées simplement, doublement et triplement mutées dans les gènes codant pour ces trois transporteurs. Tout d'abord, les résultats montrent que le transporteur SWEET2 s'exprime dans les fibres interfasciculaires, le phloème et le xylème. De plus, les différents mutants accumulent globalement plus de sucres solubles dans la hampe florale que le type sauvage. Les résultats suggèrent également que l'homodimère SWEET17/SWEET17 et les hétérodimères SWEET2/SWEET17 et SWEET16/SWEET17 sont nécessaires pour un développement correct des fibres interfasciculaires et des pôles de xylème. Finalement les résultats obtenus par l'analyse du triple mutant *swt2swt16swt17* montrent l'existence d'une possible compensation fonctionnelle par d'autres membres de la famille SWEET, qui restent à identifier.

Sommaire

Introduction……1

Matériels et Méthodes……3

Résultats et Discussion…….……..……6

Conclusion et perspectives…….....11

Introduction

Ce stage a lieu dans le cadre du M1 Biologie Intégrative et Physiologie Végétale de l'Université Paris-Saclay. Il s'est déroulé à l'INRAe de Versailles dans l'Institut Jean-Pierre Bourgin. Cet institut est organisé en 3 pôles de recherche : le pôle Génomes, DSM (Développement, Signalisation et Modélisation) et BEAM (Biomasse, Environnement, Adaptation et Métabolisme). Les travaux présentés ont été menés au sein de l'équipe CATS (Carbone, Allocation, Transport et Signalisation) appartenant au pôle BEAM. Cette équipe est animée par Sylvie Dinant (DR2) et se compose de 3 autres chercheures (Catherine Bellini, Rozenn Le Hir et Françoise Vilaine) et de 2 assistantes ingénieures (Beate Hoffmann et Noémie Vignolles). L'équipe CATS a pour thématique de recherche : l'identification des facteurs clés intervenant dans le transport et l'homéostasie des sucres et la caractérisation de leur rôle dans le développement et la réponse des plantes aux changements de l'environnement.

La photosynthèse permet la transformation de l'énergie lumineuse en matières organiques. C'est au cours de ce processus, que les principaux sucres utilisés par les plantes sont synthétisés (ex: glucose, fructose et saccharose). Ces sucres, produits majoritairement dans les feuilles matures (organes sources), constituent donc la principale source d'énergie et participent ainsi à la croissance de la plante. Ces sucres peuvent également être stockés sous forme d'amidon, de sucres solubles ou de polyols dans les organes de réserves, aussi appelées organes puits (ex: tubercule, racines, fruits...) ou bien être séquestrés sous forme de cellulose et de polysaccharides dans les parois des cellules végétales.

Chez les plantes supérieures, le transport des nutriments, dont les sucres, s'effectue à longue distance via le système vasculaire. Le système vasculaire se compose du xylème et du phloème. Plus précisément, le phloème se compose de 3 types cellulaires : les cellules de parenchyme phloémien, les cellules compagnes et les tubes criblés (Le Hir et al. 2008). Les tubes criblés sont des cellules allongées ponctuées de plages de cribles, qui permettent la circulation de la sève élaborée à partir des feuilles photosynthétiques (organes sources) vers les organes non photosynthétiques (organes puits). Le xylème se compose également de 3 types cellulaires : les cellules de parenchyme xylémien, les vaisseaux xylémiens et les fibres. Le xylème et notamment les vaisseaux de xylème permettent la conduction d'eau, des acides aminés, du nitrate et des sels minéraux mais aussi de certaines hormones (Lucas et al. 2013). Le xylème a également un rôle de soutien grâce à la présence de la paroi secondaire lignifiée présente dans les vaisseaux et les fibres.

La principale voie de transport des sucres à longue distance est le phloème qui transporte principalement du saccharose. Pourtant lors de la formation de la paroi secondaire des cellules de xylème, les cellules ont un besoin important en sucres pour la formation des composants de ces parois (ex : cellulose, hémicelluloses) (Verbančič et al. 2018). Cependant les mécanismes de transport de sucres dans ce tissu restent globalement méconnus.

Au niveau intercellulaire et intracellulaire, le transport des sucres est orchestré par de nombreuses protéines. Jusqu'à présent, trois principales familles de transporteurs de sucres ont été identifiées : la famille des « Monosaccharide Transporters » (MSTs, transporteurs d'hexoses), des « Sucrose Transporters » (SUTs, transporteurs de saccharose) qui se regroupent au sein de la superfamille des « Major Facilitator Superfamily » (MFS) (Chen et al. 2015b) et plus récemment la famille des transporteurs "Sugars Will Eventually be Exported Transporters" (SWEETs) a été identifiée (Chen et al. 2010). Les gènes de la famille des SWEET (Sugar Will Eventually be Exported Transporters) codent pour des protéines transmembranaires permettant principalement le transport facilité des sucres (saccharose, glucose et/ou fructose) selon le gradient de concentration (Chen et al. 2010). Ils sont majoritairement actifs au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane de la vacuole (tonoplaste) (Xue et al. 2022). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* compte 17 gènes codant pour des transporteurs SWEET. Chaque gène *SWEET* code pour une protéine composée de 7 domaines transmembranaires. Afin de créer un transporteur SWEET fonctionnel, la formation d'homodimère et/ou des hétéro-oligomères est obligatoire (Xuan et al. 2013). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'étude de lignées dérégulées dans l'expression de certains gènes *SWEETs* a permis de suggérer un rôle de ces transporteurs dans les interactions plantes-microorganismes (pathogènes ou non) ainsi que dans le développement des plantes et leur réponse aux changements de l'environnement (Xue et al. 2022).

Jusqu'ici seulement trois transporteurs SWEET ont été localisés au niveau de la membrane de la vacuole : SWEET2, SWEET16 et SWEET17. Plus précisément, la protéine SWEET2 transporte spécifiquement du glucose et est impliqué dans l'interaction Arabidopsis-Pythium (Chen et al. 2015a). La protéine SWEET16 transporte du saccharose, du glucose et du fructose alors que la protéine SWEET17 transporte spécifiquement du fructose (Chardon et al. 2013; Klemens et al. 2013). Les travaux précédents montrent que les transporteurs SWEET16 et SWEET17 sont capables de former des homodimères contrairement à SWEET2 (Xuan et al. 2013).

Tableau 1. Synthèse sur les homo- et hétérodimères présents dans les différents mutants

Dimère \ Mutant	*swt2*	*swt16*	*swt17*	*swt2swt16*	*swt2swt17*	*swt16swt17*	*swt2swt16swt17*
SWEET2/ SWETT17	absent		absent	absent	absent	absent	absent
SWEET16/ SWEET17		absent	absent	absent	absent	absent	absent
SWEET16/ SWEET16		absent		absent		absent	absent
SWEET17/ SWEET17			absent		absent	absent	absent

De plus, seuls des hétérodimères entre SWEET16 et SWEET17 et entre SWEET2 et SWEET17 ont été montrés expérimentalement par BIFC en protoplastes d'Arabidopsis ou en système de double hybride dans la levure, respectivement (Xuan et al. 2013; Aubry et al. 2022). Ainsi sur la base de ces informations, il est donc possible de savoir quels sont les homo- et hétérodimères présents au niveau de la vacuole dans les différents mutants (Tableau 1). Cependant nous n'avons jusqu'à présent aucune idée si les homo- ou les hétérodimères transportent des sucres différents ou non. Finalement, il a récemment été montré que les transporteurs SWEET16 et SWEET17 étaient impliquées dans la mise en place du xylème de la hampe florale et la composition de la paroi secondaire de ce tissu (Aubry et al. 2022) suggérant ainsi que le transport de sucres entre le cytosol et la vacuole étaient important pour ces processus. En effet le transport des sucres au niveau du tonoplaste est central afin de maintenir un apport correct de sucres dans le cytosol. Une perturbation du transport vacuolaire de sucres induit en effet des conséquences importantes dans le développement des plantes et leur réponse aux changements de l'environnement (Hedrich et al. 2015).

Ce stage a pour objectif de poursuivre l'analyse de l'impact d'une modification du transport de sucres au niveau du tonoplaste sur le développement du système vasculaire de la hampe florale. Pour répondre à cet objectif, nous disposons de lignées d'*Arabidopsis thaliana* mutées dans l'expression des gènes *SWEET2*, *SWEET16* et/ou *SWEET17*. Le projet se propose donc de caractériser les lignées suivantes : le type sauvage (WT), les lignées simplement mutées (s*wt2*, *swt16*, *swt17*), les lignées doublement mutées (*swt2swt16*, *swt2swt17* et *swt16swt17*) ainsi que la lignée triplement mutée (*swt2swt16swt17*). Les analyses se feront sur la hampe florale qui constitue un organe central chez *Arabidopsis thaliana* puisque c'est l'organe de transport principal permettant la distribution des nutriments et des macromolécules entre les feuilles et les fleurs, les fruits et les graines.

Matériels et Méthodes

Matériel végétal et conditions de croissance

Avant mon arrivée, le mutant *sweet2-1* (Chen et al. 2015a) a été croisé avec le double mutant *sweet16-4sweet17-1* (Aubry et al. 2022) par Beate Hoffmann afin d'obtenir le triple mutant *sweet2-1sweet16-4sweet17-1* (nommé *swt2swt16swt17* dans la suite du rapport). Les génotypes ont été vérifiés par PCR à la génération F2. Les analyses de ce rapport portent sur des plantes de la génération F3.

Les plantes ont été cultivées en chambre de culture dans du terreau nutritif dans des conditions contrôlées (Jours longs : Aube - 6h, 19°C; Jour - 8h, 21°C, Crépuscule - 20h, 20°C, Nuit - 22h, 18°C. Hygrométrie : 60%) et sont issues d'un lot de graines homogènes. Il y a 6 plantes par génotype sauf pour la lignée s*weet16* où deux des plantes ont subi un retard de croissance dû à une attaque de Thrips, et *swt2swt16swt17* où une plante n'a pas poussé.

Caractérisation morphologique de la hampe florale

Les mesures de hampes (diamètre et hauteur) ont été faites à 46 et 51 jours après germination afin de pouvoir quantifier l'accroissement des plantes. La hauteur a été mesurée à l'aide d'un tuteur, celui-ci est placé à la base de la hampe principale, puis une marque est placée là où la hampe se termine, le tuteur est alors reporté sur une règle graduée en cm. Le diamètre est quant à lui mesuré à l'aide d'un pied à coulisse en mm, à la base de la hampe.

Prélèvement du matériel végétal

Les hampes florales ont été récoltées 51 jours après germination. Pour chaque plante, seule la hampe florale principale dépourvue des hampes florales latérales, des siliques et des fleurs a été prélevée. La partie basale des hampes a été coupée (2 cm), afin d'être utilisée pour les observations au microscope. Le reste des hampes a été dans des tubes (1 par plante) dans l'azote liquide puis conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

Analyse anatomique de la hampe florale

Pour chaque plante, la partie basale de la hampe florale a été incluse dans un Eppendorf de 1,5 mL contenant de l'agarose à 8% (v/v) encore liquide. Une fois solidifiée après une nuit à 4°C, les blocs d'agarose contenant les hampes florales sont coupés au vibratome afin d'obtenir des coupes à 150 µm d'épaisseur. Les coupes sont conservées à 4 °C dans des tubes Eppendorf contenant de l'alcool à 96%.

Les coupes sont ensuite colorées grâce à la coloration FASGA (Tolivia and Tolivia 1987). Cette coloration permet de colorer en rose la lignine et en bleu la cellulose (**Figure 1**). La solution mère FASGA se prépare comme suit : 3 mL de solution de safranine à 1%, 11 mL de solution de bleu alcian à 0,5%, 30 mL de glycérol, 20 mL d'H_20 milliQ et 1 mL d'acide acétique glacial. Cette solution peut être conservée pendant 1 mois à 4°C. La solution est finalement filtrée puis diluée au ⅛ ème avant utilisation.

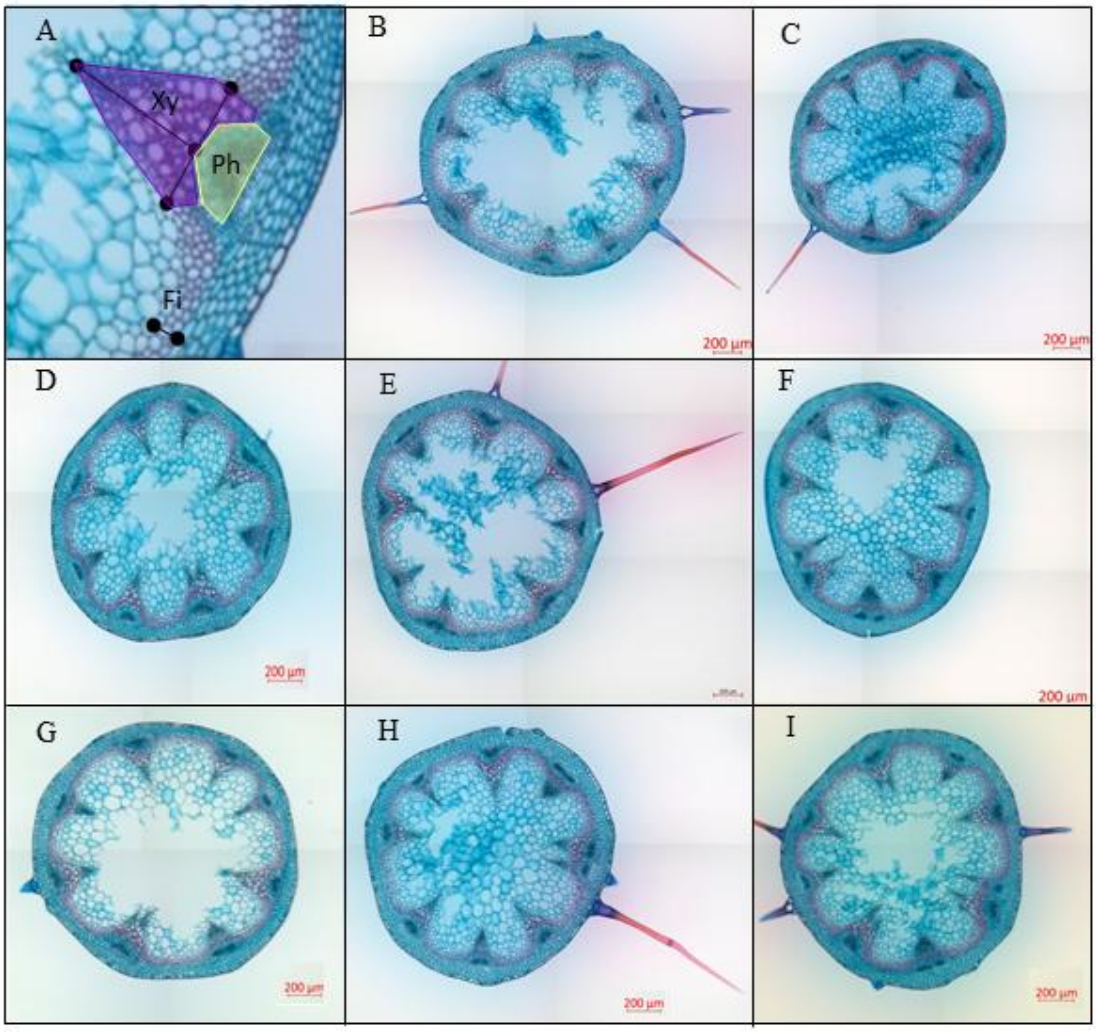


Figure 1. Photographies des coupes de hampe des différents génotypes colorées au FASGA observé à l'Axiozoom.

(A) Différentes mesures réalisées sur les coupes de hampe florale. Longueur et largeur des pôles, épaisseur des fibres interfasciculaire. Ainsi que les surfaces occupées par le phloème (jaune) et par le xylème (violet). Fi : fibres interfasciculaire, Ph : phloème ; Xy : xylème. (B-I) Photographie représentative d'une section d'une plante de type sauvage (B) ou des mutants *swt2swt16swt17* (C) *swt2* (D) *swt16* (E) *swt17* (F) *swt2swt16* (G) *swt2swt17* (H) et *swt16swt17* (I). Barre d'échelle = 200 µm.

Les coupes sont rincées puis baignées dans 1 mL de colorant durant 4 heures sur un agitateur, puis rincées à l'eau afin d'enlever l'excédent de colorant. Les coupes sont conservées à 4°C dans de l'eau milliQ.

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle dans du glycérol, lutées au vernis à ongle et photographiées grâce à un microscope de type Axio zoom V16 équipé d'un objectif Plan-NEOFLUARZ 2.3x/0.57 FWD 10.6mm. Les images obtenues sont alors traitées sous ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/) afin d'obtenir le diamètre de la coupe en mm, le nombre de pôles, la largeur (indicateur de la taille des cellules), la longueur (indicateur du nombre de cellules) des pôles de xylème ainsi que les surfaces des aires occupées par le phloème et le xylème et l'épaisseur des fibres interfasciculaires (**Figure 1**).

Quantification des sucres solubles

Les hampes conservées à -80°C sont broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier contenant de l'azote liquide afin de maintenir les échantillons congelés Une fois finement broyés, environ 50 mg de poudre sont pesés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Pour chaque tube le poids précis est noté pour sa prise en compte dans le calcul final.

L'extraction des sucres est réalisée grâce à une double extraction alcoolique à froid. Plus précisément, la poudre végétale contenus dans les tubes est resuspendue dans 500 µL d'alcool à 80% (v/v). Durant 1 heure, les tubes sont vortexés toutes les 10 minutes et maintenus au frais à 4°C entre chaque mélange. Après cela, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 14000 tours/minutes à 4°C. Les surnageants sont extraits dans de nouveaux tubes eppendorf de 1,5 mL, les culots sont quant à eux resuspendus de nouveau dans 500 µL d'alcool à 80% (v/v) les étapes précédentes sont répétées une fois.

Les surnageants issues du même tube sont mélangés et placés une nuit au SpeedVac afin que l'alcool s'évapore, les culots sont finalement resuspendus dans 100 µL d'eau distillée et serviront pour les dosages de sucres, en attendant ils sont conservés à -20°C.

La quantification des sucres est réalisée grâce au kit r-biopharm de quantification du saccharose, glucose, fructose (https://food.r-biopharm.com/products/sucrosed-glucosed-fructose/). Ce kit permet la quantification du glucose avant et après hydrolyse du saccharose par voie enzymatique selon le principe présenté dans la **Figure 2**. Le dosage du fructose est ensuite après sa conversion en glucose (**Figure 2**). Le protocole détaillé du dosage des sucres est présenté dans l'**Annexe 1**.

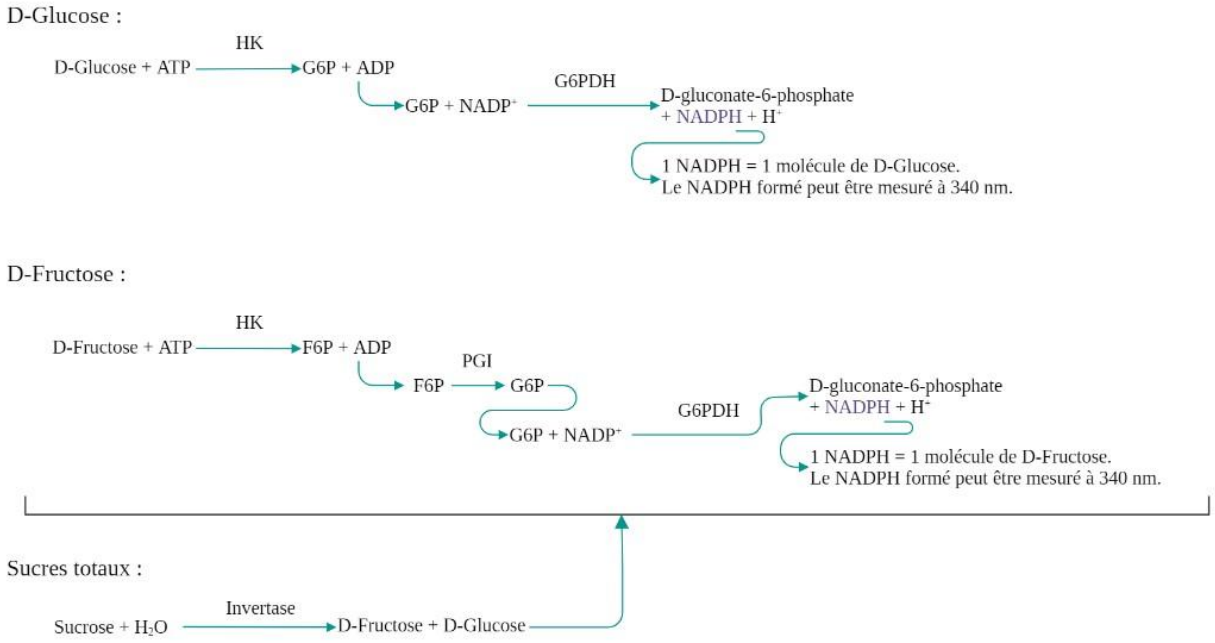


Figure 2. Principe du dosage des sucres solubles.

Localisation tissulaire du transporteur SWEET2

Afin d'évaluer la localisation de l'expression du transporteur SWEET2, une lignée exprimant le clone génomique du gène *SWEET2* fusionnée au gène rapporteur de la β-glucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur de *SWEET2* a été analysée. Les 3 premiers cm de la partie basale de la hampe florale ont été prélevés et une coloration histochimique GUS a été réalisée. Plus précisément, les échantillons ont été incubés dans de l'acétone 80% (v/v) durant 20 minutes à -20°C afin de perméabiliser les parois. Trois lavages successifs à l'eau distillée ont ensuite été réalisés avant incubation dans le tampon GUS. Le tampon GUS se prépare comme suit (quantités pour 10 ml de solution finale) : 10 mg de X-gluc dissous dans 500 µl de DMSO. On ajoute 100 µl de Triton-X100 à 10% (v/v), 200 µl d'EDTA 0,5M, 125 µl de potassium ferrocyanide 40mM et 125 µl de potassium ferrycianide 40mM. On complète avec du tampon sodium phosphate (0.2M Na_2HPO_4 et 0.2M NaH_2PO_4, pH 7) jusqu'à 50 ml. Les échantillons dans le tampon sont ensuite placés dans une pompe à vide pour 10 minutes afin d'optimiser la pénétration du tampon GUS dans la totalité des tissus. Finalement, les échantillons sont incubés à 37°C durant 12 heures afin que la réaction enzymatique se produise. La réaction enzymatique est stoppée dans de l'éthanol 70° et les échantillons sont conservés à 4°C avant inclusion dans de l'agarose 8%. Des coupes de 50 µm d'épaisseur sont ensuite effectuées à l'aide d'un vibratome puis montées entre lames et lamelles en présence de 100 µl de Phloroglucinol 2% (w/v) et de 100 µl d'acide chlorhydrique 50% (v/v) afin de contre-colorer les lignines en rouge. Les échantillons ont été observés en microscopie à fond clair.

Résultats et Discussion

Les différents mutants accumulent des sucres dans la hampe florale

Il a précédemment été montré que les protéines SWEET2, SWEET16 et SWEET17 transportent des sucres. Dans un premier temps j'ai donc réalisé un dosage des sucres solubles dans les hampes florales des différents mutants (**Figure 3**). Bien que nous ayons observés une forte variabilité dans le dosage de sucres, plusieurs tendances se dégagent. Ainsi j'ai observé une tendance à l'augmentation de la concentration en glucose chez les mutants *sweet2, sweet17, swt2swt16, swt16swt17 et swt2swt16swt17* en comparaison des plantes WT (**Figure 3**). Le dosage du fructose montre une augmentation significative de ce sucre dans les mutants s*weet17, swt2swt17* et *swt2swt16swt17* alors que seule une tendance similaire est mesurée pour le double mutant *swt16swt17* (p-value = 0.09) (**Figure 3**).

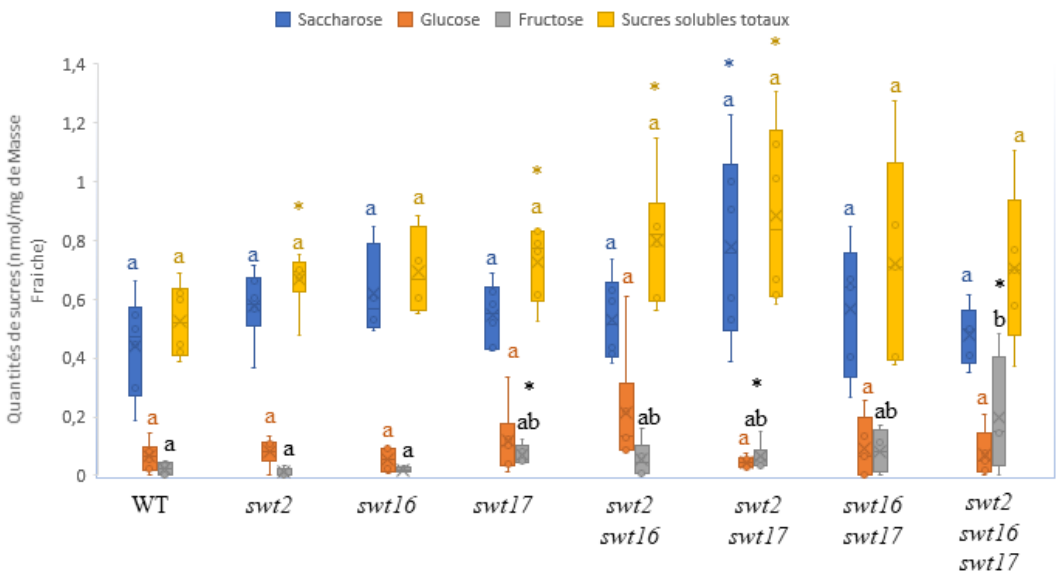


Figure 3. Les différents mutants accumulent des sucres solubles dans la hampe florale. Concentration de différents sucres solubles présents dans la hampe chez des plantes de type sauvage (WT), *swt2*, *swt16*, *swt17*, *swt2swt16*, *swt2swt17*, *swt16swt17* et *swt2swt16swt17*. Les données sont présentées sous forme de boites à moustaches. Le trait au milieu de la boite représente la valeur de la médiane. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au type sauvage (WT) selon le test t de Student (P< 0.05). Les lettres représentent le résultat d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$, 3<n<6).

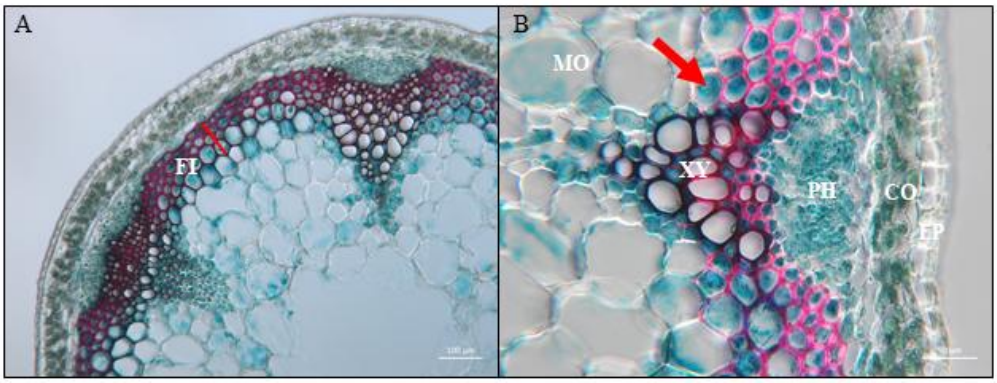


Figure 4. Localisation du transporteur SWEET2 dans la hampe florale.
Le précipité bleu indique la localisation de l'expression de la protéine SWEET2-GUS dans la hampe florale. Vue générale (A) et vue centrée sur un pôle cribro-vasculaire (B) La lignine présente dans la paroi des cellules du xylème et des fibres interfasciculaires est colorée en rose grâce au phloroglucinol. EP : Épiderme, CO : Cortex, PH : Phloème, XY : Xylème, MO : Moelle, FI : Fibres interfasciculaires. Barre d'échelle : 100 µm (A) et 50 µm (B)

Si l'on considère la somme totale des sucres solubles (saccharose, glucose et fructose), l'ensemble des mutants présentent une augmentation de contenu en sucres solubles bien que cette augmentation ne soit significative que pour les simples mutants *swt2* et *swt17* et les double mutants *swt2swt16* et *swt2swt17* (**Figure 3**).

L'augmentation du contenu en fructose des mutants *swt17*, *swt2swt17*, *swt16swt17* et *swt2swt16swt17* est cohérente avec les résultats précédemment publiés (Chardon et al. 2013; Aubry et al. 2022) et est liée à la spécificité de transport de fructose de SWEET17. On peut donc suggérer que comme dans le cas du double mutant *swt16swt17*, l'augmentation du contenu en fructose dans le triple mutant est liée à une séquestration plus importante de ce sucre dans la vacuole. Cependant sur cette culture, nous avons constaté que la quantité de sucres étaient très faibles par rapport aux cultures précédentes. Ceci peut s'expliquer par le fait que les plantes analysées ici ont subi au début de leur développement une attaque de thrips puis d'oïdium (traité par du soufre). Il est donc possible que cela ait impacté le dosage des sucres. Il faudra donc répéter ces dosages sur une culture indépendante.

Le transporteur SWEET2 est localisée dans le système vasculaire de la hampe florale

Afin de savoir si et où le transporteur SWEET2 était exprimé dans la hampe florale, j'ai utilisé une lignée exprimant une fusion traductionnelle entre la protéine SWEET2 et la protéine GUS. Cette construction permet d'observer les cellules dans lesquelles est exprimé le transporteur SWEET2 sous la forme d'un précipité bleu (**Figure 4**). Le transporteur SWEET2 est exprimé dans les pôles cribro-vasculaires ainsi que dans les fibres interfasciculaires (**Figure 4.A**). Au sein d'un pôle, on peut observer une coloration bleue dans les cellules du phloème ainsi que dans les cellules de parenchyme xylémien (à la pointe du xylème) ainsi que dans les cellules de xylème en cours de développement (située en haut du xylème) (**Figure 4.B**). Les travaux précédents ont montré que les transporteurs SWEET16 et SWEET17 été également localisées dans le phloème, les fibres interfasciculaires ainsi que dans les cellules de xylème en cours de développement (Aubry et al. 2022; Hoffmann et al. 2022). De plus le transporteur SWEET17 est également exprimé dans les cellules de parenchymes xylémiens (Aubry et al. 2022). Ainsi les transporteurs SWEET2, SWEET16 et SWEET17 sont présents tous les trois dans les fibres interfasciculaires, le phloème ainsi que dans les cellules de xylème en développement. SWEET17 et SWEET2 sont, quant à eux, exprimés ensemble dans les cellules de parenchymes xylémiens.

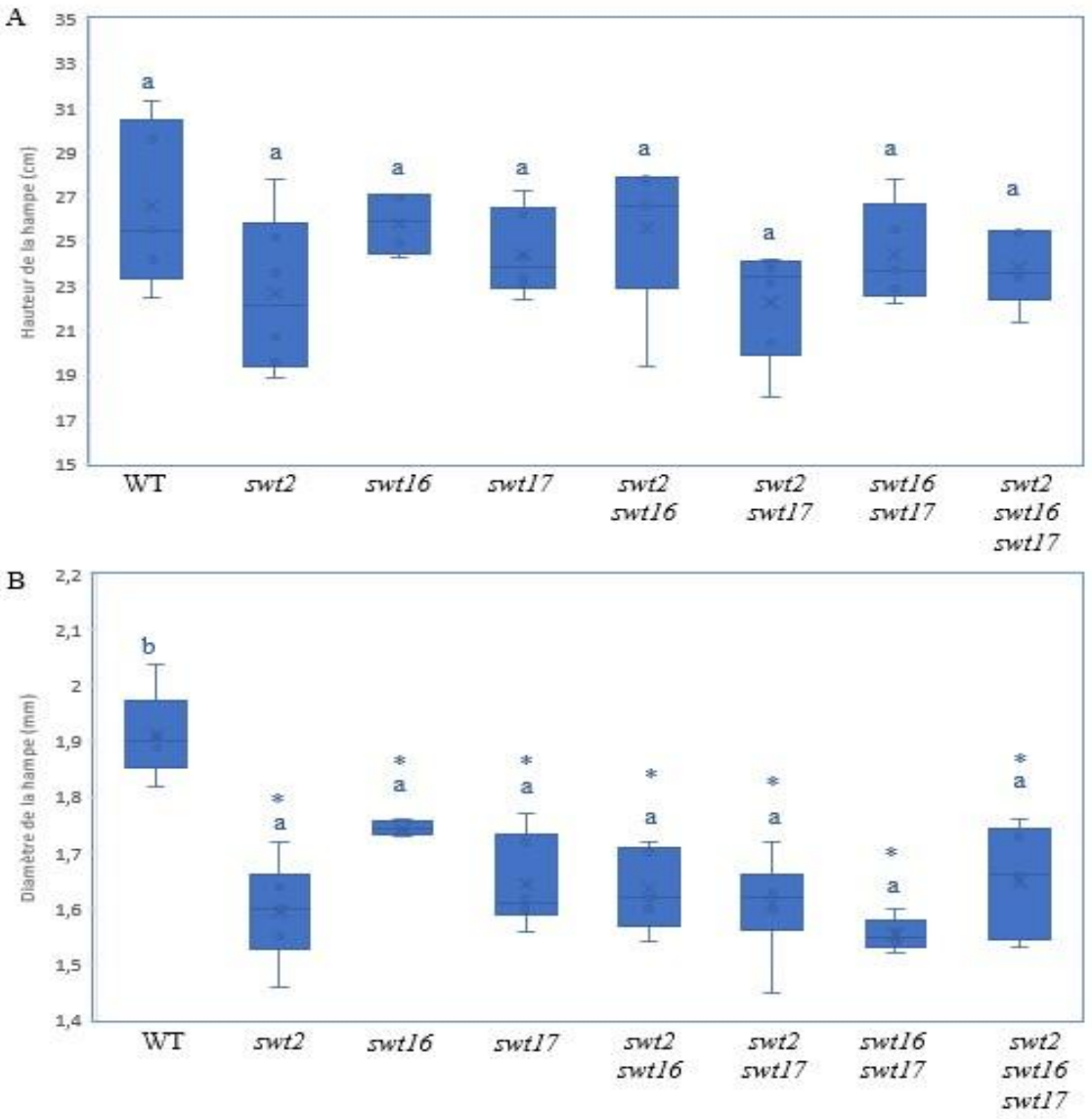


Figure 5. La croissance radiale de la hampe florale est réduite chez les mutants.

(A) Hauteur de la hampe florale et (B) Diamètre de la hampe florale 51 jours après la germination. Les mesures ont été réalisées chez des plantes de type sauvage (WT) et chez les mutants *swt2, swt16, swt17, swt2swt16, swt2swt17, swt16swt17* et *swt2swt16swt17*. Les données sont présentées sous forme de boites à moustaches. Le trait au milieu de la boite représente la valeur de la médiane. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au type sauvage (WT) selon le test t de Student ($P < 0.05$). Les lettres représentent le résultat d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$, $4<n<6$).

La croissance radiale de la hampe florale est réduite chez les différents mutants

Dans un premier temps, j'ai analysé la croissance en hauteur et en largeur de la hampe florale des différents mutants comparé aux plantes de type sauvage. Après 51 jours de croissance en chambre de culture, la hampe florale principale des plantes de type sauvage (WT) mesure environ 26 cm de haut (**Figure 5.A**). Aucune différence significative n'est observée chez les différents mutants comparée aux plantes WT (**Figure 5.A**). Le diamètre moyen de la hampe principale est quant à lui de presque 2 mm chez le type sauvage (**Figure 5.B**). De façon intéressante, la croissance radiale de tous les mutants est significativement différente par rapport au type sauvage (**Figure 5.B**). Ces résultats confirment ceux précédemment publiés pour les lignées *swt16*, *swt17* et *swt16swt17* (Aubry et al., 2022) et montrent également l'importance de l'expression de *SWEET2* dans ce phénotype.

Compte tenu des connaissances actuelles sur la dimérisation des transporteurs SWEET, nos résultats suggèrent que dans le simple mutant *swt2*, c'est uniquement l'absence de l'hétérodimère SWEET2/SWEET17 qui est responsable du phénotype observé. De façon surprenante, la croissance radiale du triple mutant n'est pas aggravée par rapport aux différents doubles mutants, ce qui suggère l'existence d'une possible compensation fonctionnelle par d'autres facilitateurs vacuolaires pour ce phénotype. Jusqu'à ce jour, aucune information n'a été publié sur la localisation subcellulaire de deux membres de la famille des SWEETs (SWEET3 et SWEET6). Des travaux précédents de l'équipe suggèrent que le gène *SWEET3* pourrait être un bon candidat (données non publiées). La quantification de l'expression de ce gène dans les différents mutants sera réalisée par qPCR pour confirmer ou non cette hypothèse.

Le double mutant *swt2swt16* présente une croissance en hauteur plus lente que celle des plantes sauvages

J'ai ensuite voulu voir si la vitesse de croissance en hauteur et en largeur de la hampe florale était différente chez les mutants. J'ai donc mesuré ces paramètres après 46 jours et 51 jours de croissance. La hampe florale des plantes WT augmente d'environ 76% en 5 jours alors que la vitesse de croissance de la hampe du double mutant *swt2swt16* n'est que de 51% (**Figure 6.A**). Cette différence est significative que cela soit avec le test-t ou l'ANOVA. Finalement aucune différence significative n'est calculée concernant la vitesse de la croissance en largeur des différents mutant par rapport aux plantes WT (**Figure 6.B**). Dans le double mutant *sweet2sweet16*, seuls les homodimères SWEET17/SWEET17 sont fonctionnels.

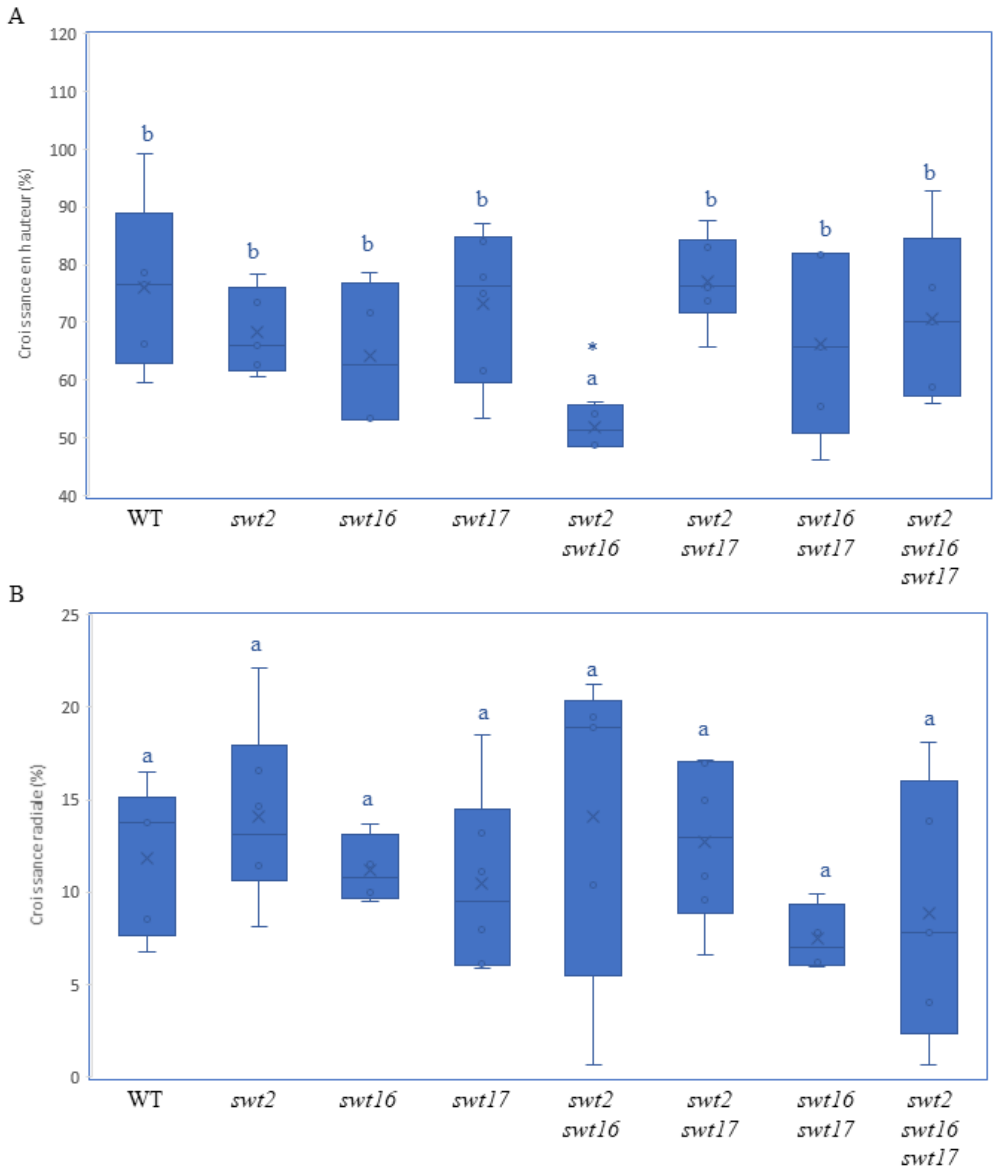


Figure 6. **Le mutant *sweet2sweet16* présente une croissance en hauteur plus lente**

Pourcentage d'augmentation de la hauteur (A) et de la largeur (B) de la hampe florale entre 46 et 51 jours après la germination chez des plantes de type sauvage WT, *swt2*, *swt16*, *swt17*, *swt2swt16*, *swt2swt17*, *swt16swt17* et *swt2swt16swt17*. Les données sont présentées sous forme de boites à moustaches. Le trait au milieu de la boite représente la valeur de la médiane. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au type sauvage (WT) selon le test t de Student ($P < 0.05$). Les lettres représentent le résultat d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$, $4<n<6$).

Puisque SWEET17 transporte spécifiquement du fructose (Chardon et al., 2013), ce résultat suggère que le transport de fructose entre le cytosol et la vacuole n'est pas essentiel pour la croissance en hauteur de la hampe florale.

La densité des pôles est supérieure chez les mutants *swt2swt17* et *swt16swt17*

J'ai ensuite poursuivi mon analyse de la hampe florale en comptant le nombre de pôles cribro-vasculaires présents sur une coupe et en calculant leur densité (**Figure 7**). Aucune différence significative n'a été observée entre les mutants et le type sauvage concernant le nombre de pôles cribro-vasculaires (**Figure 7.A**). Cependant si on rapporte le nombre de pôle à la taille de la section de la hampe en calculant la densité des pôles cribro-vasculaires, une augmentation significative de la densité est observée chez les doubles mutants *swt2swt17* et *swt16swt17* (**Figure 7.B**). Cette augmentation dans la densité des pôles chez le double mutant *swt16swt17* avait déjà été observé dans une culture indépendante (Hoffmann et al. 2022). Ce résultat suggère que seuls l'homodimère SWEET17/SWEET17 et les hétérodimères SWEET2/SWEET17 et SWEET16/SWEET17 et donc les sucres qu'ils transportent sont importants dans le contrôle de la proportion du nombre de pôles cribro-vasculaires.

La surface moyenne occupée par le phloème et le xylème est réduite chez les mutants *swt2swt16* et *swt16swt17*

L'analyse des pôles cribro-vasculaires a été affinée en mesurant la surface occupée par le phloème et le xylème. Les paramètres suivants ont ensuite été calculés : surface moyenne de phloème et de xylème et surface totale de phloème et de xylème par section. En complément l'épaisseur des fibres interfasciculaires a également été mesurée (**Figure 8**). Chez les trois doubles mutants, j'ai observé que la surface moyenne occupée par le phloème est significativement réduite par rapport à celle du type sauvage (**Figure 8.A**). La surface moyenne occupée par le xylème est également significativement réduite chez les mutants *swt2swt16* et *swt16swt17* (**Figure 8.A**).

La surface totale du système vasculaire est réduite chez les mutants *sweet2, sweet16, swt2swt16* et *swt16swt17*

J'ai ensuite calculé la somme de l'ensemble des surfaces occupées par le phloème et le xylème sur une section de hampe florale ainsi que la somme totale du phloème et du

xylème afin d'avoir une idée de la capacité totale de la plante au transport de l'eau et des éléments nutritifs (**Figure 8.B**).

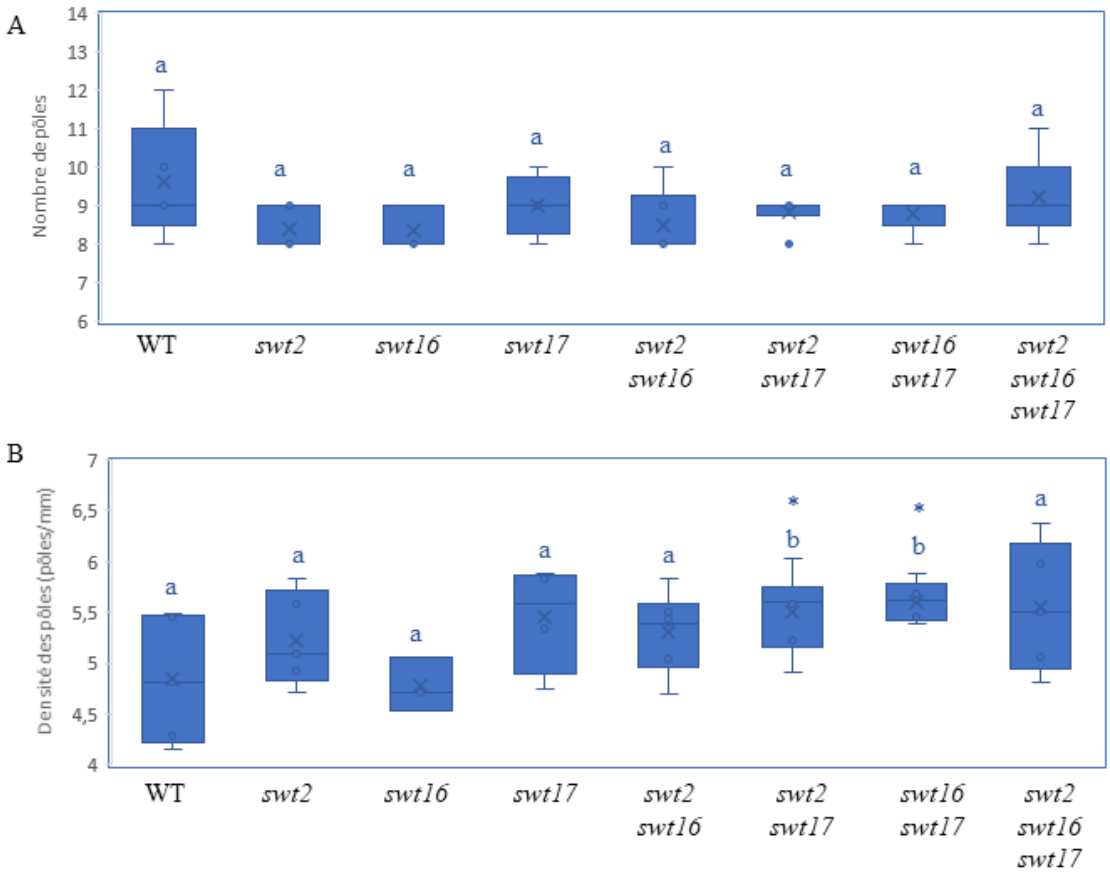


Figure 7. Les mutants *swt2swt17* et *swt16swt17* présentent une densité plus élevée de pôles cribro-vasculaires.

(A) Nombre de pôles cribro-vasculaires dans la hampe principale et (B) densité de pôles chez des plantes de type sauvage WT, *swt2, swt16, swt17, swt2swt16, swt2swt17, swt16swt17* et *swt2swt16swt17.* Les données sont présentées sous forme de boites à moustaches. Le trait au milieu de la boite représente la valeur de la médiane. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au type sauvage (WT) selon le test t de Student (P< 0.05). Les lettres représentent le résultat d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$, $4<n<6$).

Les résultats montrent que chez les mutants *swt2*, *swt16*, swt2swt16, *swt2swt17* et *swt16swt17* présentent une surface totale de phloème et/ou de xylème significativement réduite par rapport au type sauvage (**Figure 8.B**). Si l'on considère l'ensemble du système vasculaire, cette différence est significative avec le test-t et l'ANOVA pour les doubles mutants *swt2swt16* et *swt16swt17* alors que seul le test-t montre une différence significative pour les mutants *swt2*, *swt16* et *swt2swt17* (**Figure 8.B**). Compte tenu du fait que le diamètre des hampes florales de ces mutants est également réduit par rapport au type sauvage, j'ai également calculé la densité de phloème, xylème ou du système vasculaire totale ainsi que le ratio xylème/phloème (**Figure 9**). Les résultats montrent qu'aucune différence significative n'est observée concernant la densité du phloème, du xylème et du système vasculaire en général pour aucun des mutants (**Figure 9.A**). Ceci montre que la réduction de la quantité de système vasculaire est proportionnelle à la diminution du diamètre et suggère un défaut global de développement de la hampe florale chez ces mutant

De façon intéressante, le calcul du ratio de la surface de xylème/ surface de phloème montre que chez le double mutant *swt2swt17* la réduction de la surface du xylème est plus importante que la réduction de la surface du phloème ce qui se traduit par un ratio plus élevé par rapport au type sauvage (**Figure 9.B**). Chez ce mutant, seuls l'homodimère SWEET17/SWEET17 et les hétérodimères SWEET2/SWEET17 et SWEET16/SWEET17 sont absents, ce qui suggèrent que la présence de ces transporteurs sont essentiels pour le développement correct du xylème.

Le triple mutant possède un phénotype proche du mutant *swt2swt16* quant à l'épaisseur des fibres interfasciculaires

Compte tenu de l'expression de SWEET2 dans les fibres interfasciculaires, j'ai également mesuré l'épaisseur de ces fibres dans les différents génotypes. De façon intéressante, l'ensemble des mutants présentent moins de fibres interfasciculaires que le type sauvage (**Figure 8.C**). De plus, l'analyse de la variance à un facteur montre que le double mutant *swt2swt17* est significativement différent des autres mutants dont le triple mutant (**Figure 8.C**). Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une séquestration plus importante dans la vacuole du saccharose et du fructose par l'homodimère SWEET17 et les hétérodimères SWEET2/SWEET17 et SWEET16/SWEET17 impacte négativement le développement des fibres interfasciculaires.

Les doubles mutants et le triple mutant possèdent des pôles de xylème moins larges que ceux du type sauvage

Finalement j'ai voulu savoir si la réduction de la surface du xylème était due à un nombre réduit de cellules ou bien à des cellules de plus petite taille. Pour cela j'ai mesuré la longueur et la largeur des pôles de xylème.

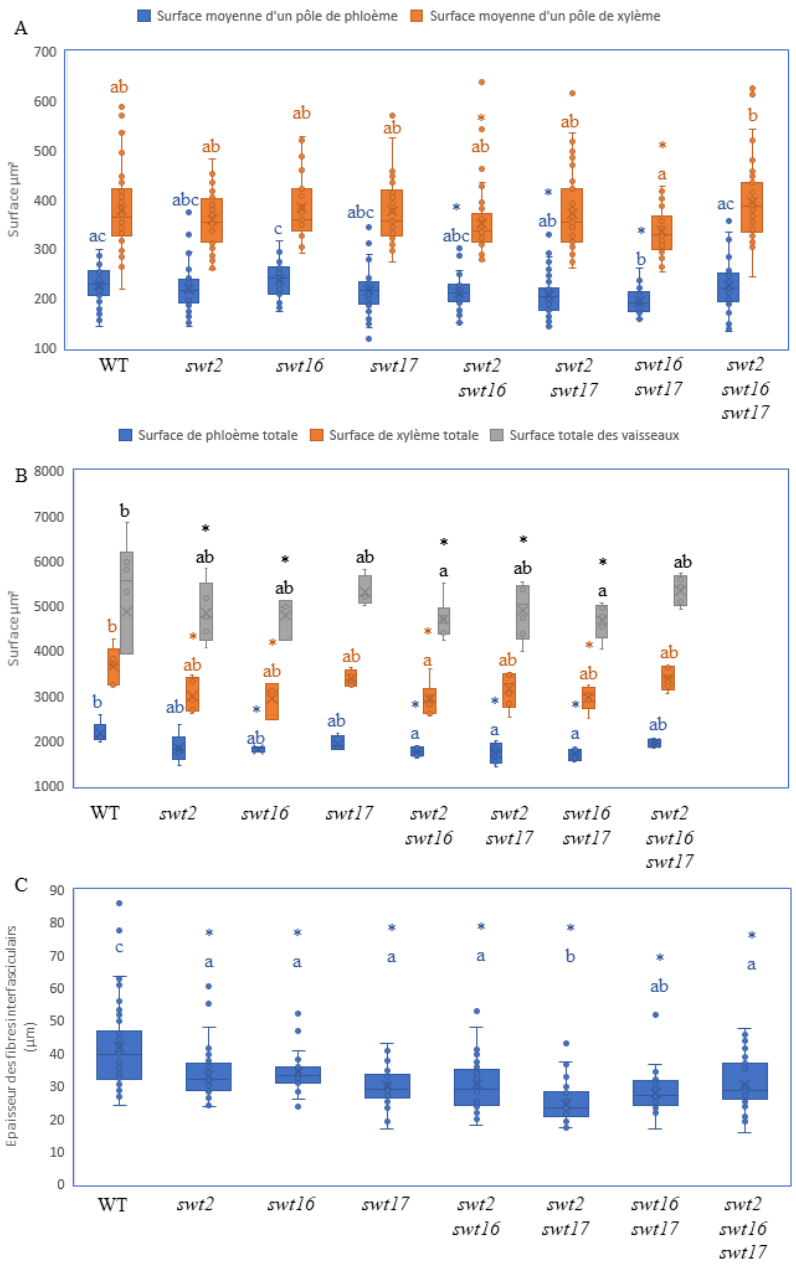


Figure 8. Les mutants présentent un défaut de développement du système vasculaire et des fibres interfasciculaires de la hampe florale.

(A) Surface moyenne d'un pôle de xylème ou de phloème. (B) Surface totale du phloème et du xylème sur une section de hampe florale. (C) Epaisseur des fibres interfasciculaires. Les mesures ont été réalisées chez des plantes de type sauvage WT et les mutant *swt2, swt16, swt17, swt2swt16, swt2swt17, swt16swt17* et *swt2swt16swt17*. Les données sont présentées sous forme de boites à moustaches. Le trait au milieu de la boite représente la valeur de la médiane. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au type sauvage (WT) selon le test t de Student (P< 0.05). Les lettres représentent le résultat d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$, $3<n<6$).

En effet, une différence dans la longueur de pôle peut refléter une différence dans le nombre de cellules alors qu'une différence dans la largeur peut traduire une différence dans la taille des cellules (Wang et al. 2019). La mesure de la largeur des pôles montre que les pôles des doubles mutants et du triple mutant sont plus étroits que ceux du type sauvage (**Figure 10**) ce qui suggère que les cellules de xylème sont plus petites dans ces mutants. Par contre aucune différence entre le triple mutant et les doubles mutants n'a été observée. Ces résultats confortent ceux obtenus précédemment sur le double mutant *swt16swt17* (Aubry et al. 2022).

Finalement la mesure de la longueur des pôles montre que seul le simple mutant *swt2* possède des pôles significativement plus courts que le type sauvage (**Figure 10**). Dans le simple mutant *swt2*, seul l'hétérodimère SWEET2/SWEET17 est absent. De plus, les transporteurs SWEET2 et SWEET17 sont tous les deux exprimés dans les cellules de parenchyme xylémien. Ce résultat suggère donc que le transport des hexoses entre le cytosol et la vacuole dans les cellules de parenchyme xylémien est important pour que le nombre correct de cellules de xylème soir produit.

Conclusion et perspectives

Des lignées simplement, doublement et triplement mutées pour l'expression des gènes *SWEET2, SWEET16* et *SWEET17* ont été étudiées afin de comprendre l'impact de ces gènes sur le développement de la hampe florale chez *Arabidopsis thaliana.* Ces transporteurs sont connus pour transporter différents types de sucres. Ainsi SWEET16 transporte du saccharose, du glucose et du fructose (Klemens et al. 2013). La protéine SWEET17 transporte spécifiquement du fructose alors que la protéine SWEET2 transporte spécifiquement du glucose (Chardon et al. 2013; Chen et al. 2015). De plus, il a été montré que les transporteurs SWEET16 et SWEET17 forment des homodimères et sont également capables de former un hétérodimère alors que SWEET2 ne forme qu'un hétérodimère avec SWEET17 (Xuan et al. 2013; Aubry et al. 2022).

Les résultats obtenus dans le cadre de ce stage ont permis de montrer que le transporteurs SWEET2 s'exprime dans le phloème, dans les fibres interfasciculaires et les vaisseaux de xylème en développement (comme SWEET16 et SWEET17) ainsi que dans les cellules de parenchyme xylémien (comme SWEET17). J'ai également montré que les mutants accumulent globalement plus de sucres, probablement piégés dans la vacuole puisque ces transporteurs sont tonoplastiques.

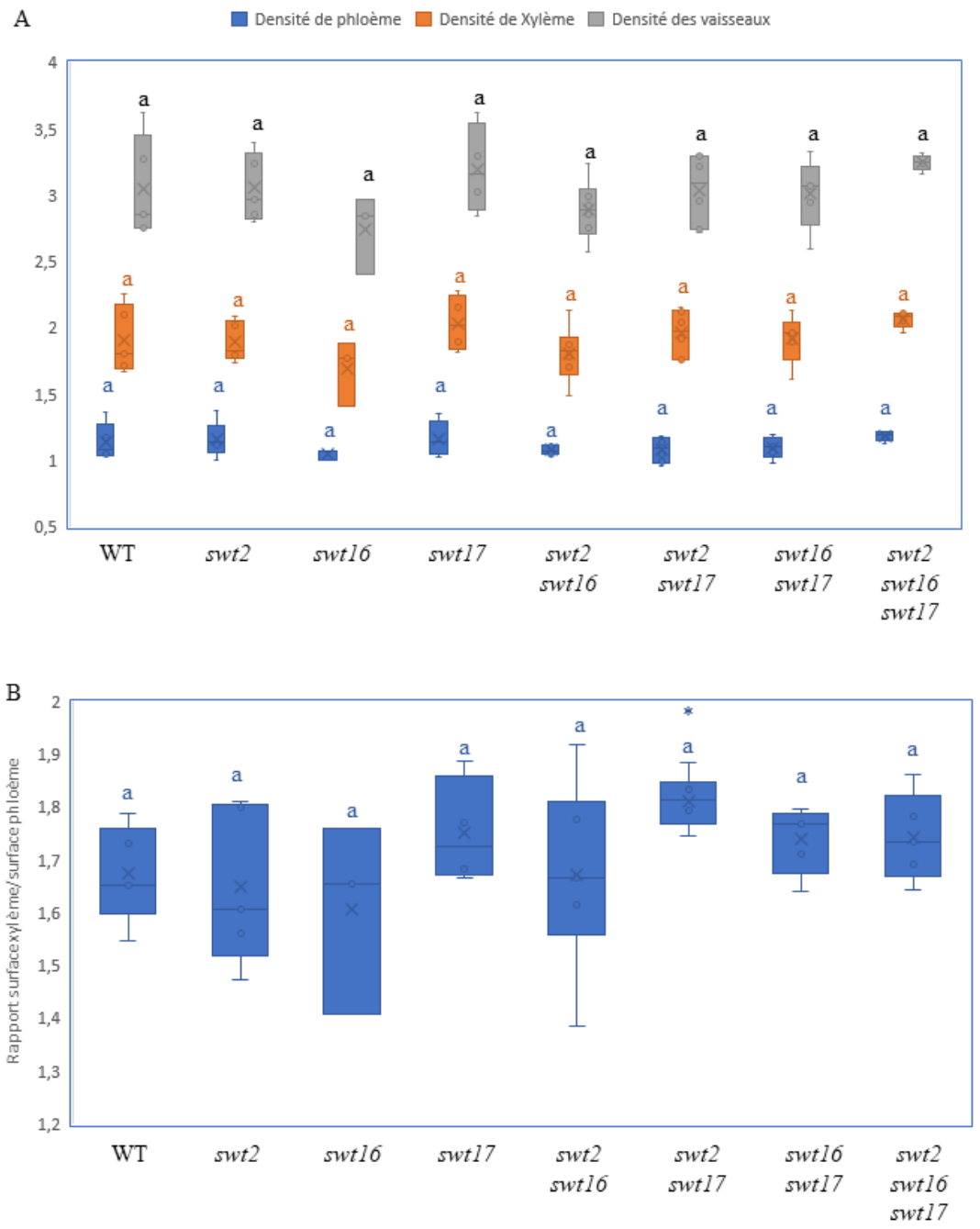


Figure 9. Le double mutant *swt2swt17* présente un défaut de développement du xylème. (A) Densité du phloème, du xylème et du système vasculaire global. Rapport entre la surface du phloème et la surface du xylème (B). Les données sont présentées sous forme de boites à moustaches. Le trait au milieu de la boite représente la valeur de la médiane. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au type sauvage (WT) selon le test t de Student (P< 0.05). Les lettres représentent le résultat d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$, $3<n<6$).

Cette séquestration plus importante des sucres dans la vacuole conduit à un défaut de développement de la hampe florale (ex : réduction du diamètre de la hampe florale, réduction du nombre de pôles cribro-vasculaires, moins de fibres interfasciculaires, moins de cellules de xylèmes).

Plus précisément, l'analyse du simple mutant *swt2*, dans lequel seul l'hétérodimère SWEET2/SWEET17 est absent (Tableau 1), permet de suggérer que le transport de glucose et de fructose entre le cytosol et la vacuole est important pour le développement du xylème. De plus, le phénotype du double mutant *swt2swt17* permet de suggérer que l'homodimère SWEET17 et les hétérodimères SWEET16/SWEET17 et SWEET2/SWEET17 sont impliqués dans la gestion du saccharose et du fructose dans les fibres interfasciculaires et sont important pour le développement des celles-ci. Les résultats suggèrent également que ces mêmes dimères jouent un rôle dans la formation des pôles cribro-vasculaires ainsi que dans le développement du xylème.

Finalement, nous avons été un peu surpris par les phénotypes observés sur le triple mutant *swt2swt16swt17*. Selon les dimères possibles, le triple mutant devrait avoir un phénotype similaire à celui du double mutant *swt16swt17* (Tableau 1). Pourtant pour la majorité des phénotypes (ex : densité des pôles cribro-vasculaires, surface du système vasculaire, épaisseur des fibres interfasciculaires), le triple mutant n'est pas significativement différent du type sauvage alors que le double mutant *swt16swt17* est lui significativement du type sauvage. Une hypothèse peut expliquer ces observations. Il est possible qu'il existe une complémentation fonctionnelle dans le triple mutant. Des travaux préliminaires dans l'équipe montre que le transporteur SWEET3 pourrait assurer ce rôle. En effet, les travaux de l'équipe montrent que le promoteur du gène *SWEET3* s'exprime spécifiquement dans les cellules de parenchymes xylémiens de la hampe florale et que le mutant *swt3* présente des défauts de développement de la hampe florale similaires aux mutants analysés dans ce stage. Jusqu'ici aucune localisation subcellulaire n'a été publié pour ce transporteur. Afin d'aller plus loin dans cette hypothèse, nous allons dans un premier temps mesurer l'expression de *SWEET3* par qPCR dans le triple mutant. Une complémentation fonctionnelle par des membres de la famille des facilitateurs tonoplastiques de sucres de type ERDL/ESL (Slawinski et al. 2021) pourraient également être envisagée.

Le matériel que j'ai généré pendant ce stage va continuer à être exploiter (ex : mesures de la taille et du nombre des cellules de xylème, dosage de l'amidon, des d'acides aminés, quantification de l'expression de gènes de transport de sucres) et une autre culture indépendante va être semer afin de confirmer ou non les différents phénotypes obtenus.

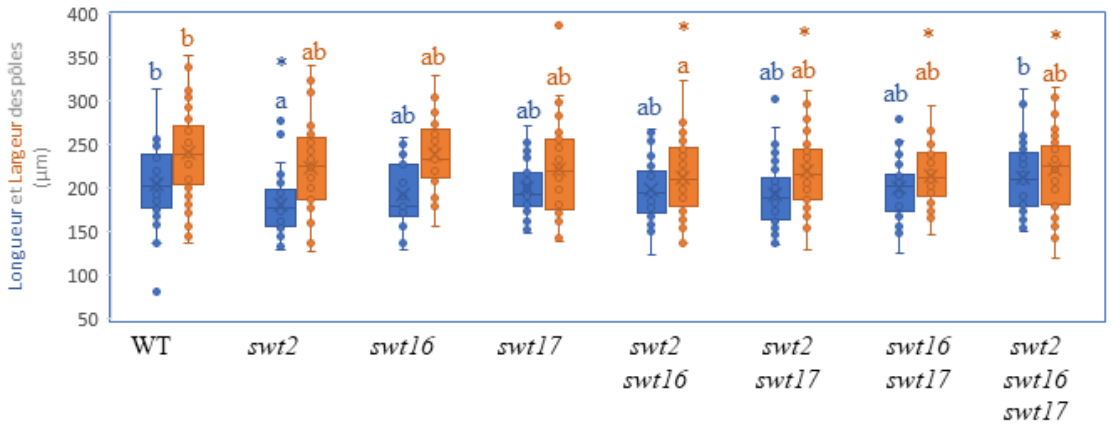


Figure 10. Une mutation dans les gènes *SWEET2*, *SWEET16* et/ou *SWEET17* est importante pour le nombre et/ou la taille des cellules de xylème.

Les mesures ont été réalisées chez des plantes de type sauvage WT et les mutant *swt2*, *swt16*, *swt17*, *swt2swt16*, *swt2swt17*, *swt16swt17* et *swt2swt16swt17*. Les données sont présentées sous forme de boites à moustaches. Le trait au milieu de la boite représente la valeur de la médiane. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au type sauvage (WT) selon le test t de Student (P< 0.05). Les lettres représentent le résultat d'une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) et post-test de Tukey. Les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$, $3<n<6$).

Remerciements

Tout d'abord je tenais à remercier les responsables de la formation du Master 1 Biologie Intégrative et Physiologie Végétale de l'université Paris-Saclay pour la confiance qu'ils m'ont accordés. Cette confiance a été pour moi un véritable moteur durant cette année.

Je tiens ensuite à remercier l'INRAe de Versailles et l'IJPB qui m'ont permis de réaliser ce stage dans de bonnes conditions, tant l'infrastructure que le matériel et les formations mis à ma disposition. Je tiens également à remercier tout le personnel présent dans mon bâtiment pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie l'équipe CATS et tout ses membres, Sylvie, Françoise, Béate, Noémie et Charlotte pour l'aide et le soutien apporté, leur gentillesse et leur bonne humeur. Travailler avec vous est un réel plaisir de tous les jours.

Enfin je remercie tout particulièrement Rozenn Le Hir, ma maîtresse de stage. Pour la patience, la gentillesse et la pédagogie dont elle a su faire preuve. Passer ces quelques semaines avec toi fut un grand plaisir. J'espère sincèrement avoir réussi à te rendre la confiance que tu as placée en moi et dont j'avais tant besoin ces derniers temps…

Je tiens également à remercier ma famille qui s'est complétement dévouée à mes études durant cette année compliquée, sans eux, rien de cela n'aurait été possible. Merci infiniment.

Merci à mes amis qui ont su m'écouter et me donner le sourire durant cette année, qui m'ont permis de surmonter certains moments difficiles, vous avez toujours été là pour moi que cela soit dans les bons comme dans les mauvais moments.

Enfin, un remerciement tout particulier à ma supportrice de tous les jours, qui fais ressortir le meilleur de ma personne au quotidien. Tu m'as permis de finir cette année avec le plein d'énergie et de bonne humeur, ce qui était loin d'être le cas il y a encore quelques mois de cela.

Références

Aubry E, Hoffmann B, Vilaine F, Gilard F, Klemens PAW, Guérard F, Gakière B, Neuhaus HE, Bellini C, Dinant S, Le Hir R (2022) A vacuolar hexose transport is required for xylem development in the inflorescence stem. Plant Physiol 188: 1229–1247

Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens PAW, 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: 697–702

Chen H-Y, Huh J-H, Yu Y-C, Ho L-H, Chen L-Q, Tholl D, Frommer WB, Guo W-J (2015a) The Arabidopsis vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts Pythium infection. Plant J 83: 1046–1058

Chen L-Q, Cheung LS, Feng L, Tanner W, Frommer WB (2015b) Transport of Sugars. Annu Rev Biochem 84: 865–894

Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature 468: 527–532

Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE (2015) Sugar transport across the plant vacuolar membrane: Nature and regulation of carrier proteins. Curr Opin Plant Biol 25: 63–70

Le Hir R, Beneteau J, Bellini C, Vilaine F, Dinant S (2008) Gene expression profiling: keys for investigating phloem functions. Trends Plant Sci 13: 273–280

Hoffmann B, Aubry E, Marmagne A, Chardon F, Dinant S, Le Hir R (2022) Impairment of sugar transport in the vascular system acts on nitrogen remobilization and nitrogen use efficiency in Arabidopsis thaliana. Submitt to Front Plant Sci

Klemens PAW, Patzke K, Deitmer J, Spinner L, Le Hir R, Bellini C, Bedu M, Chardon F, Krapp A, Neuhaus HE (2013) Overexpression of the vacuolar sugar carrier *AtSWEET16* modifies germination, growth, and stress tolerance in Arabidopsis. Plant Physiol 163: 1338–1352

Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav SR, Helariutta Y, He XQ, Fukuda H, Kang J, Brady SM, Patrick JW, Sperry J, Yoshida A, Lopez-Millan AF, Grusak MA, Kachroo P (2013) The plant vascular system: evolution, development and functions. J Integr Plant Biol 55: 294–388

Slawinski L, Israel A, Paillot C, Thibault F, Cordaux R, Atanassova R, Dédaldéchamp F,

Laloi M (2021) Early Response to Dehydration Six-Like Transporter Family: Early Origin in Streptophytes and Evolution in Land Plants. Front Plant Sci 12: 1–26

Tolivia D, Tolivia J (1987) Fasga: A new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. J Microsc 148: 113–117

Verbančič J, Lunn JE, Stitt M, Persson S (2018) Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis. Mol Plant 11: 75–94

Wang N, Bagdassarian KS, Doherty RE, Kroon JT, Connor KA, Wang XY, Wang W, Jermyn IH, Turner SR, Etchells JP (2019) Organ-specific genetic interactions between paralogues of the PXY and ER receptor kinases enforce radial patterning in Arabidopsis vascular tissue. Development dev.177105

Xuan YH, Hu YB, Chen L-Q, Sosso D, Ducat DC, Hou B-H, Frommer WB (2013) Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. Proc Natl Acad Sci 110: E3685–E3694

Xue X, Wang J, Shukla D, Cheung LS, Chen L-Q (2022) When SWEETs Turn Tweens: Updates and Perspectives. Annu Rev Plant Biol 73: 1–25

Annexes

Annexe 1 : Protocole du dosage de saccharose, du glucose et du fructose

Dosage du saccharose

- Dans une plaque de 96 puits, 125 µL de gamme préparée au préalable par puits contenant la gamme, 10 µL d'échantillons issus de l'extraction de sucres et 115 µL d'H2O milliQ dans les puits contenant les échantillons.
- Ajouter à tous les puits 15 µL d'invertase (Beta-fructosidase).
- Mettre 1 heure au nanospectromètre à 30°C et à 340 nm.
- Ajouter 60 µL de NAD.
- Mettre 15 min au nanospectromètre à 30°C et à 340 nm, obtention de la DOA.
- Ajouter 5 µL de HK + G6PDH dilué au ⅕.
- Mettre 60 cycles au nanospectromètre à 30°C et à 340 nm, obtention de la DOB.
- DOB - DOA = DO du saccharose qui lorsque rapporté à la gamme donne la concentration de saccharose dans l'échantillon. La masse de l'échantillon étant connue, nous pouvons obtenir la concentration de saccharose en nmol/mg de masse fraîche.

Dosage du glucose et du fructose

- Dans une plaque de 96 puits, 140 µL de gamme préparée au préalable par puits contenant la gamme, 10 µL d'échantillons issus de l'extraction de sucres et 135 µL d'H2O milliQ dans les puits contenant les échantillons.
- Ajouter 60 µL de NAD.
- Mettre 15 min au nanospectromètre à 30°C et à 340 nm, obtention de la DOA.
- Ajouter 5 µL de HK + G6PDH dilué au ⅕.
- Mettre 60 cycles au nanospectromètre à 30°C et à 340 nm, obtention de la DOB.
- Ajouter 5 µL de PGI dilué au ⅕.
- Mettre 60 cycles au nanospectromètre à 30°C et à 340 nm, obtention de la DOC.
- DOB - DOA = DO du glucose qui lorsque rapporté à la gamme donne la concentration de glucose dans l'échantillon. La masse de l'échantillon étant

connue, nous pouvons obtenir la concentration de saccharose en nmol/mg de masse fraîche.

- DOC - DOB = DO du fructose qui lorsque rapporté à la gamme donne la concentration de fructose dans l’échantillon. La masse de l'échantillon étant connue, nous pouvons obtenir la concentration de saccharose en nmol/mg de masse fraîche.