



HAL
open science

Transport du saccharose chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) : réponse à la défoliation et à l'intensité lumineuse

Alexandre Berthier

► **To cite this version:**

Alexandre Berthier. Transport du saccharose chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) : réponse à la défoliation et à l'intensité lumineuse. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Caen Basse Normandie, 2011. Français. NNT : . tel-02806324

HAL Id: tel-02806324

<https://hal.inrae.fr/tel-02806324>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



UNIVERSITÉ de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R : Institut de biologie fondamentale et appliquée

École Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé et Environnement

THÈSE

Présentée par

Mr Alexandre BERTHIER

Et soutenue

Le mardi 7 juin 2011

Transport du saccharose chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) : réponse à la défoliation et à l'intensité lumineuse.

En vue de l'obtention du
DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ de CAEN
Spécialité : **Biologie animale et végétale**
Arrêté du 07 août 2006

MEMBRES du JURY

Mr R. LEMOINE, Directeur de Recherche, CNRS Poitiers (*Rapporteur*)

Mr S. SAKR, Professeur, Université d'Angers, CNRS Angers (*Rapporteur*)

Mr P. BARRE, Ingénieur de Recherche, INRA Lusignan (*Examineur*)

Mr A. VIAN, Professeur, Université d'Angers, INRA Angers (*Examineur*)

Mr F. MEURIOT, Maître de Conférences, Université de Caen (*Co-Encadrant de Thèse*)

Mme N. NOIRAUD-ROMY, Maître de Conférences, Université de Caen (*Co-Encadrante de Thèse*)

Mme M-P. PRUD'HOMME, Professeur, Université de Caen (*Directrice de Thèse*)

REMERCIEMENTS

C'est l'heure des remerciements. La thèse ne s'est pas accomplie toute seule. Elle a été en effet fédératrice et collaborative. C'est donc non sans une certaine appréhension et humilité que j'attaque cette phase de l'ascension rédactionnelle : les remerciements. J'y ai pensé de multiples fois, à chaque rencontre, à chaque étape clef, à chaque déception et à chaque réussite.

Mes tous premiers remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont accepté la lourde tâche d'évaluer ce manuscrit de thèse. Je suis très honoré que Mr. Rémi Lemoine et Mr. Soulaïman Sakr aient accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et de juger ainsi mon travail. Je remercie également Mr. Alain Vian et Mr. Philippe Barre de l'intérêt qu'ils portent à ce manuscrit en acceptant d'en être les examinateurs.

Je tiens à remercier chaleureusement le directeur du laboratoire, Frédéric Le Dily de m'avoir accueilli au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA nutrition NCS pour la réalisation de ma thèse.

Je souhaite également remercier Mr Rémi Lemoine et toute son équipe pour m'avoir si bien accueilli au sein du laboratoire PHYMOTS de Poitiers et m'avoir permis de réaliser de si belles observations.

Je voudrais remercier Philippe Barre (Lusignan INRA, UR3F) pour son aide sur la cartographie des gènes LpSUT, pour avoir bien voulu répondre à mes nombreuses questions que cela soit par téléphone ou directement de visu, et aussi pour m'avoir aidé dans la recherche de nouvelles amorces de SUT.

Je tiens à remercier très sincèrement mes trois encadrants, Marie, Nathalie et Fredo. Trio de choc que vous êtes, vous avez su me faire progresser, dépasser mes limites, m'encourager, et surtout prendre confiance en moi !! Pour toutes ces raisons, je vous suis éternellement reconnaissant. Je ne peux tout écrire ici mais je tiens à vous remercier spécialement chacun.

Marie, un grand merci pour m'avoir fait confiance pour ce projet de thèse devenue réalité. Tu m'as permis de m'ouvrir aux autres, d'échanger scientifiquement avec le monde entier et de développer mon esprit d'ouverture envers les autres scientifiques. Tu es vraiment une personne extraordinaire je suis fier d'avoir travaillé à tes côtés. Je me souviendrai très longtemps des valeurs scientifiques que tu m'as inculquées. Au Panthéon des Femmes que j'ai rencontrées, tu tiens une place de choix,

Nathalie, je t'adresse mes plus sincères remerciements pour avoir vu un potentiel bien caché durant mon M2R et m'avoir proposé la thèse. J'ai apprécié de travailler avec toi. Même si dès fois ça chauffe un peu, tu es franche et c'est tant mieux. Je voudrais te remercier tout particulièrement pour m'avoir soutenu et m'avoir permis d'obtenir un poster d'ATER et ainsi goûter aux joies de l'enseignement. J'en retire une expérience enrichissante. Enfin, j'espère qu'un jour nous repartirons en BM réaliser des manips de « ouf » comme nous les aimons.

Fredo, je voudrais te remercier pour tout ce que tu m'as apporté durant cette thèse. J'espère avoir été à la hauteur d'un Maréchal d'Empire tel que le fut mon illustre ancêtre (si, si au 70^{ème} degré). Nous avons

partagé tant de choses que j'ose utiliser une métaphore cinématographique que tu connais bien : **Star Wars**. Tu es mon maître Jedi de la science (Obiwan, sans la barbe. Quoique ça dépend des jours ;-)) et moi l'apprenti Padawan (Luke, sans les cheveux). Tes corrections sont aussi précises que le maniement du sabre laser par Yoda et la dextérité de tes envois de mails tard, très tard, ou même voire tôt le matin (plus rare ceux-là ;-)), n'avaient d'égale que la qualité de tes smileys d'encouragements. Tu as su me protéger du côté obscur. J'ai beaucoup appris à tes côtés mon Ami. Merci d'avoir partagé ton savoir. Ah oui ! J'oubliais moi aussi maintenant je vais pouvoir utiliser le cutter laser ! ☺

Je remercie l'ensemble des membres du labo passés et présents, pour m'avoir supporté malgré mes railleries, mes fous rires (voire mes rires fous), bref tout ce qui me caractérise.

Je voudrais remercier Christine Gourbe, pour l'aide qu'elle a pu m'apporter dans les premières années que j'ai passé au labo. Merci Christine pour ta prévenance et ton aide.

Je tiens à remercier la BM team (exclusivement féminine. Cela a du bon la BM : rien à voir avec les voitures allemandes !) Sandrine, Julie et Josiane. Je me souviendrai longtemps des matins avec le bonnet sur les oreilles pour ne pas attraper froid. Heureusement la chaleur de vos rires et la musique nous faisaient vite oublier la Sibérie. Votre aide quotidienne m'a permis de boucler l'ensemble des manip. Même quand il s'agit de faire plusieurs centaines de minipreps, de broyer des échantillons ou encore d'autoclaver à la chaîne, il y avait toujours l'une d'entre-vous.

Je tiens à remercier l'équipe C-Défol (cela se prononce « c'est des folles ! »). Eh oui les femmes ont une part importante dans la réussite de cette thèse. Dans cette équipe je me suis senti à l'aise dès le premier jour, cela doit sûrement venir de l'atmosphère dégagée par les fumées sortant du bureau d'une certaine personne. Merci à Annette pour son soutien, ses relectures et son éternel sourire. Merci à Marie-Laure, chef d'orchestre de l'HPLC sachant manier la seringue d'injection aussi bien que la baguette. Merci à toute l'équipe.

Je voudrais remercier tous les participants aux récoltes qui ont épluché des centaines de grammes de BFC, des kilos de gaines et compté des milliers de talles. A vous tous merci ! Sans oublier l'enfer de la chambre froide (pour montrer aux petits nouveaux ce que c'est la science). Merci à vous tous.

Je tiens à remercier Anne-Françoise et Raphaël pour leur excellent travail au sein de la serre, car avant d'avoir de beaux résultats, il faut de belles cultures de plantes. Comme dit toujours Fredo : de belles plantes, c'est déjà 50% de la manip réussie. Promis ! la prochaine fois que je cultive des Ray-grass, il n'y aura pas de pucerons. Merci à vous deux, notamment à toi Raph la gazelle, un jour je te doublerai dans une côte ! D'ailleurs pourquoi pas en Champagne ! J'aurai l'aide du terrain (ou pas...).

Je remercie P. Lainé, pour avoir été le premier à m'accueillir en Normandie et également pour sa convivialité et son hospitalité.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire PHYMOTS Laurence, Fabienne, Florence, Magalie, Anne, Bruno, Mr Lemoine, mais également les thésards Audrey, Damien, Anna,.. Ainsi que cette ex Poitevine : je veux bien-sûr parler de toi Marjorie merci pour tous tes conseils pour l'immuno.

Je voudrais remercier Céline et toute l'équipe de l'ESIX pour l'aide qu'ils m'ont apportée. Un petit clin d'œil à tous les étudiants de première année ESIX1.

Durant cette thèse je n'ai pas seulement appris à réaliser une PCR en temps réel ou encore à réaliser une expression hétérologue, j'ai aussi appris à Tricoter merci donc au club des tricoteuses. Je suis en retard pour le dernier carré, mais il arrive.

Je remercie également l'Association Française des Amateurs de Minitel et de Boulier (AFAMB). Merci Président Alain ! J'ai vraiment apprécié « bavarder » avec vous. Quel temps précieux de gagné pendant la thèse, grâce à ces fabuleuses machines.

Je tiens à remercier Bénédicte pour avoir ouvert mon courrier afin de m'éviter une éventuelle contamination à l'Anthrax. Eh oui ! Nous sommes en plan vigipirate rouge.

Je voudrais remercier toutes les personnes, de près ou de loin, qui ont trouvé le moyen de rendre compliquées les choses simples. Ils m'ont permis de me dépasser et d'acquérir d'autres compétences inattendues.

Je tiens à remercier les plantes en particulier les Ray-grass, qui se sont fait disséquer, éplucher, broyer et lyophiliser sans jamais se plaindre. Qui a dit que la biologie était une science molle ?

Maintenant que c'est à mon tour, j'ai une pensée pour les anciens doctorants en particulier Marie, Maha, Virginie et Fabrice. Merci pour votre soutien que ce soit par mail malgré les milliers de kilomètres, ou bien furtivement dans le couloir. J'en profite pour souhaiter bon courage aux prochains : Laetitia, Antonin, Marouf, Mustapha et Philippe. Le chemin est long mais le parcours est superbe, alors profitez du paysage !

Un grand remerciement à Romain. Romain, finalement, contrairement à Léonardo, tu as réussi à lire le petit papier et t'échapper du bloc C. Tu forces l'admiration ! J'espère sincèrement que notre amitié restera malgré des voies différentes et un certain éloignement. J'ai vraiment apprécié de te connaître et de partager ta passion pour la modélisation informatique. D'ailleurs, je te remercie pour tous les démontages/remontages de Mark I et reboutage d'Atari. J'ai apprécié tes qualités d'ingénieur informaticien et de modélisateur 3D hors du commun.

Je tiens à remercier Antonin, compagnon d'arme, fou de plantes tout autant que moi. Je crois qu'on aurait pu nous attribuer au moins quatre fleurs pour le concours des bureaux fleuris. Pour toi, la fin (de la thèse !) approche également. Saches que tu peux compter sur moi pour les prochains mois ! De toute manière, on imposera la cadence en rotation par minute (RPM). Je te souhaite une réussite dans tes futurs choix, on va se revoir d'ailleurs à mon avis d'ici peu de temps. Une petite pensée pour ton Américaine. Annelise, tu vois finalement j'ai réussi à finir !

Je remercie les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Pierre-Maxime et Dimitri. J'espère vous avoir transmis la passion de la science et le petit grain de folie qui permet de se lancer dans une thèse. Les gars, merci pour votre aide !

Un big up pour Anne G., José et Julien ancien M2R en train de devenir grand chercheur.

Je tiens à remercier mes Kitzpotes (Vévé et Yoyo) « Das enfants terribles », pour leurs kitzcabrioles, la kitzaventure, leurs kitzshumours : La montagne, on la fracasse ! D'ailleurs, j'ai l'impression que grâce à vous j'ai souvent réussi à faire le vide dans le cerveau. (Eh oui ! Il n'est pas vide !)

Je remercie tous mes potes les Nico and co. (Nico D. et Nico P.) et tous les autres.

Je voudrais remercier Choco, compagnon de mes courtes nuits, toujours prêt à partager son bâton à la carotte avec moi pour éviter le coup de barre de la nuit.

Dans la série animalière, je remercie les kangourous pour leur accueil. Promis ! Nous nous reverrons ! Je remercie également les bisounours... Ils auront eux aussi permis de forger mon caractère.

Je voudrais remercier toute ma famille, et en particulier mes parents : mon Père pour ses fameux « ça va aller » qui remontent toujours le moral, et ma Mère pour le recul qu'elle m'a apporté face à cet exercice et pour m'avoir porté (et supporté) jusqu'à aujourd'hui. Merci à mon Frère et mes Grands-Parents d'avoir supporté l'éloignement. Cela n'a pas toujours été évident ! Je vous aime tous !

*Enfin, je voudrais terminer ces remerciements en exprimant mes plus sincères remerciements à la logisticienne du moral, à celle qui m'a tenu et soutenu pendant ces 3 longues années, à celle qui a su me remettre sur le droit chemin, celle qui m'a gardé dans la réalité tout en me l'allégeant. Et en ces derniers instants, inlassable traqueuse de coquilles, relectrice au tempérament de feu, bibliographe à l'œil exercé, tu as été de tous les instants celle sur qui je pouvais compter. MERCI. Ces mots s'adressent à toi Charlotte, ma future épouse : **Je t'aime.***

A tous merci car ce travail est le résultat d'un collectif.

TABLE DES MATIERES

<i>I. INTRODUCTION GENERALE</i>	- 1 -
<i>II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	- 5 -
<i>A. Les écosystèmes prairiaux et le Ray-grass anglais</i>	- 5 -
A.1. La prairie et les cultures fourragères	- 5 -
A.2. Les espèces prairiales et le ray-grass anglais	- 7 -
<i>B. La coupe et la physiologie de la repousse chez les espèces fourragères</i>	- 11 -
B.1. La coupe	- 11 -
B.2. Réponse physiologique de la plante lors de la repousse	- 12 -
B.3. La mobilisation des réserves carbonées	- 14 -
B.4. Le carbone de transfert	- 18 -
<i>C. Les mécanismes du transport du saccharose</i>	- 22 -
C.1. Le transport des photoassimilats chez les végétaux supérieurs	- 22 -
C.2. Les protéines membranaires du transport de sucres	- 24 -
C.3. Régulation des transporteurs de saccharose	- 31 -
<i>D. Objectifs de recherche</i>	- 35 -
<i>III. CHAPITRE 1</i>	- 37 -
<i>Activation of sucrose transport in defoliated Lolium perenne L.: an example of apoplastic phloem loading plasticity</i>	- 37 -
<i>A. Introduction</i>	- 40 -
<i>B. Materials and methods</i>	- 42 -
B.1 Plant materials and growth conditions	- 42 -
B.2 Plasmolysis experiment and tissue fixation	- 42 -
B.3 Preparation of plasma membrane vesicles, enzyme assays and latency, Suc uptake	- 43 -
B.4 Screening of cDNA libraries	- 45 -
B.5 Functional analysis of LpSUT1	- 45 -
B.6 RNA isolation, RT-PCR and real-time qPCR analysis	- 46 -

B.7 Extraction and analysis of water-soluble carbohydrates (WSC)	- 47 -
B.8 Other measurements	- 47 -
C. Results	- 48 -
C.1 Anatomy and plasmolysis in leaf tissues of <i>Lolium perenne</i>	- 48 -
C.2 Characterization of sucrose transport in <i>Lolium</i> using plasma membrane vesicles	- 48 -
C.3 Identification and functional expression of a sucrose transporter from <i>Lolium perenne</i>	- 49 -
C.4 Effect of defoliation on Suc transport in leaf sheaths of <i>Lolium perenne</i>	- 50 -
D. Discussion	- 51 -
D.1 Suc loading pathway in leaf tissues of <i>Lolium perenne</i>	- 51 -
D.2 Characterization of <i>Lolium perenne</i> sucrose transport	- 52 -
D.3 Putative role for LpSUT1	- 53 -
D.4 Effect of defoliation on Suc transport in leaf sheaths of <i>Lolium perenne</i>	- 54 -
E. Transition chapitre 1 – chapitre 2	- 56 -
IV. CHAPITRE 2	- 58 -
<i>Identification of a new sucrose transporter in rye-grass: LpSUT2, a key element, along with LpSUT1, of C partitioning during regrowth after defoliation?</i>	- 58 -
A. Introduction	- 61 -
B. Materials and methods	- 63 -
B.1 Plant materials and growth conditions	- 63 -
B.2 Screening of cDNA libraries	- 63 -
B.3 HRM procedure and LpSUT mapping	- 64 -
B.4 Functional analysis of LpSUT	- 65 -
B.5 RNA isolation, RT-PCR and real-time qPCR analysis	- 65 -
B.6 Preparation of anti-LpSUT antibodies, isolation of plasma membrane vesicles, SDS-PAGE and western blot	- 67 -
B.7 H ⁺ -ATPase and LpSUT immunolocalization	- 67 -
B.8 Other measurements	- 68 -
B.9 Statistics	- 68 -
C. Results	- 68 -
C.1 Cloning of LpSUT2 cDNA	- 68 -
C.2 Gene mapping	- 69 -
C.3 Functional expression of LpSUT2 in yeast	- 69 -
C.4 Expression analysis of LpSUT1 and LpSUT2	- 70 -

C.5 Localization of LpSUT1 and LpSUT2 proteins _____	- 71 -
D. Discussion _____	- 72 -
D.1 LpSUT2: a new sucrose transporter with intriguing characteristics _____	- 72 -
D.2 LpSUT1 and LpSUT2 : key elements of C partitioning for leaf growth before and after defoliation ? _____	- 73 -
E. Transition chapitre 2 – chapitre 3. _____	- 77 -
V. CHAPITRE 3 _____	- 79 -
<i>Differential regulation of two sucrose transporters by defoliation and light conditions in perennial rye-grass _____</i>	- 79 -
A. Introduction _____	- 82 -
B. Materials and methods _____	- 84 -
B.1 Plant materials and growth conditions _____	- 84 -
B.2 Light treatments _____	- 84 -
B.3 Tissue sampling _____	- 84 -
B.4 Extraction and analysis of water soluble carbohydrates _____	- 85 -
B.5 RNA isolation, RT-PCR and real-time PCR analysis _____	- 85 -
B.6 Statistical analysis _____	- 87 -
C. Results _____	- 87 -
C.1 Plant regrowth after defoliation _____	- 87 -
C.2 Mobilization of C resources during regrowth _____	- 88 -
C.3 Sucrose transporter expression _____	- 89 -
D. Discussion _____	- 90 -
D.1 Defoliation and regrowth of rye-grass: role of LpSUT1 _____	- 90 -
D.2 Light conditions and sucrose transport in rye-grass: role of LpSUT2 _____	- 92 -
VI. DISCUSSION GENERALE _____	- 95 -
<i>A. Nature du transport de saccharose et caractéristiques biochimiques et moléculaires de ce transport de saccharose chez le Ray-grass anglais _____</i>	- 97 -
A.1. Un type de transport de nature apoplastique _____	- 97 -
A.2. Identification de transporteurs de saccharose _____	- 98 -
A.3. Cartographie des gènes LpSUT _____	- 99 -

A.4. Caractérisation des protéines LpSUT	- 99 -
<i>B. Physiologie du transport de saccharose chez le ray-grass anglais non défolié en conditions d'éclairement non modifiées</i>	- 102 -
B1. Anatomie du ray-grass et méthodologie d'immunomarquage	- 102 -
B2. Expression des transcrits LpSUT1 et localisation du transporteur de saccharose LpSUT1	- 105 -
B3. Expression des transcrits LpSUT2 et localisation du transporteur de saccharose LpSUT2	- 107 -
B4. Intégration des connaissances et cadre conceptuel	- 108 -
<i>C. Physiologie du transport de saccharose chez le Ray-grass anglais en condition de repousse et d'éclairement modulé</i>	- 110 -
C1. Effet de la défoliation sur le transport du saccharose	- 110 -
C2. Effet de la variation de l'intensité lumineuse sur les transporteurs de saccharose	- 112 -
C3. Intégration des connaissances et cadre conceptuel	- 115 -
<i>VII. CONCLUSIONS et PERSPECTIVES DE RECHERCHE</i>	- 116 -
<i>A. Etude de la nature du transport latéral de saccharose</i>	- 116 -
<i>B. Localisation tissulaire et cellulaire de LpSUT1 et LpSUT2</i>	- 116 -
<i>C. Rôles physiologiques de LpSUT1 et LpSUT2</i>	- 117 -
<i>D. Régulation des transporteurs LpSUT1 et LpSUT2</i>	- 118 -
<i>E. Recherche d'autres transporteurs de saccharose</i>	- 119 -
<i>F. LpSUTs : des marqueurs moléculaires pour la sélection variétale ?</i>	- 119 -
<i>VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	- 121 -
<i>IX. Table des illustrations</i>	- 143 -
<i>Table des figures</i>	- 143 -
<i>Table des tableaux</i>	- 152 -
<i>X. ANNEXES</i>	- 154 -

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

am : ante meridiem

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATPase : Adénosine triphosphate pompe à protons

BFC : Bases des feuilles en croissance

C : Carbone

CC : Compagnon Cell, Cellule compagne

dCTP : Désoxycytosine triphosphate

DEPC : Diethylpyrocarbonate

DM : Dry Matter, matière sèche

DTT : Dithiothréitol

E. coli : Escherichia coli

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

E.U. : European Union

EST : Expressed Sequence Tag

FEH : Fructan exohydrolase

1-FFT : Fructane:fructane 1-fructosyltransférase

6-FFT : Fructane:fructane 6-fructosyltransférase

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

6G-FFT : Fructane:fructane 6G-fructosyltransférase

GFP : Green Fluorescence Protein

GLM : Generalized Linear Model

HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

HRM : High Resolution Melt (PCR)

kDa : kiloDalton

kM : Constante de Michaelis

LpSUT1 : Lolium perenne Sucrose Transporter 1

LpSUT2 : Lolium perenne Sucrose Transporter 2

LpSUT4 : Lolium perenne Sucrose Transporter 4

LSD : Least Significant Difference

MFS : Major Facilitator Superfamily

mM : milliMole

MS : Matière Sèche

N : Azote

NEM : N-Ethylmaleimide

PAR : Rayonnement photosynthétique actif

pb : Paire de bases

PBS : Tampon Phosphate Salin

PC : Parenchyma Cell, Cellule du Parenchyme

PCMBS : Parachloromercuribenzenesulfonic acid

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PEG : Poly Ethylène Glycol

pH : potentiel Hydrogène

PMSF : Phenylmethanesulfonylfluoride

PMV : Plasma-membrane vesicles, vésicules de plasmalemme

PVPP : Polyvinylpyrrolidone

QTL : Quantitative Trait Locus

RT : Reverse Transcription (transcription inverse)

RT-qPCR : Reverse Transcription- quantitative Polymerase Chain Reaction

6-SFT : Saccharose:fructane 6-fructosyltransférase

1-SST : Saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase

SAU : Surface Agricole Utile

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SSC : Sodium Saline Citrate

SE : Sieve Element, tube criblé du phloème

SPP : Sucrose Phosphate Phosphatase

SPS : Sucrose Phosphate Synthase

STH : Surface toujours herbe

SUT : SUcrose Transporter

SUC : SUcrose carrier

SUF : SUcrose Facilitator

SuSy : Sucrose Synthase

UBC : Ubiquitine

UDP-glucose : Uridyl Phosphate glucose

UTR : Untranslated region (région non traduite)

μM : microMolaire

V_{max} : Vitesse maximale de transport

Introduction
générale

Introduction
générale

A**B****C**

Figure I.1: (A) Prairie de Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) artificielle exploitée de manière intensive (fauchage). Crédit photothèque INRA (www.inra.fr/photothèque/). (B) Prairie naturelle (pâturage). Crédit photo: www.photo-de-vaches.com (C) Ray-grass anglais Crédit photographie: (www.plantcare.com/oldSite/httpdocs/images/namedImages/Lolium.perenne.jpg).

I. INTRODUCTION GENERALE

Outre leur impact environnemental bénéfique, les écosystèmes prairiaux sont à la base de l'alimentation humaine (produits carnés et laitiers), générant ainsi à eux seuls plusieurs dizaines de milliards d'euros au niveau mondial. Ils sont également à la base d'un bassin d'activité qui représente plusieurs millions d'emplois. **Les écosystèmes prairiaux représentent donc une force importante de l'agriculture moderne.** Ils sont couverts de plantes herbacées **et font partie d'un ensemble appelé cultures fourragères qui comprend** les fourrages racines et tubercules, les fourrages annuels, les prairies non permanentes et **les prairies permanentes.** **En France, et notamment en Basse-Normandie,** région d'élevage et de production de produit laitiers et carnés par excellence, **ce sont essentiellement ces dernières qui sont représentées,** notamment en raison d'un climat océanique tempéré. **La plante préférentiellement retrouvée dans ce type de prairies est le Ray-grass anglais (*Lolium perenne L.*, **Figure I.1.C**).** Cette espèce vivace très commune forme des touffes composées de talles pouvant atteindre 90 cm de hauteur en pleine floraison. Elle présente différents avantages tels qu'une très bonne appétence et digestibilité pour les ruminants, ainsi que des rendements fourragers élevés et réguliers au cours de l'année.

La récolte des parties aériennes du Ray-grass anglais est réalisée lors du pâturage par le bétail ou lors de la fauche mécanique par l'exploitant agricole (Figure I.1.A.B.). Ces deux modes d'exploitation induisent l'élimination plus ou moins sévère de l'appareil photosynthétique aérien. Le Ray-grass anglais possède cependant une vitesse de repousse (ou refoliation) très importante après coupe, en dépit d'un arrêt plus ou moins brutal de ses capacités photosynthétiques foliaires et d'absorption de nutriments au niveau racinaire. En effet, il est capable de retrouver une autotrophie pour le carbone en moins de trois jours. **La repousse rapide passe généralement par une mobilisation efficace des réserves au niveau des tissus épargnés par la coupe que sont principalement les gaines et, dans une moindre mesure, les bases des feuilles en croissance (BFC).** Les réserves carbonées sont représentées à plus de 90 % par les fructanes (polymères hydrosolubles de fructose construits sur une base de saccharose) qui sont particulièrement mis à contribution lors des douze premières heures de repousse

(Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). Stockés dans la vacuole, leur teneur peut ainsi diminuer de près de 85% au cours de cet intervalle de temps. **Leur hydrolyse produit du fructose or ce dernier n'est pas véhiculé via le phloème entre les tissus sources (gaines) et les tissus puits en croissance intense (BFC).**

Comme chez la plupart des espèces végétales, c'est le saccharose qui est le composé préférentiellement chargé au niveau du phloème. Outre son rôle de substrat énergétique, source de carbone, le saccharose est une molécule clef car il peut aussi servir d'osmoticum pour maintenir l'homéostasie cellulaire ainsi que jouer un rôle de molécule protectrice lors de stress abiotiques tels que la sécheresse ou encore le froid. **Le transport de photoassimilats comme le saccharose fait l'objet de multiples études depuis de nombreuses années. Cependant, chez les graminées comme le Ray-grass anglais, les informations sont assez limitées.** Le transport de saccharose a été identifié chez de multiples espèces comme pouvant se dérouler de manière symplastique, *via* des liaisons intra-cellulaires au niveau des plasmodesmes, ou bien apoplastique au niveau de l'espace compris entre les parois des cellules. Contrairement au premier, qui se fait par gradient osmotique et ne nécessite pas d'énergie, le transport apoplastique est réalisé par des protéines de transport utilisant l'entrée ou la sortie d'un proton pour l'entrée d'une molécule de saccharose. La voie apoplastique existe chez de nombreuses Poacées (Riz, Blé, Orge ; Braun et Slewinski, 2009). **Dans le cadre du transport du saccharose, de nombreuses études ont montré l'existence de transporteurs protéiques membranaires spécifiques appelés Sucrose Transporters (SUTs) présents aussi bien chez les Dicotylédones que chez les Monocotylédones.** Les transporteurs de saccharose possèdent un rôle majeur dans la fourniture de carbone mais également pour la fourniture d'énergie *via* le saccharose (Lemoine, 2000). A l'heure actuelle, une soixantaine d'entre eux ont été identifiés et plusieurs membres sont présents au sein d'une même plante et représentent une famille multigénique.

Chez le Ray-grass anglais, nous avons alors émis l'hypothèse que sa très bonne capacité de repousse était déterminée par un transport efficace de saccharose entre les tissus sources et les tissus puits foliaires.

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la voie apoplastique du transport de saccharose, ce qui nous a conduit à isoler, identifier, caractériser les premiers transporteurs de saccharose chez cette espèce, et à en étudier la régulation au cours d'un cycle coupe-repousse.

La première partie du manuscrit est consacrée à l'analyse bibliographique relative aux écosystèmes prairiaux, à la coupe et la physiologie de la repousse chez les espèces fourragères, ainsi que sur le métabolisme carboné et les mécanismes du transport de saccharose chez les végétaux supérieurs. Les résultats obtenus sont organisés en trois chapitres correspondant chacun à un article scientifique dont le premier a été publié, tandis que les deux autres sont actuellement soumis :

- **BERTHIER A., DESCLOS M., AMIARD V., MORVAN-BERTRAND A., DEMMIG-ADAMS B., ADAMS W^{III}., TURGEON R., PRUD'HOMME M.P., and NOIRAUD-ROMY N. (2009). Activation of sucrose transport in defoliated *Lolium perenne* L.: an example of apoplastic phloem loading plasticity *Plant Cell and Physiology*. acceptée IF= 3.59**

- **BERTHIER A., MEURIOT F., BARRE P., DEDALDECHAMPS F., LEMOINE R., PRUD'HOMME M.P., and NOIRAUD-ROMY N. 2011a. Identification of a new sucrose transporter in rye grass: LpSUT2, a key element, along with LpSUT1, of C partitioning during regrowth after defoliation? *Soumis à Plant Molecular Biology*. (Avril 2011) IF= 3.978**

- **FURET P.M., BERTHIER A., DECAU M.L., MORVAN-BERTRAND A., PRUD'HOMME M.P., NOIRAUD-ROMY N., MEURIOT F. 2011b. Differential regulation of two sucrose transporters by defoliation and light conditions in perennial ryegrass. *Soumis à Plant Cell and Environment*. (Avril 2011) IF= 5.081**

La discussion générale réalise une synthèse des apports de ce travail et tente de le replacer dans le contexte de la physiologie de la plante en repousse, ce qui permet de dégager de nouvelles perspectives de recherches.

Les résultats obtenus et exposés dans les deux premiers chapitres ont fait par ailleurs l'objet de deux posters (Annexe I et II, p.154 et 155) présentés l'un en 2009 au 8th *National Meeting of the French Society of Plant Biology, Strasbourg (France)* et l'autre en 2010 au 15th *International Workshop Plant Membrane Biology, Adélaïde (South Australia)*. Ce dernier a été sélectionné pour une présentation orale que j'ai eu l'honneur de donner lors du congrès.

Ces travaux de recherche ont été financés pour moitié par des subventions INRA, provenant à part égale du département Environnement et Agronomie (EA) et du département Biologie végétale (BV), et pour moitié par la Région Basse-Normandie. Le projet, débuté en janvier 2008, a été réalisé au sein de l'UMR INRA / UCBN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie, Nutritions N, C, S. L'étude du transport de saccharose est un axe de recherche émergent, développé conjointement à mon arrivée au sein de l'équipe Carbone-Défoliation, dont l'objectif est de comprendre la physiologie de la repousse du Ray-grass anglais.

Au cours de ma thèse, j'ai été amené à faire deux séjours au laboratoire PHYMOTS dirigé par R. Lemoine pour y effectuer l'immuno-localisation des transporteurs de saccharose.

Analyse
bibliographique

Analyse
bibliographique

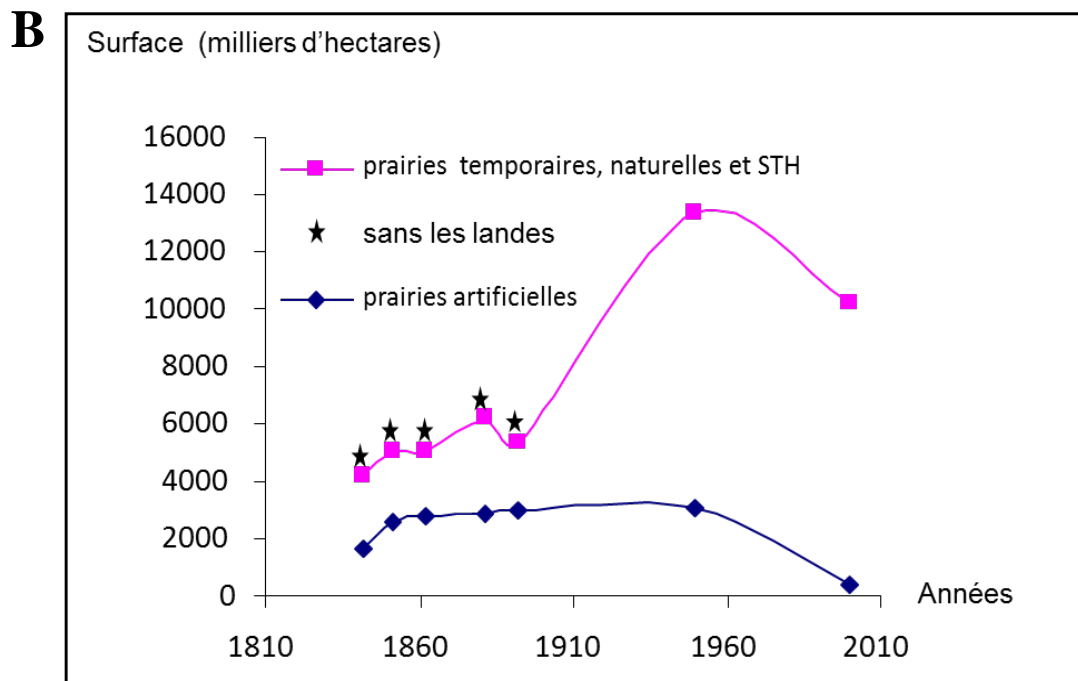
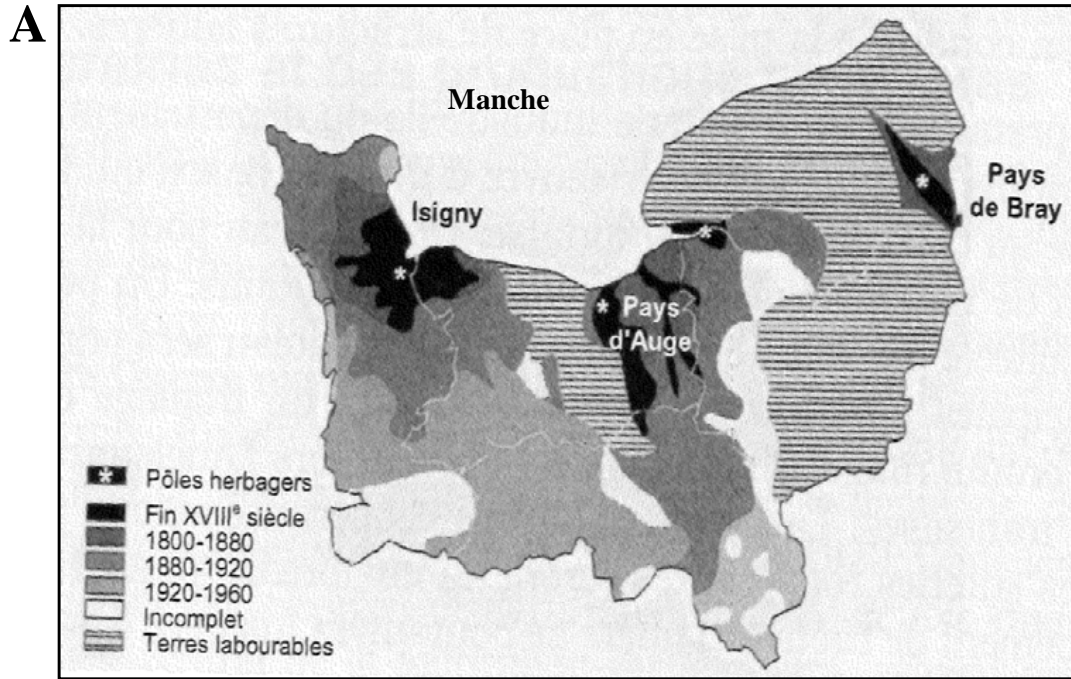


Figure II.1: (A) Evolution des surfaces prairiales en Normandie depuis la fin du XVIII^{ème} siècle. (B) Evolution des surfaces de prairies artificielles, temporaires et permanentes au cours des deux derniers siècles en France (Huyghe., 2007; d'après P. Brunet, Musée de Normandie).

II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Les écosystèmes prairiaux et le Ray-grass anglais

A.1. La prairie et les cultures fourragères

L'écosystème prairial est un système environnemental que l'Homme a su exploiter depuis sa sédentarisation et la domestication des animaux. **Les écosystèmes prairiaux** ont ainsi toujours été en lien avec la progression de la civilisation humaine. En effet, ces écosystèmes **sont à la base de l'alimentation animale, au travers de leur production de fourrage, et permettent la production, à moindre frais, de laine, de produits laitiers et carnés à haute valeur ajoutée.** Ainsi, parallèlement à l'amélioration des performances zootechniques des animaux domestiqués, l'augmentation de la productivité fourragère des prairies a été constamment au centre des préoccupations. **Les efforts de recherche portent sur de nombreux domaines en particulier l'amélioration variétale et la sélection de génotypes plus productifs.** Par conséquent, ces écosystèmes se sont peu à peu transformés en agrosystèmes visant à produire de plus en plus, et à moindre coût, car les surfaces exploitables sont *in fine* limitées. La prairie s'est donc transformée en passant d'un écosystème à une surface agricole utile, jusqu'à devenir un système de production à part entière.

Durant plus d'un siècle, de 1850 à 1970, les surfaces consacrées aux productions fourragères (surfaces toujours en herbe et cultures fourragères) ont augmenté régulièrement jusqu'à couvrir 45 % de la surface agricole utile en France (Hyughe *et al.*, 2005). C'est plus particulièrement vrai en Normandie (Figure II.1 ; Hyughe *et al.*, 2007) où l'évolution a été très importante entre 1880 et 1960. Cependant, l'élevage hors-sol et l'avènement des oléo-protéagineux (tourteaux de Soja et Colza) ont contribué à diminuer l'utilisation des prairies. Les prairies ont également cédé face à la croissance urbaine *via* l'expansion des grandes agglomérations françaises. A la suite d'importantes crises qui ont touché l'opinion publique (Vache folle, Tremblante du mouton, Grippe aviaire), les années 2000 ont vu émerger une agriculture plus responsable. **Les modèles modernes développés lors du siècle dernier ne sont plus appréciés et la prairie est revenue au premier plan.** C'est ainsi que depuis le début du XXIème siècle, la diminution des surfaces prairiales s'est

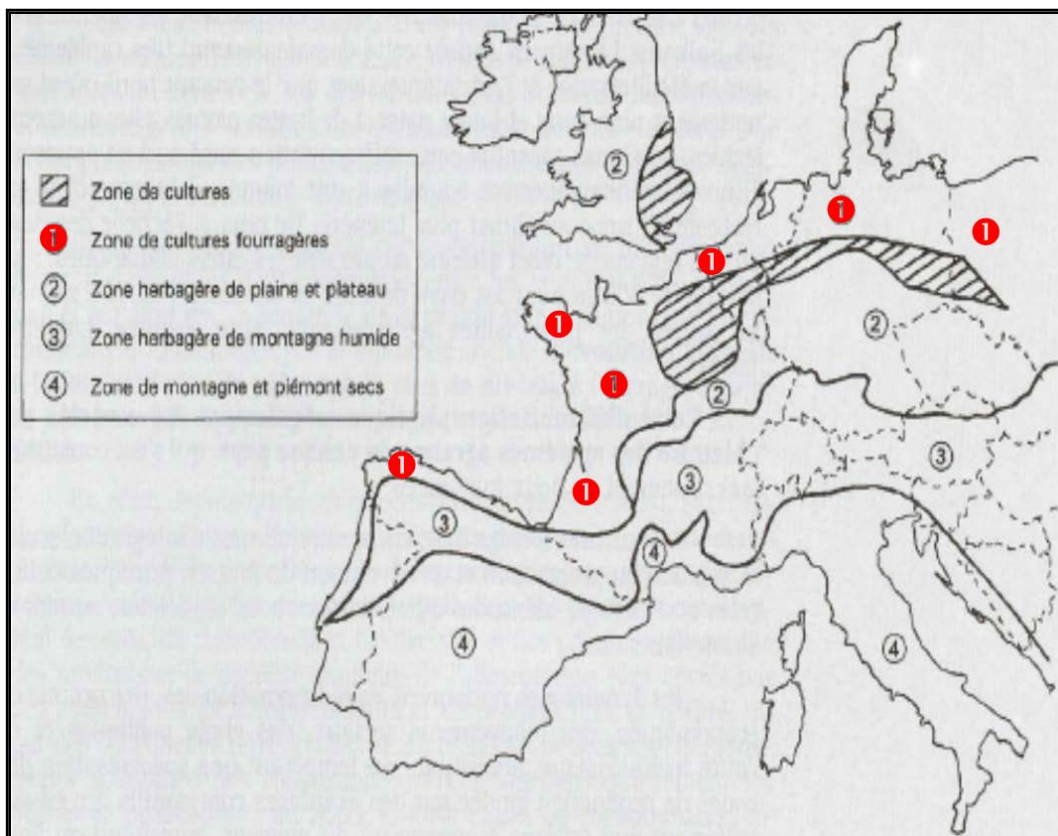


Figure II.2: Carte de l'Europe géographique désignant les quatre grandes zones possédant des types prairiaux différents. ❶ Zone de cultures fourragères. ❷ Zone herbagère de plaine et de plateau. ❸ Zone herbagère de montagne humide. ❹ Zone de montagne et piémont secs, de type méditerranéen (Huyghe *et al.*, 2005).

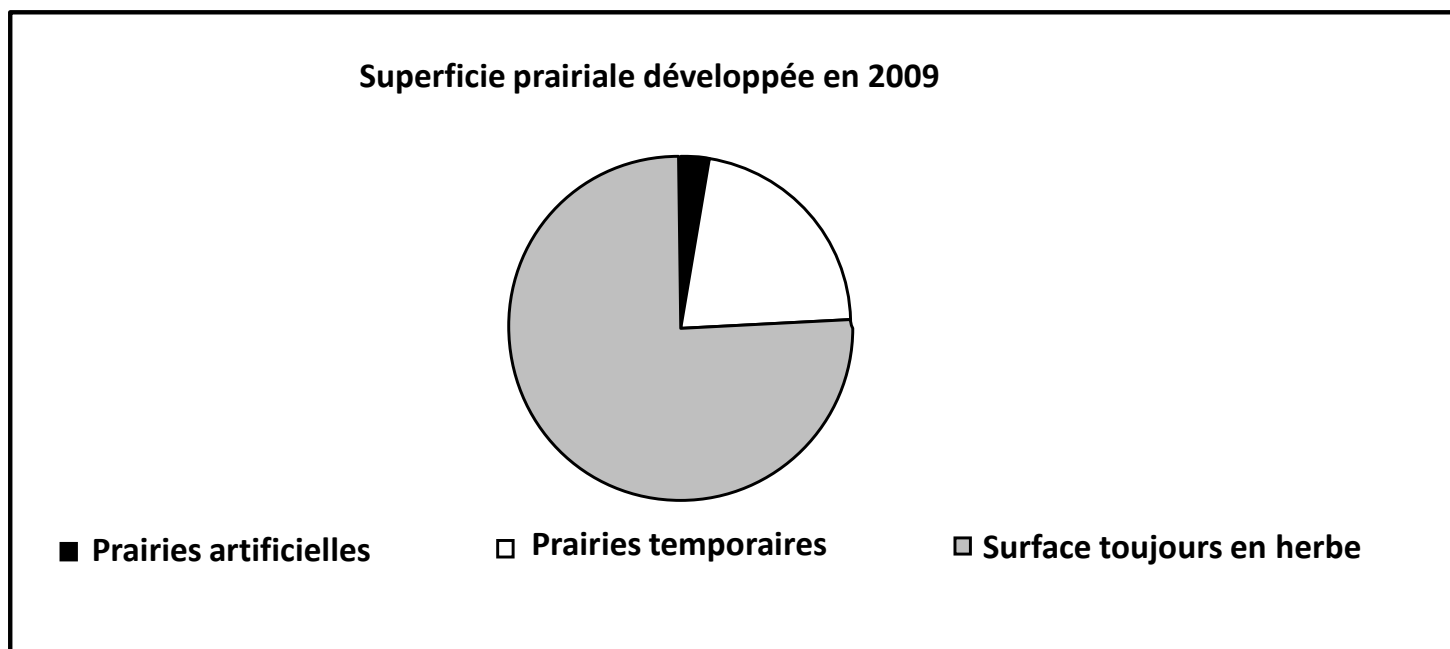


Figure II.3: Répartition (en %) des surfaces prairiales en France en 2009 (prairies artificielles, prairies temporaires et surfaces toujours en herbe). Ces valeurs sont établies par l'AGRESTE sur l'ensemble du territoire français pour l'année 2009 (Agreste; 2009).

ralentie. Les grandes entreprises (*Elle & Vire*®, *Président*®) utilisent par exemple ce système de culture pour donner une image de marque respectueuse de la nature. En 2011, la prairie véhicule une image d'authenticité et revient par conséquent dans les débats d'aménagement du territoire, notamment en raison de sa biodiversité élevée et de ses effets bénéfiques sur l'environnement. **Les agrosystèmes prairiaux diffèrent des autres systèmes de culture par la pérennité des espèces végétales qui les composent et par les pratiques culturales qui les concernent.** Les prairies sont caractérisées par le maintien de peuplements à forte hétérogénéité intra et interspécifique, le prélèvement non légal d'une partie de l'appareil aérien végétatif des plantes, l'utilisation limitée d'intrants chimiques et le recours peu fréquent au labour permettant d'éviter la libération massive de nitrate. Un autre avantage, peu mis en valeur et pourtant primordial, est celui de prévenir les sols de l'érosion durant toute l'année. Elles favorisent ainsi une faune souterraine et une meilleure infiltration des eaux de pluie qui d'ailleurs suffisent à son développement harmonieux, contrairement à certaines cultures comme le Maïs. **Enfin, les prairies jouent un rôle non négligeable dans la séquestration de carbone : hors toundra, les prairies mondiales représenteraient 15% du stock total de C organique (Tate et Ross, 1997).**

L'appétence des différentes espèces végétales qui composent un système prairial est fortement étudiée. Elle dépend notamment des teneurs en sucres solubles des tissus foliaires. Les ruminants sélectionnent de manière préférentielle les espèces ou les variétés riches en sucres (ex : Ray-grass anglais). Ces espèces, du fait de leur richesse en sucres, permettent également une meilleure digestibilité et une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote (Miller *et al.*, 2001).

La diversité des prairies se retrouve en Europe sous la forme de quatre grandes zones (Figure II.2 ; Pflimlin *et al.*, 2001). Les cultures fourragères se situent sur la partie occidentale où se sont développés des systèmes d'élevages intensifs rencontrés en Basse-Normandie ou en Bretagne, deux régions de production de produits laitiers et carnés par excellence. A l'heure actuelle, la pérennité des prairies est recherchée pour réduire les coûts de production. La productivité et la qualité des prairies est donc en constante évolution, c'est pourquoi il existe une diversité de prairies artificielles et naturelles (permanentes). Comme le présente la figure II.3, la grande majorité des surfaces prairiales est représentée par prairies naturelles, c'est-à-dire composées de surfaces toujours en herbe (STH), puis par les prairies temporaires, qui font l'objet d'un semis et d'un retournement périodique, et enfin par les prairies artificielles. Ces dernières sont essentiellement constituées par le Maïs fourrager (*Zea maïs* L.) et la Luzerne (*Medicago sativa* L.), et elles

Tableau II.1: Composition chimique et valeurs nutritives de l'ensilage et de différents mélanges (graminées, graminées-Trèfle, graminée-Luzerne) cultivés sur prairies. Les valeurs nutritives sont indiquées en g/kg MS et la composition botanique est exprimée en pourcentage total. NDF : Neutral Detergent Fibre; ADF : Acid Detergent Fibre; NEL : Energie Nette pour la production Laitière; PAIE : Protéine Assimilable dans l'Intestin synthétisées à partir de l'Energie fermentescible; PAIN : Protéine Assimilable dans l'Intestin synthétisées à partir de la matière azotée dégradable (Morel *et al.*, 2006).

Constituant	- Ensilage adaptation	A Mélange graminées	B Mélange graminées- trèfles	C Mélange graminées- luzerne
Matière sèche	33,6	42,3	42,1	35,3
Cendres	137	114	124	143
Matière azotée	179	132	161	213
Cellulose brute	232	254	243	269
Matière grasse	21	19	18	19
Parois cellulaires (NDF)	404	448	420	413
Lignocellulose (ADF)	266	289	275	308
NEL (MJ)	5,9	5,8	5,9	5,4
PAIE	76	75	80	75
PAIN	106	76	95	128
Composition botanique (%)				
Graminées	71,6	89,2	56,2	40,3
Légumineuses	8,5	2,0	40,5	58,6
Autres plantes	19,9	8,8	3,4	1,1



Figure II.4: (A) Deux variétés différentes de Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) cultivées en plein champ, (B) Photographie de la ligule (séparant la gaine du limbe), et inflorescence (supportant les épillets) chez le Ray-grass anglais. Photographies libres de droits.

sont exploitées de manière intensive. La valeur nutritive des prairies temporaires est toutefois plus importante que celles des STH (**Tableau II.1.**). Ces dernières, du fait de leur surface importante, occupent cependant une place de choix dans les écosystèmes prairiaux. Leur composition floristique est variée (25 espèces différentes en moyenne) avec une prédominance du Ray-grass anglais (*L. perenne* L.).

A.2. Les espèces prairiales et le ray-grass anglais

Le genre *Lolium* appartient à la famille des Poacées, tribu des *Festucae*. Ce genre se distingue par le fait qu'il n'existe pas de polyploïdies naturelles. Les *Lolium* sont ainsi exclusivement diploïdes à l'état naturel. Ils se distinguent du genre *Festuca* par leurs inflorescences en épi et non en panicule. **Le genre *Lolium* est composé de huit espèces** : des espèces autogames (toutes annuelles) telles que *L. temulentum* L., *L. persicum* Boiss. et Hohen., ou encore *L. loliaceum* Bory et Chaub., *L. subulatum* Vis., et des espèces allogames qui peuvent être annuelles/bisannuelles comme *L. multiflorum* Lam. et enfin ***L. perenne* L., seule espèce entièrement pérenne faisant ainsi l'objet de nombreuses études par les sélectionneurs (Figure II.4).**

Parmi les Poacées fourragères, le Ray-grass anglais est sans nul doute celle qui est cultivée et/ou présente sur les plus grandes surfaces, ce qui en fait une espèce fourragère de premier rang. Le Ray-grass anglais a été « domestiqué » depuis le XVII^{ème} siècle tout d'abord au Royaume-Uni puis exporté dans les zones tempérées européennes. Aujourd'hui il est présent jusqu'en Nouvelle-Zélande, pays où il est très fortement semé, au détriment de la forêt originelle. Le Ray-grass anglais est très apprécié pour sa facilité d'implantation mais également pour sa pérennité supérieure à 5-6 ans en culture intensive. Cette pérennité peut monter à plusieurs dizaines d'années dans les prairies permanentes. Le Ray-grass anglais possède aussi une excellente résistance au piétinement c'est pourquoi il est aussi bien utilisé dans les gazons à fort passage que dans les prairies en conditions humides qui nécessitent une bonne résistance à la pression animale. Enfin, **le Ray-grass anglais est la Poacée présentant la meilleure valeur nutritive aussi bien en termes de digestibilité (facilité de digestion de la matière organique couplée à une excellente appétence) du fait notamment de sa faible teneur en lignine, qu'en termes d'ingestibilité (facilité d'être ingérée en peu de temps) du fait de sa végétation relativement basse et dense.**

L'effort des sélectionneurs, via l'inscription au catalogue de plus de 146 variétés (Catalogue officiel des semences. 2010), démontre l'importance de la place du Ray-grass

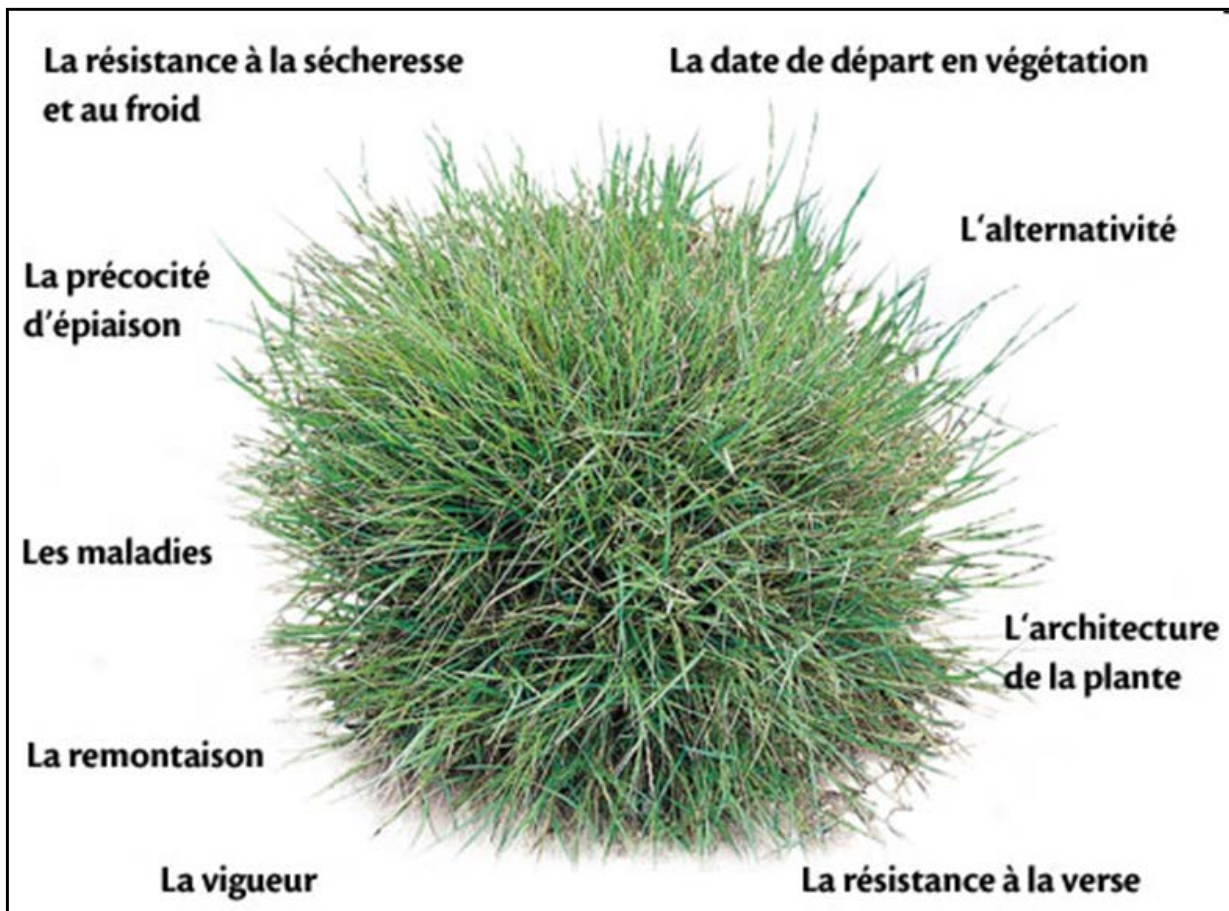


Figure II.5: Amélioration variétale et principaux points de sélection des Poacées cultivées dans les systèmes prairiaux, en particulier pour le ray-grass anglais. Source (www.prairies-gnis.org).

anglais au sein des prairies. **Les objectifs de sélection visent à améliorer sa qualité alimentaire, sa résistance aux maladies comme la rouille (Barre et al., 2006), son rendement en fauche, sa répartition dans l'année (échéance d'épiaison, Wilkins et Humphreys, 2003) et sa facilité d'utilisation au pâturage (Source Gnis, J. Greffier).** Ainsi la sélection porte sur des plantes faiblement remontantes, résistantes au piétinement et au tassement du sol, à épiaison plus ou moins précoce et faciles à prélever par l'animal. Des efforts de sélection ont aussi été employés sur des paramètres morphologiques (longueur des feuilles) et biochimiques (teneurs en sucres solubles). Des morphotypes à larges feuilles sont plus productifs en cas de coupes peu fréquentes que des morphotypes à feuilles courtes et à port plus prostré, qui sont eux plus productifs en cas de coupes fréquentes (Horst et al., 1978 ; Hasard et Ghuesquière, 1997). La richesse en sucres solubles des tissus prélevés par l'animal est l'une des composantes de la qualité alimentaire. C'est la raison pour laquelle des variétés à hautes teneurs en sucres ont été sélectionnées (Humphreys, 1989 ; Turner et al., 2001, 2002, 2006). Les sucres solubles représentent en effet une source d'énergie et de squelettes carbonés. Ils augmentent aussi l'efficacité d'utilisation de l'azote par les bactéries du rumen des bovins, ce qui permet une meilleure incorporation de l'azote dans le lait et la viande et donc une diminution concomitante des excréments azotés dans l'environnement (Miller et al., 2001).

Des efforts de sélection de variétés hybrides polyploïdes ont également été réalisés. Ainsi, la tétraploïdie, obtenue artificiellement (colchicine) par doublement du nombre de chromosomes, confère aux plantes une plus grande richesse en eau, une réduction du nombre de talles compensée par une augmentation de leur biomasse, une meilleure résistance aux maladies et une meilleure tolérance au froid (Skøt et al., 2007).

A.2.a. Critères de sélection

Les objectifs de sélection sont de créer des variétés mieux adaptées à la fois aux conditions environnementales et aux méthodes et de culture. Cela signifie tout d'abord une meilleure tolérance aux maladies, comme la rouille (*Puccinia coronata* et *P. graminis*) car ces rouilles sont des causes établies de refus d'alimentation. Les efforts sont centrés également vers les conditions de culture qui peuvent parfois être défavorables (sécheresse et froid. (Figure II.5 ; Balfourier et al., 1992).

Pour le Ray-grass anglais, graminée fourragère très utilisée en France, les sélectionneurs de plantes fourragères poursuivent plusieurs objectifs. La qualité alimentaire, la résistance aux maladies, l'amélioration du rendement, sa répartition

Tableau II.2: Tableau représentant la souplesse d'utilisation (intervalle de temps entre le départ en végétation et le début d'épiaison) au travers de la précocité d'épiaison de différentes espèces telles que la fétuque, le brome, etc. Ces valeurs correspondent aux dates relevées en moyenne dans le bassin parisien. Source *www.prairies-gnis.org*

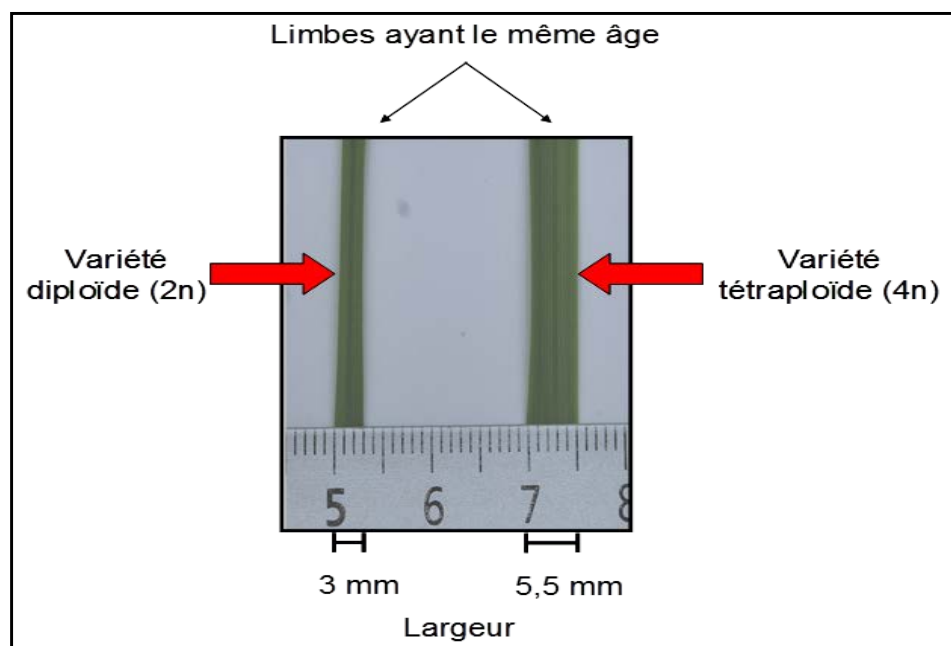
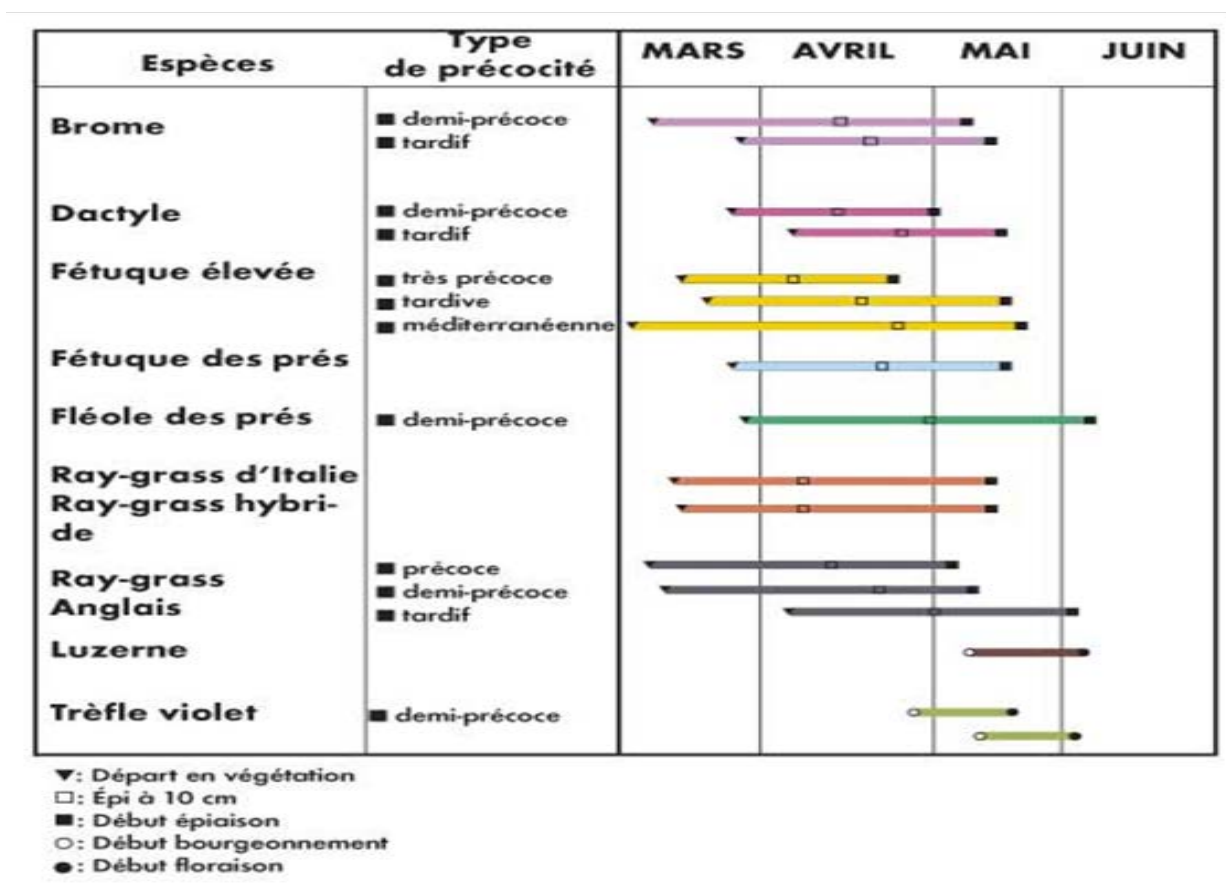


Figure II.6: Différence de largeur (en mm) du limbe entre une variété de Ray-grass anglais diploïde (2n; Salem) et une variété de Ray-grass anglais tétraploïde (4n; Sébastien). Les plantes sont âgées de quatre semaines et sont soumises à des conditions de cultures identiques. Photo personnelle, Berthier 2010.

dans l'année de culture et la facilité d'utilisation (notamment au pâturage) sont des critères sur lesquels les sélectionneurs travaillent depuis de nombreuses années (source GNIS J. Greffier). Le Ray-grass anglais étant particulièrement apprécié pour le pâturage, la sélection porte sur des plantes faiblement remontantes, résistantes au piétinement, au tassement du sol, et facilement accessibles par l'animal. Détaillons maintenant quelques-unes des réponses apportées par les sélectionneurs à ces critères de sélection.

A.2.b. Précocité d'épiaison

Généralement, la précocité désigne la précocité d'épiaison pour les graminées et la précocité de floraison pour les légumineuses. Il ne faut pas la confondre avec la " précocité de pousse" au printemps, qui est plutôt appelée " démarrage en végétation ". Dans le cas du Ray-grass anglais, l'épiaison représente dans le cycle ontogénique la période où l'inflorescence apparaît. Le Ray-grass anglais, contrairement à d'autres espèces prairiales, possède une grande souplesse d'utilisation (Tableau II.2). La différence entre un Ray-grass anglais précoce et tardif peut atteindre au maximum cinq semaines, ce qui n'est pas négligeable en termes de facilité de récolte (Tableau II.2). Cette échéance d'épiaison est surtout utilisée dans le cadre d'une souplesse d'exploitation ; la précocité tardive permettant par exemple d'étaler le premier cycle de pâturage de plusieurs semaines d'une parcelle à une autre.

A.2.c. Tétraploïdie

La tétraploïdie est obtenue par les sélectionneurs de manière artificielle en doublant le nombre de chromosomes. Ainsi, le Ray-grass anglais passe d'un statut $2n$ à $4n$ et les principaux avantages de ces Ray-grass sont leur richesse en eau ainsi que la grosseur de leurs tiges et de leurs feuilles (Figure II.6). La résistance aux maladies est également améliorée. Il est cependant nécessaire de semer à une densité plus élevée car le nombre de tiges est en règle générale plus faible. Les animaux broutent préférentiellement les tétraploïdes, plus courts, que les diploïdes. La résistance au froid (passage de l'hiver) est ainsi améliorée du fait de cette coupe plus basse. Dans les gazons, les diploïdes et les tétraploïdes sont semés ensemble car ils permettent d'obtenir une densité plus élevée.



Figure II.7: Logo du projet Grassohol.

A.2.d Teneurs en fructanes

Les teneurs en fructanes ont un intérêt dans l'appétence de la plante pour les animaux en permettant d'améliorer les quantités ingérées durant les dix heures qu'une vache utilise par jour pour pâturer. A l'heure du réchauffement climatique et des politiques de développement durable, des projets apparaissent pour utiliser cette source de carbone représentée par la richesse en fructanes du Ray-grass anglais. C'est le cas du Grassohol project (www.grassohol.org, **Figure II.7**) dirigé par le professeur Gallagher. Ce projet consiste à examiner la possibilité d'utiliser les fortes quantités de sucres contenues dans le Ray-grass anglais pour en faire des bio-éthanol.

Au final, l'effort des sélectionneurs, via l'inscription de plus de 146 variétés au catalogue officiel, démontre parfaitement l'importance de la place du Ray-grass anglais au sein des écosystèmes prairiaux. Cette plante fait ainsi l'objet de nombreuses études et c'est pourquoi nous nous attarderons plus particulièrement sur cette plante aux multiples facettes.

Le Ray-grass anglais est la plante majoritairement cultivée dans un contexte prairial de gestion intensive (fauche et pâturages). Ces cycles pluriannuels de coupe imposent des repousses successives. **La nécessité d'une source de carbone endogène rapidement mobilisable est relativement obligatoire pour permettre une repousse rapide.** Ce carbone mobilisé permettra ensuite la production de nouveaux tissus assurant un retour rapide à l'autotrophie pour le carbone et la pérennité de la plante. **Ce mécanisme pose certaines questions essentielles, en l'absence d'organes photosynthétiques supprimés par la coupe.**

- **Durant les premiers temps de la repousse, quel est le lieu de stockage et sous quelles formes le carbone se trouve-t-il ?**
- **De la même manière, sous quelle forme et comment est-il transporté entre tissus sources et tissus puits ?**

Ces différents points vont alors être traités dans les paragraphes suivants.

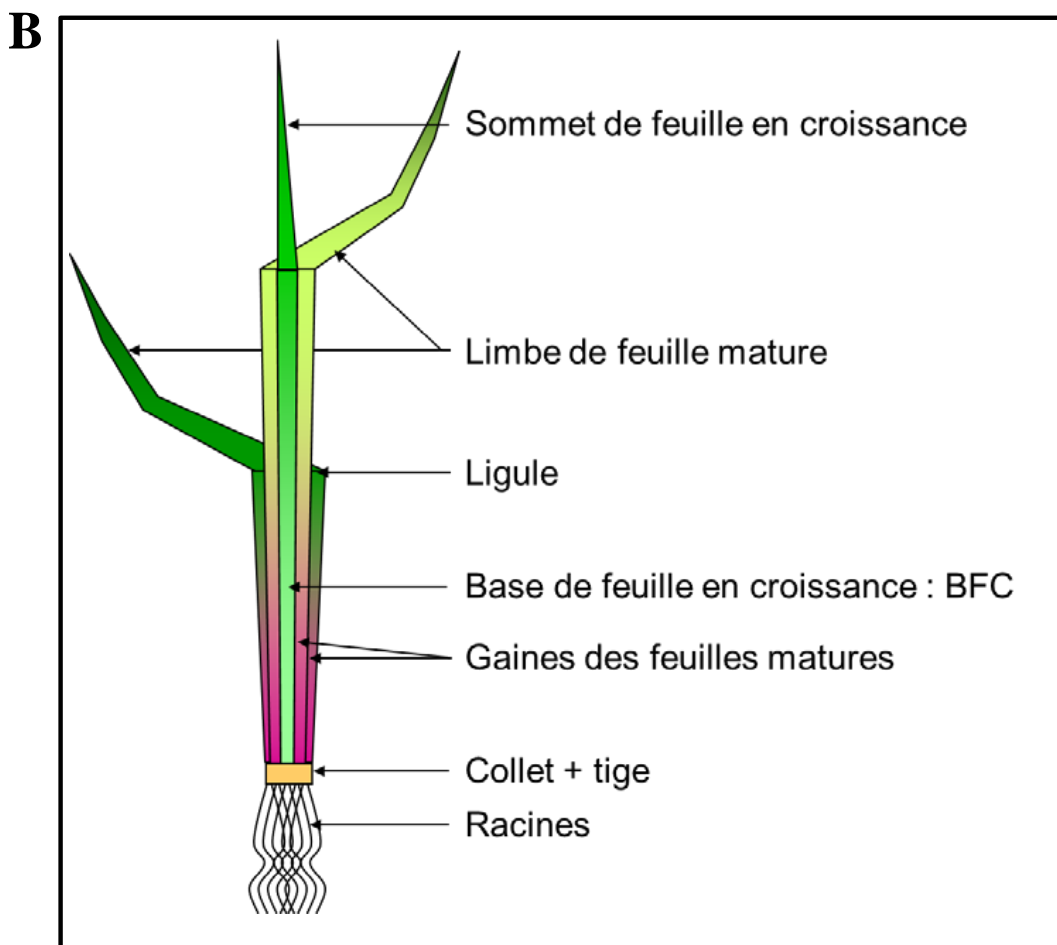
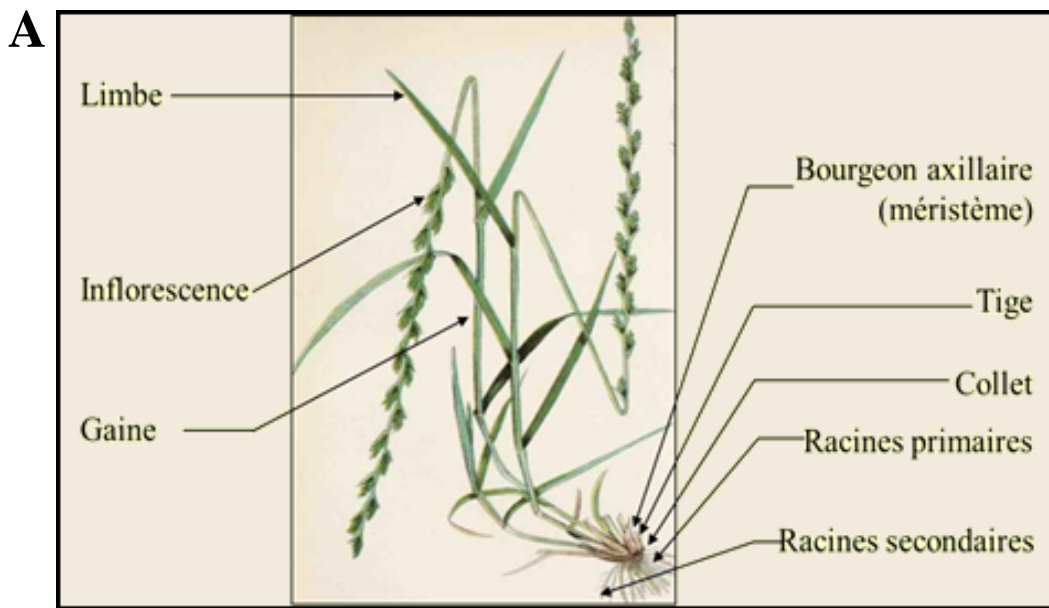


Figure II.8: (A) Plant de Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) composé de plusieurs tiges. (B) Représentation schématique des différents organes d'une tige de Ray-grass anglais. Le stade présenté est celui comportant deux feuilles matures, la troisième étant en train d'apparaître.

B. La coupe et la physiologie de la repousse chez les espèces fourragères

Un rappel sur la morphologie du Ray-grass anglais est nécessaire afin de bien comprendre l'imbrication des différents organes ainsi que leurs possibles rôles dans le contexte de repousse après coupe (**Figure II.8**). **Le Ray-grass anglais est une plante composée de plusieurs talles**. Chaque talle possède ses propres parties aériennes et souterraines. Ces dernières partent de la base du collet, qui est lui-même surmonté par les parties aériennes, majoritairement photosynthétiques, et qui sont agencées en couches concentriques produisant un gradient de maturité tissulaire partant du centre vers l'extérieur. Ainsi, les parties externes sont composées de gaines âgées prolongées par les limbes (lieu principal de la photosynthèse). **Les gaines entourent la future feuille émergente, et celle-ci possède à sa base une zone à forte activité méristématique**. Ce lieu de différenciation et d'élongation cellulaire est nommé **base de feuille en croissance (BFC, Figure II.8.b)**. Nous allons maintenant nous attacher à décrire l'implication de chaque tissu lors de la repousse après coupe.

B.1. La coupe

La défoliation, qui peut être réalisée lors du pâturage ou de la fauche mécanique (elle est alors également appelée coupe), consiste en la suppression partielle ou totale de l'appareil photosynthétique aérien (feuilles, tiges, etc). Celle-ci est d'autant plus sévère qu'elle supprime une quantité importante de tissus photosynthétiquement actifs et de tissus méristématiques. La suppression des tissus méristématiques foliaires peut être de nulle à partielle, ce qui est généralement le cas chez les Poacées où ces tissus sont situés en position basale, près du sol. Le méristème peut alors reprendre sa croissance après la coupe, (**Smith et al., 1986**). Chez des espèces à port plus érigé et à architecture buissonnante telle que la Luzerne, la défoliation peut correspondre à une suppression massive des bourgeons caulinaires, ce qui nécessite l'activation de bourgeons dormants situés en position basale, voire même la génération de nouveaux bourgeons au niveau du collet comme chez les Fabacées (**Hyder, 1972**).

Les plantes fourragères pérennes sont soumises à des cycles de coupe et de repousse successifs au cours de l'année qui sont caractérisés par leur fréquence

Tableau II.3 : Nombre de talles (\pm S.E.) par plante immédiatement (J0) et après 7 jours de repousse (J7) pour des Ray-grass anglais cultivés sur un milieu riche (2mM) ou non (0,2 mM) en azote. SD: simple défoliation RD: défoliations répétées. (le nombre indiqué entre parenthèses indique le pourcentage de parties aériennes supprimées; 100% : suppression totale (Lestienne *et al.*, 2006).

Traitements (% défoliation)	Nombre de talles par plantes			
	Fertilisation azotée			
	Forte (2mM)		Faible (0,2 mM)	
	jour 0	jour 7	jour 0	jour 7
SD-A (0%)	22,0 (5,0)	41,4 (9,2)	7,2 (1,1)	11,6 (5,2)
SD-B (25%)	25,7 (4,3)	36,2 (5,7)	7,4 (0,9)	14,2 (3,3)
SD-C (50%)	21,4 (5,8)	43,8 (17,5)	8,2 (1,3)	11,2 (3,9)
SD-D (75%)	22,0 (5,4)	41,8 (12,3)	6,8 (0,4)	11,6 (2,7)
SD-E (100%)	25,0 (5,0)	38,2 (5,0)	8,2 (0,8)	9,2 (1,6)
RD-A (0%)	85,0 (17,4)	125,4 (9,3)	21 (4,6)	24,6 (8,0)
RD-C (50%)	93,5 (18,6)	99,6 (11,7)	19,6 (4,9)	26,0 (8,0)
RD-E (100%)	79,2 (13,8)	102,2 (18,0)	19,2 (5,7)	24,8 (4,1)

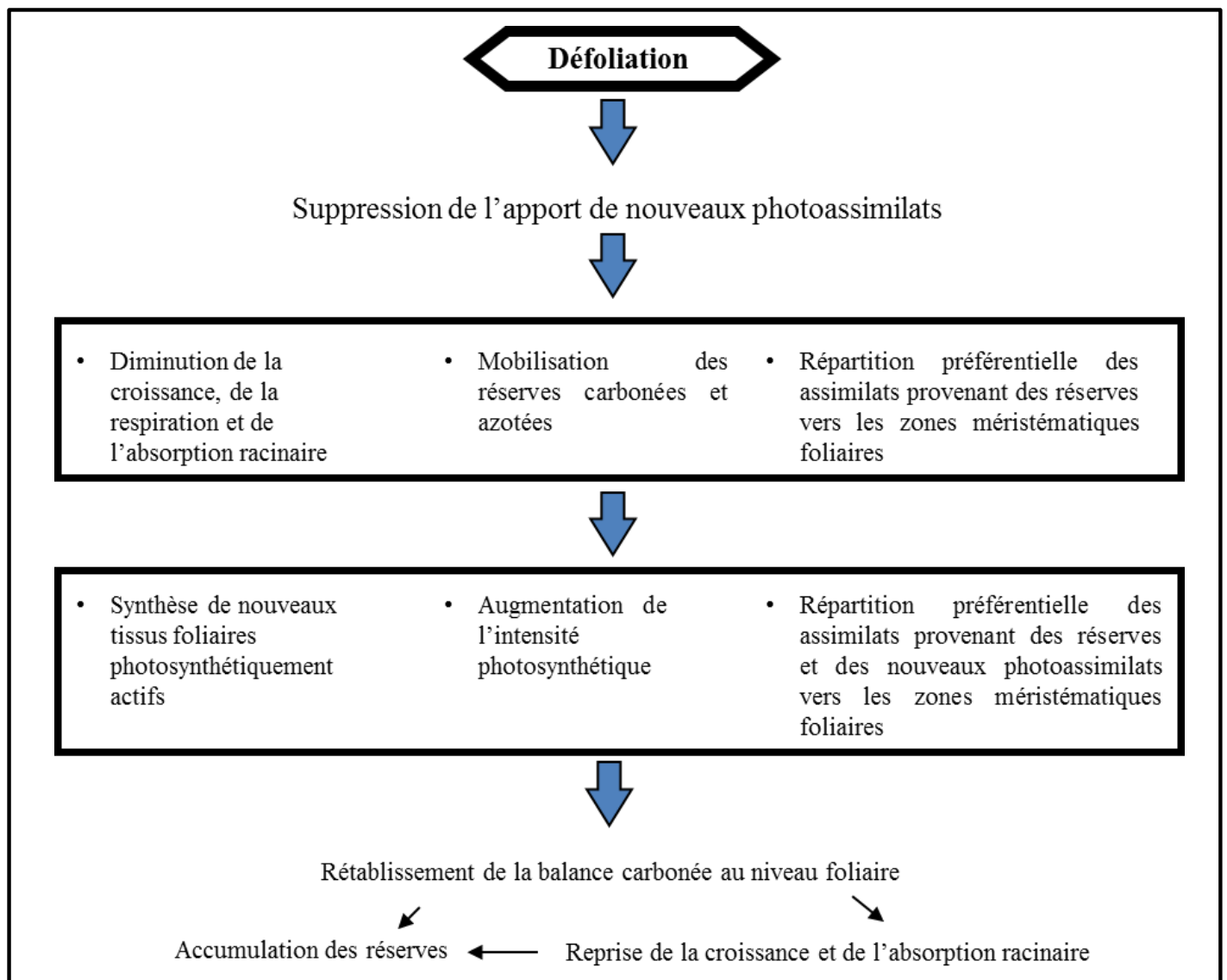


Figure II.9 : Représentation des réponses physiologiques séquentielles généralement observées après une défoliation qui élimine l'ensemble des tissus photosynthétiques sans supprimer les méristèmes caulinaires ou foliaires, d'après Morvan-Bertrand A., Thèse de l'Université de Caen, 1998.

(rythme de coupe) et leur intensité (hauteur de coupe). La coupe se caractérise alors par une suppression plus ou moins répétée (fonction de la fréquence) et importante (fonction de l'intensité) de feuilles, de tiges et de méristèmes caulinares et apicaux, conditionnant la repousse ultérieure. Ces deux paramètres déterminent les conditions d'exploitations de la culture.

B.1.a. Fréquence de la coupe

La fréquence de la coupe induit des réponses qui sont mises en place à court mais aussi à long terme. Pour le Ray-grass anglais, il a par exemple été montré que les plantes étant défoliées de manières répétitives produisaient 3,5 fois plus de talles en moyenne que des plantes défoliées une seule et unique fois (**Tableau II.3** ; *Lestienne et al., 2006*). Cependant, la taille des talles produites par les plantes défoliées régulièrement est plus faible que pour les plantes défoliées une seule fois. Selon les auteurs, ceci est dû au fait que chaque défoliation induit la formation de nouvelles talles nécessitant de répartir les ressources disponibles (en assimilats carbonés ou azotés) sur l'ensemble de la plante.

B.1.b. Intensité de la coupe

L'intensité de la coupe induit des réponses à court terme (de quelques heures à quelques jours), comme la mobilisation des ressources carbonées, qui permettent de restaurer une balance carbonée positive grâce à la construction de nouveaux organes foliaires photosynthétiques. Un retour plus ou moins rapide à l'autotrophie pour le carbone est en effet très important afin d'assurer une repousse de qualité (*Hume, 1991*).

B.2. Réponse physiologique de la plante lors de la repousse

La nature et l'amplitude des réponses développées par les plantes lors de la repousse après défoliation dépendent principalement de la sévérité de la défoliation elle-même, mais également des facteurs environnementaux (température, éclaircissement, etc.). La repousse des plantes après défoliation est assurée par des réponses physiologiques et morphologiques ; ces dernières étant plus longues à mettre en place (*Chapman et Lemaire, 1993*). La **figure II.9** représente les différentes réponses physiologiques et morphologiques apparaissant suite à une défoliation sévère ou partielle (*Morvan-Bertrand et al., 1998*). Le but final de ces changements est de rétablir le plus rapidement la croissance des parties racinaires et aériennes pour pérenniser l'individu.

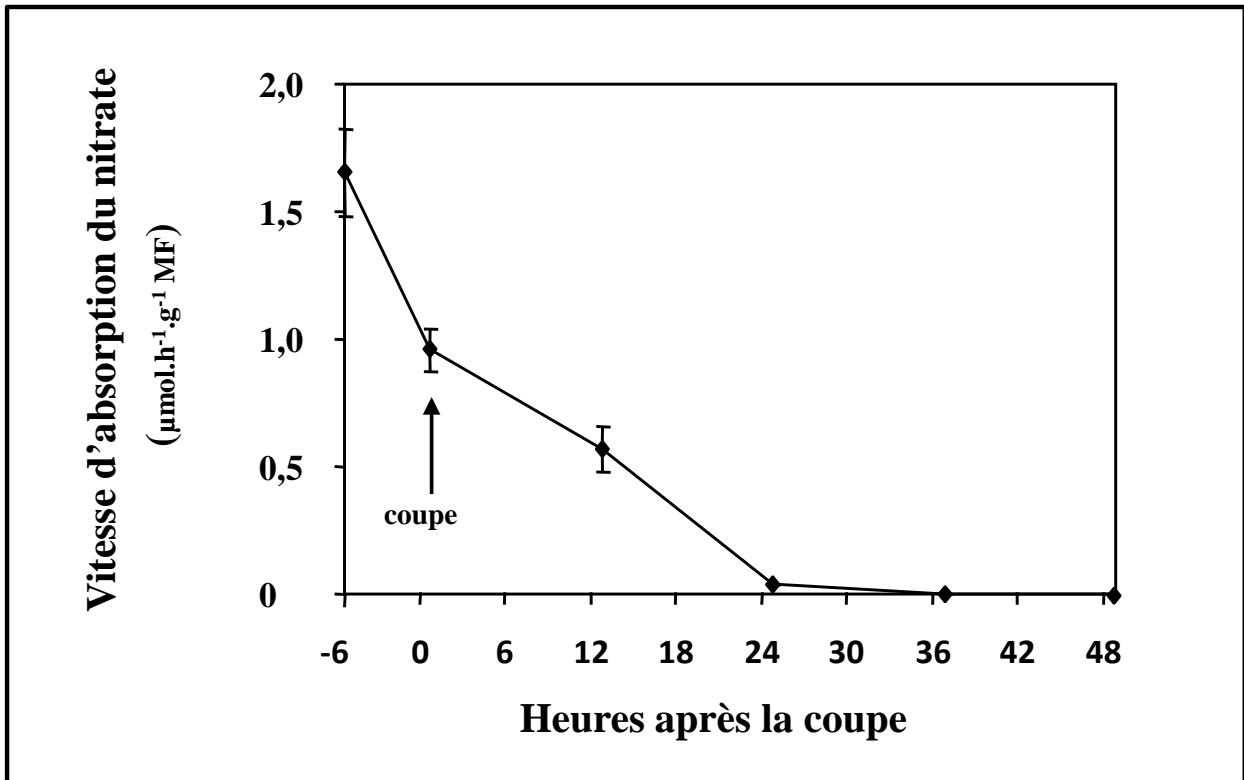


Figure II.10: Evolution de la vitesse d'absorption du nitrate dans les racines au cours des 48 heures suivant la défoliation de Ray-grass anglais pré-cultivés pendant 10 jours sur 1.0 mM de KNO_3 . Les barres verticales représentent \pm S.E. de la moyenne pour $n = 3$ (Louahlia *et al.*, 1999).

B.2.a. Les réponses des parties racinaires

La croissance ainsi que la respiration racinaire de la plupart des espèces fourragères telles que le Ray-grass anglais (Jarvis et Macduff, 1989), le Dactyle (Davidson et Milthorpe, 1966a) et l'Orge (Ryle et Powell, 1975), sont fortement réduites, voire stoppées, après une défoliation sévère. En effet, du fait de la suppression des organes photosynthétiques aériens, l'allocation de photoassimilats en provenance des parties aériennes vers les racines est fortement réduite. **L'absorption racinaire de nitrate, d'ammonium ou encore phosphate sont également diminuées (Davidson et Milthorpe, 1966b ; Ourry *et al.*, 1988 ; Macduff et Jackson, 1992 ; Louahlia *et al.*, 1999 ; Figure II.10).** Un exemple observé chez le Ray-grass anglais (Thornton et Millard, 1996) est qu'en fonction de l'intensité de la coupe, c'est à dire de la hauteur de celle-ci, la masse racinaire évolue ainsi que l'absorption de l'azote. Ainsi, les plantes défoliées à 4 cm (sévèrement) ont une diminution plus importante de leur masse racinaire par rapport aux plantes défoliées à 8 cm. Ce comportement provoque une diminution de l'absorption d'azote de 0,14 mg N/plante/semaine pour les plantes coupées à 4 cm à 0,54 mg N/plante/semaine pour les plantes coupées à 8 cm. En effet, la baisse de la fourniture en ressources carbonées limite l'activité de nombreuses enzymes de la voie d'assimilation de l'azote comme la nitrate réductase (Boucaud et Bigot, 1989).

B.2.b. Les réponses des parties aériennes

Une défoliation sévère provoque une diminution brutale de la photosynthèse (Ludlow et Charles-Edwards, 1980 ; Parsons *et al.*, 1983). Cependant, lorsque la défoliation n'élimine pas la totalité des feuilles assimilatrices, l'intensité photosynthétique des surfaces foliaires résiduelles diminue transitoirement immédiatement après la coupe (Detling *et al.*, 1979 ; Nowak et Cadwell, 1984 ; Atkinson, 1986). Chez l'Agropyron (*Agropyron smithii* L.), l'élimination d'une partie du limbe réduit par exemple de 31 % l'intensité photosynthétique des tissus restants (Detling *et al.*, 1979). Les raisons de cette diminution transitoire de l'intensité photosynthétique ne sont pas connues mais elles pourraient être dues à la blessure des tissus (Richards, 1993). **Après cette diminution initiale lors des premières heures de repousse, la photosynthèse retrouve généralement un niveau égal ou supérieur à celui des plantes non coupées (Ryle et Powell, 1975 ; Detling *et al.*, 1979). Ce processus est appelé photosynthèse compensatoire (Richards, 1993).** Cette augmentation de l'intensité photosynthétique a été observée chez *Lolium perenne* L. (Woledge, 1977) et chez de nombreuses autres espèces

de Poacées (Richards, 1993). Une à deux semaines après l'élimination de l'ensemble des tissus photosynthétiques, la capacité photosynthétique est multipliée par deux dans les feuilles en repousse chez *Bromopsis erecta* L. (Bryant *et al.*, 1998). Richards (1993) suggère que l'induction d'une photosynthèse compensatoire pourrait être liée à l'augmentation de la quantité de lumière interceptée par les tissus foliaires restants et nouvellement synthétisés et/ou à la modification des équilibres hormonaux. **La photosynthèse compensatoire, associée à la répartition préférentielle des nouveaux photoassimilats vers les zones méristématiques foliaires permet à la plante d'ajuster rapidement l'offre en assimilats à la demande et donc de rétablir une balance carbonée positive. Cela lui permet alors de reprendre une croissance racinaire et une absorption d'azote soutenues.**

Comme il l'a été énoncé précédemment, la disponibilité en carbone influence le comportement physiologique de la plante suite à une défoliation. Ce carbone peut provenir d'une photosynthèse réduite, mais également d'un mécanisme très important durant les premières heures de repousse : **la mobilisation des ressources carbonées**. Les plantes possèdent la capacité de stocker du carbone sous différentes formes de réserves. **Ces réserves chez les végétaux sont essentiellement constituées par de l'amidon ou des fructanes. Pour les Poacées prairiales, il est le plus souvent question de fructanes**, polymères hydrosolubles de fructose (Chatterton *et al.*, 1989). Il a été montré que, suite à la défoliation, il y avait chez le Ray-grass anglais une diminution des teneurs en fructanes. Cette diminution s'accompagne d'une augmentation de l'activité des enzymes de dégradation (fructanes-exohydrolases : FEH ; Prud'homme *et al.*, 1992). Cette mobilisation est un aspect important de la repousse. C'est pourquoi nous allons nous y attarder plus longuement dans le chapitre suivant.

B.3. La mobilisation des réserves carbonées

B.3.a Les ressources carbonées : les fructanes

Les fructanes, ont été identifiés par Rose en 1804 dans les rhizomes d'aunée (*Inula helenium* L.) de la famille des Astéracées (Pontis et Del Campillo, 1985). Depuis, les fructanes ont été répertoriés chez de nombreuses espèces de bactéries et de végétaux supérieurs et chez quelques espèces de champignons, d'algues et de bryophytes. Chez les angiospermes, environ 45000 espèces dont 2500 Astéracées et 8000 Poacées synthétisent

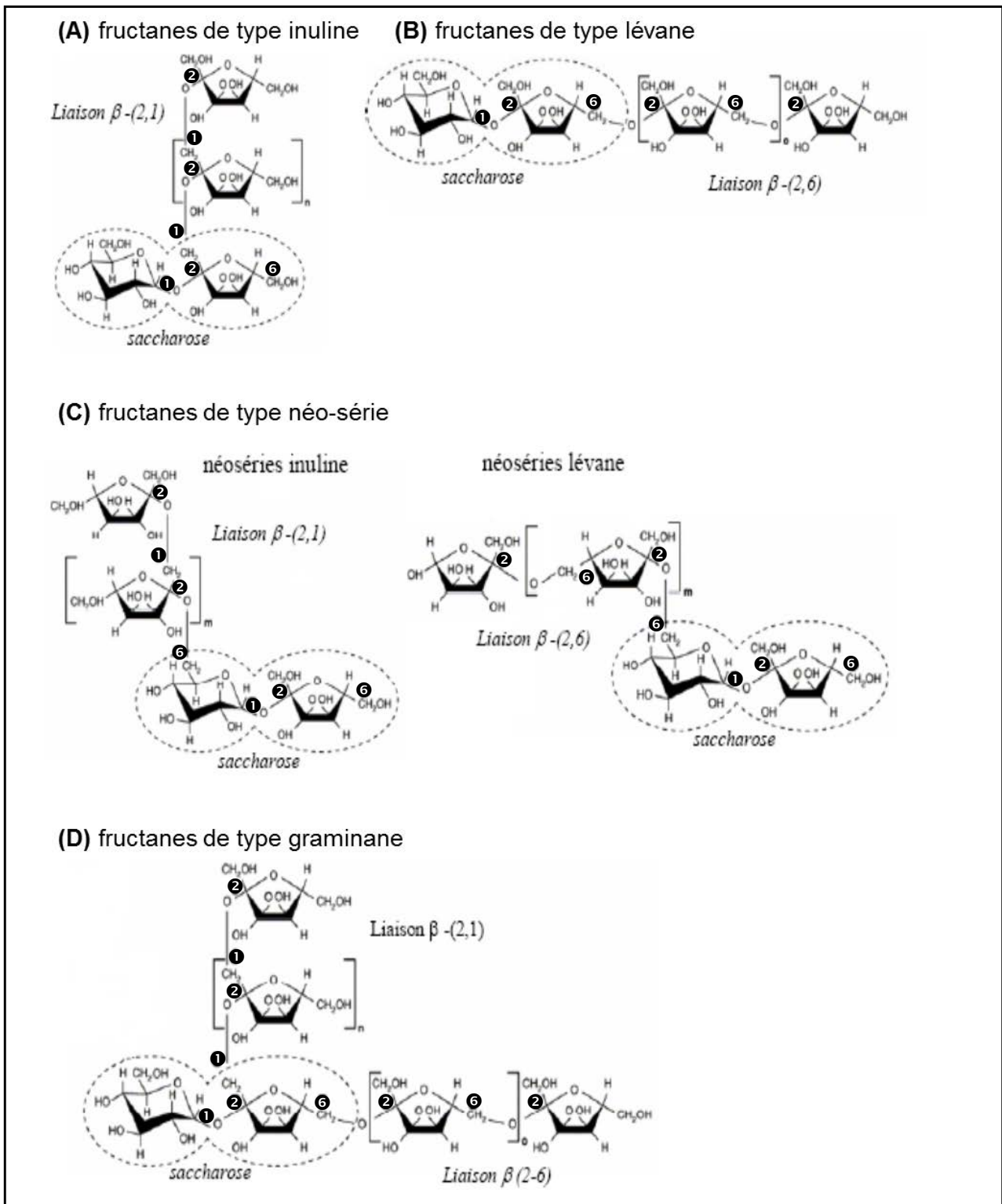


Figure II.11: Structure des quatre types de fructanes. (A) type inuline, (B) type lévane, (C) type néosérie, (D) type graminane. La molécule de saccharose est entourée en pointillé et le numéro dans un rond noir (1, 2 et 6) correspond au numéro de l'atome de carbone dans la molécule (Ritsema et Smeekens, 2003).

des fructanes (Hendry, 1993). Parmi les Poacées accumulant des fructanes se trouvent des espèces de grandes cultures telles que des céréales (le Blé, l'Orge et l'Avoine) et des plantes fourragères (le Ray-grass anglais et la Fétuque élevée ; Figure II.11).

B.3.b. Localisation des fructanes

Les fructanes constituent la réserve glucidique majeure chez 12 à 15 % des Angiospermes. Ils s'accumulent aussi bien dans les organes puits pour le carbone tels que les bulbes (Dahlia), les tubercules (Topinambour), les tiges, les gaines foliaires, les jeunes feuilles, les racines (Chicorée, Pissenlit), que dans les feuilles matures, organes sources pour le carbone, lieu de la photosynthèse.

Chez les Poacées, à l'état végétatif, il n'existe pas d'organe de stockage à proprement dit. Les teneurs les plus élevées se rencontrent dans les entre-noeuds de la base des tiges (Pollock et Jones, 1979), dans les gaines foliaires matures (Volnec, 1986) et dans les zones de croissance foliaire (Volnec et Nelson, 1984 ; Schnyder et Nelson, 1987). Les fructanes peuvent y représenter jusqu'à 30 % de la matière sèche. Il est possible, mais dans des proportions plus faibles, d'avoir des fructanes dans les inflorescences (Smith, 1967), dans les graines (Schnyder et Nelson, 1988) et dans les racines (Prud'homme *et al.*, 1992). L'utilisation de protoplastes de feuilles d'Orge par Wagner *et al.* (1983) a permis de mettre aussi en évidence une localisation au niveau des cellules du mésophylle. Ces polymères ont été localisés également dans les gaines périvasculaires (Koroleva *et al.*, 1997, 1998, 2000), à l'inverse de l'épiderme où les fructanes n'ont jamais été observés.

Grâce à une propriété de cristallisation dans l'éthanol des fructanes, il a été possible de les localiser rapidement. En effet, les sphérocristaux formés apparaissent dans la vacuole. Par la suite, les techniques d'obtention de protoplastes et de purification de vacuole ont démontré que les fructanes étaient bien localisés dans cet organite cellulaire. Leur lieu de synthèse et de dégradation a été également identifié comme étant vacuolaire.

B.3.c. Métabolismes des fructanes

Le métabolisme de biosynthèse des fructanes est relativement bien connu chez les Astéracées qui synthétisent presque exclusivement des fructanes de la famille "inuline" dont les résidus fructosyles sont liés en β (2-1) (Van Laere et Van den Ende, 2002).

Un premier modèle permettant d'expliquer la synthèse des fructanes de type "inuline" a été proposé par Edelman et Jefford dès 1968. D'après ce modèle, deux enzymes

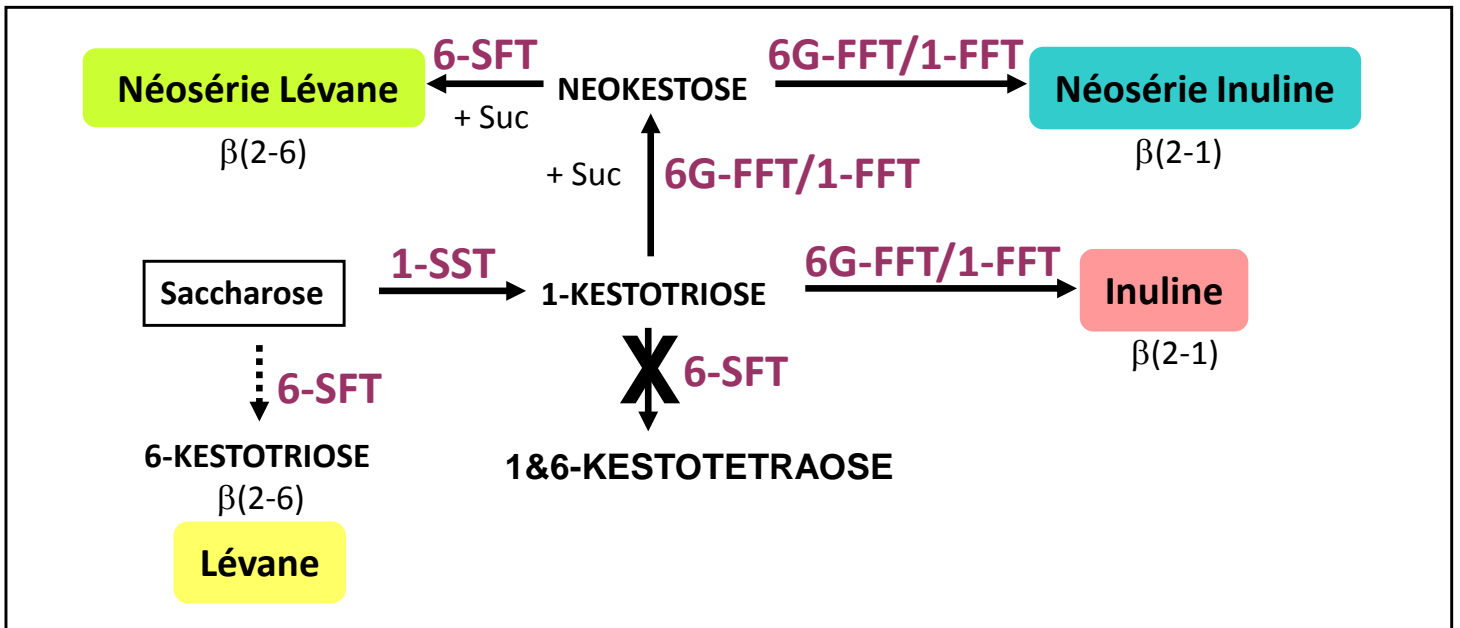


Figure II.12: Modèle de synthèse des différents types de fructanes observés chez le Ray-grass anglais: inuline, lévane, néosérie inuline et néosérie lévane (Lasseur *et al.*, 2011).

agissant de manière conjuguée sont responsables de la synthèse des fructanes de type "inuline" : la saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST) et la fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT). Malheureusement, ce modèle ne permet pas de rendre compte des voies de synthèse des fructanes de type lévane et de type néoséries retrouvées chez les Monocotylédones (Pollock et Cairns, 1991 ; Cairns, 1993 ; Vijn et Smeekens, 1999 ; Ritsema et Smeekens, 2003).

Chez les Monocotylédones, la coexistence de liaisons β (2-6) et de liaisons β (2-1), de structures linéaires et de structures branchées possédant un résidu glucosyle interne ou terminal indique la présence d'activités enzymatiques supplémentaires, portées par les mêmes ou par d'autres protéines. L'intégralité du métabolisme de biosynthèse des fructanes peut être appréhendée chez certaines espèces de Monocotylédones grâce à la purification des enzymes de biosynthèse des fructanes ou des ADNc correspondants.

Chez le Blé, ont été caractérisées successivement la 1-SST et la 6-SFT (Kawakami et Yoshida, 2002) puis la 1-FFT (Kawakami et Yoshida, 2005). La 1-SST permet de former le 1-kestotriose, la 1-FFT les liaisons β (2-1) et la 6-SFT le 1&6-kestotétraose (ou bifurcose) ainsi que les liaisons β (2-6). Le même modèle est suggéré chez l'Orge (Duchateau *et al.*, 1995). Un argument en faveur de ce modèle est fourni par le fait que l'introduction de l'ADNc de la 6-SFT d'Orge dans le génome de la Chicorée, possédant les activités 1-SST et 1-FFT, permet la synthèse de graminanes semblables à celles de l'Orge (Sprenger *et al.*, 1997). **Chez le Ray-grass anglais (Figure II.12), Pavis *et al.* (2001) suggèrent l'intervention de quatre enzymes : une 1-SST pour la synthèse de 1-kestotriose, une 1-FFT pour l'allongement des chaînes de fructose en β (2-1), une 6G-FFT pour la production des fructanes des néoséries et une fructosyltransférase telle qu'une 6-SFT ou une 6-FFT pour la formation des liaisons β (2-6).**

B.3.d. Rôle des fructanes

Les fructanes peuvent avoir différents rôles. Par exemple, chez les Poacées des zones tempérées, l'accumulation des fructanes au froid, c'est-à-dire à des températures proches ou inférieures à 10°C (Chatterton *et al.*, 1989), permettrait de protéger les plantes des dommages dus au froid. La synthèse des fructanes serait d'après certains auteurs un avantage sélectif pour les plantes qui en possèdent par rapport aux plantes n'accumulant que l'amidon ou le saccharose (Chatterton *et al.*, 1989). Chez les Poacées, les fructanes sont accumulés en particulier à la base des parties aériennes durant la phase végétative, d'autant plus lorsque l'activité photosynthétique est encore importante

(Archbold, 1940 ; Pollock, 1984 ; Pollock et Cairns, 1991). **Le rôle des fructanes comme forme de réserve carbonée est donc bien établi. Par ailleurs, les fructanes (de petit degré de polymérisation) sont des polysaccharides totalement solubles ; ils ont par conséquent un rôle osmotique. Il est à noter que ce rôle osmotique est moins marqué que le saccharose.** Les fructanes situés dans la zone d'élongation cellulaire participent au maintien du potentiel osmotique permettant l'absorption de l'eau indispensable à l'expansion cellulaire (Schnyder et Nelson, 1987 ; Roth *et al.*, 1997). Les fructanes ont un rôle dans l'importation de l'eau dans les processus d'ouverture des fleurs, mais aussi un rôle de résistance à des stress abiotiques tel que la sécheresse et le froid. La structure même des fructanes laisse à penser qu'ils possèdent certainement une forte capacité de rétention de l'eau au vu de leur nombre important de groupements hydroxyles (Levitt, 1980). **Par ailleurs, le rôle primordial du métabolisme des fructanes est de réguler la concentration cytosolique en saccharose. Le contrôle de la teneur en saccharose est en effet très important car ce sucre joue un rôle majeur dans la régulation de la vitesse de photosynthèse et dans la répartition du carbone dans la plante (Pollock et Farrar, 1996).**

Il apparaît clairement que les formes majoritaires de carbone stocké chez le Ray-grass anglais sont les fructanes. Par conséquent nous avons en les fructanes un très bon candidat pour fournir le carbone et l'énergie nécessaire à la repousse. En effet, ces réserves sont mobilisables rapidement *via* un arsenal enzymatique et se trouvent en grande quantité dans les tissus épargnés par la coupe. Cependant, ce carbone stocké doit être acheminé vers les tissus en repousse afin d'être efficace dans le mécanisme de retour à l'autotrophie. Une étude a montré que ces fructanes n'étaient pas véhiculés par les faisceaux conducteurs (Amiard *et al.*, 2004). Il s'agit en réalité d'une molécule fortement liée à ceux-ci : le saccharose. C'est en effet ce composé carboné qui est transféré au sein des faisceaux conducteurs pour alimenter les tissus en repousse. Intéressons nous dès lors à cette molécule de transport de carbone.

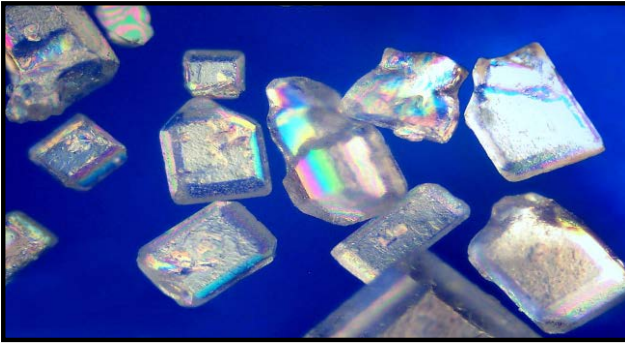
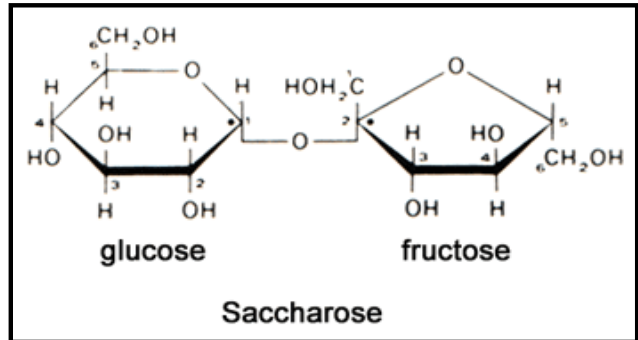
A**B**

Figure II.13: (A) Cristaux de saccharose (Photographie libre de droits). (B) Représentation de Fischer d'une molécule de saccharose constituée d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose.

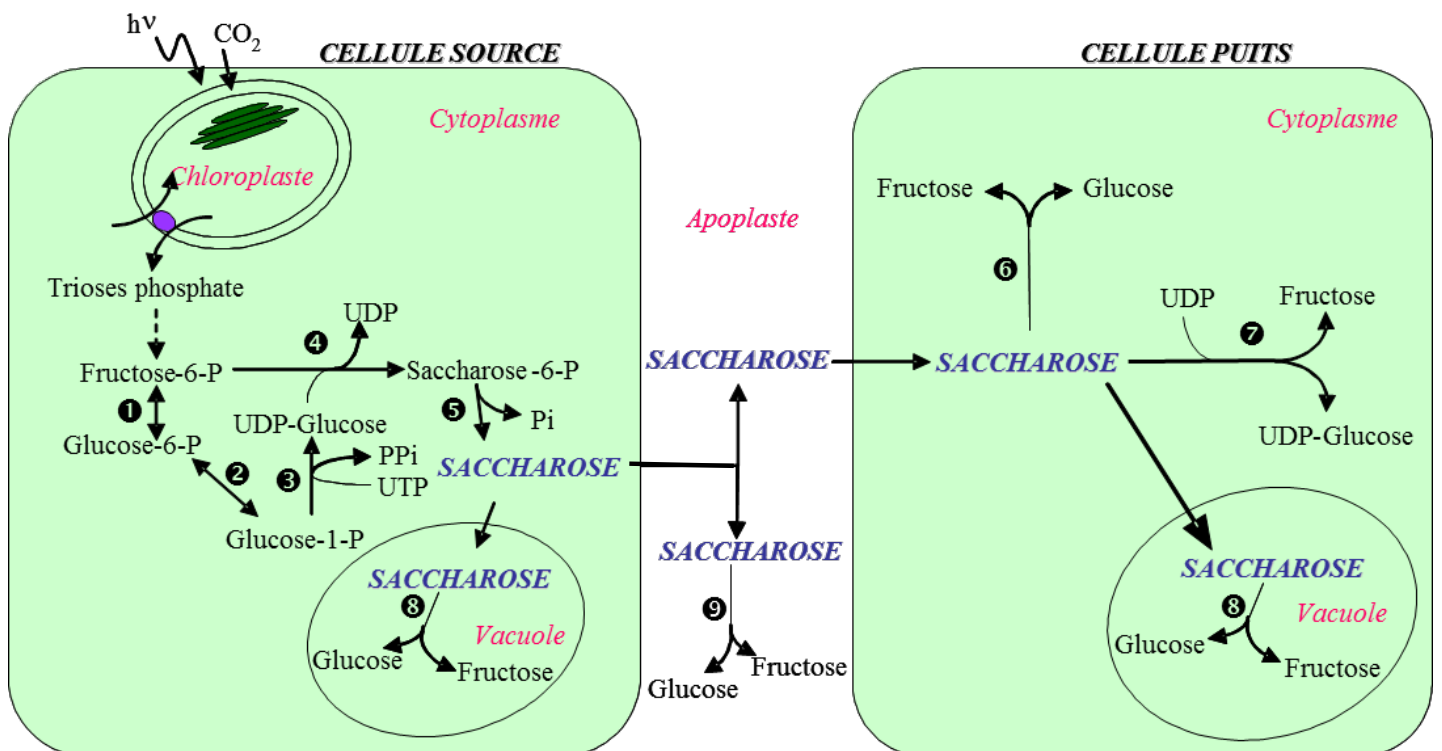


Figure II.14: Métabolisme du saccharose dans une cellule photosynthétique (cellule source) et dans une cellule non photosynthétique (cellule puits). Les numéros correspondent aux principales enzymes: ① hexose phosphate isomérase, ② phosphoglucomutase, ③ UDP-glucose pyrophosphorylase, ④ saccharose-phosphate synthase (SPS), ⑤ saccharose-phosphate phosphatase (SPP), ⑥ invertase cytosolique, ⑦ saccharose synthase (SuSy), ⑧ invertase vacuolaire, ⑨ invertase pariétale.

B.4. Le carbone de transfert

B.4.a. Le saccharose

Le principal sucre transporté chez les végétaux supérieurs est le saccharose (β -D-fructofuranosyl-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-glucopyranoside, **Figure II.13**), même s'il existe des exceptions comme par exemple dans les feuilles d'Agave (*Agave deserti*), où des oligofructanes s'accumulent dans les tissus vasculaires et se retrouvent dans l'exsudat phloémique (Wang et Nobel, 1998). **Par contre, chez le Ray-grass anglais, il n'y a pas de fructanes dans les exsudats phloémiques si bien qu'ils ne représentent pas une forme de transport du carbone chez cette espèce (Amiard et al., 2004).**

B.4.b. Localisation et métabolisme

Le saccharose est formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose, reliées par une liaison osidique β 2-1. Le saccharose est un produit dérivé de la photosynthèse, ayant lieu dans les feuilles. Il est synthétisé dans le cytosol des cellules photosynthétiques, à partir des trioses phosphate issus de la photosynthèse et exportés des chloroplastes (Stitt et al., 1987). Les trioses phosphate sont convertis en fructose-6-phosphate, puis en UDP-glucose à partir desquels se forme le saccharose-6-phosphate grâce à une saccharose phosphate synthase (SPS, EC 2.4.1.14, **Figure II.14**). Par la suite, la saccharose phosphatase (SPP, EC 3.1.3.24) conduit au saccharose. En présence de saccharose synthase (SuSy, EC 2.4.1.13), le saccharose est hydrolysé en UDP-glucose et en fructose. Un autre groupe d'enzymes, les invertases (EC 3.2.1.26), permet l'hydrolyse du saccharose en glucose et en fructose. Ces deux catégories d'enzymes hydrolytiques diffèrent notamment par leur localisation tissulaire. Ainsi, dans les méristèmes et les tissus jeunes, la SuSy prédomine. Par contre, dans les tissus différenciés, comme les organes de réserve, les invertases sont majoritaires. Néanmoins, il existe des exceptions comme le tubercule de Pomme de terre où la SuSy est dominante (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). **Chez les espèces accumulatrices de fructanes, le saccharose est le substrat de fructosyltransférases qui transfèrent le fructose du saccharose sur du saccharose ou des fructanes. Les réactions seraient vacuolaires et ont principalement lieu dans les cellules puits (Ritsema et Smeekens, 2003).**

Différentes classes existent pour chacune de ces enzymes du métabolisme du saccharose. Ainsi, chez les Dicotylédones, trois familles géniques (A, B et C) ont été identifiées pour la SPS (Langerkämper et al., 2002). Récemment, une quatrième famille

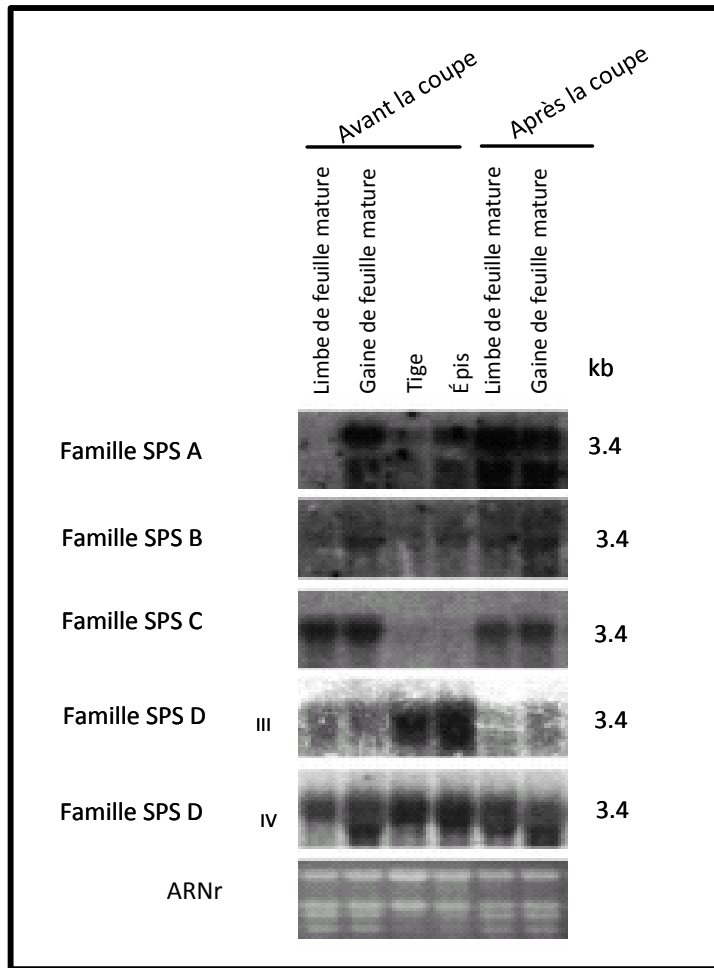


Figure II.15: Analyse des niveaux de transcrits des différents gènes SPS (A, B, C, D_{III}, D_{IV}) chez le Blé (*Triticum aestivum* L.) par northern blot. Les ARN ont été extraits dans différents tissus (limbes, tige, épis, gaines) à partir de plantes non défoliées et défoliées (Castelden *et al.*, 2004).

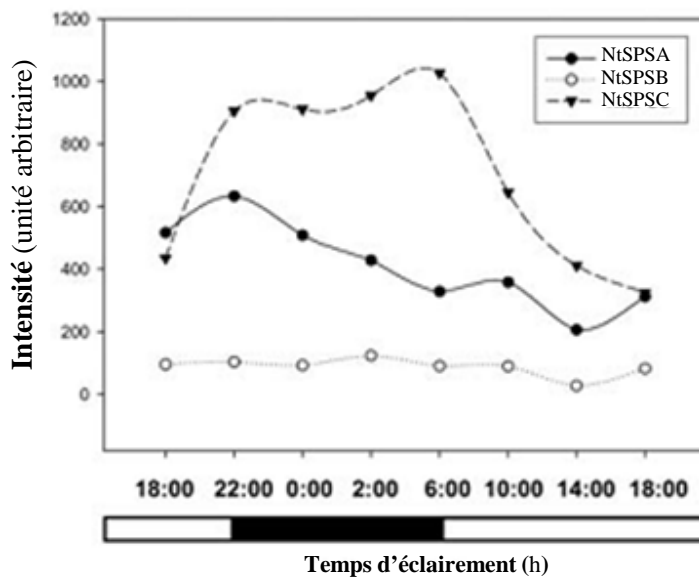


Figure II.16: Changements nycthéméraux de l'expression (intensité relative) des trois saccharose phosphate synthase (NtSPSA, NtSPSB, NtSPSC) dans des feuilles sources (matures) de Tabac (*Nicotiana tabacum* L.; Chen *et al.*, 2005).

(D), elle-même divisée en deux sous-classes, a été mise en évidence chez les Poacées (Castelden *et al.*, 2004). Ces familles géniques se distinguent par des profils d'expression temporelle et spatiale différents (Figure II.15). Une étude menée sur le Riz (*Oryza sativa*), l'espèce modèle des Monocotylédones (la plus proche du Ray-grass anglais), a permis d'identifier six gènes codant la SuSy. Il a été démontré par des alignements multiples de séquences que ces six isoformes SuSy peuvent être classifiées parmi les trois familles SuSy proposées : Sus1, SusA et New Group (Hirose *et al.*, 2008). Dans le cas des invertases, plusieurs isoformes permettent d'avoir des invertases adaptées à chaque type de compartiment. Ainsi les invertases sont vacuolaires, pariétales ou encore cytosoliques. Par exemple, l'invertase pariétale a un pH optimal de fonctionnement de 4,5. Elle est ainsi adaptée au faible pH de la paroi (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998).

Le contrôle de la synthèse du saccharose dans les cellules source a été largement étudié et repose notamment sur une régulation coordonnée entre la fructose-1,6-bisphosphatase cytosolique et la SPS. Selon les connaissances actuelles sur la régulation de la SPS, l'état de phosphorylation de la protéine est le facteur clé de l'activité enzymatique (Comparot *et al.*, 2003). En effet, trois sites de phosphorylation ont été identifiés : Ser¹⁵⁸, Ser²²⁹ et Ser⁴²⁴. A l'obscurité, la SPS est phosphorylée et inactive. Lors d'une illumination, la SPS est déphosphorylée et l'activité enzymatique croît avec l'intensité photosynthétique. Lorsque le site Ser²²⁹ est phosphorylé, une interaction entre la SPS et la protéine 14.3.3, facteur général de régulation propre aux eucaryotes, est possible. Ce complexe conduit à l'inhibition de la SPS ce qui entraîne une interruption de la voie de synthèse du saccharose. La protéine 14.3.3 permet également la dégradation de la SPS en se liant ensuite au protéasome (Comparot *et al.*, 2003). Une régulation génique s'observe également pour les gènes codant la SPS. Ainsi, chez le Tabac, les taux de transcrits *NtSPSC* augmentent à l'obscurité tandis que les transcrits des autres isoformes (*NtSPSA*, *NtSPSB*) ne montrent pas de changements diurnes. Ces résultats suggèrent que l'isoforme *NtSPSC* serait spécifiquement impliquée dans la synthèse du saccharose lors de la mobilisation de l'amidon à l'obscurité (Chen *et al.*, 2005 ; Figure II.16).

Le contrôle de la dégradation du saccharose a également été étudié. Ainsi, chez la Carotte, les transcrits *SusyDc1* sont présents dans les tiges et dans les racines aux différents stades de développement. Par contre, les transcrits *SusyDc2* sont localisés dans les fleurs. Ces profils d'expression suggèrent un rôle de l'enzyme dans l'utilisation du saccharose pour la croissance (Sturm *et al.*, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus pour des transcrits codant des invertases pariétales et vacuolaires (Tymowska-Lalanne et Kreis,

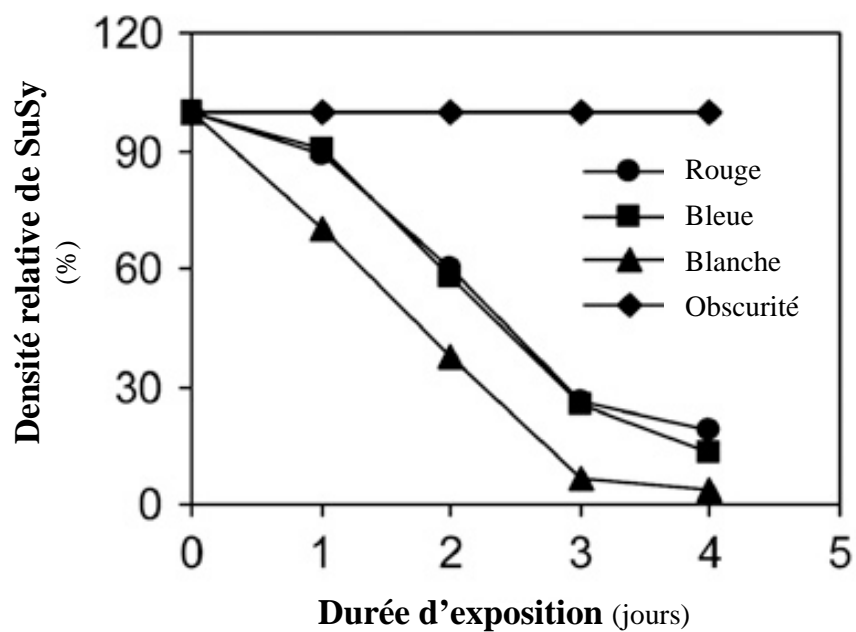


Figure II.17: Densitométrie des spots d'un immunoblot avec des anticorps dirigés contre la SuSy de Maïs (ZmSUS1) dans des conditions d'éclairage variées (lumière blanche ▲; rouge ●; bleue ■) chez les feuilles émergentes issues de graines cultivées pendant 7 jours à l'obscurité. Les valeurs sont exprimées (en %) en prenant comme référence les valeurs obtenues (pour chaque jour) pour le traitement laissé à l'obscurité (◆, 100%; Qiu *et al.*, 2007).

1998). Récemment chez le Maïs, il a été explicité que la dégradation de la SuSy pouvait être liée au phénomène d'arrêt de l'étiollement, et donc du changement de statut de tissu puits en tissu source de carbone (Qiu *et al.*, 2007). Bien que les auteurs n'explicitent pas totalement cette dégradation, ils suggèrent que cette dernière permet de fournir en acides aminés la fabrication de nouvelles protéines en raison du changement des relations puits - source.

Des stress abiotiques comme la sécheresse et le stress salin affectent également le métabolisme du saccharose. Ainsi, dans des feuilles d'Epinard (*Spinacia oleracea*), un stress hydrique conduit à une accumulation de saccharose due à une activité SPS accrue grâce à la phosphorylation de la Ser⁴²⁴ (Comparot *et al.*, 2003). A l'inverse, dans des feuilles de Maïs (*Zea mays*), un stress hydrique se traduit par une nette accumulation d'hexoses corrélée à une induction de l'activité de l'invertase vacuolaire (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). Toujours chez le Maïs, un éclairage suite à un longue obscurité est également un stress abiotique pouvant entraîner la dégradation de la SuSy (Qiu *et al.*, 2007 ; Figure II.17). Lors d'une acclimatation au froid, les activités SPS et SuSy augmentent conjointement à une accumulation de saccharose dans les tiges et les feuilles de Ray-grass anglais (Bhownik *et al.*, 2006).

B.4.c. Rôles

Chez le Ray-grass anglais, le saccharose est étudié car il est la forme soluble de transport de carbone majoritaire (Amiard *et al.*, 2004).

Le saccharose occupe un rôle central dans le métabolisme cellulaire des végétaux supérieurs. Ce rôle crucial impose que sa synthèse et sa dégradation soient parfaitement ajustées au besoin de la plante à tout moment.

Le saccharose est d'une manière générale considéré comme la forme de transport du carbone tout comme les fructanes et l'amidon sont les principales formes de stockage de carbone. Cependant, il est possible que le saccharose soit une forme de réserve chez certaines espèces telles que la Betterave sucrière (hypocotyle tubérisé), la Canne à sucre (moelle des chaumes) et l'Erable du Canada (sève brute), espèces qui sont très largement cultivées par l'homme.

Le saccharose peut également avoir un rôle dans la tolérance aux stress. Ainsi, il peut être utilisé pour l'ajustement osmotique lors de la tolérance aux stress abiotiques. Un phénomène bien connu chez la plante de la résurrection (*Craterostigma plantagineum*) soumise à une sécheresse où la dessiccation des feuilles s'accompagne d'une conversion

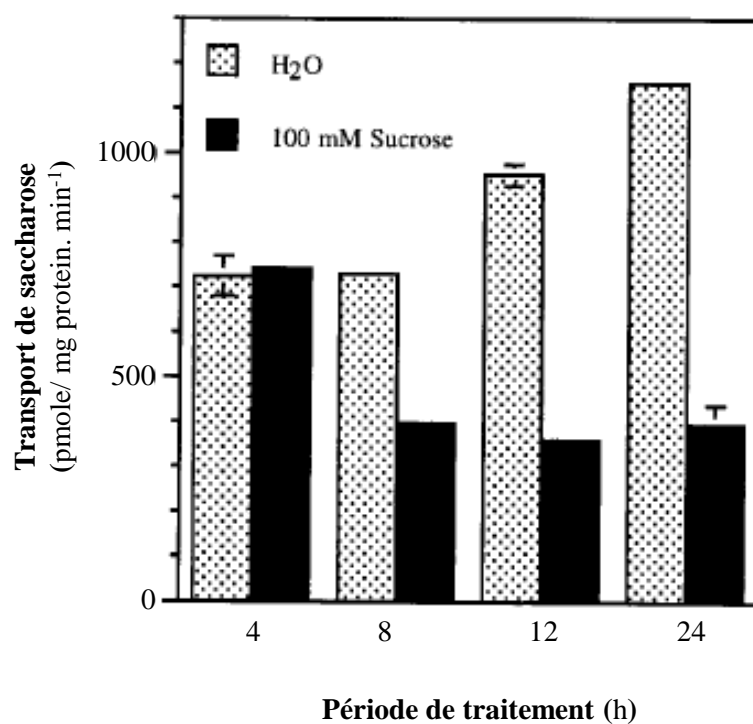


Figure II.18: Activité du transport de saccharose dans des vésicules de plasmalemme, réalisées à partir de feuilles de Betteraves sucrières, traitées pendant 4, 8, 12, ou 24h avec de l'eau (▨) ou 100 mM de saccharose (■) (Chiou and Bush, 1998).

du principal glucide, le 2-octulose (90% des glucides totaux) en saccharose (Bianchi *et al.*, 1991).

Le rôle du saccharose pour la transduction de signal est soumis à polémique. **Le saccharose étant le principal photoassimilat glucidique chez les plantes, il n'est donc pas impossible qu'il joue un rôle dans la signalisation glucidique.** De nombreux gènes répondant aux changements de la concentration en saccharose sont également affectés par la concentration en glucose, ce qui laisse penser que l'effet saccharose serait lié au glucose après l'hydrolyse du saccharose (Koch, 1996). Cependant, dans quelques cas, seul le saccharose modifie l'expression génique comme le gène de la patatine I qui est induit dans les cellules de Tabac en culture (Smeekens et Rook, 1997). **Un autre exemple est la régulation par le saccharose d'un transporteur de saccharose (Chiou et Bush, 1998 ; Figure II.18).** Ces auteurs ont montré en utilisant des vésicules de plasmalemmes de feuilles de Betteraves sucrières excisées que le transport de saccharose est inhibé de 65% par rapport au témoin lorsque les feuilles excisées ont été incubées en présence de 100 mM de saccharose. Par contre, dans les mêmes conditions, le transport de glucose ou d'alanine n'est nullement affecté, ce qui suggère une action spécifique sur l'absorption de saccharose. Afin de s'assurer que seul le signal saccharose conduit à cette inhibition du transport du saccharose, l'effet du glucose et du fructose sur l'activité de transport de saccharose a été testé. Une diminution du transport de 30% seulement a été constatée avec l'un ou l'autre des hexoses, ou avec les deux. L'hexokinase quant à elle, n'intervient pas comme détecteur dans cette voie de signalisation car l'incubation en présence de mannoheptulose 10 mM, un inhibiteur de l'hexokinase qui bloque la voie médiée par les hexoses, n'a pas d'effet.

En résumé, plusieurs rôles peuvent être attribués au saccharose : source d'énergie, forme de stockage, tolérance aux stress ou perception du signal sucre, forme de transport. Bien que le saccharose constitue le principal photoassimilat, il peut se trouver associé à des oligosaccharides ou des polyols chez de nombreuses espèces.

B.4.d. Le système de circulation

Après synthèse dans les cellules mésophylliennes des feuilles, une partie du saccharose est transporté vers les différents organes puits de la plante, où il sera alors métabolisé. Les photoassimilats sont chargés dans le phloème avant d'être transportés à longue distance. Ce processus appelé, chargement du phloème, peut être réalisé selon deux voies (Lalonde *et al.*, 2003) que nous allons détailler dans ce troisième chapitre.

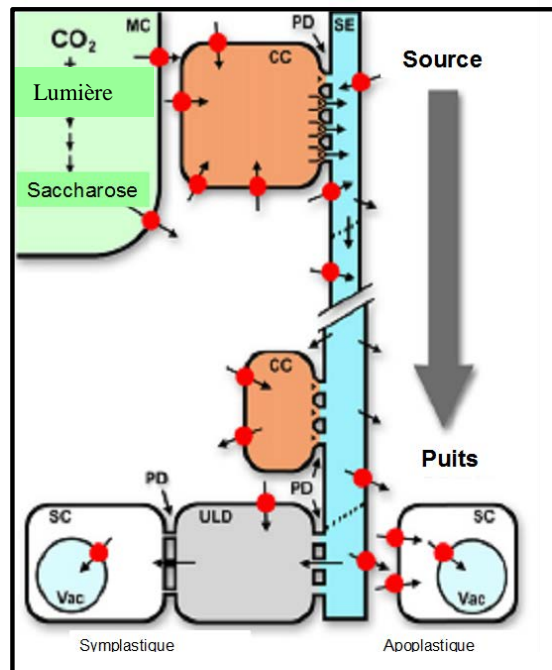


Figure II.19: Schéma représentant le chemin des molécules de saccharose d'une cellule du mésophylle par la voie symplastique et apoplastique, partant ainsi d'une cellule de tissu source vers une cellule de tissu puits (flèche grise, à droite). Les ronds rouges représentent les transporteurs de saccharose au sein des différentes membranes cellulaires et les flèches indiquent la direction du transport de saccharose. **SE** : tubes criblés du phloème; **CC** : cellule compagne; **MC** : cellule du mésophylle; **PD** : plasmodesme ; **SC** : cellule puits ; **ULD** : domaine de déchargement ; **Vac** : vacuole (Sauer, 2007).

Comme nous venons de le voir, la défoliation sous ses différents aspects (intensité, fréquence) peut provoquer des réponses morphologiques (ex : nombre de talles) et des réponses physiologiques (arrêt de l'absorption racinaire, mobilisation des réserves carbonées). Cependant, chez les espèces Poacées prairiales tel que le Ray-grass anglais, les organes et les mécanismes physiologiques impliqués semblent parfaitement adaptés à la défoliation. En effet, leurs réponses à ce phénomène sont adaptées à la sévérité de la coupe et permettent une repousse rapide de l'individu. Au regard de ces données, outre le mécanisme primordial de la dégradation des fructanes, il apparaît que l'étape de la mobilisation des réserves et donc du transport soit essentielle afin de rapidement alimenter en carbone les tissus puits. Ce transport du carbone fait l'objet d'études approfondies depuis un certain nombre d'années. Cependant, il est encore mal compris pour des espèces prairiales tel que le Ray-grass anglais. C'est pourquoi nous nous efforcerons de rassembler les informations concernant le transport de saccharose au sein de la plante et ainsi permettre de répondre à un certain nombre de questions sur l'incidence du transport de saccharose durant la repousse ou si ce transport peut se révéler limitant pour la repousse.

C. Les mécanismes du transport du saccharose

C.1. Le transport des photoassimilats chez les végétaux supérieurs

Au sein des feuilles matures, le transport et le chargement de produits photosynthétiques, depuis le chloroplaste des cellules du mésophylle vers les tubes criblés du phloème, impliquent plusieurs étapes dont le saccharose est généralement la forme de transport préférentielle chez les végétaux (Oparka et Santa Cruz, 2000).

Tout d'abord, le saccharose est synthétisé dans une cellule assimilatrice du mésophylle d'une feuille mature (*i.e.* source) et il subit un transport latéral jusqu'à proximité du complexe conducteur. En effet, le saccharose est généralement la forme de transport de carbone au sein du phloème. Ce transport (appelé chargement du phloème) peut-être réalisé par la voie symplastique et/ou la voie apoplastique (**Figure II.19**) :

- Lors d'un transport *via* le symplasma (compartiment défini comme l'espace intracellulaire limité extérieurement par le plasmalemma), les photoassimilats comme le saccharose passent d'une cellule à l'autre par les plasmodesmes (Madore *et al.*, 1986).

- Lors d'un transport apoplastique, les sucres entrent dans le compartiment extracellulaire à proximité directe de l'élément conducteur. Le mécanisme de l'efflux du saccharose de la cellule compagne et/ou l'élément criblé par un système de co-transport H^+ /saccharose (Williams *et al.*, 2000). Ainsi, dans les feuilles sources, les sucres sont plus concentrés dans les cellules compagnes et les éléments criblés que dans le mésophylle (Geiger, 1975). Ce transport est de type symport H^+ /saccharose et l'énergie nécessaire est fournie par le gradient de protons généré par une ATPase pompe à protons. Les mécanismes de transport d'autres molécules sont mal connus, mais des systèmes de transport pour les acides aminés ont été découverts (Williams *et al.*, 1996). Une fois dans l'élément criblé, le saccharose et les autres solutés sont alors ensuite transportés selon un transport longitudinal (*i.e.* de longue distance) vers les organes puits.

Ce transport longitudinal au sein du phloème entre les organes sources et les organes puits est un mécanisme qui s'effectue par un flux de masse (Münch, 1930). La sève élaborée s'écoule en suivant un gradient osmotique généré entre le lieu de chargement en assimilats au niveau des organes sources et le lieu de déchargement au niveau des organes puits suivant une voie descendante ou ascendante selon l'emplacement respectif des organes sources et des organes puits. Au niveau des organes sources, le chargement du phloème génère une forte accumulation des solutés dans le tube criblé entraînant une chute du potentiel hydrique. L'eau entre alors activement dans le phloème et engendre une augmentation de la pression de turgescence. Cependant, la paroi épaissie du tube criblé résiste à la pression de turgescence et empêche la déformation de la cellule. Cette pression pousse l'eau et les solutés hors de l'élément criblé et un courant de sève va se former tout au long des tubes criblés, et ce jusqu'aux tissus puits. Dans ces derniers, le déchargement des solutés hors du phloème conduit à une élévation du potentiel hydrique par rapport au xylème, ce qui fait sortir l'eau des cellules du phloème et diminue la pression osmotique. Ces différences de potentiel hydrique entre les organes sources et puits conduisent au mouvement de la sève en flux de masse (**Figure II.19**).

Enfin, **le transport latéral (appelé déchargement du phloème) vers les organes puits (racines ou jeunes feuilles en développement/ repousse, tissus de stockage, organes de reproduction et de dispersion comme les fruits et les graines) peut**

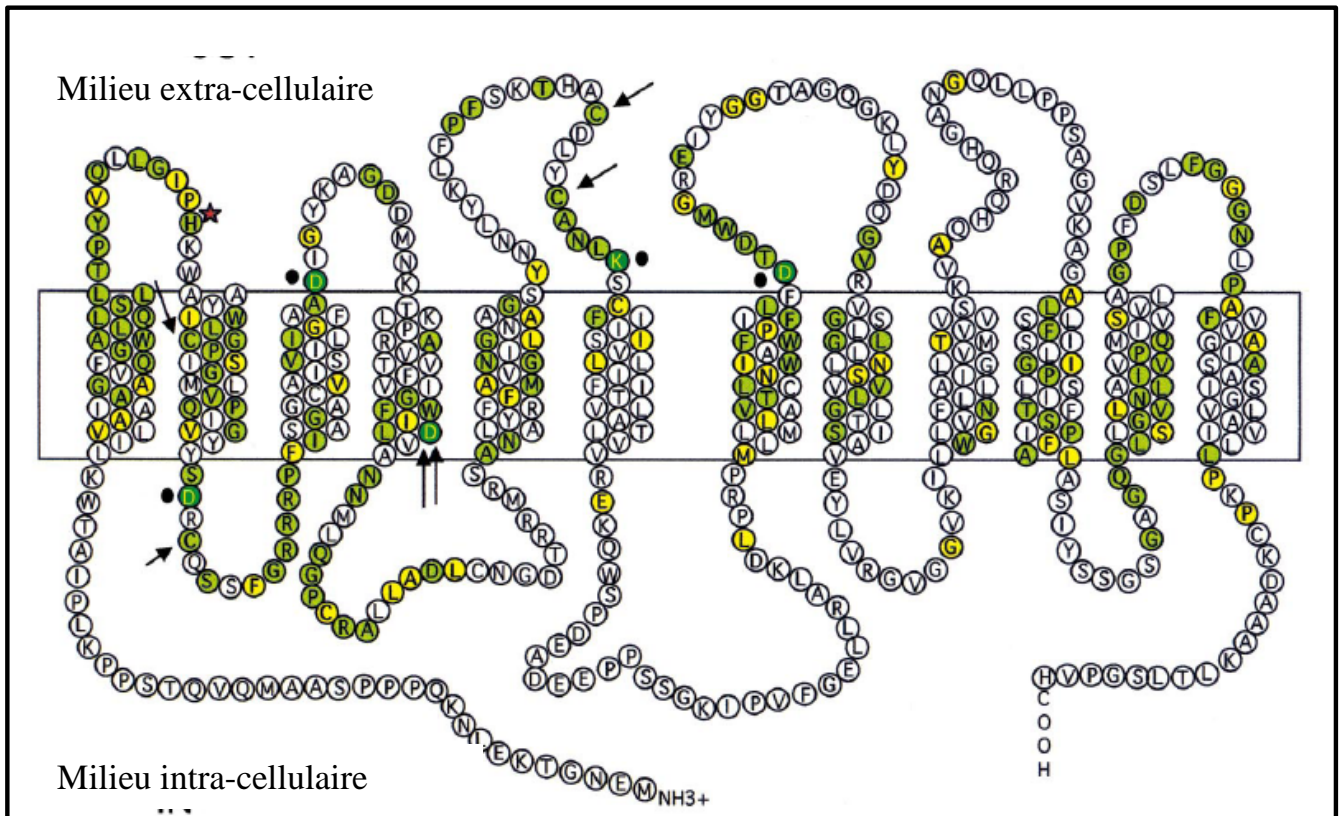


Figure II.20: Tentative de prédiction de la protéine AgSUT1 du Céleri (*Apium graveolens* L.). Les segments transmembranaires ont été prédits grâce au logiciel HMMTOP qui se base sur une comparaison différentielle des séquences de transporteurs de saccharose fonctionnels (Tusnady et Simon, 1998). L'alignement de séquences a été réalisé avec le programme Multialin de pbil.univ-lyon1.fr (Corpet, 1988). Les résidus peptidyl (cercle vert) sont conservés dans toutes les séquences. Les résidus de cystéine conservés sont indiqués par une flèche et les résidus chargés (+ ou -) proches des segments transmembranaires sont indiqués par un point noir. Le résidu asparagine localisé dans un segment transmembranaire est indiqué par une double flèche et le résidu histidine 65, qui a été le sujet d'une étude de mutagenèse est indiqué par une étoile. (Lu et Bush, 1998; Lemoine, 2000).

s'effectuer par les voies apoplastique et symplastique sans qu'elles soient exclusives l'une de l'autre (Oparka et Van Bel, 1992).

- Le déchargement du phloème est généralement symplastique dans les jeunes feuilles et les racines en croissance, et dans les organes dans lesquels le saccharose est finalement stocké sous forme de polymères de sucres.

- Pour le déchargement apoplastique du phloème, les sucres doivent traverser au moins deux membranes (celle de la cellule criblée et celle de la cellule puits) et lorsque les sucres sont transportés dans la vacuole, ils doivent aussi traverser le tonoplaste (Taiz et Zeiger, 1998). Une invertase pariétale acide peut métaboliser le saccharose en hexoses dans l'apoplaste. En effet, les tissus puits contiennent de nombreux transporteurs de monosaccharides ce qui supporte l'existence possible de cette voie (Williams *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces données montre que le transport des sucres des tissus sources vers les tissus puits est médié par le saccharose *via* la présence de transporteurs membranaires spécifiques du saccharose appelés SUT (SUcrose Transporters). Ces protéines semblent être au centre du système d'acheminement du carbone vers les tissus puits. Notre problématique s'intéressant à la capacité de repousse des tissus puits suite à la défoliation, il est judicieux de préciser les caractéristiques de ces protéines de transport du saccharose.

C.2. Les protéines membranaires du transport de sucres

Les transporteurs de saccharose font partie de la superfamille des falcitateurs (MFS ; Lemoine, 2000). Les protéines de cette superfamille possèdent 12 domaines transmembranaires (Figure II.20), segments membranaires qui ont une configuration en hélices- α . Cette vieille famille étant apparue chez les Procaryotes, il est considéré que ces transporteurs sont des protéines issues de la duplication et la fusion de gènes primordiaux codant auparavant une protéine à six domaines transmembranaires. C'est pourquoi les six premiers domaines possèdent de fortes similitudes avec les six derniers domaines, ces domaines étant reliés par une boucle cytoplasmique centrale plus importante que les autres domaines hydrophiles. Cette théorie a été établie, grâce à l'étude de la lactose perméase, protéine appartenant à la MFS chez *E. coli*. En effet, cette protéine résultant de l'expression de plusieurs promoteurs, les résultats de cette expression sont ensuite assemblés au sein de la membrane pour former la lactose perméase. Les membres

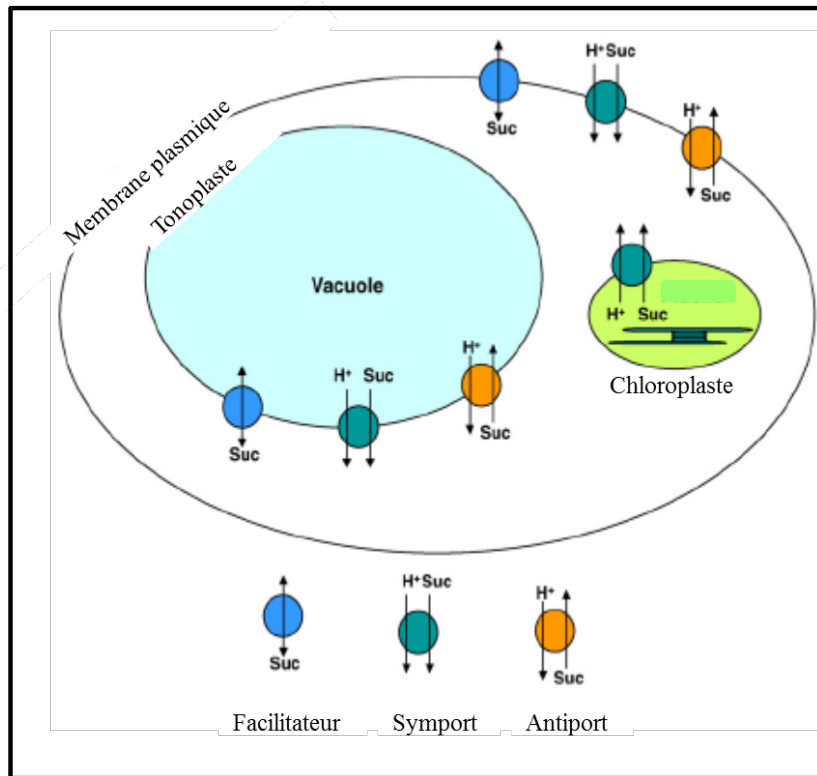


Figure II.21: Localisation intracellulaire des protéines de transport du saccharose. Ces localisations sont obtenues par mise en évidence à l'aide de marqueurs génétiques, d'immunolocalisation et d'analyses biochimiques. Suc : saccharose (Kühn and Gröf; 2010).

de cette superfamille peuvent être des uniports, des symports et des antiports et sont capables de transporter un bon nombre de métabolites (Figure II.21). **Ainsi, les transporteurs de saccharose se rapprochent des transporteurs d'hexoses des plantes mais également des mousses, des champignons, des animaux et des bactéries.** L'origine évolutive des protéines de transport du saccharose a ainsi pu être identifiée chez des végétaux tels que des lycophytes (*Selaginella lepidophylla*) et des mousses comme *Physcomitrella patens*.

Cependant, l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ne possède pas de transporteurs de saccharose. La complexité croissante de l'architecture et de la spécialisation des cellules des végétaux supérieurs est peut être à l'origine de l'apparition des transporteurs de sucres spécifiques et spécialisés tels que les transporteurs de saccharose. En effet, l'apparition d'organes spécialisés (fleurs, tubercules) fait que le carbone produit au niveau des cellules sources photosynthétiques doit être acheminé par de multiples membranes avant d'arriver au sein des cellules puits.

C.2.a. Transport de saccharose

i) Identification

Dans les années 70, un certain nombre d'études ont conduit la communauté scientifique à l'idée que le chargement phloémien pourrait impliquer un transport actif de saccharose depuis l'apoplaste vers les fines nervures des feuilles (Sovonick *et al.*, 1974). Les résultats obtenus *via* des disques foliaires, des vésicules de plasmalemmes montrent que le transport de saccharose est saturable, électrogénique, spécifique du saccharose et dû à une protéine qui nécessite une force proton motrice pour réaliser un co-transport proton/saccharose (Komor, 1977 ; Delrot, 1981 ; Bush, 1989).

Différentes approches expérimentales ont été employées pour identifier le symport proton/saccharose. Un marquage par photoaffinité a permis d'isoler une protéine impliquée dans le transport de saccharose mais qui est dépourvue des régions membranaires caractéristiques des protéines intégrales intervenant dans le transport (Ripp *et al.*, 1988 ; Grimes *et al.*, 1992). Un marquage différentiel a permis l'identification d'un ensemble de polypeptides de 42 kDa qui correspondrait au transporteur de saccharose ou à une partie de cette molécule. Toutefois, l'hétérogénéité de la fraction de 42 kDa n'a pas permis d'identifier le transporteur au niveau moléculaire.

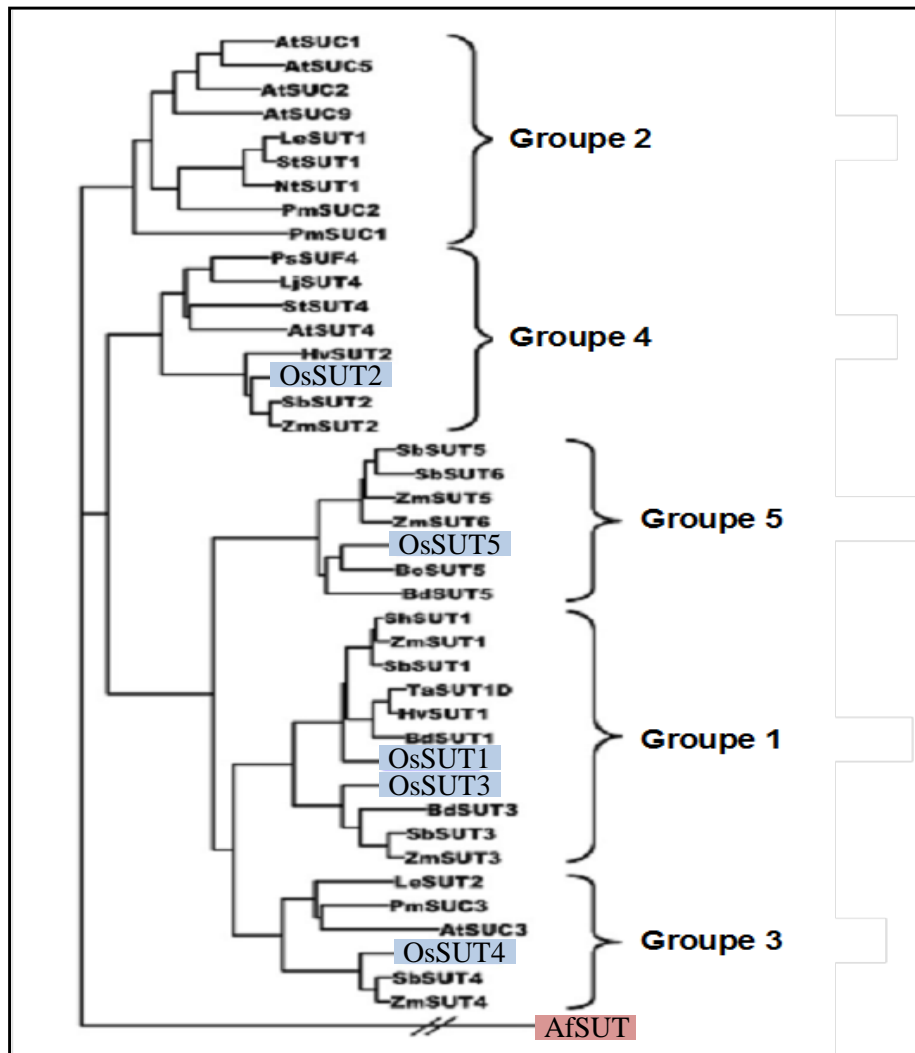


Figure II.22: Arbre phylogénétique représentant les transporteurs de saccharose identifiés chez les poacées ainsi que chez certaines dicotylédones. L'arbre est créé grâce au logiciel PHYLIP. Il est basé sur l'alignement des séquences protéiques de chaque transporteur par comparaison au transporteur de saccharose de *Aspergillus fumigatus* (*AfsUT*, surlignage bordeaux). Les transporteurs de saccharose chez le Riz (*Oryza sativa* L.) servant à former les groupes sont surlignés en bleu (Braun *et al.*, 2009).

Afin d'isoler le premier ADNc codant un transporteur de saccharose, une approche génétique basée sur la complémentation de levures mutantes a tout d'abord été utilisée au début des années 90. En transformant des souches de levures mutantes dépourvues d'invertase pariétale (YSH INV8 et YSH SUSY7) avec une banque d'ADNc de feuilles d'Épinard, un ADNc appelé *SoSUT1* (*Spinacea oleacera* SUCrose Transporter 1) fut isolé (Riesmeier *et al.*, 1992). Par la suite, la technique de criblage de banque d'ADNc par hybridation de sondes moléculaires homologues ou hétérologues a été principalement utilisée et a permis de cloner de nombreux ADNc codant des transporteurs de saccharose aussi bien chez les Dicotylédones que chez les Monocotylédones. Plusieurs transporteurs de saccharose co-existent au sein d'une même famille. Ainsi, chez *Arabidopsis*, 9 gènes codant des transporteurs de saccharose ont été recensés tandis que chez le Riz, seuls 5 gènes l'ont été (*Arabidopsis initiative genome 2000* ; Aoki *et al.*, 2003). Le séquençage complet du génome d'autres espèces a permis d'identifier de nouveaux gènes notamment chez le Maïs (*Maize genome project*), le Sorgho (*Sorghum genome project*) et *Brachypodium sp.* (*Brachypodium genome project* ; Braun et Slewinski, 2009). **A l'heure actuelle, aucun transporteur de saccharose n'a été identifié chez le Ray-grass anglais.** Cependant, ces protéines ubiquistes des Angiospermes ont un rôle prépondérant dans la fourniture en carbone des tissus sources vers les tissus puits. Chez le Ray-grass anglais, **ces protéines seraient des candidats sérieux à l'explication des bonnes capacités de repousse du Ray-grass anglais.** C'est pourquoi nous allons nous attacher à développer chaque groupe de cette famille multigénique que sont les transporteurs de saccharose, de manière à apporter **des éléments de réponse à une meilleure compréhension du phénomène de fourniture en carbone sous forme de saccharose lors de la repousse chez *Lolium perenne* L.** Nous allons maintenant détailler les différents groupes de transporteurs identifiés et caractérisés chez les Monocotylédones et les Dicotylédones en nous basant sur la classification établie par Kuhn et Gröf, 2010 (**Figure II.22**).

ii) Les transporteurs de saccharose du groupe 1

Les transporteurs du groupe 1 sont uniquement présents chez les Dicotylédones. Plusieurs transporteurs de saccharose identifiés chez *Arabidopsis thaliana* L. appartiennent à ce groupe. Chez cette espèce, les SUT semblent impliqués dans le chargement du phloème. Ainsi, les transcrits *AtSUC2* et la protéine *AtSUC2* sont exprimés dans les cellules compagnes des veines secondaires lors de la transition de tissus puits en tissus sources au niveau des feuilles (Truernit et Sauer, 1995 ; Stadler et Sauer,

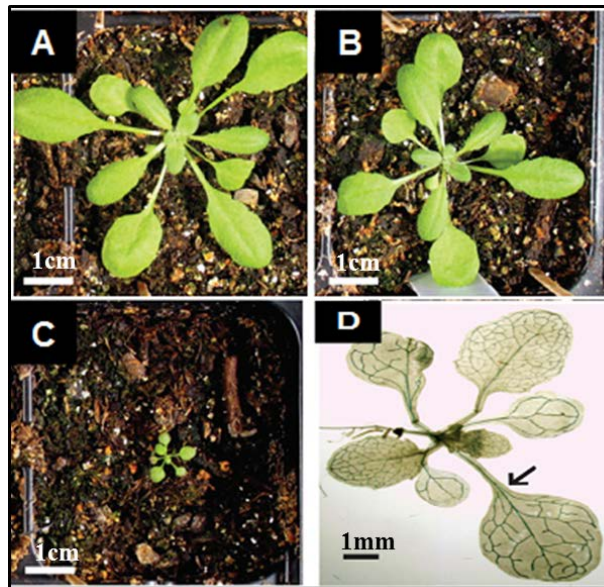


Figure II.23: Plants d'*Arabidopsis thaliana* L. transformés et âgés de 21 jours et homozygotes pour le gène *AtSUC2* (+: valide; -: invalide). (A) *+/+* croissance normale, (B) *+/-* croissance réduite, (C) *-/-* croissance nulle. (D) Expression du gène XGal (coloration bleue) sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* dans un plant d'*Arabidopsis thaliana* L. âgé de 21 jours. Le marquage (flèche; D) met en avant une expression de *AtSUC2* au sein du complexe vasculaire. (Srivastava *et al.*, 2008).

1996 ; Wright *et al.*, 2003). De plus, la protéine AtSUC2 a une affinité pour le saccharose qui est en accord avec son rôle dans le chargement du phloème par l'apoplaste (Chandran *et al.*, 2003). Enfin, des mutants d'insertion du transporteur de saccharose AtSUC2 présentent une exportation de saccharose réduite dans les feuilles qui accumulent les glucides. Par conséquent, la croissance est plus lente et la floraison retardée (Gottwald *et al.*, 2000 ; Srivastava *et al.*, 2008 ; Figure II.23). L'ensemble de ces données montre que la protéine AtSUC2 a pour rôle la distribution des photoassimilats en assurant le chargement de saccharose dans les veines secondaires des feuilles (Srivastava *et al.*, 2008). Des phénotypes similaires ont été observés à l'aide de constructions d'ARN antisens *SUT1* de différentes Solanacées (*Solanum tuberosum*, (Riesmeier *et al.*, 1994) ; *Nicotiana tabacum*, (Bürkle *et al.*, 1998) ; *Lycopersicon esculentum*, Hackel *et al.*, 2006). Là encore, il ressort que les transporteurs SUT1 de ces Dicotylédones interviendraient dans le chargement du phloème. Chez les Solanacées, les protéines SUT1 ont d'abord été localisées dans les membranes des tubes criblés (Kühn *et al.*, 1997 ; Barker *et al.*, 2000). Une étude récente a montré que les transporteurs de saccharose SUT1 chez le Tabac, la Pomme-de-terre et la Tomate sont localisés sur la membrane plasmique des cellules compagnes (Schmitt *et al.*, 2008).

iii) Les transporteurs de saccharose du groupe 2

Parmi les transporteurs de saccharose identifiés chez les Poacées, les protéines OsSUT4 et ZmSUT2 ont été cataloguées dans le groupe 2 au même titre que des transporteurs de saccharose de Dicotylédones comme AtSUT2 et LeSUT2 (Aoki *et al.*, 2003 ; Sauer, 2007). Les membres de ce groupe présentent quelques particularités. La boucle cytoplasmique centrale, située entre les 6^{ème} et 7^{ème} domaines transmembranaires, est constituée de 60 à 90 acides aminés tandis que chez les autres transporteurs de saccharose cette même région ne comprend que 30 à 40 acides aminés (Aoki *et al.*, 2003 ; Kühn et Grof, 2010). Chez les Dicotylédones, les protéines SUT2 présentent une faible affinité pour le saccharose avec des valeurs de K_M apparente de l'ordre de 4 à 20 mM (Sauer, 2007). Les transporteurs de saccharose SUT2 ont été localisés dans les membranes plasmiques des éléments criblés chez la Tomate (Barker *et al.*, 2000), le Plantain (Barth *et al.*, 2003) et *Arabidopsis* (Meyer *et al.*, 2004). Ils ont également été observés dans de nombreux organes puits (Barth *et al.*, 2003 ; Meyer *et al.*, 2004). Par ailleurs, chez des plantes d'*Arabidopsis*, le taux de transcrit du gène *AtSUC3/AtSUT2* augmente dans des tissus blessés (tiges et feuilles) pendant les 6 premières heures après l'excision (Meyer *et*

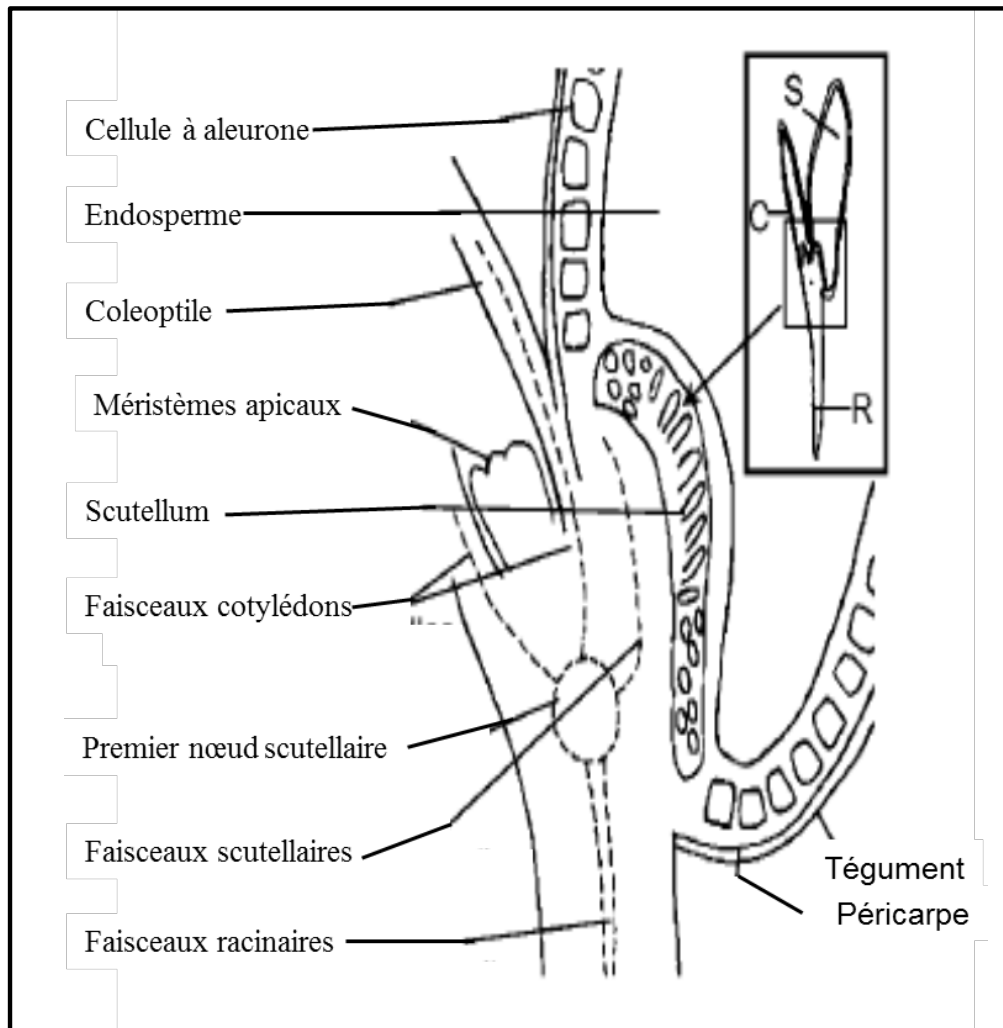


Figure II.24: Section longitudinale d'une plantule après trois jours de germination à partir d'une graine de Blé (*Triticum aestivum* L.), S; Graine; C; Coléoptile ; R; Radicelle. (Aoki *et al.*, 2006)

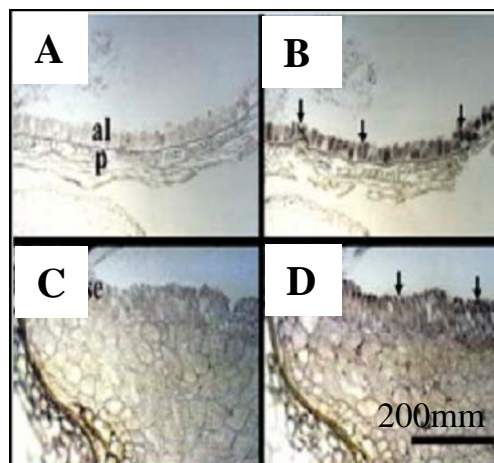


Figure II.25: Hybridation *in situ* des ARN *TaSUT1* sens (A, C) et anti-sens (B, D) sur une coupe longitudinale de graine de Blé (*Triticum aestivum* L.) après trois jours de germination. La révélation est faite grâce à la phosphatase alcaline permettant de distinguer une coloration bleue lorsqu'il y a eu liaison entre la sonde et le réactif. A et B représentent l'aleurone et le péricarpe. Les transcrits *TaSUT1* sont localisés dans les cellules de l'aleurone (flèches). C et D présentent une section de la région du scutellum. Le signal des transcrits de *TaSUT1* (flèches) se situe à la base des cellules du scutellum. al, Aleurone; p, pericarpe (Aoki *et al.*, 2006).

al., 2004). Chez le Riz, les transcrits *OsSUT4* sont principalement exprimés dans les feuilles puits (Aoki *et al.*, 2003). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la fonction de ces SUT chez les Poacées et les Dicotylédones (Braun et Slewinski, 2009).

iv) Les transporteurs de saccharose du groupe 3

Seulement présent chez les Monocotylédones, le groupe se subdivise en 2 classes, représentées respectivement par les transporteurs de saccharose OsSUT1 et OsSUT3 isolés chez le Riz (Hirose *et al.*, 1997 ; Aoki *et al.*, 2003).

A l'heure actuelle, la fonction des gènes *SUT3* est inconnue chez les Poacées (Braun et Slewinski, 2009). Le niveau d'expression des transcrits *OsSUT3* le plus élevé a été observé dans les feuilles puits de Riz (Aoki *et al.*, 2003). Cela suggère que le transporteur de saccharose OsSUT3 interviendrait dans l'approvisionnement en saccharose des organes source aux organes puits (Aoki *et al.*, 2003).

A l'inverse, les données sur les transporteurs de saccharose du type SUT1 ont fait l'objet de nombreuses études chez différentes Poacées. Chez les Monocotylédones, le premier gène codant un transporteur de saccharose a été isolé chez le Riz et nommé *OsSUT1* (Hirose *et al.*, 1997). Depuis, plusieurs gènes orthologues de type SUT1 ont été identifiés chez d'autres céréales telles que le Maïs (Aoki *et al.*, 1999), l'Orge (Weschke *et al.*, 2000), le Blé (Aoki *et al.*, 2002), la Canne à sucre (Rae *et al.*, 2005).

La capacité d'absorption du saccharose a été démontrée par une expression fonctionnelle dans les levures pour les transporteurs de saccharose OsSUT1 (Hirose *et al.*, 1997 ; Aoki *et al.*, 2003), HvSUT1 (Weschke *et al.*, 2000) et TaSUT1 (Aoki *et al.*, 2002). Pour d'autres transporteurs de saccharose comme HvSUT1 et ShSUT1, une spécificité élevée pour le saccharose a été observée en utilisant des oocytes de Xénope (Sivitz *et al.*, 2005, 2007).

Chez les Poacées, les transporteurs de saccharose ont surtout été étudiés lors du remplissage des graines. Ainsi, dans les caryopses de Riz, la protéine OsSUT1 a été localisée dans la membrane plasmique de la couche d'aleurone (Furbank *et al.*, 2001, Figure II.24) et est essentielle pour le transport des assimilats lors du remplissage des graines (Scofield *et al.*, 2002). Un rôle similaire a été proposé pour les protéines HvSUT1 d'Orge (Weschke *et al.*, 2000) et TaSUT1 de Blé (Bagnall *et al.*, 2000 ; Aoki *et al.*, 2002 ; Figure II.25). Cependant, le rôle des transporteurs de saccharose de type SUT1 chez les Poacées ne se limite pas là. En effet, les transcrits *SUT1* ont été détectés dans les tissus

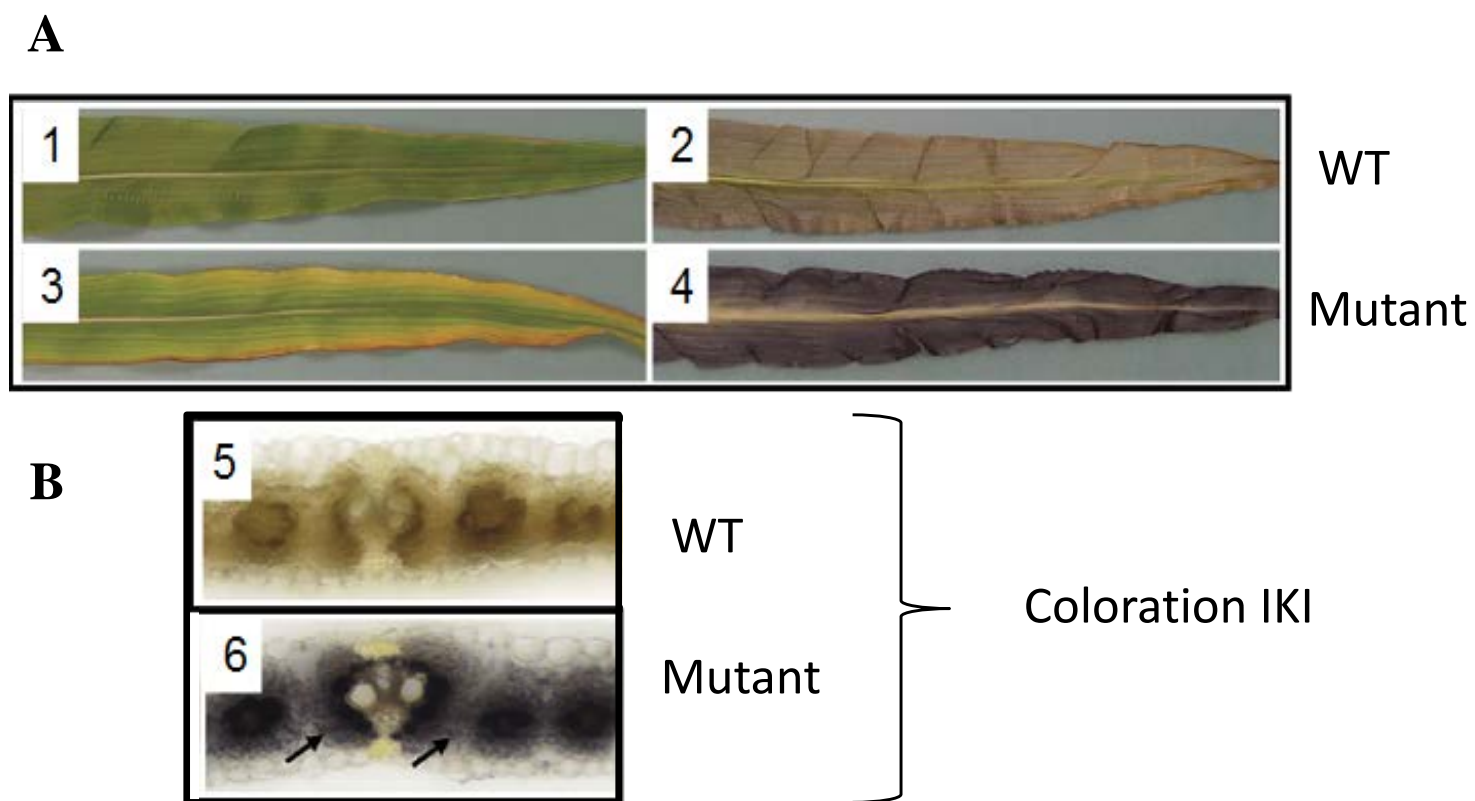


Figure II.26: (A) Feuille cinq de Maïs (*Zea mays* L.) sauvage (1 et 2) et Maïs mutant SUT1 (3 et 4). Les images 1 et 3 sont celles sans coloration à l'IKI (Iodide de potassium iodine) en lumière du jour, et permettent de voir la sénescence qui est plus avancée pour le mutant SUT1. Les images 2 et 4 présentent les résultats d'une coloration sur les feuilles cinq des deux individus. Il apparaît une forte accumulation d'amidon dans la feuille du mutant SUT1. (B) Coupes transversales (5 et 6) des feuilles 2 et 4 ayant un marquage à l'IKI. Les flèches montrent l'accumulation d'amidon dans les cellules du mésophylle et cette accumulation apparaît nettement plus marquée pour les mutants (Slewinski *et al.*, 2009).

végétatifs chez le Riz (Hirose *et al.*, 1997 ; Matsukura *et al.*, 2000 ; Aoki *et al.*, 2003), le Maïs (Aoki *et al.*, 1999), l'Orge (Weschke *et al.*, 2000) et le Blé (Aoki *et al.*, 2002). Des expériences d'immunolocalisation ont montré que la protéine ShSUT1 est localisée au niveau des cellules du parenchyme et des cellules entourant les faisceaux dans les feuilles et les tiges (Rae *et al.*, 2005). Il semble donc que le transporteur de saccharose ShSUT1 intervient dans la récupération du saccharose qui a fuit dans l'apoplaste et non dans le chargement du phloème. De même, chez le Riz, des lignées mutantes d'ARN antisens *OsSUT1* n'ont pas permis d'établir un rôle de la protéine OsSUT1 dans le chargement du phloème. En effet, ces mutants ne présentent aucune altération des taux photosynthétiques, de la morphologie des plantes ou de la teneur en glucides dans les feuilles (Ishimaru *et al.*, 2001 ; Scofield *et al.*, 2002). Par contre, les mutants anti-*OsSUT1* ont un remplissage des grains réduit et une germination des graines diminuée (Ishimaru *et al.*, 2001 ; Scofield *et al.*, 2002). Chez le Maïs, une lignée mutante pour le transporteur de saccharose ZmSUT1 présente une accumulation importante des glucides dans les feuilles matures accompagnée d'une chlorose et une sénescence précoce (Slewiniski *et al.*, 2009 ; Figure II.26). Lorsque des feuilles de plantes mutantes *sut1* et de plantes sauvages sont soumises à un apport de saccharose marqué au ^{14}C , une exportation en saccharose très fortement réduite est observée dans les mutants *sut1*. Chez le Maïs, la protéine ZmSUT1 joue un rôle essentiel dans le chargement du phloème en saccharose dans les feuilles (Slewiniski *et al.*, 2009).

v) Les transporteurs de saccharose du groupe 4

Le premier membre du groupe 4 identifié a été HvSUT2 chez l'Orge (Weschke *et al.*, 2000). Par la suite, d'autres protéines comme AtSUT4, StSUT4 ou LjSUT4, notamment chez les Dicotylédones, l'ont également été (Sauer, 2007). Une expression fonctionnelle dans les levures a montré une faible affinité pour le saccharose avec une K_M apparente de 5 mM pour la protéine HvSUT2 (Weschke *et al.*, 2000), et de 11,6 mM pour le transporteur AtSUT4 (Weise *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis* et la Tomate, les gènes *AtSUT4* et *LeSUT4* sont exprimés dans les feuilles sources et dans les tissus puits (feuilles puits, fleurs et fruits ; Weise *et al.*, 2000). Contrairement aux quatre autres gènes *OsSUT*, le gène *OsSUT2* semble être exprimé à des taux presque similaires dans les différents tissus de la plante (Aoki *et al.*, 2003). Un profil d'expression similaire a été observé avec le gène *HvSUT2* chez l'Orge (Weschke *et al.*, 2000). Des études protéomiques et des immunolocalisations ont permis de mettre en évidence que plusieurs de ces transporteurs du groupe 4 sont localisés au niveau du tonoplaste (Braun et Slewiniski, 2009). Ainsi, les

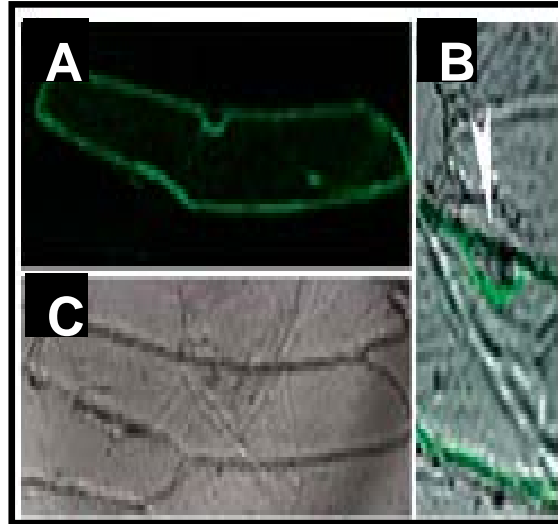


Figure II.27: Localisation subcellulaire de HvSUT2 (Transporteur de saccharose chez l'Orge; *Hordeum vulgare* L.). Cette localisation est faite grâce à la construction d'un gène exprimant la protéine GFP sous le contrôle du gène HvSUT2 dans des cellules épidermiques d'oignon. Le noyau est indiqué par la flèche blanche, mettant en évidence la position du tonoplaste, lieu où la présence de HvSUT2 est révélée grâce à la GFP (en vert, **A** et **B**). La photographie **C** représente la même cellule observée au microscope à transmission sans excitation de la GFP (Endler *et al.*, 2006).

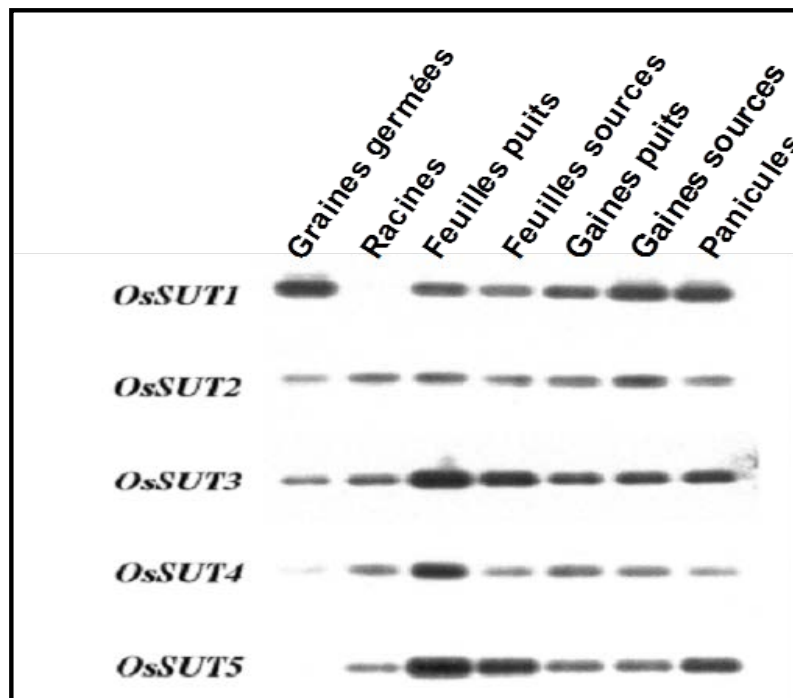


Figure II.28: Analyse de l'expression des transcrits par RT-PCR semi quantitative des cinq gènes (*OsSUT1*, 2, 3, 4 et 5) pour différents tissus de Riz (*Oryza sativa* L.): graines germées et racines âgées de sept jours après germination, feuilles puits récoltées trois semaines avant épiaison, gainés source et feuilles source récoltées une semaine après épiaison, gainés sources récoltées une semaine avant épiaison, panicules entière récoltées 10 jours après épiaison (Aoki *et al.*, 2003).

transporteurs de saccharose HvSUT2 (Figure II.27), AtSUT4 et LjSUT4, de part leur localisation, interviendraient dans les échanges de saccharose entre la vacuole et le cytoplasme (Endler *et al.*, 2006 ; Reinders *et al.*, 2008). Contrairement aux autres transporteurs du groupe SUT4, la protéine StSUT4 est localisée dans la membrane plasmique et non dans le tonoplaste (Chincinska *et al.*, 2008). La Pomme-de-terre est considérée comme une plante de jours courts pour la tubérisation et une plante de jours longs pour la floraison (Chincinska *et al.*, 2008). Des plantes transformées avec des constructions antisens du gène *StSUT4* ont une floraison précoce, une production de tubercules plus importante et un « évitement de l'ombre » réduit. Le transporteur de saccharose StSUT4 pourrait agir en aval des photorécepteurs détectant la qualité de la lumière dans les feuilles source et en mont de l'éthylène et des gibbérellines. La protéine StSUT4 jouerait donc un rôle important dans les interconnexions entre la disponibilité en carbone et les mécanismes d'induction florale (Chincinska *et al.*, 2008). L'unique SUT de type 4 dont les auteurs suggèrent une fonction est celui de la Pomme-de-terre : StSUT4 (Chincinska *et al.*, 2008). Contrairement aux SUT4 cités auparavant, StSUT4 est localisé dans la membrane plasmique mais pas dans le tonoplaste. Cela pourrait suggérer qu'un facilitateur (SUF) se trouve au niveau tonoplastique pour assurer les échanges de saccharose entre la vacuole et le cytoplasme. La fonction de StSUT4 serait d'agir sur la tubérisation et la floraison. Nous reviendrons sur cette protéine particulièrement étudiée par Chincinska *et al.* (2008) dans le chapitre de la régulation.

vi) Les transporteurs de saccharose du groupe 5

Les données relatives aux transporteurs de saccharose du groupe 5 sont très fragmentaires. A l'heure actuelle, les membres de ce groupe se rencontrent seulement chez les Poacées comme le Riz, le Maïs, le Sorgho, le Bambou (Braun et Slewinski, 2009). L'identification des gènes codant les transporteurs de saccharose de type SUT5 et SUT6 repose sur le séquençage des génomes correspondants. Chez le Riz, les transcrits *OsSUT5* sont exprimés de manière ubiquitaire. Cependant, le niveau d'expression est plus élevé dans les feuilles puits et dans les premiers stades du développement des graines (Aoki *et al.*, 2003 ; Figure II.28). La protéine OsSUT5 pourrait donc jouer un rôle dans le transport du saccharose dans le caryopse durant les stades précoces de développement.

C.3. Régulation des transporteurs de saccharose

C.3.a. Régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Les régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle permettent à la plante d'ajuster la quantité de transcrits de ses transporteurs de saccharose en fonction des facteurs de l'environnement, des statuts hormonaux et nutritionnels, et du développement.

i) Contrôle par les facteurs environnementaux

La lumière contrôlerait l'expression de certains transporteurs de sucres en agissant directement *via* un récepteur ou bien indirectement, par exemple en modifiant le statut carboné de la plante *via* la photosynthèse. En effet, chez la Tomate, la quantité de transcrits *LeSUT1* (*Lycopersicon esculentum* Sucrose Transporter 1) diminue à l'obscurité et augmente à la lumière (Kühn *et al.*, 1997). Chez la Carotte, les quantités de transcrits *DcSUT1* (*Daucus carotta* Sucrose Transporter 1) augmentent elles aussi durant les phases diurnes dans les parties aériennes. Cette induction par la lumière n'est pas une règle générale puisque, toujours chez la Carotte, les quantités de transcrits *DcSUT2* (*Daucus carotta* Sucrose Transporter 2), principalement exprimés dans les parenchymes racinaires, ne sont pas modifiées par les conditions d'éclairement (Shakya *et al.*, 1998). La lumière induit l'expression des transcrits *PmSUC1* (*Plantago major* Sucrose Carrier 1) et *PmSUC2* (*Plantago major* Sucrose Carrier 2) étudiés chez *Plantago major* (Gahrtz *et al.*, 1996). Chez le riz, Hirose *et al.* (1997) ont détecté des quantités plus importantes de transcrits *OsSUT1* (*Oryza sativa* Sucrose Transporter 1) dans des plantules étiolées par rapport à des plantules cultivées à la lumière. Chez l'embryon de Riz, la lumière induit l'expression des transcrits *OsSUT1* (Matsukura *et al.*, 2000).

L'expression de quelques transporteurs de sucres a été étudiée en réponse à certains stress. Chez le Céleri, l'application d'un stress salin (arrosage avec une solution de NaCl 300 mM pendant 4 semaines) provoque une diminution de l'expression d'un transporteur de saccharose *AgSUT1*, ce qui pourrait favoriser le transport et l'accumulation chez cette plante d'un osmoprotectant, le mannitol (Noiraud *et al.*, 2000). Le stress mécanique par lésion est lui aussi un facteur d'induction de l'expression du transporteur de saccharose *AtSUC3* (*Arabidopsis thaliana* Sucrose Carrier 3 ; Meyer *et al.*, 2004).

Certains transporteurs semblent de plus être impliqués lors d'une interaction plante/micro-organisme. Lors d'une colonisation par le champignon *Paxillus involutus* (Batsch) Fr., dans les racines de *Betula pendula*, l'expression des transcrits du transporteur

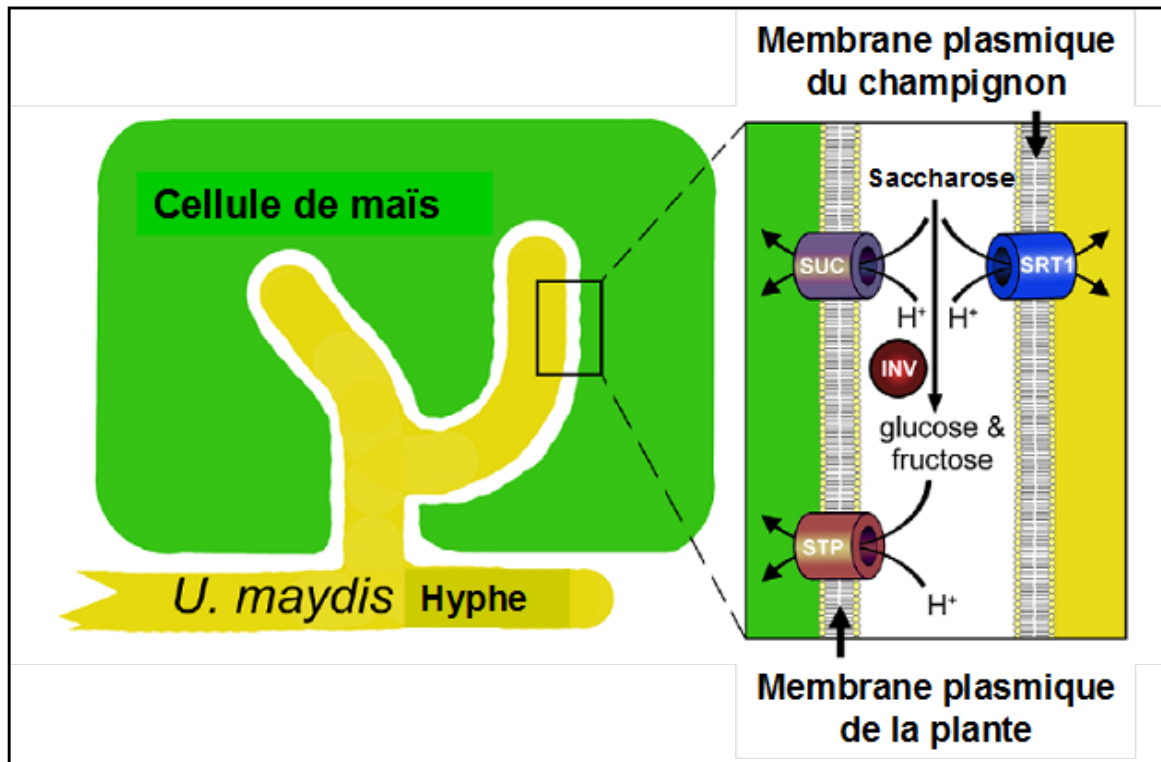


Figure II.29: Modèle de l'interface de la compétition bi-directionnelle pour le saccharose extracellulaire entre la plante et le champignon pathogène. (SUC : transporteur de saccharose végétal, SRT1: transporteur de saccharose fongique à haute affinité, Inv: invertase extracellulaire végétale, STP: transporteur d'hexoses végétal, H⁺: protons; Wahl *et al.*, 2010).

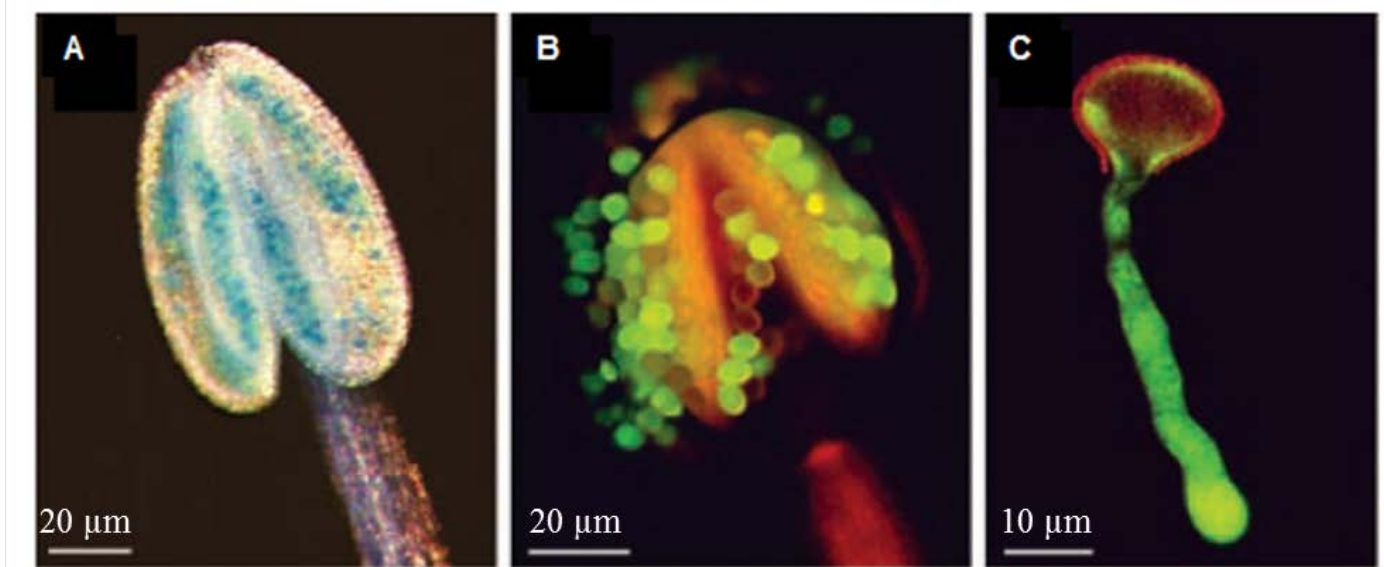


Figure II.30: Localisation de l'activité du promoteur d'*AtSUC3* dans les grains de pollen d'*Arabidopsis thaliana* L. (A) Expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur d'*AtSUC3* (*AtSUC3*-promoteur::GUS). Le marquage bleu indique la présence d'*AtSUC3* dans les grains de pollen dans une anthère fermée. (B) Fluorescence verte des grains de pollen d'une anthère ouverte, le marquage est réalisé à l'aide d'une construction GFP (*AtSUC3*-promoteur::GFP). (C) Fluorescence verte dans le tube pollinique en croissance. Le marquage est réalisé à l'aide d'une construction GFP (*AtSUC3*-promoteur::GFP), (Meyer *et al.*, 2004).

de saccharose *BpSUC1* est réduite (Wright *et al.*, 2000). Le transporteur de saccharose AtSUC2 a été le premier transporteur décrit comme étant induit suite à une attaque par un pathogène, en l'occurrence le nématode *Heterodera schachtii*. Ce transporteur, exprimé dans les syncytia induits par le nématode, serait impliqué dans l'approvisionnement en saccharose de cette structure qui se comporte comme un puits fort (Jüergensen *et al.*, 2003).

Plus récemment, un transporteur de saccharose (Srt1) chez le champignon (*Ustilago maydis*) parasite du Maïs a été découvert (Wahl *et al.*, 2010 ; Figure II.29). Ce transporteur de saccharose est un des éléments conférant une virulence extrême à ce pathogène. En effet, de par sa localisation spécifique, la protéine Srt1 permet l'utilisation directe du saccharose apoplastique sans nécessiter une hydrolyse préalable. De plus, Srt1 possède une affinité plus importante que les transporteurs de saccharose connus à ce jour chez le Maïs. Ainsi, une forte compétitivité s'installe au sein des cellules infectées, ce qui offre un avantage contre les défenses de l'hôte (Figure II.29).

ii) Contrôle au cours du développement

Des variations de l'expression de certains transporteurs de sucres ont été décrites au cours du développement chez les plantes. Chez la Pomme-de-terre, la transition puits/source des feuilles s'accompagne d'une augmentation de la quantité des transcrits du transporteur de saccharose StSUT1 qui jouerait un rôle dans le chargement en saccharose du phloème (Riesmeier *et al.*, 1993). Les transcrits *AtSUC3* sont absents des tiges des jeunes plantules et ne s'expriment que dans les cellules de garde et les trichomes des très jeunes plantules (Meyer *et al.*, 2004). Quelques transporteurs de saccharose comme NtSUT3 (*Nicotiana tabacum* Sucrose transporter 3) (Lemoine *et al.*, 1999), AtSUC1 et AtSUC3 (Meyer *et al.*, 2004) sont présents dans les grains de pollen (Figure II.30). La protéine AtSUC1 est un transporteur de saccharose spécifique de la fleur, plus précisément elle a été localisée dans le tissu connectif des anthères, le funicule et le tube pollinique en cours de croissance par immunolocalisation. Ce profil d'expression suggère que la protéine AtSUC1 pourrait jouer un rôle dans la mise en place de la force osmotique permettant la déhiscence des anthères et la croissance du tube pollinique. Dans le grain de pollen mature, les ARNm *AtSUC1* ont été détectés mais pas les protéines AtSUC1 (Meyer *et al.*, 2004). Les transcrits *AtSUC3* sont exprimés dans les grains de pollen et dans des anthères encore fermées. La protéine AtSUC3 est détectée dans des grains de pollen issus d'anthères déhiscentes ainsi que dans le tube pollinique de grains de pollen germés (Meyer *et al.*,

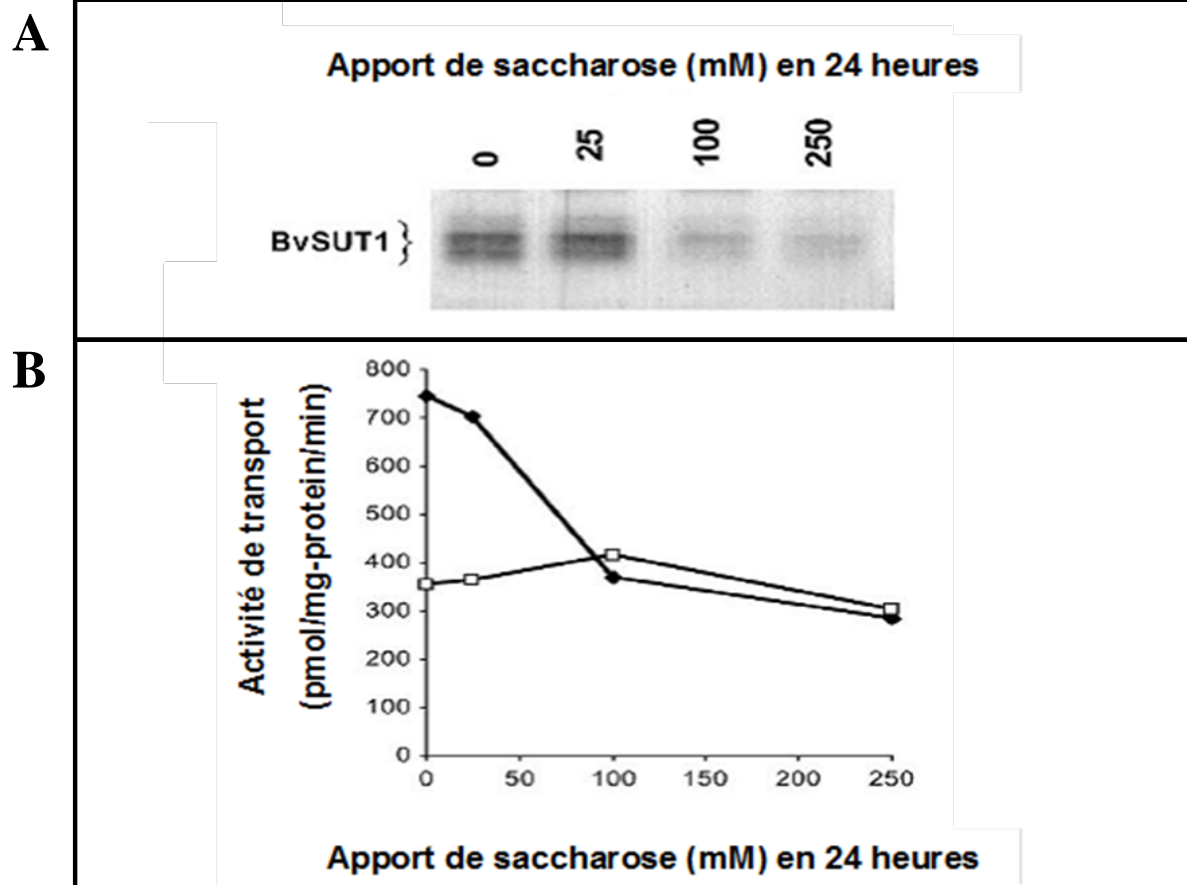


Figure II.31: Abondance de la protéine BvSUT1 et activité de transport de saccharose de BvSUT1 en fonction de la concentration de l'apport de saccharose dans les 24 heures chez la betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.). (A) Western blot de la protéine BvSUT1 sur des extraits de vésicules de plasmalemme de betterave en fonction de l'apport en saccharose. (B) Force proton motrice (■) et transport d'alanine (témoïn; □) sur les même vésicules de plasmalemme de Betterave (Vaughn *et al.*,2002).

2004). Dans le grain de pollen non-germé, les transcrits *NtSUT3* sont exprimés au cours des derniers stades de la maturation. Dans le grain de pollen en cours de germination et par rapport au niveau observé dans le pollen non-germé, l'expression du gène *NtSUT3* est stable pendant les 6 premières heures de germination. Ensuite, son expression diminue (Lemoine *et al.*, 1999). Chez la betterave, l'activité du transporteur de saccharose est régulée par son taux de transcription, lui-même régulé par la concentration en saccharose (Figure II. 31 ; Vaughn *et al.*, 2002).

C.3.b. Modifications post-traductionnelles

i) Phosphorylations

Les séquences en acides aminés de certains transporteurs de saccharose possèdent des sites potentiels de phosphorylation qui pourraient être impliqués dans la régulation de leur activité. Des études pharmacologiques, conduites sur des feuilles de Betterave, ont permis de montrer que l'infiltration d'acide okadaïque réduisait l'absorption du saccharose alors que la quantité de transporteurs restait constante (Roblin *et al.*, 1998). L'acide okadaïque étant un inhibiteur spécifique des phosphatases de types 2A, il semblerait que l'activité des transporteurs de saccharose soit régulée par phosphorylation/déphosphorylation et, en l'occurrence, inhibée par son état de phosphorylation. Chez la Betterave, l'existence d'une cascade de phosphorylations protéiques entre la perception de la concentration en saccharose et la régulation de la transcription du gène *BvSUT1* a été mise en évidence par des études pharmacologiques (Ramson-Hodgkins *et al.*, 2003).

ii) N-glycosylations

Les séquences en acides aminés de certains transporteurs de saccharose possèdent des sites potentiels de N-glycosylation. L'asparagine en position 402 des protéines AtSUC en est un exemple (Delrot *et al.*, 2000).

iii) Oligomérisation

La première indication montrant que les transporteurs de saccharose pourraient exister sous forme oligomérique a été apportée par des expériences de gel filtration sur des fractions enrichies en plasmalemmes (Li *et al.*, 1991). En conditions non-dénaturantes, une fraction de 120 kDa possédant une activité de transport de saccharose a été identifiée. Après traitement au SDS, le complexe de 120 kDa se dissocie pour donner un polypeptide de 42 kDa, taille compatible avec celle de StSUT1 (46 kDa). Toutefois, on ne peut pas

exclure qu'un seul transporteur et des protéines autres que des transporteurs de saccharose constituent le complexe isolé.

Chez les Solanacées, l'expression des gènes *StSUT1*, *StSUT2* et *StSUT4* est co-localisée au niveau des tubes criblés (Reinders *et al.*, 2002). De plus, l'utilisation du système "yeast-based split-ubiquitin" a permis de montrer que ces transporteurs sont capables de former des homo-oligomères et d'interagir les uns avec les autres (Reinders *et al.*, 2002). Une étude similaire a été menée chez *Arabidopsis*, espèce pour laquelle SUT1, SUT2 et SUT4 s'expriment au niveau des cellules compagnes (Schulze *et al.*, 2003). Cette homo-dimérisation pourrait favoriser la stabilité des transporteurs, leur ciblage vers la membrane plasmique ou intervenir dans la régulation de leur activité.

D. Objectifs de recherche

Le transport du saccharose apparaît comme l'un des mécanismes centraux de l'adaptation physiologique du Ray-grass anglais à la défoliation. Cependant, ce mécanisme est encore imparfaitement connu chez cette plante, en particulier lors de la repousse après défoliation. Nous émettons l'hypothèse que l'implication des transporteurs de saccharose représente un des points clés de ce mécanisme de repousse.

Notre objectif principal consistera à identifier, caractériser et localiser différents transporteurs de saccharose chez *Lolium perenne* L.

- **Identifier** : dans un premier temps, l'identification des protéines responsables du transport de saccharose est indispensable. De plus, nous pouvons nous attendre à en découvrir plusieurs car, comme l'a démontré l'analyse bibliographique, il existe une famille multigénique de transporteurs de saccharose. Si l'on se réfère à la Poacée la plus étudiée dans ce domaine (le Riz), nous pouvons nous attendre à 5 types de protéines.
- **Caractériser** : dans un second temps, la caractérisation des protéines identifiées permettra d'appréhender leurs différents paramètres moléculaires et biochimiques. Ces paramètres sont des sources d'informations précieuses puisqu'ils nous renseignent sur les capacités de transport du saccharose de chaque protéine. Parallèlement à cela, le suivi de leur expression permettra d'apporter des éléments de réponses sur la sensibilité de réponse des gènes de transports de saccharose durant la repousse.
- **Localiser** : dans un troisième temps, une méthode de localisation de ces protéines sera mise en place. Comme il l'a été présenté auparavant, les rôles les mieux définis l'ont été grâce à deux méthodes : la production de mutants et la localisation tissulaire. La production de mutants chez le Ray-grass anglais n'étant pas acquise, l'utilisation de la localisation par immunologie sera donc réalisée. Elle permettra de valider une localisation tissulaire des différentes protéines identifiées et caractérisées.

Ainsi nos objectifs permettront de répondre à nos différentes problématiques qui sont les suivantes :

- ❖ **Au regard des connaissances sur les transporteurs de saccharose identifiés chez les Poacées jusqu'à aujourd'hui, est-ce qu'un seul ou plusieurs transporteurs entrent en jeu ?**
- ❖ **Est-ce que le transport du carbone *via* le phloème est influencé par la coupe ?**
- ❖ **Est-ce que les SUT interviennent dans ce mécanisme de repousse en condition lumineuse limitée ?**
- ❖ **Est-ce que les SUTs peuvent devenir des marqueurs de sélection ?**

Chapitre 1

Activation of sucrose transport in defoliated

Lolium perenne L.: an example of apoplastic

phloem loading plasticity

III. CHAPITRE 1

Activation of sucrose transport in defoliated *Lolium perenne* L.: an example of apoplastic phloem loading plasticity

Alexandre Berthier¹, Marie Desclos¹, Véronique Amiard^{2,3}, Annette Morvan-Bertrand¹, Barbara Demmig-Adams⁴, William W. Adams III⁴, Robert Turgeon², Marie-Pascale Prud'homme¹, Nathalie Noiraud-Romy¹

¹UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie and nutritions NCS, irba, Esplanade de la Paix, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

²Department of Plant Biology, Cornell University, Plant Science Building, Ithaca, NY 14853, USA.

³Present address: Centro de Genómica Nutricional Agro acuícola, Unidad de Biotecnología de Plantas, INIA-Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

⁴Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Colorado, Boulder, CO 80309-0334, USA.

Corresponding author: Nathalie Noiraud-Romy

UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions NCS, irba, Esplanade de la Paix, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

Phone : (33)-2-31-56-56-17 Fax : (33)-2-31-56-53-60

E-mail : nathalie.noiraud-romy@unicaen.fr

Article publié dans *Plant and Cell Physiology* 2009; **50**: 1329 - 1344

Résumé

La voie de chargement du phloème a été étudiée dans les tissus foliaires de la plante fourragère *Lolium perenne* L. L'effet de la défoliation (correspondant à une suppression des limbes foliaires) a été testé sur la capacité de transport du saccharose dans les gaines des feuilles matures, qui sont la source majeure de carbone pour la repousse. L'étude de la voie de transport du carbone a été suivie *via* une combinaison de microscopie électronique, d'expériences de plasmolyse, et de vésicules de membranes de plasmalemmes (PMV) purifiées par partition aqueuse à deux phases à partir de la fraction microsomale.

Les résultats mettent en évidence un mécanisme de chargement du phloème de nature apoplastique. La création d'une force proto-motrice artificielle aux PMV de gaines foliaires a énergisé une absorption active, transitoire et saturable de saccharose (Suc). L'affinité des transporteurs de saccharose a été de 580 μM dans les gaines foliaires des plantes non défoliées. La défoliation a induit une diminution de K_m suivie par une augmentation de V_{max} . Un transporteur a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de chaumes (incluant les gaines foliaires) et a été exprimé fonctionnellement dans la levure. Le niveau d'expression du transporteur 1 de saccharose de *L. perenne* (LpSUT1) a été augmenté dans les gaines foliaires en réponse à la défoliation.

L'ensemble de ces résultats indique que la capacité de transport du saccharose est augmentée dans les gaines foliaires de *L. perenne* en réponse à la suppression des limbes foliaires. Cette augmentation pourrait impliquer une synthèse *de novo* de transporteurs de Suc, incluant LpSUT1, et pourrait représenter un des mécanismes contribuant à une refoliation rapide.

Mots-clés :

Défoliation, *Lolium perenne* L., Transport de saccharose

Abstract

The pathway of carbon phloem loading was examined in leaf tissues of the forage grass *Lolium perenne*. The effect of defoliation (leaf blade removal) on sucrose transport capacity was assessed in leaf sheaths as the major carbon source for regrowth. The pathway of carbon transport was assessed via a combination of electron microscopy, plasmolysis experiments, and plasma membrane vesicles (PMV) purified by aqueous two-phase partitioning from the microsomal fraction.

Results support an apoplastic phloem loading mechanism. Imposition of an artificial proton-motive-force to PMV from leaf sheaths energized an active, transient and saturable uptake of Sucrose (Suc). The affinity of Suc carriers for Suc was 580 μM in leaf sheaths of undefoliated plants. Defoliation induced a decrease of K_M followed by an increase of V_{max} . A transporter was isolated from stubble (including leaf sheaths) cDNA libraries and functionally expressed in yeast. The level of *Lolium perenne* *SUCrose Transporter 1* (*LpSUT1*) expression increased in leaf sheaths in response to defoliation.

All together, results indicate that Suc transport capacity increased in leaf sheaths of *L. perenne* in response to leaf blade removal. This increase might imply *de novo* synthesis of Suc transporters, including *LpSUT1*, and may represent one of the mechanisms contributing to rapid refoliation.

Keywords:

Defoliation, *Lolium perenne*, Sucrose transport

A. Introduction

Forage grasses are the backbone of sustainable agriculture and contribute extensively to the world economy. *Lolium perenne* (perennial ryegrass) is the most important forage grass in European agriculture, where it is the major food source for grazing sheep and cattle. Grazing or cutting leads to the removal of the most photosynthetically active carbon-exporting leaves. The ability of perennial ryegrass to regrow after defoliation is related to the position of leaf meristem and reserves beyond the reach of animals and machines. Perennial ryegrass uses fructans (fructose polymers) as carbon storage compounds. Fructans are located mainly in leaf sheaths and in the leaf growth zone of elongating leaves (Guerrand *et al.*, 1996 ; Pavis *et al.*, 2001). Mature grass leaves are composed of a blade and a sheath. The growing part of the elongating leaf is confined to its basal region that is enclosed by the sheaths of older leaves. Cells are displaced away from the basal meristem as a result of continued production and elongation of new cells (Schnyder *et al.*, 1990). As these emerge from the whorl of the sheaths, they are photosynthetically competent and export photoassimilates towards the sink tissues, e.g. the leaf growth zone that also imports assimilates from mature leaves (Allard and Nelson, 1991 ; Brégard and Allard, 1999 ; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999b). In the vegetative stage of growth, stems of forage grasses are only a few millimetres long. Whereas mature leaf sheaths initially serve then as passages for assimilates between leaf blades and developing sinks (Borland and Farrar, 1989), their role shifts over the lifetime of the plant from a carbon sink (before defoliation) to a carbon source (after defoliation) (Amiard *et al.*, 2003). Leaf sheaths are generally regarded as the major storage sink since they can accumulate up to 70% of the fructans stored in the vegetative parts (Volenc, 1986 ; Housley and Volenc, 1988) that serve to fuel regrowth following a defoliation event (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001 ; Amiard *et al.*, 2003). In the first hours following defoliation, fructan levels decrease by more than 80% (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001). Fructose arising from fructan degradation is not transported *per se* (Amiard *et al.*, 2003, 2004), but is instead converted to sucrose (Suc) that accounts for more than 90% of the total soluble sugars in the phloem sap of leaf sheaths after defoliation. Plant persistence and productivity might therefore depend on the ability of the leaf sheaths that remain after defoliation to export Suc, as the product of fructan degradation, towards the leaf meristem via the phloem.

In all higher plants, Suc plays an indispensable role in the export of assimilated carbon into the phloem (Sauer, 2007). In photosynthetic tissues, Suc is loaded into the

phloem cells symplastically and/or apoplastically and translocated to sink organs via the sieve tubes of the phloem. In apoplastic phloem loaders, Suc from the mesophyll enters the cell wall and is actively taken up by the companion cells (CC) and/or sieve elements (SE) of the minor veins by means of H^+ /Suc symporters, called Suc transporters (SUT or SUC). In symplastic phloem loaders, Suc gains access to the phloem through plasmodesmata. A diffusion gradient is maintained by converting Suc to larger sugars in distinctive minor vein companion cells, so that the sugar size presumably prevents them from diffusing back (“polymer trapping”) (Turgeon, 1996).

Regardless of the agronomic importance of *L. perenne* as a major grassland species, and of the potential importance of carbon transport processes to sustain refoliation, the mechanism of phloem loading is not known in this species. Previous studies involving plasmolysis and evaluation of plasmodesmata density (Evert *et al.*, 1978, 1996b ; Botha, 2005), suggest an apoplastic mode of phloem loading in maize and barley, two monocot species. These authors also suggest that the initially formed metaphloem with thin wall sieve elements (SE_{Tn}) and companion cells (CC), is involved in loading, while the later-forming metaphloem with thick wall sieve elements (SE_{Tk}) and associated parenchyma cells (PC), is not. In rice, another monocot species, one of the Suc transporters, *OsSUT1*, is specifically involved in the transport of assimilate remobilized from starch reserves located in leaf sheaths (Aoki *et al.*, 2003) and during the sink-source transition in rice leaf sheaths the mRNA level of *OsSUT1* increase at the heading stage (Hirose *et al.*, 1999 ; Chen and Wang, 2008).

We hypothesize that apoplastically loading species offer greater flexibility for acclimation to defoliation than symplastically loading species (Amiard *et al.*, 2005) since symplastic loading is physically constrained by the (fixed numbers of) plasmodesmata that are formed during leaf development, while apoplastic loaders can potentially enhance their transport capacity by increasing Suc transporter density, or by modifying their activity. To elucidate carbon transport between organs in *L. perenne*, the present study aimed to (i) examine the pathway of carbon phloem loading in ryegrass leaf tissues via a combination of electron microscopic vein analysis and plasmolysis experiments, (ii) characterize the uptake of Suc into plasma membrane vesicles (PMV) prepared from leaf sheaths, (iii) identify and characterize putative Suc transporters from rye-grass, and (iv) analyze the effect of defoliation on overall Suc transport and Suc transporter expression in leaf sheaths.

B. Materials and methods

B.1 Plant materials and growth conditions

Seeds of *Lolium perenne* L. cv. Bravo were germinated and grown for 8 weeks in a greenhouse on a nutrient solution in 9.0 L polyvinyl chloride pots as described previously (Gonzalez *et al.*, 1989). The nutrient solution was aerated continuously and replaced every week. The photoperiod was 16 h of natural light supplemented by a photosynthetic photon flux density of $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Phytotubes, Claude, GTE, Puteaux, France). The thermoperiod was 24°C (day) and 18°C (night). Plants were defoliated at 5 cm above the ground level at 8:00 am. Plants were harvested and separated into mature leaf sheaths and elongating leaf bases (0 to 5 cm from leaf base), frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C and used for characterization of Suc transport (three-replicate analysis). In a second experiment, plants were harvested in the same way after 0, 1 and 6 h of regrowth and analyzed for the effect of defoliation on Suc transport in leaf sheaths.

Plants for plasmolysis experiments were grown from seed in Fafard Canadian Growing Mix 2 (70% Canadian sphagnum peat, perlite, and vermiculite) in growth chambers under the light and temperature conditions described above, but without natural light.

B.2 Plasmolysis experiment and tissue fixation

Plasmolysis experiments were conducted following Turgeon and Medville (1998) with minor modifications. At midday, leaf pieces (1 mm x 2 mm) were cut under water, randomized, and transferred into a graded series of sorbitol fixative solutions ranging from 400 to 1200 mOsm, in steps of 100 mOsm. In addition to sorbitol, fixative solutions contained 2% glutaraldehyde in 25 mM Pipes–NaOH buffer. The pre-plasmolysis step used by Turgeon and Medville (1998) before fixation was omitted because preliminary experiments, conducted on another species with and without pre-plasmolysis, did not differ in their results (data not shown). After one hour of plasmolysis/fixation, tissues were washed in buffer and post-fixed for one hour in 1% OsO₄ at room temperature. Tissues were then dehydrated in acetone and embedded in Spurr's resin. Sections (60 nm) were cut with a diamond knife and stained with 2% (wt/vol) uranyl acetate (in 30% methanol) and

0.2% (wt/vol) lead citrate. All samples were inspected under a CM10 transmission electronic microscope (Philips Electronic Instruments, Mahwah, NJ). A cell was considered plasmolyzed if at least one quarter of the plasma membrane was pulled away from the cell wall. Only phloem parenchyma cells associated with SE_{TK} were considered for plasmolysis determination. Analyses of variances (ANOVA) were performed to examine plasmolysis variation among five cell types (CC, PC, Mesophyll, SE_{TK} and SE_{Tn}). For each cell type at least 8 cells from three minor veins were observed on each leaf. Three leaves (replicates) were evaluated at each osmolarity level. Variances were analyzed using the Generalized Linear Model (GLM) from SAS (SAS 2001). Least square means (lsmeans) were estimated for each cell type (SAS 2001). Ls means were compared by the least significant difference (LSD) test (Sokal and Rohlf, 1995). Additional leaf tissues were fixed, for anatomical characterization without plasmolysis, as described by [Amiard *et al.* \(2005\)](#).

B.3 Preparation of plasma membrane vesicles, enzyme assays and latency,

Suc uptake

Plasma membrane vesicles (PMV) from the entire leaf sheath were purified from a microsomal fraction by two-phase partitioning as described by [Larsson *et al.* \(1988\)](#). 30 g of mature leaf sheaths were added to 140 mL of cold grinding medium (500 mM sorbitol, 50 mM HEPES buffered at pH 7.8 with KOH, 5 mM EDTA), to which 0.5 mM DTT, 0.6% PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) and 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonide fluoride) were added at the time of grinding, and homogenized 4 times for 15 s in a kitchen mixer (Braun). Grinding and all following operations were performed at 4°C. After filtration through Miracloth, the filtrate was centrifuged for 15 min at 10,000 g. The corresponding supernatant was centrifuged for 33 min at 50,000 g to obtain the microsomal fraction. Microsomal pellets were resuspended in 9 mL of the following buffer: 300 mM sorbitol, 5 mM potassium phosphate pH 7.8, 0.5 mM DTT, 1 mM EDTA and added to a 27 g partition system (6.2% Dextran T500, 6.2% PEG, 300 mM sorbitol, 5 mM potassium phosphate pH 7.8, 0.5 mM DTT). After thorough mixing and centrifugation at 1,000 g for 10 min, the upper phase containing PMV was collected and added to fresh lower phase to improve the purity, while the lower phase was re-extracted with fresh upper phase (for further details see [Larsson *et al.*, 1988](#)). Upper phases were diluted in KP buffer (50 mM potassium phosphate pH 7.5, 330 mM sorbitol, 0.5 mM CaCl₂, 0.25 mM MgCl₂, 0.5 mM

DTT, 1 mM EDTA) and centrifuged for 1 h at 100,000 g. The final PMV pellet was re-suspended in a minimal amount of KP buffer, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

PMV were equilibrated in a medium containing 50 mM potassium phosphate pH 7.5, 330 mM Suc, 0.5 mM CaCl₂, 0.25 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 1 mM EDTA. The activities of the tonoplast ATPase (nitrate sensitive), mitochondrial ATPase (azide sensitive), plasma membrane ATPase (cupric ion sensitive) and acid phosphatase (molybdate sensitive) were determined according to [Gallagher and Leonard \(1982\)](#). Released Pi was measured according to [Ames \(1966\)](#) with 0.1% (w/v) SDS included to prevent precipitation. Latency was determined with Triton X-100. Triton X-100 (0.02% w/v) was used to obtain total activities, since a large part of the plasma membrane ATPase activity is latent, due to the right-side-out orientation of the PMV and the fact that the active site of the ATPase is on the cytoplasmic side of the membrane ([Larsson et al., 1988](#)).

The uptake of Suc in PMV was studied by imposing an artificial proton-motive-force (pmf) as described in [Lemoine and Delrot \(1989\)](#). Vesicles (15-20 µg protein) stored in KP buffer (pH 7.5, see above) were diluted at time 0 in 400 µL of NaP buffer (50 mM sodium phosphate pH 5.5, 330 mM sorbitol, 0.5 mM CaCl₂, 0.25 mM MgCl₂) in the presence of 5 µM valinomycin, generating a ΔpH (acidic outside) and a ΔΨ (negative inside). These gradients represent the two components of the proton-motive-force (pmf), and their orientation (alkaline and negative inside) is similar to *in vivo* conditions. The external medium contained ¹⁴C-Suc ([¹⁴C-U]-Suc; 18.5 kBq mL⁻¹) at the required concentration. At selected times, the incubation was stopped by adding 2 mL blocking buffer (chilled NaP buffer, no Suc) and vesicles were collected by vacuum filtration (HAWP 02500, Millipore). Filters were rinsed twice with 2 mL blocking buffer, dried and counted by liquid scintillation. To estimate the pmf-dependent uptake of Suc, the experimental points were repeated in the presence of 10 µM CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) to collapse the pmf. Results are expressed as pmf-dependent uptake obtained by subtracting the uptake rates in the presence of CCCP from total uptake rates.

B.4 Screening of cDNA libraries

In an attempt to isolate different Suc transporter genes expressed in ryegrass, a 450 bp *L. perenne* PCR product was used to screen two cDNA libraries prepared from stubble (composed of leaf sheaths and elongating leaf bases) of 8-week-old plants treated to accumulate fructans (Lasseur *et al.*, 2006) or defoliated (Lothier *et al.*, 2007). The PCR product was previously obtained with sense primer Suc1 (5'-CGTCGGCTTCTCGGCTGAC-3') based on the conserved amino acid sequences VGFSAD and antisense primer Suc2 (5'-ACCCATCCAGTCGGTGTC-3') designed from the conserved amino acid sequences DTDWMG. The PCR product was labelled with [α -³²P] dCTP by using a random priming method with the NEBlot kit (Biolabs, France). Hybond-N nylon filters (Amersham BioSciences, Les Ulis, France) were hybridized overnight at 42°C using standard conditions (Stratagene). Filters were washed for 15 min at 42°C with 0.1% SDS and 2 x SSC (1 x SSC is 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), for 15 min at 50°C with 0.1% SDS and 2 x SSC, and for 30 min at 50°C with 0.1% SDS and 1 x SSC. *In vivo* excision was performed on the clones that gave positive signals during the three rounds of screening. The cDNAs were sequenced (BIOfidal, France). Nucleotide sequences were compared with sequences available in NCBI Databank. Transmembrane regions and protein orientations were predicted using HMMTOP (Hidden Markov Model Topology Prediction ; Tusnady and Simon, 1998).

B.5 Functional analysis of LpSUT1

LpSUT1 cDNA was ligated into the *Bam*HI-*Xho*I sites of the yeast shuttle vector pDR195 (Rentsch *et al.*, 1995) with the *Saccharomyces PMA1* promoter. Competent yeast cells SUSY7/ura3 were prepared and transformed according to Dohmen *et al.*, (1991). *Saccharomyces* cells transformed with the corresponding empty plasmid were used as controls.

For Suc-uptake assays, yeast was grown to an A_{600} of 0.8 in liquid minimal media containing glucose. Cells were collected by centrifugation, washed in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 5.5, and suspended in the same buffer to an A_{600} of 20. Uptake assays were initiated by adding glucose to a final concentration of 10 mM to yeast cells 30 s before adding ¹⁴C-Suc ([¹⁴C-U]-Suc; 7.4 kBq mL⁻¹). After incubation at 30°C with shaking, cells were collected (at 1, 2, 3, and 5 min) by vacuum filtration onto glass fiber

filters (Millipore, France) and washed twice with 4 mL of ice-cold 10 mM Suc before radioactivity was determined by liquid scintillation counting (UltimaGold, PerkinElmer). The radioactivity incorporated in the cells was determined in a liquid scintillation counter (Packard Instruments, Meriden, CT). For inhibition and competition studies, reagents were added 30 s prior to Suc.

B.6 RNA isolation, RT-PCR and real-time qPCR analysis

Plant tissues were ground in liquid nitrogen and suspended in a pre-warmed (80°C) solution consisting of 750 µL phenol and 750 µL extraction buffer (0.1 M LiCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 8.0). After shaking, 750 µL of chloroform-isoamylalcohol (24:1) were added and the solution was centrifuged for 5 min (4°C) at 12 000 g. Total RNA was precipitated with LiCl (final concentration 2 M) overnight at 4°C. Following centrifugation for 30 min (4°C) at 12 000 g, the pellet was suspended in 500 µL of water and 500 µL of phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1), mixed and centrifuged for 5 min. RNA in the supernatant was precipitated again with 0.1 vol. of Na-acetate buffer (3M; pH 5.2) and 2 vol. absolute ethanol and stored for a minimum of 1 h at -80°C. After centrifugation for 30 min (4°C) at 12 000 g, the pellet was resuspended in 100 µL RNase free water. Then, samples were treated following the Clean-up protocol of the RNeasy Minikit (Qiagen) coupled to a DNase treatment (RNase free-DNase; Qiagen, France). RNA was quantified using an RNA BioPhotometer (Eppendorf, Germany) and visualized after electrophoresis on agarose gels 1.5% (w/v). One µg aliquot was used to generate cDNA with the i-script cDNA synthesis kit (Bio-Rad, France).

cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using SUT1F (5'-CAGGCAAGTATGGACCCAGT-3') and SUT1R (5'-ACCAAACACATGCACAGGAA-3') as specific primers for LpSUT1. rRNA18SF (5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3') and rRNA18SR (5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3') were primers for 18S rRNA. Amplification was achieved in the following conditions so that the products were analyzed during the exponential phase of the PCR curve: 5 min at 95°C; 27 cycles (LpSUT1) or 17 cycles (18S rRNA) of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and elongation at 72°C for 1 min. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

The cDNA was diluted 1:100 with water and 4 µL was used as a template for real-time qPCR analysis. The gene-specific primers were SUT1F and SUT1R. As a marker for

constitutive expression, rRNA18S was amplified with rRNA18SF and rRNA18SR primers. PCR reactions were performed in a total volume of 15 μ L, 500 nM for each primer and 10 μ L of iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad, France) on the Chromo 4 System (Bio-Rad, France). The qPCR programme included a preliminary step of 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 40 s. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the dissociation curves after qPCR reactions using the Chromo 4 System (Bio-Rad, France) and by sequencing the qPCR product that confirmed that the correct amplicons were produced from each pair of primers. Fluorescence data were collected after each extension step. A melting curve was run after the PCR cycles; it showed single products for all samples. The 18S rRNA gene was used as an internal control; fold changes of RNA transcripts were calculated using the comparative threshold cycle method described by Livak and Schmittgen (2001). Expression levels produced by qPCR were expressed as a ratio relative to the control point, which was set to 1. All the qPCR results were confirmed by three independent reactions from RNA of the same batch of plants.

B.7 Extraction and analysis of water-soluble carbohydrates (WSC)

Measurement of water soluble carbohydrates in *Lolium perenne* tissues was carried out as described by Lothier *et al.* (2007).

B.8 Other measurements

Proteins were determined according to Bearden (1978) using 0.01% Triton X-100 to solubilize membrane proteins and bovine serum albumin as a standard. Chlorophyll was determined according to Arnon (1949).

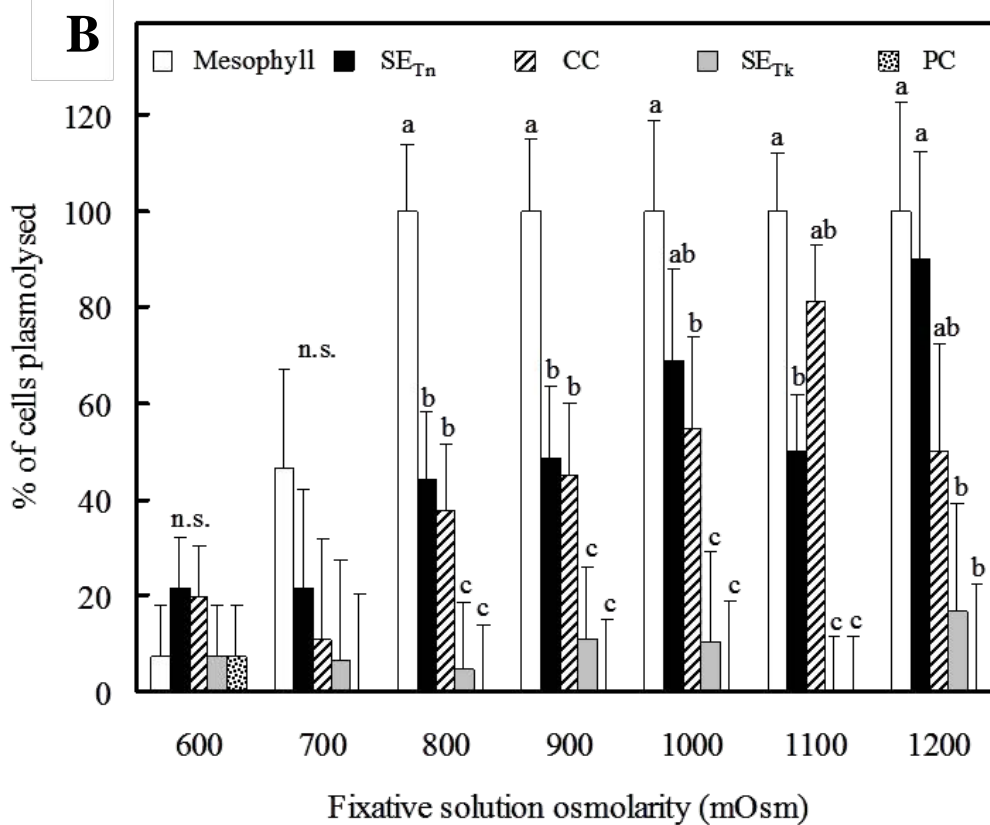
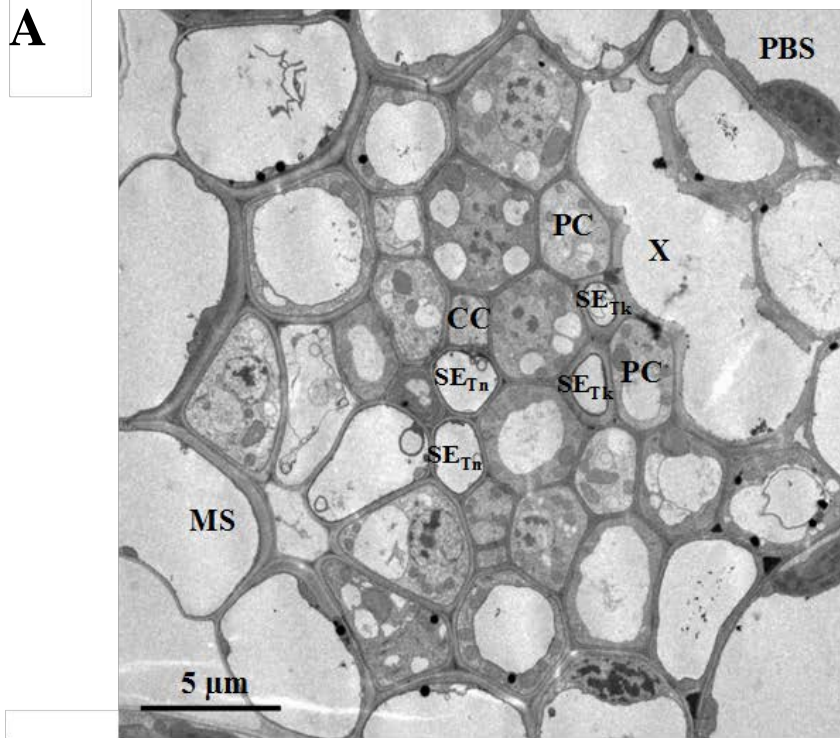


Figure III.1: (A) Transverse section of a vein in a leaf blade of *Lolium perenne*. Companion cells (CC); mesophyll (MS); parenchymatous bundle sheath (PBS); phloem parenchyma cells (PC); thick walled sieve element (Tk); thin walled sieve element (Tn); xylem vessels (X). (B) Percentage of plasmolysed cells (\pm SE) at different osmolarities. Companion cells (CC), phloem parenchyma cells (PC), thick-walled sieve elements (SE_{Tk}), thin-walled sieve elements (SE_{Tn}). n.s., cell types were not significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA). Cell types showing the different letters were statistically different at $p < 0.05$ for each osmolarity.

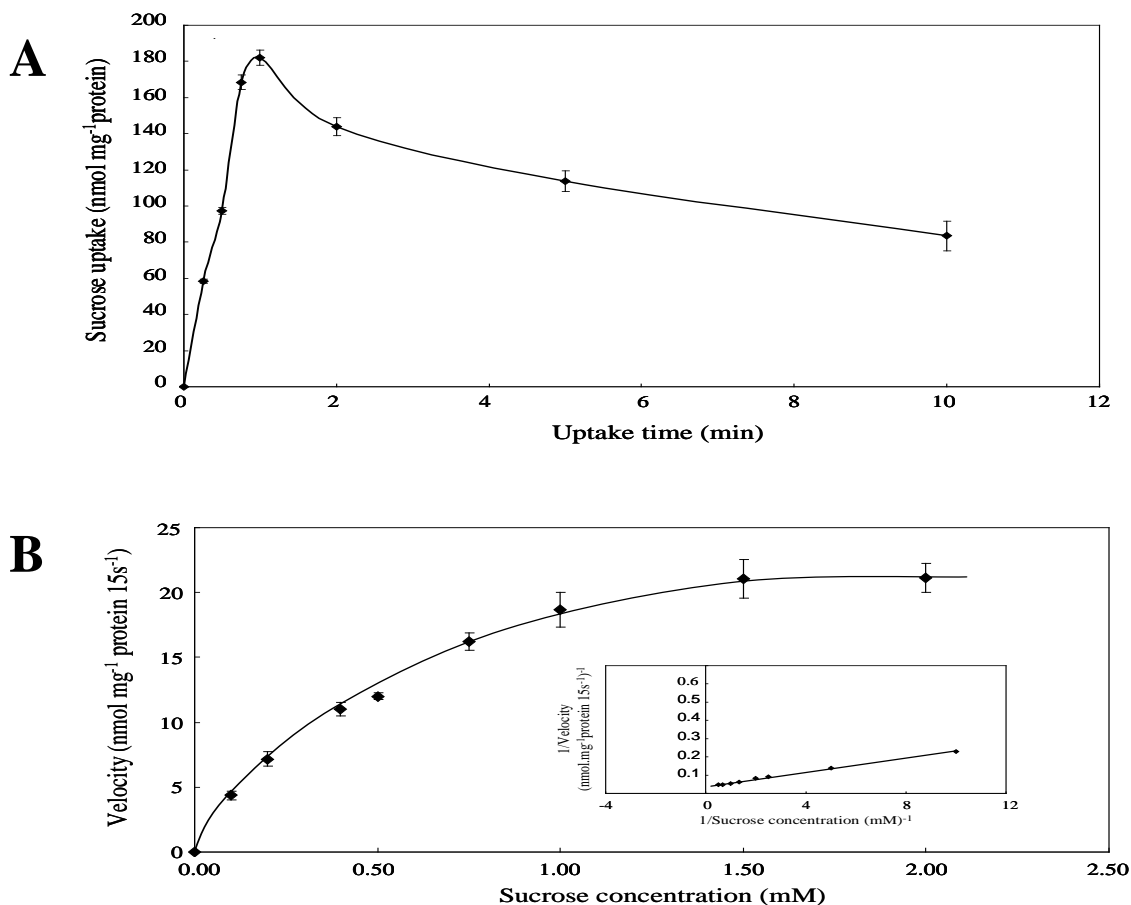


Figure III.2: (A) Proton-motive-force-dependent uptake of 1 mM Suc as a function of time in plasma membrane vesicles from ryegrass leaf sheaths. The results are expressed as pmf-dependent uptake (total uptake – uptake in the presence of 10 μ M CCCP). The results are the mean \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). (B) Proton-motive-force-dependent uptake rate of Suc (measured during the first 15 s) as a function of Suc concentration in plasma membrane vesicles from ryegrass leaf sheaths. The results are expressed as pmf-dependent uptake (total uptake – uptake in the presence of 10 μ M CCCP). The results are the mean \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). The inset shows a Lineweaver-Burk plot of the uptake data.

Table III.1: Effect of various inhibitors and competing sugars on Suc uptake into plasma membrane vesicles obtained from ryegrass leaf sheaths. The Suc concentration was 3 mM and the incubation time was 15 s. The results are expressed as pmf-dependent uptake (total uptake – uptake in the presence of 10 μ M CCCP). Control samples were treated in parallel: 100% = 42.58 \pm 0.58 nmol Suc mg⁻¹protein 15s⁻¹. The results are the mean of two independent experiments (three replicates per experiment). Because some data did not fit the parametric tests conditions, we choose to analyze transport activity by the non parametric test of Kruskal-Wallis (Sokal and Rohlf; 2003), and then by the signed-ranks test. Letters beside the activity indicate statistical significance.

	Transport activity (%)
50 μ M CCCP	20.5 \pm 1.7a
1 mM PCMBs	41.5 \pm 2.7b
0.5 mM DEPC	41.6 \pm 4.6b
1 mM NEM	52.4 \pm 4.2b
10 mM maltose	63.8 \pm 1c
10 mM raffinose	91.9 \pm 2.3d
10 mM mannose	99 \pm 2.2d
Control	100 \pm 1.4d
10 mM glucose	102.8 \pm 1.9d
10 mM palatinose	127 \pm 1.5e
10 mM fructose	132.5 \pm 2.1e

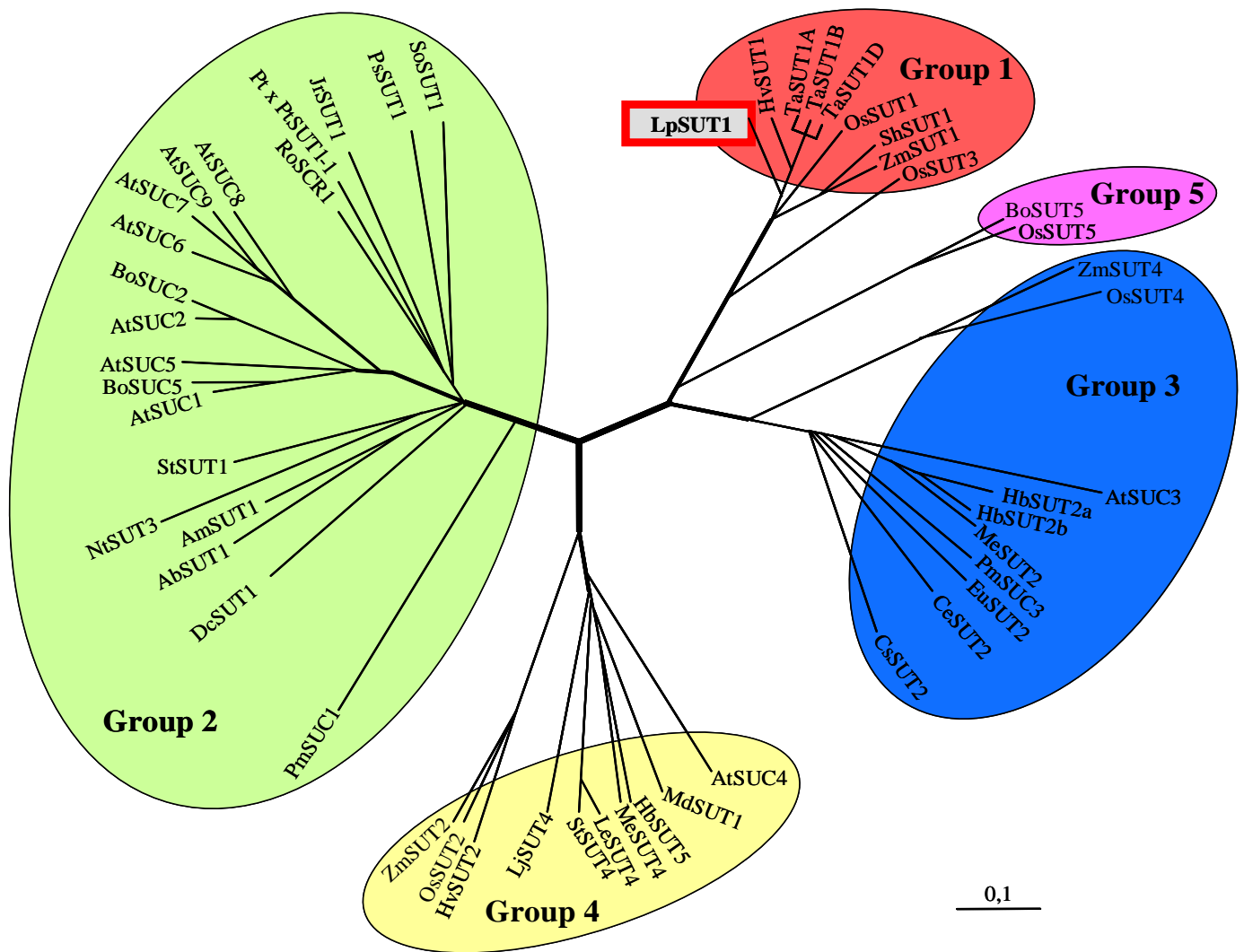


Figure III.3: Phylogenetic tree for 52 confirmed Suc transporter sequences from publicly accessible databases. The transporters presented are: AbSUT1 (*Asarina barclaiana*; AAF04294), AmSUT1 (*Alonsoa meridionalis*; AAF04295), AtSUC1 (*Arabidopsis thaliana*; At1g71880), AtSUC2 (At1g22710), AtSUC3 (At2g02860), AtSUC4 (At1g09960), AtSUC5 (At1g71890), AtSUC6 (At5g43610), AtSUC7 (At1g66570), AtSUC8 (At2g14670), AtSUC9 (At5g06170), BoSUC1 (*Brassica oleracea*; AAL58071), BoSUC2 (*B. oleracea*; AAL58072), BoSUT5 (*Bambusa oldhamii*; AAY43226), CsSUT2 (*Citrus sinensis*; AAM29153), DcSUT1 (*Daucus carota*; BAA89458), EuSUT2 (*Eucommia ulmoides*; AAX49396), HbSUT2a (*Hevea brasiliensis*; ABJ51934), HbSUT2b (*H. brasiliensis*; ABJ51932), HbSUT5 (*H. brasiliensis*; ABK60189), HvSUT1 (*Hordeum vulgare*; CAB75882), HvSUT2 (*H. vulgare*; CAB75881), JrSUT1 (*Juglans regia*; AAU11810), LeSUT2 (*Lycopersicon esculentum*; AAG12987), LeSUT4 (*L. esculentum*; AAG09270), LjSUT4 (*Lotus japonicus*; CAD61275), LpSUT1 (*Lolium perenne*; EU255258), MdSUT1 (*Malus x domestica*; AAR17700), MeSUT2 (*Manihot esculenta*; ABA08445), MeSUT4 (*M. esculenta*; ABA08443), NtSUT3 (*Nicotiana tabacum*; AAD34610), OsSUT1 (*Oryza sativa*; AAF90181), OsSUT2 (*O. sativa*; BAC67163), OsSUT3 (*O. sativa*; BAB68368), OsSUT4 (*O. sativa*; BAC67164), OsSUT5 (*O. sativa*; BAC67165), PmSUC1 (*Plantago major*; CAI59556), PmSUC2 (*P. major*; X75764), PmSUC3 (*P. major*; CAD58887), Pt X PtSUT1-1 (*Populus tremula* • *Populus tremuloides*; CAJ33718), PsSUT1 (*Pisum sativum*; AAD41024), RcSCR1 (*Ricinus communis*; CAA83436), ShSUT1 (*Saccharum hybridum*; AAV41028), SoSUT1 (*Spinacea oleracea*; Q03411), StSUT1 (*Solanum tuberosum*; CAA48915), StSUT4 (*S. tuberosum*; AAG25923), TaSUT1A (*Triticum aestivum*; AAM13408), TaSUT1B (*T. aestivum*; AAM13409), TaSUT1D (*T. aestivum*; AAM13410), ZmSUT1 (*Zea mays*; BAA83501), ZmSUT2 (*Z. mays*; AAT51689), ZmSUT4 (*Z. mays*; AAS91375). Protein sequences were aligned with the program CLUSTAL (Chenna et al., 2003) and the tree was calculated using the program PHYLODENDRON© (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>). Bar indicates the evolutionary distance. The sequences fall into five groups: Group 1 (red) and 5 (purple) contain only sequences from monocot, group 2 (green) contain only sequences from dicot, while the two other groups (3, blue and 4, yellow) contain sequences from both monocot and dicot species (Braun and Slewinski, 2009).

C. Results

C.1 Anatomy and plasmolysis in leaf tissues of *Lolium perenne*

Veins of *L. perenne* leaf blades are surrounded by a parenchymatous bundle sheath (PBS) and a mestome sheath (MS) with no chloroplasts (Figure III.1.A). The wall of the mestome sheath cells is thicker on the side facing the vein. Within the vein, the thick-walled sieve elements (SE_{Tk}) touch the xylem vessels or are separated from them by phloem parenchyma cells (PC). On the opposite side of the SE_{Tk} and PCs, away from the xylem, thin walled sieve elements (SE_{Tn}) and their associated companion cells (CC) are found. PCs have dense cytoplasm with one or more small vacuoles, and are generally bigger than CCs associated with SE_{Tn}. Few plasmodesmata were observed at the interface of the SE_{Tn}-CC complex and of the SE_{Tk}-PC complex.

SE_{Tk} and their associated PC were the most difficult cells to plasmolyze in leaf tissues of *L. perenne* (Figure III.1.B): these cells were not plasmolyzed by a 1200 mOsm solution, while the mesophyll cells plasmolyzed at 800 mOsm, and both SE_{Tn} and their CC at 1000 mOsm. The absolute osmolarity at which cells plasmolyzed may be overestimated as some of the fixative solution might enter the cells before the fixation occurs. However, the relative plasmolysis results indicate that phloem cells have a higher osmolarity than mesophyll cells.

C.2 Characterization of sucrose transport in *Lolium* using plasma membrane vesicles

PMV purification from the microsomal fraction by phase partitioning in a mixture of dextran T500 and PEG at 6.2% produced comparatively good yields while minimizing contamination from other membrane systems (data not shown). Only negligible amounts of chlorophyll, a marker for chloroplast thylakoids, were recovered with the plasma membranes (4.71 mg mg⁻¹ protein). By using 30 g of fresh leaf sheath tissue it was possible to recover 0.33 mg of plasma membrane. The determination of ATPase latency in the presence of 0.02% Triton X-100 suggested that more than 64% of the purified plasma membrane vesicles retained their original (right-side-out) orientation (data not shown).

Under artificially imposed gradients (ΔpH and $\Delta\Psi$), rapid accumulation of Suc occurred during the first minute of incubation (Figure III.2.A). The maximal uptake value

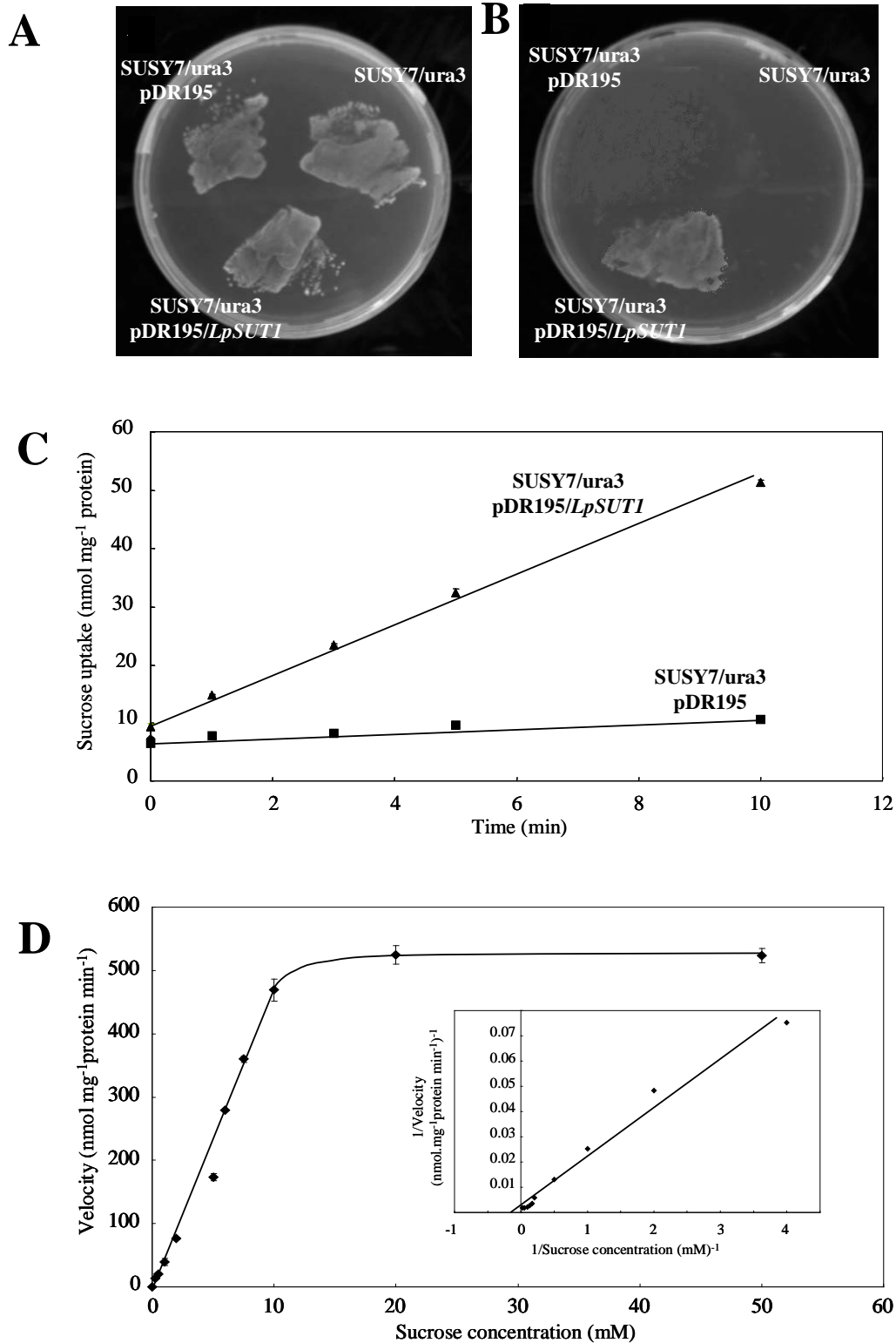


Figure III.4: Growth of yeast transformants on complete media (YNB glucose, tryptophan and uracil) (**A**) and on media supplemented with Suc as the sole carbon source (**B**). No transformed yeasts and empty vector pDR195 were used as negative controls. In (**B**), yeasts were plated on synthetic minimal media containing 2% (w/v) Suc at pH 4.0 and 20 mg l⁻¹ tryptophan and grown for 10 days at 28°C. (**C**) Time course of Suc uptake. SUSY7/ura3 yeast transformed with LpSUT1 in pDR195 (triangles) or empty pDR195 vector (squares) were assayed for ¹⁴C-Suc uptake at 1 mM Suc and pH 4.0. The results are means ± SD of two independent experiments (four replicates per experiment). (**D**) Concentration dependence of Suc transport in transgenic yeast cells expressing LpSUT1. Suc uptake rates of SUSY7/ura3 control cells (with the pDR195 plasmid) were subtracted from Suc uptake rates of LpSUT1-expressing cells to determine the LpSUT1-dependent Suc uptake rates at different Suc concentrations. The results are means ± SD of two independent experiments (four replicates). The inset shows a Lineweaver-Burk plot of the uptake data.

Table III.2: Inhibition and substrate specificity of LpSUT1 expressed in yeast cells. The Suc concentration was 10 mM and the incubation time was 3 min. Inhibitors were added 30 s before the addition of Suc to the assay. Control samples were treated in parallel: 100% = 22.44 ± 0.84 nmol Suc mg-1protein min-1. In order to determine the LpSUT1-dependent Suc uptake rates, Suc uptake rates of SUSY7/ura3 control cells (with the pDR195 plasmid) were subtracted from Suc uptake rates of LpSUT1-expressing cells. The results are means \pm SD of two independent experiments (four replicates). Some data did not fit the parametric tests conditions, we choose to analyse transport activity by the non parametric test of Kruskal Wallis (Sokal and Rohlf, 2003), and then by the signed-ranks test. Letters beside the activity indicate statistical significance.

	Transport activity (%)
50 μ M CCCP	$21.7 \pm 2a$
100 μ M NEM	$26.7 \pm 2.5a$
100 μ M PCMBS	$28.83 \pm 3.61a$
0.5 mM DEPC	$30.5 \pm 1.3a$
10 mM α -phenylglucoside	$34.9 \pm 2.9a$
10 mM maltose	$59.8 \pm 5.3b$
0,25 mM quercitin	$74.8 \pm 1.3bc$
5 mM esculin	$74.8 \pm 1.5bc$
10 mM mannose	$89.3 \pm 3.4c$
10 mM raffinose	$91.9 \pm 6.7c$
10 mM lactulose	$94 \pm 4.6c$
1 mM biotin	$95.4 \pm 3.1c$
10 mM turanose	$95.9 \pm 5.1c$
10 mM arbutin	$97.6 \pm 3.7c$
10 mM glucose	$98 \pm 4.6c$
Control	$100 \pm 3.7c$
10 mM palatinose	$102.8 \pm 4.5c$
10 mM melezitose	$111.4 \pm 4.5c$
10 mM fructose	$118.9 \pm 6.7c$

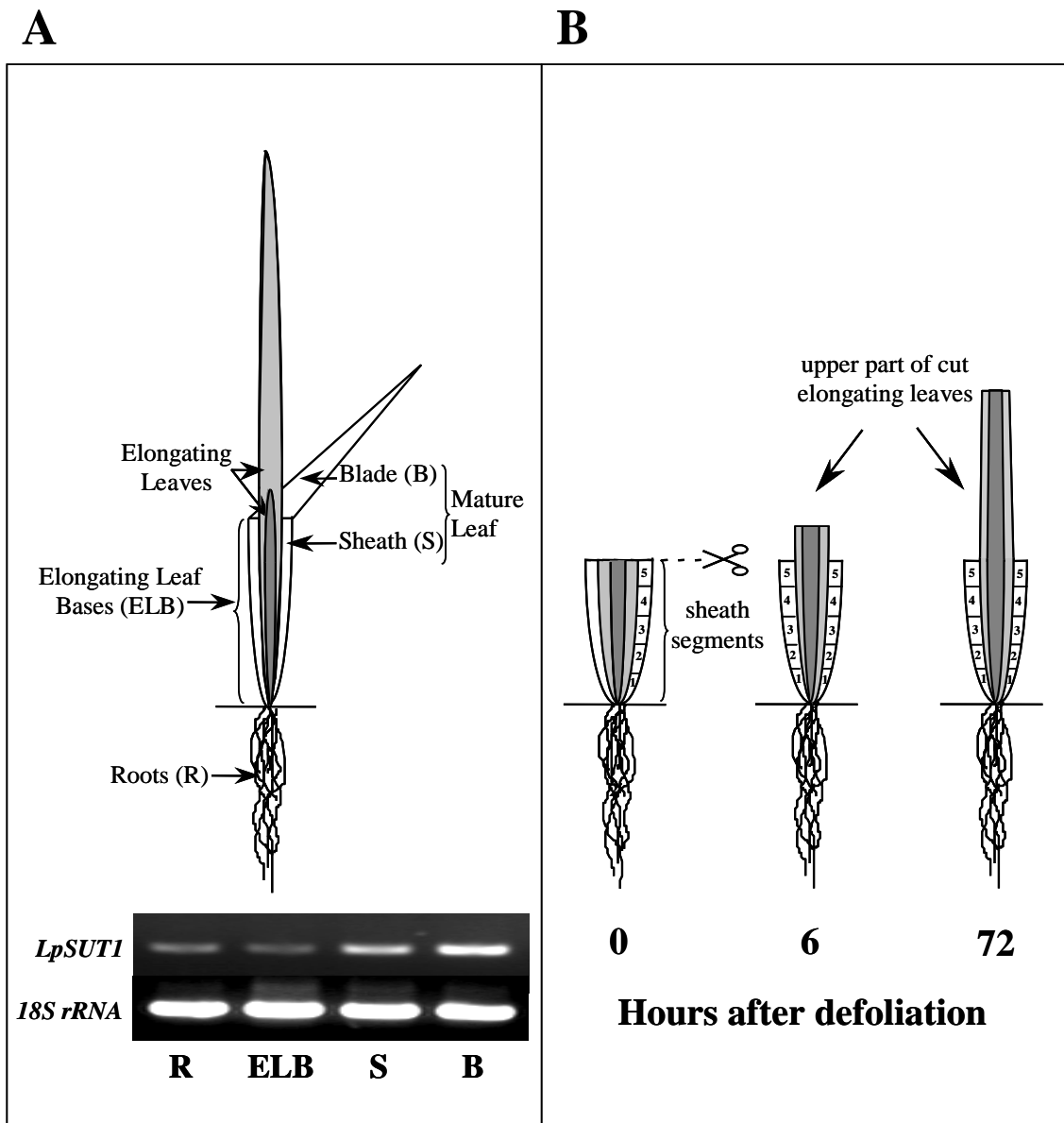


Figure III.5: (A). Schematic view of a tiller of *Lolium perenne* L. In a tiller at vegetative stage, stems are reduced to a few mms. A mature leaf is composed of a blade and a sheath. The growing part of the leaves is confined to their basal region, which is enclosed by the sheaths of older leaves. Accumulation of *LpSUT1* mRNA in *L. perenne* tissues. Total RNA was isolated from various tissues as indicated and subjected to semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis using *L. perenne* 18S rRNA as an internal control. R, roots; ELB, elongating leaf bases; S, sheaths; B, blades (B). After defoliation, leaf sheaths do not regrow. Elongating leaf bases reproduced their own length in two days. Sheaths were separated from elongating leaves and were dissected longitudinally in five 10 mm-long segments (numbers 1 to 5).

(180 nmol mg⁻¹protein) was obtained after 1 min incubation. In studies dealing with artificially energized uptake, rapid accumulation of Suc during the first 1-2 min is frequently followed by a decrease in Suc accumulation (Lemoine *et al.*, 1991; Mauroussat *et al.*, 1992). In the present case, uptake decreased between 1 and 10 min (Figure III.2.A.).

In the case of Suc uptake concentration dependence determination, vesicles energized by $\Delta\text{pH} + \Delta\Psi$ were used to ensure maximal uptake rates and an incubation time of 15 s was chosen to assess what presumably is the initial rate of uptake (Figure III.2.B.). Saturation kinetics are consistent with carrier-mediated transport (Figure III.2.B.) and allows estimation of K_M (580 μM) and V_{max} (21.40 nmol mg⁻¹protein 15s⁻¹).

Sucrose transport was strongly inhibited by the protonophore CCCP (50 μM) and also significantly reduced by covalent modification with p-chloromercuriphenylsulfonic acid (PCMBS), Nethylmaleimide (NEM) and diethylpyrocarbonate (DEPC) (Table III.1.).

Among different sugars tested, only maltose, a dimer of glucose linked in $\alpha(1-4)$, inhibited Suc uptake (Tableau III.1.).

C.3 Identification and functional expression of a sucrose transporter from *Lolium perenne*

After repeated screenings of cDNA libraries prepared from ryegrass stubble, seven positive clones were isolated and sequenced. They represented a single sequence and differed only in the length of the 5'- and 3'- untranslated regions. The longest cDNA was fully sequenced and named *LpSUT1* (*Lolium perenne* Suc Uptake Transporter 1, GenBank accession EU255258). The deduced protein is 522 amino acids long and showed highest homology with HvSUT1 and other monocot Suc transporters (Figure III.3). The phylogenetics tree was calculated by the informatic program Phylodendron[©].

In order to determine whether *LpSUT1* protein is functional as a Suc transporter, *LpSUT1* cDNA was cloned into a yeast expression vector (pDR195) and transformed into the *Saccharomyces* strain SUSY7/ura3 that contains a deletion of the SUC2 gene (invertase). Growth of the transformed yeasts on media containing sucrose as sole carbon source indicate that *LpSUT1* encodes a functional Suc transporter (Figure III.4). The estimated K_M was 5.65 mM with a V_{max} at 528 nmol mg protein⁻¹ min⁻¹ (Figure III.4.D) and uptake was optimal around pH 4.5 (data not shown). As already noted with respect to the total transport capacity of leaf sheath PMV (Tableau III.1), PCMBS, NEM and DEPC

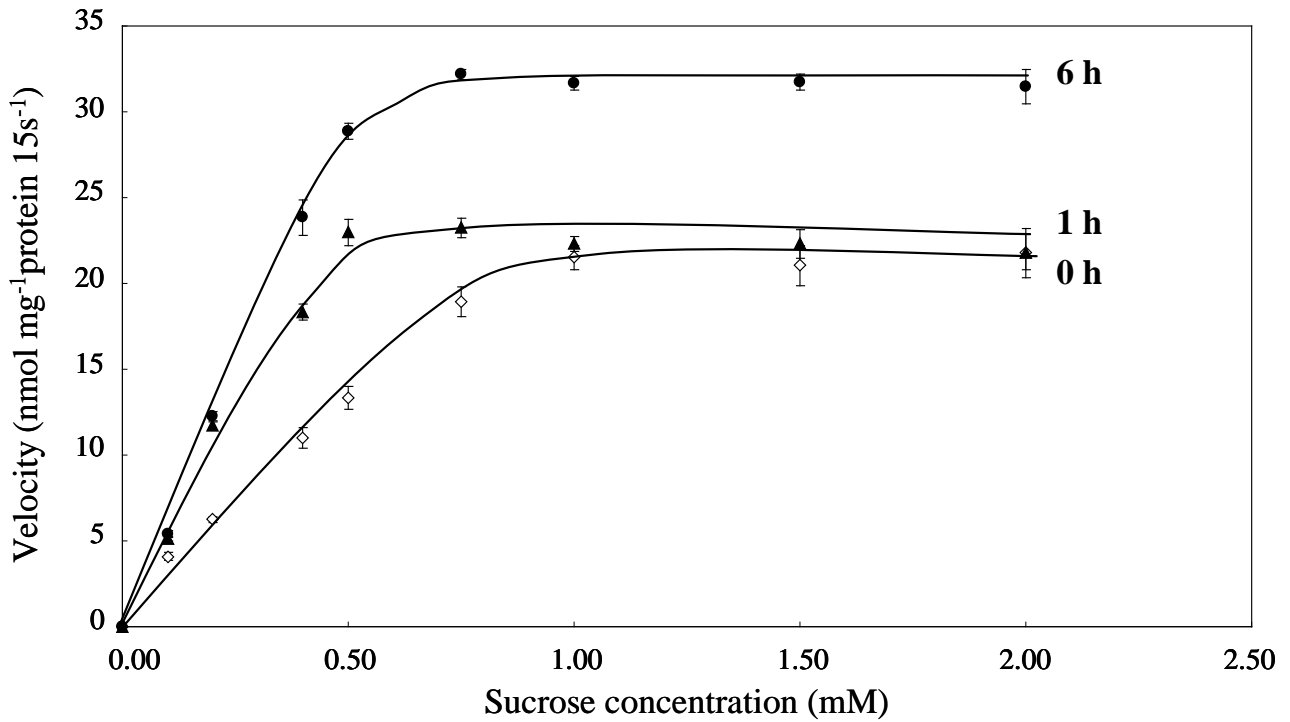


Figure III.6: Proton-motive-force-dependent uptake of 1 mM Suc as a function of time in plasma membrane vesicles from undefoliated ryegrass leaf sheaths (\diamond), 1 h-defoliated leaf sheaths (\blacktriangle) and 6 h-defoliated leaf sheaths (\bullet). The results are expressed as pmf-dependent uptake (total uptake – uptake in the presence of 10 μ M CCCP). The results are the mean \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment).

had a significant effect on Suc transport by LpSUT1 expressed in yeast (Table III.2). To determine the substrate specificity of LpSUT1, transport of Suc was studied in the presence of various sugars and derivatives that might be potential substrates for Suc transporters (Table III.2). Maltose and the synthetic glucoside, α -phenylglucoside, strongly inhibited Suc uptake, by 40% and 65% respectively. Esculin (6,7-dihydroxycoumarin β -D-glucoside) and the plant flavonoid quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) decreased Suc uptake by 25%.

The amount of *LpSUT1* transcript was examined in different tissues of *L. perenne* using a semi-quantitative reverse-transcription (RT)-PCR approach (Figure III.5.A). The level of *LpSUT1* transcripts was higher in leaf blades than in leaf sheaths. Expression was weak in roots and elongating leaf bases.

C.4 Effect of defoliation on Suc transport in leaf sheaths of *Lolium perenne*

After defoliation, leaf sheaths do not regrow while elongating leaf bases regrow their own lengths in about two days (Figure III.5.B.). The effect of defoliation was evaluated by comparing Suc transport in PMV prepared from leaf sheaths of defoliated or undefoliated plants. The initial rate of active uptake of Suc was measured as a function of Suc concentration (Figure III.6.). Before defoliation Suc concentration corresponding to half saturation (K_M) was higher than after 1 h of regrowth (550 and 302 μ M, respectively). In PMV from leaf sheaths of 6h-defoliated plants, maximal velocity was increased to 32.40 nmol Suc $\text{mg}^{-1}\text{protein min}^{-1}$ while K_M was 315 μ M (Figure III.6.). Therefore, events occurring after defoliation modify the Suc uptake system of the plasma membrane in such a way that the affinity for Suc is initially enhanced followed by an increase in maximal velocity. To determine whether LpSUT1 could be one of the Suc transporters involved in the Suc transport capacity of leaf sheaths, leaf sheaths from undefoliated and defoliated plants were harvested and dissected into five 1-cm long segments, starting from the base (Figure III.5.B). From each segment, fructans, Suc, and total RNA were extracted. The removal of leaf blades induced a significant decrease of fructan content (by 60%) and of Suc content (by 70%) in all sheath segments between 6 and 24 h following defoliation (Figures III.7.B et II.7.C). Interestingly, this depletion was preceded by an increase in LpSUT1 transcript levels in all segments (Figure III.7.B) which started after a lag time of 3 h (data not shown). LpSUT1 transcript levels continued to increase between 6 and 24 h

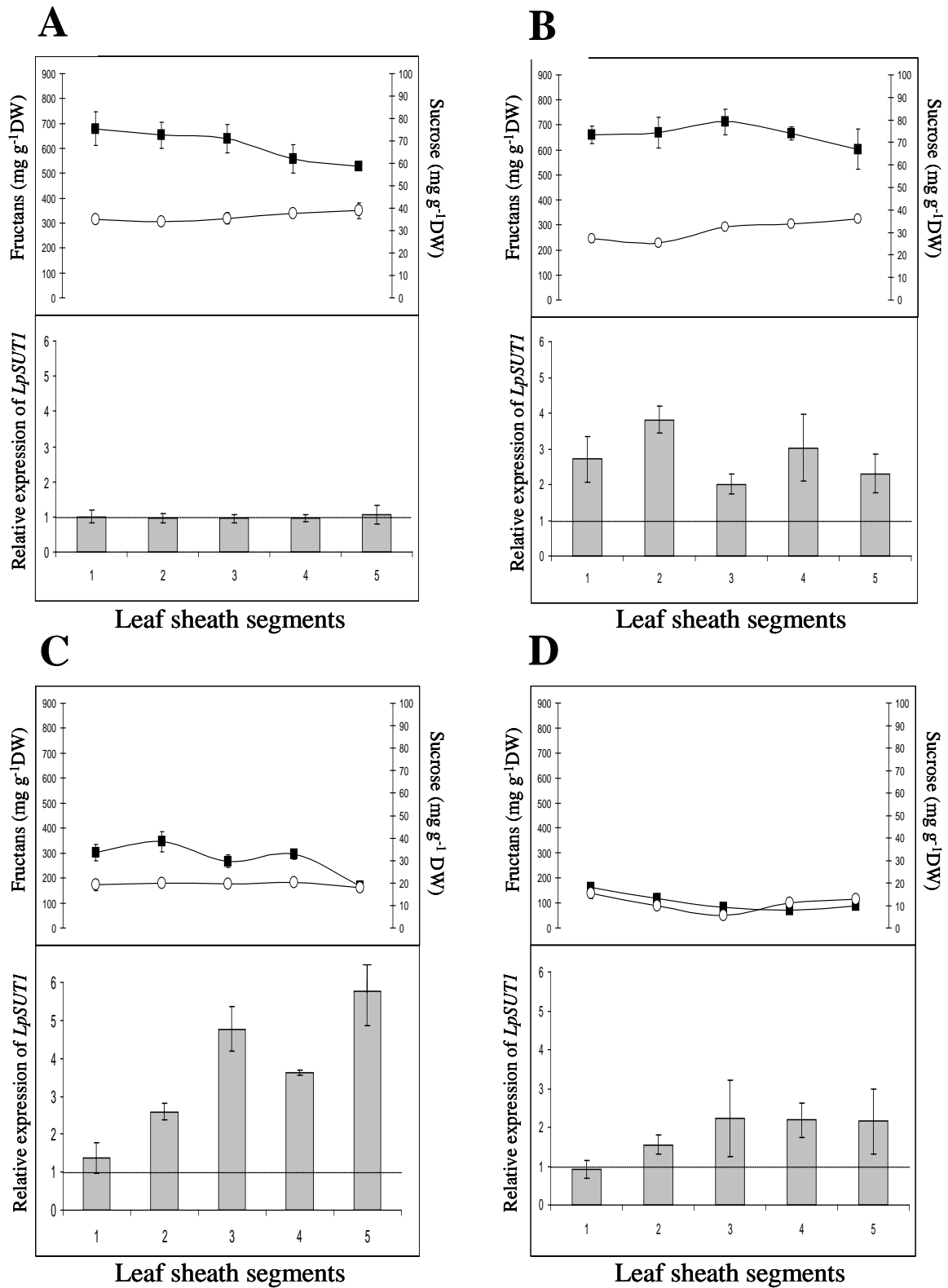


Figure III.7: Distribution of fructans (■) and Suc (○) (mg g⁻¹ dry wt) as well as real time qPCR analysis of *LpSUT1* expression in leaf sheaths of *Lolium perenne*. After 8 weeks of growing, plants were defoliated (A) and allowed to regrow for 6 h (B), 24 h (C) and 72 h (D). Sheaths were dissected longitudinally in five 10 mm-long segments (Fig. III.5). Transcript levels produced by real-time qPCR are compared with 18S rRNA transcripts and expressed as a ratio relative to the control point, i.e. segment 1 of undefoliated plants. Vertical bars represent \pm SE (n=3). Where no error bar is included, the error was smaller than the symbol.

following defoliation, especially in the distal segments (Figure III.7.C), and subsequently declined in all segments (Figure III.7.D).

D. Discussion

D.1 Suc loading pathway in leaf tissues of *Lolium perenne*

The high osmolarity of phloem cells of leaf blades compared to that of mesophyll cells indicates that Suc enters the phloem against a concentration gradient. This observation, together with the presence of only few (only one or two sometimes) plasmodesmatal connections at the interface of phloem cells and the previous finding that Suc is the main carbohydrate translocated (Amiard *et al.*, 2004), suggest that *Lolium* is an apoplastic loader. This assessment is consistent with the conclusion of former studies in monocots (Evert *et al.*, 1996b ; Botha, 2005). The present studies were done on leaf blades only. However, phloem loading might proceed similarly in leaf sheaths, since no anatomical differences between veins of leaf sheaths and veins of leaf blades were observed in preliminary experiments (data not shown).

The high osmolarity observed in the SE_{TK} and their associated parenchyma cells (PC) indicates that, surprisingly, these cells appear to be more resistant to plasmolysis than the SE_{Tn}-CC (Figure III.1). However, SE_{Tn}-CC are generally considered to be the site of phloem loading, based on the results of microautoradiographic studies (Cartwright *et al.*, 1977 ; Fritz *et al.*, 1983 ; Botha, 2005), while SE_{TK}-PC are assumed to function in retrieval of solute from the phloem (Fritz *et al.*, 1983) or sugar storage (Kuo and O'Brien, 1974). Based on the present findings as well as others, the role of the SE_{TK}-PC in phloem loading and unloading should be reconsidered to explain (1) the high osmolarity in this complex, (2) the observation that the sieve-plate pores of the SE_{TK} are not occluded in maize (Evert *et al.*, 1978), (3) the unloading role of both sieve elements (SE_{TK} and SE_{Tn}) in the immature leaf of barley (Haupt *et al.*, 2001), and (4) the physiological stage at which SE_{TK} and SE_{Tn} become mature. Indeed, maturation of SE_{Tn} occurs at the end of the protophloem activity when leaves are still a sink for carbon, and therefore at a time when SE_{Tn} are likely to be involved in phloem unloading, while the maturation of SE_{TK} occurs just before the sink-source transition, suggesting a role of SE_{TK} in phloem loading (Evert *et al.*, 1996a). Mature leaf sheaths have versatile sink/source capacities. In this mature tissue, SE_{Tn} and SE_{TK} could be involved in carbon import from the blades, when Suc is in excess at the whole

plant level (unloading), and carbon export to the sinks, when carbohydrate reserves are mobilized (loading), respectively.

D.2 Characterization of *Lolium perenne* sucrose transport

Transport of Suc in rye-grass was first studied using plasma membrane vesicle and then by cloning and characterizing one gene coding for *Lolium* Suc transporter and expressing it in yeast. The plasma membrane preparation is derived from a mixture of cell types and may include multiple transporters.

The different results presented here demonstrate the feasibility of studying Suc uptake in plasma membrane vesicles purified from monocot species. The yield of PMV preparation (1.1 mg plasma membrane protein per 100 g of tissue FW) was close to that obtained from leaves of broad bean (*Vicia faba* L.) (1.6-2.4 mg: [Maurousset et al., 1992](#)) and much higher than that prepared from petioles of celery (*Apium graveolens* L.) (4.1-5.0 µg: [Salmon et al., 1995](#)). In PMV, Suc uptake was saturable with an apparent K_M of 0.6 mM similar to values published for isolated plasma membrane vesicles of dicot species ([Bush, 1989](#) ; [Lemoine and Delrot, 1989](#) ; [Maurousset et al., 1992](#)). When expressed in yeast, the K_M value of LpSUT1 is similar to that of HvSUT1 or ShSUT1 ([Weschke et al., 2000](#) ; [Rae et al., 2005](#)), the only other monocot type I SUT for which comparable data is available. The PMV kinetic data for sucrose uptake and the yeast data for LpSUT1 are different. This suggests that the SUTs in the PMV's are not only LpSUT1 or that heterologous expression of LpSUT1 in yeast may not entirely recapitulate the endogenous activity. Inhibition of Suc transport by the protonophore CCCP, in both PMV and yeast expressing LpSUT1, support the assumption that Suc uptake is mediated by a proton cotransport mechanism. Involvement of histidine can be deduced from the result obtained with DEPC. One histidine residue (His 65) is conserved among all sucrose carriers and is located in the first extracellular loop, close to the start of the putative second transmembrane segment ([Lu and Bush, 1998](#)). Mutagenesis directed at this histidine residue affected the sucrose transport activity ([Lu and Bush, 1998](#)). The results obtained with PCMBS and NEM, permeant and non-permeant thiol-modifying agents respectively, suggest that the sucrose transport mechanism in *L. perenne* may involve cysteine residues ([Bush, 1993](#)). Numerous studies have shown that plants encode multiples Suc transporters with different substrate specificity ([Sakr et al., 1993](#) ; [Riesmeier et al., 1992](#) ; [Sauer & Stolz, 1994](#) ; [Lemoine 2000](#) ; [Noiraud et al., 2000](#) ; [Chandran et al., 2003](#)). In *Lolium*, Suc uptake is inhibited by

maltose, the synthetic glucoside α -phenylglucoside, the natural glucoside esculin and the flavonoid quercetin. Other compounds known to be transported by some Suc transporter of dicot species did not show any effect on Suc transport in *Lolium*. This is in accordance with Sivitz and collaborators (2005, 2007) observation that sucrose transporters present in monocot have higher substrate specificity than the ones present in dicot.

D.3 Putative role for LpSUT1

LpSUT1 is highly expressed in leaf blades and in leaf sheaths of undefoliated plants (Figure III.5.A). In *L. perenne*, leaf blades are photosynthetically active and represent the carbon source for other parts of the plants. Leaf sheaths can serve as a passageway for Suc between leaf blades and roots or elongating leaves (Borland and Farrar, 1989), but when carbohydrates are produced in excess compared to plant needs, Suc is unloaded in leaf sheaths and stored as fructans (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999b). In the present study, leaf sheaths were actively accumulating Suc, since their fructan content was very high (Figure III.7.A). Similarly to *LpSUT1*, *ShSUT1* was expressed predominantly in mature leaves of sugarcane that were exporting Suc and in stem internodes that were actively accumulating Suc. Immunolocalization identified the protein in cells surrounding the vascular bundles in both the leaf and the stem. In stems, *ShSUT1* has been assigned a role in partitioning of Suc between the vascular tissue and sites of storage in the parenchyma (Rae *et al.*, 2005). *StSUT1* from potato plants was also expressed in both mature exporting leaves and in importing tubers at their early stage of development. *StSUT1* was shown to be present in sieve elements of sink tubers, leading to the suggestion that it can be involved in both phloem loading and unloading (Kühn *et al.*, 2003). Indeed, the *ZmSUT1*-mediated Suc transport in maize has been shown to be reversible under physiological conditions (Carpaneto *et al.*, 2005). Depending on *LpSUT1* tissue localization (vascular or parenchyma), it could be responsible for either the retrieval of Suc from the extracellular space by blade and sheath parenchyma cells or for catalyzing Suc phloem loading and unloading in leaf blades and leaf sheaths. Moreover, fluorescent dye experiments could be used to establish the post phloem transport pathway into sheaths and the loading from sheath storage tissue to SE's. The examination of the presence or absence of symplastic continuity between cells in the phloem loading pathway could help to clarify the physiological role of *LpSUT1* as was done for *OsSUT1* or *TaSUT1* (Scofield *et al.*, 2007 ; Aoki *et al.*, 2004).

D.4 Effect of defoliation on Suc transport in leaf sheaths of *Lolium perenne*

As a prerequisite to the restoration of active photosynthesis, refoliation is the key element of a plant response to severe defoliation. Upon leaf blade removal, leaf meristems are no longer supplied with carbon assimilates from leaf photosynthesis. Extensive mobilization of non-structural carbohydrates, such as fructans, occurs in the residual parts of defoliated plants, especially in leaf sheaths, where up to 96% of the fructans are depleted during the first 2 days of regrowth (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a). In *L. perenne*, Suc is the main translocated sugar, representing at least 90% of the total sugar content in phloem sap both before and after defoliation (Amiard *et al.*, 2004). PMV prepared from leaf sheaths of undefoliated and defoliated plants served to assess changes in Suc transport capacity during the sink/source transition of leaf sheaths and revealed a decrease of K_M and subsequent increase of the maximal rate V_{max} . This increase of Suc transport capacity in leaf sheaths in response to defoliation is likely to be one of the mechanisms contributing to rapid refoliation.

The increase of V_{max} and decrease of K_M may either be due to (i) an increase in the number of the same carriers (per mg protein) as present in undefoliated leaf sheath PMV, (ii) synthesis and membrane incorporation of a new set of different carrier proteins, (iii) regulatory modification of preexisting carriers, and/or (iv) modification of the lipid environment of the carrier (Sakr *et al.*, 1993). In PMV of ryegrass leaf sheaths, the decrease of K_M for Suc observed 1 h after defoliation might be due to rapid post-translational modifications, such as dephosphorylation of Suc transporters or induction of one or more other Suc transporter isoforms (Roblin *et al.*, 1998). It is also possible that *de novo* synthesis of transporters occurred as a response to defoliation. Wounding enhanced expression of *AtSUC3*, a Suc transporter from *Arabidopsis* sieve elements, and transcripts were already detected after 1 h (Meyer *et al.*, 2003). Studies with sugar beet and spinach leaves showed that cutting also induced modifications of the Suc transport system in the leaves that were removed. Furthermore, when Suc transport was compared in attached and detached leaves, both V_{max} and K_M of the Suc transport in PMV were higher in detached leaves versus attached leaves (Sakr *et al.*, 1993). This change in the Suc transport activity resulted from an increased transcript level of Suc transporters BvSUT1 from sugar beet and SoSUT1 from spinach as well as from a corresponding increase in Suc transporter protein level in the plasma membrane (Sakr *et al.*, 1997). In *L. perenne*, defoliation enhanced the expression of LpSUT1 in the remaining leaf sheaths during the first day of

regrowth. If the amount of protein also increased in leaf sheaths, LpSUT1 could account for at least part of the increase in Suc transport capacity. This question will be investigated further in future studies, but at the present time, none of the alternative explanations given above can be ruled out, including the possibility that Suc transporters other than LpSUT1 might play an important role.

In conclusion, we have identified and characterized the first Suc transporter in one of the most important forage grasses, *L. perenne*. Since *LpSUT1* expression increased in leaf sheaths as a response to defoliation, LpSUT1 might be a key component of the carbon partitioning mechanism that provisions the leaf meristems and sustains refoliation. After defoliation, the activity of the phloem in leaf sheaths undergoes a sudden switch from unloading to loading (Amiard *et al.*, 2003). The apoplastic mode of phloem loading observed here in *L. perenne* would appear to be an appropriate adaptation to this radical change.

Funding

The financial support of the National Science Foundation (Award IBN-0235351 to WWA and BD-A) is gratefully acknowledged.

Acknowledgments

We are grateful to Sandrine Rezé for her excellent technical assistance.

E. Transition chapitre 1 – chapitre 2

Le Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) est connu pour avoir une vitesse de repousse après coupe qui est élevée, ce qui lui permet de dominer la plupart des couverts prairiaux. Cette vitesse semble être corrélée à une mobilisation efficace des réserves carbonées principalement représentées par les fructanes (polymères hydrosolubles de fructose) à partir des tissus sources (*i.e.* gaines). Cependant, le carbone issu de cette mobilisation n'est pas acheminé directement vers les tissus puits (*i.e.* bases de feuilles en croissance) sous forme de fructose mais sous forme de saccharose. **Nous avons alors émis l'hypothèse fonctionnelle suivante : la flexibilité du transport de saccharose pourrait être un point de contrôle majeur de la bonne capacité de repousse après coupe du Ray-grass anglais, et ce transport efficace de saccharose pourrait être sous la dépendance de transporteurs de saccharose (Sucrose Transporters ; SUT's).** Afin de vérifier cette hypothèse, et comme aucun transporteur de saccharose n'avait été jusqu'alors identifié chez le Ray-grass anglais, nous nous sommes attachés à la découverte de ces protéines de transport de saccharose. Les SUT sont représentés au sein d'une famille multigénique. Nos premières expérimentations (observations anatomiques, expérience de plasmolyse, utilisation de PMV) nous ont fourni des résultats montrant qu'il existait bel et bien une plasticité du transport du saccharose suite à la défoliation.

Ainsi, en collaboration avec l'équipe du Pr. Turgeon (Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, USA), nous avons observé, *via* des mesures en microscopie électronique sur des faisceaux conducteurs de gaines de Ray-grass anglais, que le **chargement du phloème** chez cette espèce se faisait d'une manière **apoplastique** au sein du complexe cellule phloémienne/cellule compagne. Les études de plasmolyse sur ces cellules ont démontré l'existence d'un puissant gradient de saccharose dirigé vers le phloème. Ces résultats impliquent l'utilisation d'une énergie importante pour permettre et maintenir l'existence de ce gradient de concentration. Grâce à l'utilisation de vésicules de plasmalemmes de gaines issues de plantes non défoliées et défoliées, il apparaît que **les évènements caractérisant ce chargement impliquent des protéines de transport de saccharose.**

Par conséquent, nous avons réalisé le clonage d'un ADNc à partir de deux banques phagiques contenant respectivement les ADNc de chaumes de Ray-grass défoliés et non défoliés. **Une protéine de transport de saccharose nommée LpSUT1 a ensuite été**

identifiée. Les caractéristiques de cette protéine ont été déterminées par expression hétérologue dans la levure. Les données observées pour la protéine LpSUT1 sont proches de celles observées chez d'autres Poacées telles que l'Orge ou le Blé. La présence avérée de ces protéines membranaires pourrait ainsi expliciter la vision d'un **transport (en termes de vitesse et de capacité) de saccharose qui pourrait être limitant pour le phénomène de repousse après coupe observé chez *Lolium perenne* L.**

L'analyse bibliographique ainsi que nos premiers résultats ont laissé à penser que la protéine LpSUT1 n'est pas le seul transporteur de saccharose impliqué lors de la repousse après coupe. Nous avons alors entrepris de rechercher, de cloner, d'identifier, de caractériser fonctionnellement et de localiser d'autres transporteurs de saccharose chez le Ray-grass anglais. Une fois identifiés et clonés, nous avons réalisé leur caractérisation. Parallèlement, nous avons également suivi leur expression au sein des gaines et des bases de feuilles en croissances lors d'une cinétique de défoliation/repousse de 24h. Pour compléter l'analyse de ces protéines, nous avons développé des anticorps spécifiques de ces transporteurs et leur immuno-localisation a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Lemoine (Laboratoire Phymots, Poitiers). Ces recherches ont permis la rédaction d'un deuxième article qui fait l'objet d'une soumission à Plant Molecular Biology. Cet article est présenté à la suite de ce paragraphe.

Chapitre 2

Identification of a new sucrose transporter in

rye-grass: LpSUT2, a key element, along

with LpSUT1, of C partitioning during

regrowth after defoliation?

IV. CHAPITRE 2

Identification of a new sucrose transporter in rye-grass: LpSUT2, a key element, along with LpSUT1, of C partitioning during regrowth after defoliation?

Alexandre Berthier¹, Frédéric Meuriot¹, Philippe Barre², Fabienne Dédaldéchamp³, Rémi Lemoine³, Marie-Pascale Prud'homme¹, Nathalie Noiraud-Romy^{1,4}

¹ UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie and nutritions NCS, irba, Esplanade de la Paix, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

² URP3F, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères, Lusignan, INRA, Le Chêne, RD 150, BP 80006, 86600 Lusignan France

³ Université Poitiers, PHYMOTS, CNRS, Poitiers, France

Corresponding author: Nathalie Noiraud-Romy

UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions NCS, irba, Esplanade de la Paix, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

Phone : (33)-2-31-56-56-17 Fax : (33)-2-31-56-53-60

E-mail : nathalie.noiraud-romy@unicaen.fr

Article soumis à *Plant Molecular Biology*.

Résumé

La repousse du Ray-grass anglais après défoliation peut résulter d'une mobilisation efficace des réserves carbonées (principalement des fructanes, correspondant à des polymères de fructose) et à leur transport sous forme de saccharose vers les feuilles en repousse, grâce à la présence de un ou plusieurs transporteurs de saccharose (SUTs). Ainsi, nos objectifs étaient d'isoler, de caractériser et d'immuno-localiser des transporteurs de saccharose chez des plantes intactes et défoliées.

Une protéine, dénommée LpSUT2, de 65 kDa et présentant 12 domaines transmembranaires, une extrémité N-terminale et une boucle interne cytoplasmique relativement longues, ainsi que des propriétés cinétiques proches de celles d'autres transporteurs de saccharose connus, a été isolée et fonctionnellement caractérisée avec succès chez la levure. De façon tout à fait intéressante, le transport de saccharose par LpSUT2 est inhibé par le fructose. Les protéines LpSUT1 et LpSUT2 ont été principalement localisées dans les cellules du mésophylle des gaines et des bases de feuilles en croissance. Elles ont aussi été détectées dans les cellules de la gaine préfasciculaire. Par contre elles sont absentes du complexe phloémien. A la différence des transcrits *LpSUT1* dont le niveau augmente dans les tissus source et dans les tissus puits en réponse à la défoliation, les transcrits *LpSUT2* sont insensibles à la défoliation et faiblement exprimés. LpSUT1 et LpSUT2 semblent avoir des fonctions différentes. LpSUT1 jouerait un rôle clé dans la mise en réserve du C et sa mobilisation en assurant le transport du saccharose des cellules de la gaine périfasciculaire aux cellules du mésophylle accumulatrice ou mobilisatrice de fructanes, selon le statut carboné de la plante. LpSUT2 pourrait être plutôt impliqué dans la perception de la concentration en saccharose ou en fructose au niveau sub-cellulaire. Les résultats sont discutés dans le contexte de la repousse après coupe d'une espèce qui produit du fructose en quantité élevée suite à la dégradation de ses fructanes.

Mots clés :

Saccharose; Transporteur de Saccharose; Perception des Sucres; *Lolium perenne* L; Repousse, Défoliation

Abstract

Rye-grass regrowth after defoliation could result from an efficient mobilization of C reserves (mainly fructans corresponding to fructose polymers) and to their transport as sucrose towards regrowing leaves, which can be supported by one or several sucrose transporters (SUTs). Therefore, our objectives were to isolate, identify, characterize and immunolocalize sucrose transporters within intact and defoliated plants.

A protein, named LpSUT2, of 65 kDa and showing a twelve spanning trans-membrane domain, extended N terminal and internal cytoplasmic loop, as well as kinetic properties consistent with well-known sucrose transporters, was isolated and successfully characterized in yeast. Interestingly, sucrose transport by LpSUT2 was inhibited by fructose. The proteins LpSUT1 and LpSUT2 were mainly localized in mesophyll cells of leaf sheaths and elongating leaf bases. They were also found in parenchyma bundle sheath (PBS) cells but they were not detected in the sieve element/companion cell complex of the phloem. Unlike *LpSUT1* transcript levels which increased as a response to defoliation in source and sink tissues, *LpSUT2* transcript levels were unaffected by defoliation and weakly expressed. LpSUT1 and LpSUT2 proteins appeared to have different functions. LpSUT1 is proposed to play a key role in C storage and mobilization by allowing sucrose transport between PBS and mesophyll cells accumulating or degrading fructanes, depending on the plant C status. LpSUT2 could be involved in sucrose/fructose sensing at sub-cellular level. Results are discussed in the context of regrowth after defoliation of a species that produces fructose in high amounts as a result of fructan degradation.

Keywords:

Sucrose; Sucrose Transporter; Sugar sensing; *Lolium perenne* L; Regrowth, Defoliation

A. Introduction

According to their low requirements for fertilizers inputs and because they are commonly bare-cutted or grazed by cattle throughout the growing season, forage grasses are the backbone of sustainable agriculture and contribute extensively to the world economy. Within grasslands, perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) has a central position because of its large representation (amongst all forage species) and its great ability to regrow after cutting. This is mainly related to the basal position of both leaf meristems and carbon reserves (especially fructans, which could represent more than 85% of overall soluble sugars) beyond the reach of cutting-machines or animals. Fructans, sucrose-derived fructose polymers, are thus principally located in leaf sheaths and in elongating leaf bases (Guerrand *et al.*, 1996 ; Pavis *et al.*, 2001) and are extensively mobilized during the first three days of regrowth (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). However, fructose arising from fructan degradation within these source tissues is not transported *per se* towards young growing tissues (Amiard *et al.*, 2003, 2004). Instead, sucrose is synthesized, subsequently loaded into phloem cells apoplastically (Berthier *et al.*, 2009), and further translocated to sink organs via phloem sieve tubes as in most higher plants (van Bel, 1993). Sucrose therefore accounts for more than 90% of the total soluble sugars in the phloem sap of leaf sheaths after defoliation (Amiard *et al.*, 2004). Only recently, Berthier *et al.* (2009) reported that this apoplastic transport is mediated through an active transport across plasma membranes via proton symport and therefore implies the presence of one or several sucrose transporters (SUTs). Such transporters are thought to play important roles in mediating carbon partitioning in plants and were therefore particularly studied (Lemoine, 2000 ; Lalonde *et al.*, 2003 ; Kühn and Grof, 2010). Over the last decade, carrier-mediated and proton-coupled sucrose transport activities have been identified in a wide range of monocot and dicot plant species, and were localized in both phloem and non-phloem tissues (Lemoine, 2000 ; Williams *et al.*, 2000 ; Lalonde *et al.*, 2003). The first SUT gene to be identified in a monocot species was that from rice (*Oryza sativa* L.), OsSUT1 (Hirose *et al.*, 1997). Since then, SUT1 genes have been isolated from other monocot species, including maize (*Zea mays* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), and wheat (*Triticum aestivum* L) (Aoki *et al.*, 1999 ; Weschke *et al.*, 2000 ; Aoki *et al.*, 2002) and were reported to be essential components of assimilates transport for grain filling (Scofield *et al.*, 2002 ; Weschke *et al.*, 2000 ; Bagnall *et al.*, 2000 ; Aoki *et al.*, 2002). Other studies also suggested a potential role of OsSUT1 in sucrose phloem loading (Hirose *et al.*, 1997 ; Matsukura *et al.*, 2000 ; Scofield *et al.*, 2007). Quite recently, Weschke *et al.* (2000) also

identified a second SUT gene in barley, *HvSUT2*. The expression of the GFP fusion protein with HvSUT2 revealed a tonoplastic localization of this sucrose transporter, which then indicated that this transporter is involved in the trade-off between vacuole and cytoplasm for sucrose (Endler *et al.*, 2006). Overall results therefore indicate that sucrose transporters present a wide variety of cellular localization and associated physiological roles at the whole plant level.

Increasing availability of molecular information regarding the sucrose transporter family highlights the fact that there are more than one sucrose transporter per plant species. Indeed, in Arabidopsis, six SUT genes have been functionally characterized by heterologous expression in yeast cells or in *Xenopus* oocytes whereas three further putative SUT sequences are found in public databases (Kühn and Grof, 2010). In Solanaceous species such as potato (*Solanum tuberosum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), three SUT genes with different characteristics for sucrose transport are known to exist (Riesmeier *et al.*, 1993 ; Barker *et al.*, 2000 ; Weise *et al.*, 2000). Lastly, Kühn and Grof (2010) reported that the rice genome encodes five SUTs: two (OsSUT1 and OsSUT3) belong to SUT3 clade, one (OsSUT4) to SUT2 clade, one (OsSUT2) to SUT4 clade and a last one (OsSUT5) to SUT5 clade. The differential expression patterns of the OsSUT transcripts suggest that the SUT gene family has many roles in both source and sink tissues and at different developmental stages (Aoki *et al.*, 2003). According to a combination of electron microscopy, plasmolysis experiments, and plasma membrane vesicles, Berthier *et al.*, (2009) recently confirmed an apoplastic phloem loading of sucrose in *Lolium perenne* L. and cloned the first sucrose transporter in this species named LpSUT1. This sucrose transporter was isolated from stubble (including leaf sheaths) cDNA libraries and functionally expressed in yeast. Results reported that the level of LpSUT1 expression increased in leaf sheaths in response to defoliation during the first day of regrowth. This sucrose transporter was thus thought to play a key role in sucrose transport between source tissues (leaf sheaths) towards young developing sinks (leaf meristems) and it was hypothesized that this transporter could participate to the ability of rye-grass to regrow after defoliation.

Considering that many plants such as Arabidopsis, rice or barley contain numerous genes encoding sucrose transporters, we hypothesized that additional sucrose transporters might be implicated in regrowth after defoliation in rye-grass. The present study therefore aimed to i) identify and characterize new sucrose transporters, (ii) immunolocalize them in leaf sheaths and in elongating leaf bases before and after defoliation in order to get insights into their physiological roles, (iii) analyze the effect of defoliation on their expression level

within these two tissues of particular interest for rye-grass regrowth after defoliation. All together, the results will lead to a better understanding of C partitioning in a fructan accumulating plant of high economic and environmental importance which metabolism is less documented than in starch accumulating plants.

B. Materials and methods

B.1 Plant materials and growth conditions

Seeds of *Lolium perenne* L. cv. Bravo were germinated and grown for 8 weeks in a greenhouse on a nutrient solution in 9 L polyvinyl-chloride pots as previously described (Gonzalez *et al.*, 1989). The nutrient solution was continuously aerated and renewed every week in order to avoid any nutrient deficiency. The photoperiod was 16h of natural light supplemented by a Photosynthetic Active Radiation (PAR) to 440 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The thermoperiod was 22°C (day) and 18°C (night). All cultivated plants are separated equally in two group, defoliated group and no defoliated group. Defoliated plants are cut at 5 cm above ground level at 8.00 am. Plants groups were harvested in the same way after 0, 3, 6 and 24h of regrowth. Plants were separated into mature leaf sheaths and elongating leaf bases (0-5 cm height from the leaf base), frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C. This allowed us to obtain the samples needed for analysis of sugar content and the RNA of each organ, to determine the effect of defoliation on Suc transport in leaf sheaths and elongating leaf bases.

B.2 Screening of cDNA libraries

In order to isolate different Suc transporter genes expressed in ryegrass, a 567 bp *L.perenne* PCR product was used to screen two cDNA libraries prepared from stubble (composed of leaf sheaths and elongating leaf bases) of 8-week-old plants either treated to accumulate fructans (Lasseur *et al.*, 2006) or defoliated (Lothier *et al.*, 2007). The PCR product was previously obtained with a sense primer SUT2F (5'-CCAACAGATGCACAACGAACGATTA-3') based on the conserved amino acid sequences VGFSAD in monocot and an antisense primer SUT2R (5'-GATGTGGTGAAGTTTACTTGAG-3') designed from the conserved amino acid sequences DTDWMG. The PCR product was labeled with [α -³²P]dCTP by using a random priming method with the NEBlot kit (Biolabs, Montigny-le-Bretonneux, France). Hybond-N nylon

filters (Amersham BioSciences, Les Ulis, France) were hybridized overnight at 42°C using standard conditions (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Filters were washed for 15 min at 42°C with 0.1% SDS and 2X SSC (1X SSC is 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), for 15 min at 50°C with 0.1% SDS and 2X SSC, and for 30 min at 50°C with 0.1% SDS and 1X SSC. *In vivo* excision was performed on the clones that gave positive signals during the three rounds of screening. The cDNAs were sequenced (BIOfidal, Vaulx-en-Velin, France). Nucleotide sequences were compared with sequences available in the NCBI Databank. Transmembrane regions and protein orientations were predicted using HMMTOP (Hidden Markov Model Topology Prediction ; [Tusnady and Simon, 1998](#)).

B.3 HRM procedure and LpSUT mapping

The mapping population was a F2 population obtained from the cross between two plants of the progeny from a plant of the turf variety Imagine (Olsen-Fennell Seeds Inc.) and a plant of the forage variety: Gagny (Gie GRASS). A map was built using AFLP markers and SSRs. Markers were from different origins ([Studer et al., 2008](#) ; [Gill et al., 2006](#) ; [Barre et al., 2009](#) ; [Jensen et al., 2005 a,b](#) ; [Faville et al., 2004](#) ; [Lauvergeat et al., 2005](#) ; [Hirata et al., 2006](#)). Genotyping was performed as in [Barre et al., 2009](#) and a map was built using the software Joinmap ([Van Ooijen and Voorrips, 2003](#)). *LpSUT* genes were mapped on this map. Total DNA of 236 plants was extracted using the CIMMYT genomic DNA extraction protocol (<http://www.cimmyt.org>) adapted for 96 well plates. The primers LpSUT1s (CTTCATTCATGTGGCTCTGC), LpSUT1as (TATTTCTAGCGCCATCCAA), LpSUT2s (CGCTGGAACCAAAGGATGTA) and LpSUT2as (ACCAGCGCTGAATTTCTGAC) were used to amplify a part of the different *LpSUT* genes. PCR reactions and discrimination of alleles were performed on a Light Cycler 480 (Roche) following manufacturer HRM (High resolution melting) protocol. The PCR conditions were: 20 ng of DNA, Master Mix HRM (Roche) 1X, 0.2 µM of forward primer, 0.2 µM of reverse primer, 3 mM of MgCl₂ in a final volume of 20 µl. The PCR program was 94°C for 10 min followed by 45 cycles of 94°C for 10 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 25 s, followed by a fusion program 95°C for 10 s, 40°C for 10 min, 65°C 1 s to 95°C with a temperature increase of 2.2°C/s. An acquisition of fluorescence was recorded every 0.02°C. For *LpSUT1* three different groups were clearly distinguished in the F2 progeny ([Figure IV.2.A](#)) which were scored as aa, ab and bb. For *LpSUT2* two different groups were clearly distinguished in the F2 progeny ([Figure IV.2.B](#)) which were scored as aa and ab. The *LpSUT1* and *LpSUT2* genes were mapped using the

software Joinmap with the Haldane distance (Van Ooijen and Voorrips, 2001 ; Figure IV.3). The linkage groups were grouped with a minimum of LOD 6.0. For *LpSUT2*, the heterozygous parent was determined by testing both possibilities aaxab and abxaa and rejecting the one where *LpSUT2* was far from the other markers of the same linkage group.

B.4 Functional analysis of *LpSUT*

LpSUT2 cDNA was ligated into the *Bam*HI-*Xho*I sites of the yeast shuttle vector YEP112 A1XE (Riesmeier *et al.*, 1992). This vector allows expression of full-length cDNAs under the control of the *S. cerevisiae ADHI* promoter. Competent yeast cells SUSY7 were prepared and transformed according to the method of Dohmen *et al.* (1991). SUSY7 transformed with the corresponding empty plasmid was used for control experiments.

Yeast cells were grown to the early logarithmic phase, washed with distilled water, and resuspended to 1% (w/v) in yeast nitrogen base (YNB) medium containing 25 mM 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) buffer, pH 4.5. The pH dependence of Suc uptake was determined in YNB medium buffered at different pH values with 25 mM MES. A 100 μ L aliquot of the cell suspension was incubated at 28°C for 0, 60, 120, 180, and 300 s in 100 μ L of a solution containing [¹⁴C-U]-Suc (7.4 kBq. mL⁻¹). The reaction was stopped by addition of 8 mL of ice-cold water and filtration on glass-fiber filters (Sartorius, Palaiseau, France). The radioactivity incorporated in the cells was determined by a liquid scintillation counter (Packard Instruments, Meriden, CT). For inhibition and competition studies, reagents were added 30 s prior to sucrose. Functional analysis of *LpSUT2* was performed according to Berthier *et al.* (2009).

B.5 RNA isolation, RT-PCR and real-time qPCR analysis

Plant tissues (leaf sheaths and elongating leaf bases) were ground in liquid nitrogen and suspended in a pre-warmed (80°C) solution consisting of 750 μ L phenol and 750 μ L extraction buffer (0.1 M LiCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 8.0). After shaking, 750 μ L of chloroform-isoamylalcohol (24:1) were added and the solution was centrifuged for 5 min (4°C) at 12 000 g. Total RNA was precipitated with LiCl (final concentration 2 M) overnight at 4°C. Following centrifugation for 30 min (4°C) at 12 000 g, the pellet was suspended in 500 μ L of water and 500 μ L of phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1), mixed and centrifuged for 5 min. RNA in the supernatant was

precipitated again with 0.1 vol. of Na-acetate buffer (3M; pH 5.2) and 2 vols. absolute ethanol and stored for a minimum of 1h at -80°C. After centrifugation for 30 min (4°C) at 12 000 g, the pellet was resuspended in 100 µL RNase free water. Then, samples were treated following the Clean-up protocol of the RNeasy Minikit (Qiagen, Courtabœuf, France) coupled to a DNase treatment (RNase free-DNase; Qiagen). RNA was quantified using an RNA BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) and visualized after electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gels. A 1 µg aliquot was used to generate cDNA with the i-script cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France).

The cDNA was diluted 1:100 with RNA free water and 4 µL was used as a template for real-time quantitative PCR (qPCR) analysis. The gene-specific primers were SUT1F (5'-CAGGCAAGTATGGACCCAGT-3') and SUT1R (5'-ACCAAACACATGCACAGGAA-3') as specific primers for LpSUT1; SUT2F (5'-TTTGGCTGGATGCATATTGA-3') and SUT2R (5'-TTCGCCGAATTAGATTGACC-3') as specific primers for LpSUT2. rRNA18SF (5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3') and rRNA18SR (5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3') were primers for 18S rRNA, SUT1R, SUT2F and SUT2R. As a marker for constitutive expression, 18S rRNA was amplified with rRNA18SF and rRNA18SR primers. PCR reactions were performed in a total volume of 15 µL, 500 nM for each primer and 10 µL of iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette France) on the Chromo 4 System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The qPCR program included a preliminary step of 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 40 s. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the dissociation curves after qPCR reactions using the Chromo 4 System (Bio-Rad, France) and by sequencing the qPCR product that confirmed that the correct amplicons were produced from each pair of primers. Fluorescence data was collected after each extension step. A melting curve was run after the PCR cycles and showed single products for all samples. The 18S rRNA gene was used as an internal control and fold changes of RNA transcripts were calculated according to the geometric average method (as described by [Vandesompele *et al.*, 2002](#)) and using the comparative threshold cycle method described by [Livak and Schmittgen \(2001\)](#) Expression levels produced by qPCR were expressed as a ratio relative to the control point for each experiment, which was set to 1. All the qPCR results were confirmed by three independent reactions from RNA of the same batch of plants.

B.6 Preparation of anti-LpSUT antibodies, isolation of plasma membrane vesicles, SDS-PAGE and western blot

Antibodies to LpSUT1 and LpSUT2 were produced Eurogentec (Angers, France) by immunization of rabbits with synthetic peptide coupled to Keyhole Limpet Hemocyanin (Eurogentec, Angers, France). Peptides were NH₂-MVRGGGNGEVELSVGA-COOH for LpSUT1, and NH₂-GSRDNDGASSEQTNGR-COOH for LpSUT2. The antiserum was immuno-purified against the peptide to increase the specificity of the response (Eurogentec).

Plasma membrane vesicles from the entire leaf sheaths were extracted from a microsomal fraction by two-phase partitioning as previously described (Berthier *et al.*, 2009). For immunoblot analysis, proteins were solubilized by heating at 65°C for 15 min. Proteins were separated by denaturing SDS-PAGE (12%) and transferred to nitrocellulose membranes at a constant current of 2.5 mA/cm² for 20 min at room temperature using a transfer buffer of 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.01% SDS, and 10% methanol. Membranes were blocked with 5% dried milk in TBS containing 0.15% (v/v) Tween 20. Immunodetection was achieved with either the LpSUT1 or the LpSUT2 antibody diluted 1:1,000 as primary antibody. The secondary antibody was alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) used at 1:1000. Bound antibody was detected using the alkaline phosphatase color reaction. All the results were confirmed by three independent western blots like present in a replicat Figure 9.

B.7 H⁺-ATPase and LpSUT immunolocalization

Immunolabeling was conducted on semi-thin (0.5-1 µm) and thin (60-80 nm) sections from chemically fixed / LRW embedded fresh tissues (elongating leaf bases and leaf sheaths) of ryegrass, and sections were processed as described by Fleurat-Lessard *et al.* (1997). Briefly, the sections were incubated overnight in LpSUT1 or LpSUT2 or H⁺-ATPase (AgriSera) antibodies (1:100 dilution) at room temperature. Controls were prepared by either omitting the antibodies or using the pre-immune serum. Semi-thin sections were then processed as described by Vignault *et al.* (2005). The sections were incubated for 1h in the Alexa Fluor 488-labeled secondary antibody (GAR-Alewa Fluor 488 A-11008 Interchim, 1/500 dilution). Observations were made under blue light (excitation: 495 nm; emission: 535 nm) using an inverted microscope IX-81 (Olympus, Tokyo, Japan).

B.8 Other measurements

Proteins were determined according to the [Bearden \(1978\)](#) method using 0.01% Triton X-100 to solubilize membrane proteins and bovine serum albumin as a standard. Analysis was achieved under spectrophotometry at 595 nm.

B.9 Statistics

Results (except those relative to RT-qPCR) are presented as mean values \pm S.E. for three replicates ($n = 3$). The effects on sucrose content were assessed according to a comparison of the means (Tukey t-Test), with MINITAB13 on windows (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal - Wallis was used. Statistical significance was postulated for $P < 0.05$. For transcript expression level, biological variability is reflected by the ΔCq ([Yuan *et al.*, 2006](#)), and min and max values of the standard error reflect the variation of the mean ([Cumming *et al.*, 2007](#)).

C. Results

C.1 Cloning of LpSUT2 cDNA

In order to isolate new sucrose transporter cDNAs from rye-grass, conserved regions of known cDNA sequences from several grass species were used to design degenerated primers for RT-PCR. Total RNA from stubble (mainly composed of leaf sheaths and elongating leaf bases) of vegetative plants was reverse-transcribed and amplified by PCR. This approach resulted in the isolation of a 550-bp cDNA which presented an extensive sequence homology with sucrose transporters. A cDNA library screening isolated five positive clones that were further sequenced. One clones presented a single complete sequence. This longest cDNA was entirely sequenced. It was 2,187-bp long and potentially encodes a protein of 607 amino acid residues with a predicted molecular mass of 65 kDa and pI of 7.55 ([GenBank accession No. GQ396637.1](#)). The deduced protein possesses an elongated central loop of 91 amino acids length. According to these overall characteristics, this protein was named LpSUT2 for *Lolium perenne* SUcrose Transporter 2. Therefore, a phylogenetic tree based on multiple sequence alignments showed that LpSUT1 and LpSUT2 belong to different

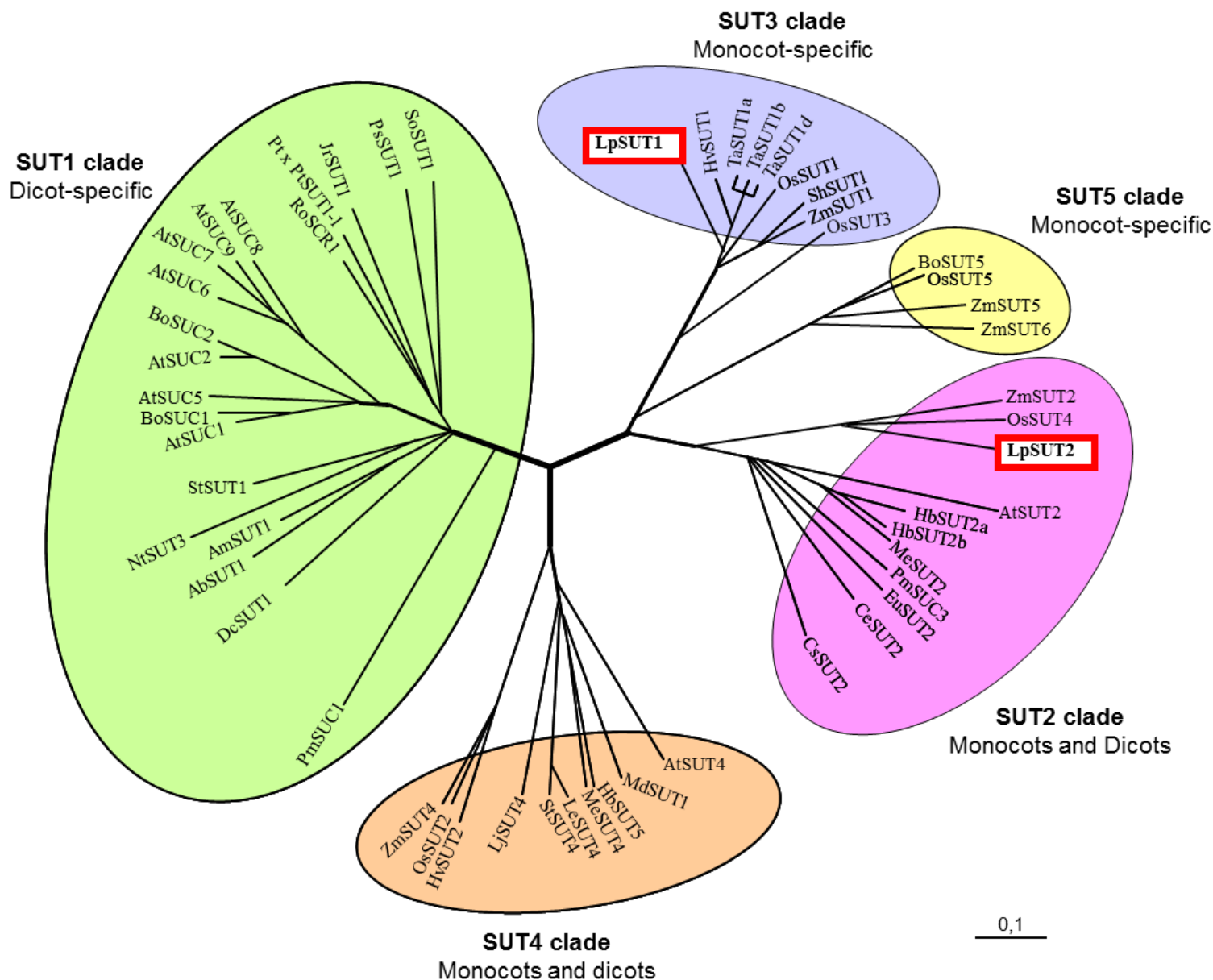


Figure IV.1: Phylogenetic tree for 53 confirmed Suc transporter sequences from publicly accessible databases. The transporters presented are: AbsSUT1 (Asarina barclaiana; AAF04294), AmsSUT1 (Alonsoa meridionalis; AAF04295), AtSUC1 (Arabidopsis thaliana; At1g71880), AtSUC2 (At1g22710), AtSUC3 (At2g02860), AtSUC4 (At1g09960), AtSUC5 (At1g71890), AtSUC6 (At5g43610), AtSUC7 (At1g66570), AtSUC8 (At2g14670), AtSUC9 (At5g06170), BoSUC1 (Brassica oleracea; AAL58071), BoSUC2 (B.oleracea; AAL58072), BoSUT5 (Bambusa oldhamii; AAY43226), CsSUT2 (Citrus sinensis; AAM29153), DcSUT1 (Daucus carota; BAA89458), EuSUT2 (Eucommia ulmoides; AAX49396), HbSUT2a (Hevea brasiliensis; ABJ51934), HbSUT2b (H. brasiliensis; ABJ51932), HbSUT5 (H. brasiliensis; ABK60189), HvSUT1 (Hordeum vulgare; CAB75882), HvSUT2 (H. vulgare; CAB75881), JrSUT1 (Juglans regia; AAU11810), LeSUT2 (Lycopersicon esculentum; AAG12987), LeSUT4 (L. esculentum; AAG09270), LjSUT4 (Lotus japonicus; CAD61275), LpSUT1 (Lolium perenne; EU255258), LpSUT2 (L. perenne; GQ396637), MdSUT1 (Malus x domestica; AAR17700), MeSUT2 (Manihot esculenta; ABA08445), MeSUT4 (M. esculenta; ABA08443), NtSUT3 (Nicotiana tabacum; AAD34610), OsSUT1 (Oryza sativa; AAF90181), OsSUT2 (O. sativa; BAC67163), OsSUT3 (O. sativa; BAB68368), OsSUT4 (O. sativa; BAC67164), OsSUT5 (O. sativa; BAC67165), PmSUC1 (Plantago major; CAI59556), PmSUC2 (P. major; X75764), PmSUC3 (P. major; CAD58887), Pt X PtSUT1-1 (Populus tremula • Populus tremuloides; CAJ33718), PsSUT1 (Pisum sativum; AAD41024), RcSCR1 (Ricinus communis; CAA83436), ShSUT1 (Saccharum hybridum; AAV41028), SoSUT1 (Spinacea oleracea; Q03411), StSUT1 (Solanum tuberosum; CAA48915), StSUT4 (S. tuberosum; AAG25923), TaSUT1A (Triticum aestivum; AAM13408), TaSUT1B (T. aestivum; AAM13409), TaSUT1D (T. aestivum; AAM13410), ZmSUT1 (Zea mays; BAA83501), ZmSUT2 (Z. mays; AAT51689), ZmSUT4 (Z. mays; AAS91375). Protein sequences were aligned with the program CLUSTAL (Chenna et al., 2003) and the tree was calculated using the program PHYLODENDRON© (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>). The horizontal bar (right bottom of the figure) indicates the evolutionary distance. The sequences fall into five clades: Group 1 (red) and 5 (purple) only contain sequences from monocot, group 2 (green) only contains sequences from dicot, while the two other groups (3, blue and 4, yellow) contain sequences from both monocot and dicot species (Braun and Slewinski, 2009).

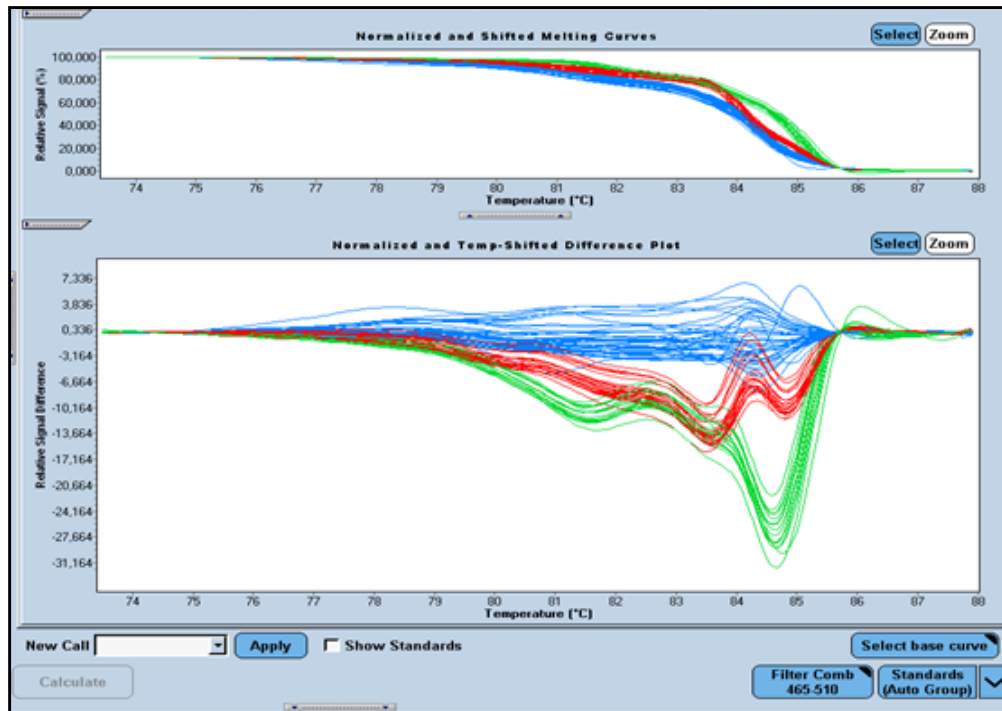
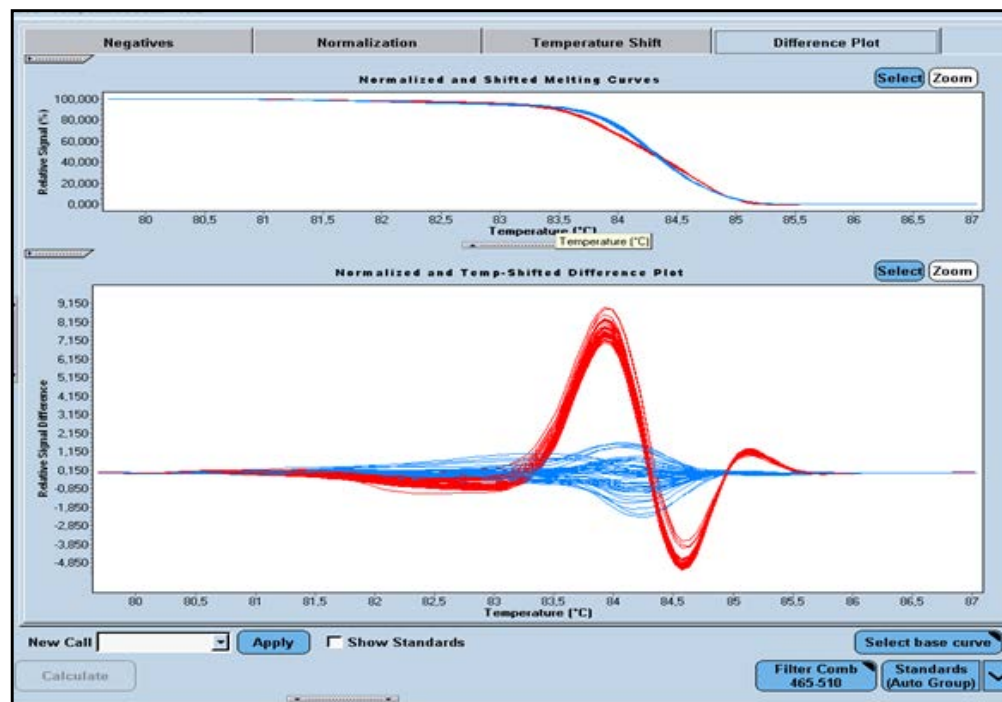
A**B**

Figure IV.2: (A) LpSUT1 HRM profiles of 96 plants of the F2 progeny showing three distinct groups of genotypes (blue, red and green). Upper graph represents the normalized and temperature shifted melting curves for all genotypes and the lower graph represents the difference between a reference normalized and temperature shifted melting curve (a blue one) and the one of each genotype. (B) LpSUT2 HRM profiles of 96 plants of the F2 progeny showing two distinct groups of genotypes (blue and red). Upper graph represents the normalized and temperature shifted melting curves for all genotypes and the lower graph represents the difference between a reference normalized and temperature shifted melting curve (a blue one) and the one of each genotype.

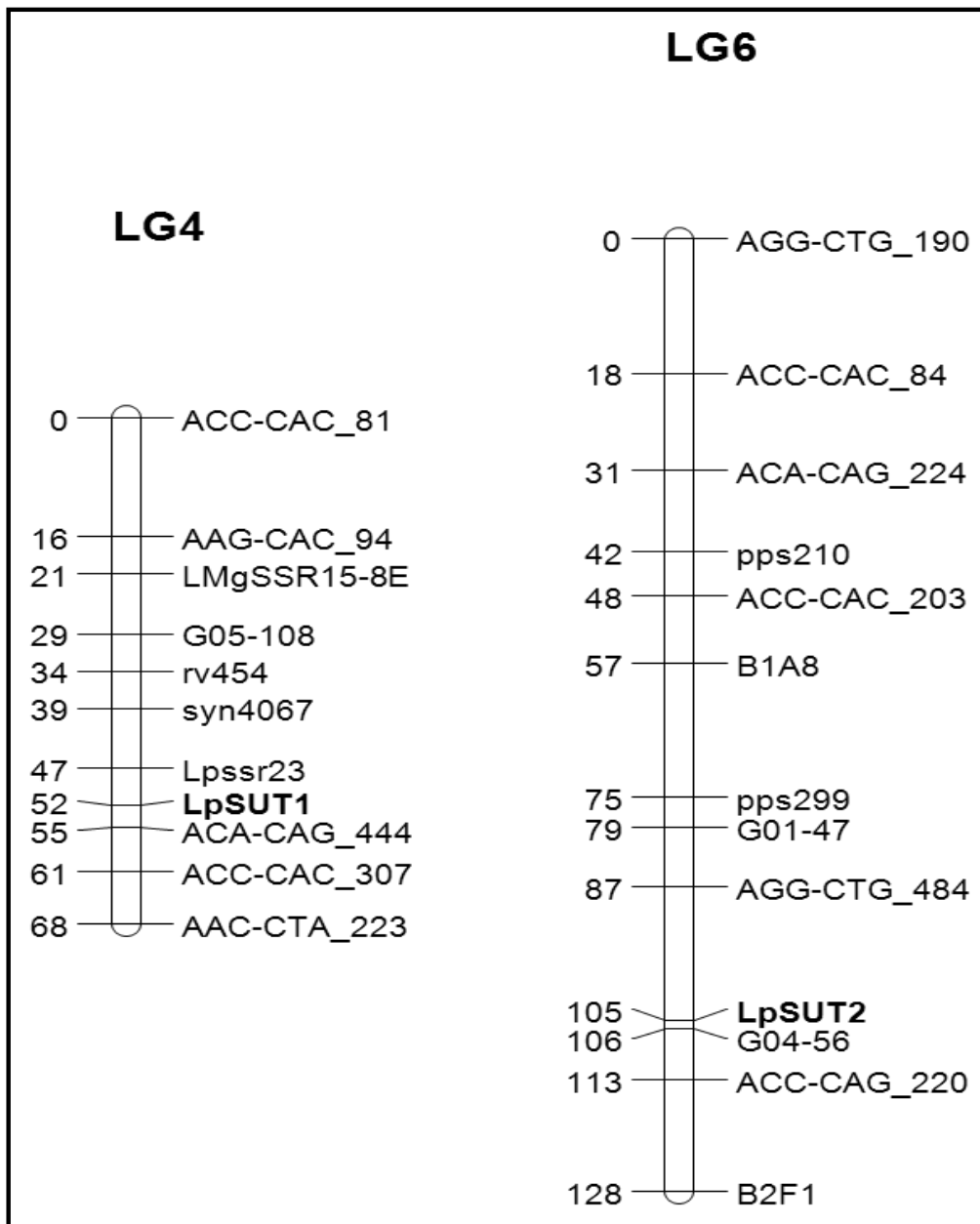


Figure IV.3: Map locations of LpSUT1 and LpSUT2 on linkage group (LG) four and six of perennial ryegrass.

subfamilies of sucrose transporters (Figure IV.1). The similarity between LpSUT1 and LpSUT2 is low (55.6%). A comparison with the sequences of other members of the SUT family showed that LpSUT2 was most similar to transporters of the SUT2 clade, in particular ZmSUT2 from maize or OsSTU4 for rice (both showed 81% identical amino acids). Amongst the transporters isolated from dicot species, LpSUT2 most closely resembles AtSUT2 from *Arabidopsis thaliana* and PmSUC3 from *Plantago major* (both showed 64% identical amino acids).

C.2 Gene mapping

Despite the large size of the *LpSUT1* and *LpSUT2* amplicons (900 bp), it was possible to clearly distinguish groups of genotypes in the F2 progeny using high resolution melting (HRM; Figure IV.2). The segregations of genotypes in the progeny were not distorted with 53:107:53 for *LpSUT1* compared to 53.25:106.5:53.25 ($p=0.998$) and with 111:119 for *LpSUT2* compared to 115:115 ($p=0.603$). *LpSUT1* and *LpSUT2* mapped on linkage group four and six, respectively (Figure IV.3). Markers were clustered in linkage group four and six with a LOD of 10 and 7, respectively.

C.3 Functional expression of *LpSUT2* in yeast

The *LpSUT2* cDNA was cloned into a yeast vector (YEP112A1XE) and transformed into the yeast strain SUSY7/trp1, a complementation system for SUTs (Riesmeier *et al.*, 1992). Three independent colonies were tested for complementation on sucrose plates. Compared to yeast transformed with the empty yeast vector alone, expression of LpSUT2 allowed growth on a medium containing 2% sucrose as the sole carbon source (data not shown). Time course studies of [¹⁴C] sucrose uptake by SUSY7/trp1 yeast expressing LpSUT2 showed that this transporter conferred higher rates of sucrose uptake than for cells transformed with empty vector alone (Figure IV.4.A). These findings demonstrate that LpSUT2 encodes a functional sucrose transporter. LpSUT2 is also equally active between pH 4.5 to 6.0 and the relative activity decreases above 50% when the pH is increased to 6.5 (Figure IV.4.B). The affinity of LpSUT2 for its physiological substrate sucrose was determined. The K_M value for sucrose of LpSUT2 was 6.2 mM with a V_{max} of 230 nmol.mg protein⁻¹.min⁻¹ (Figure IV.4.C).

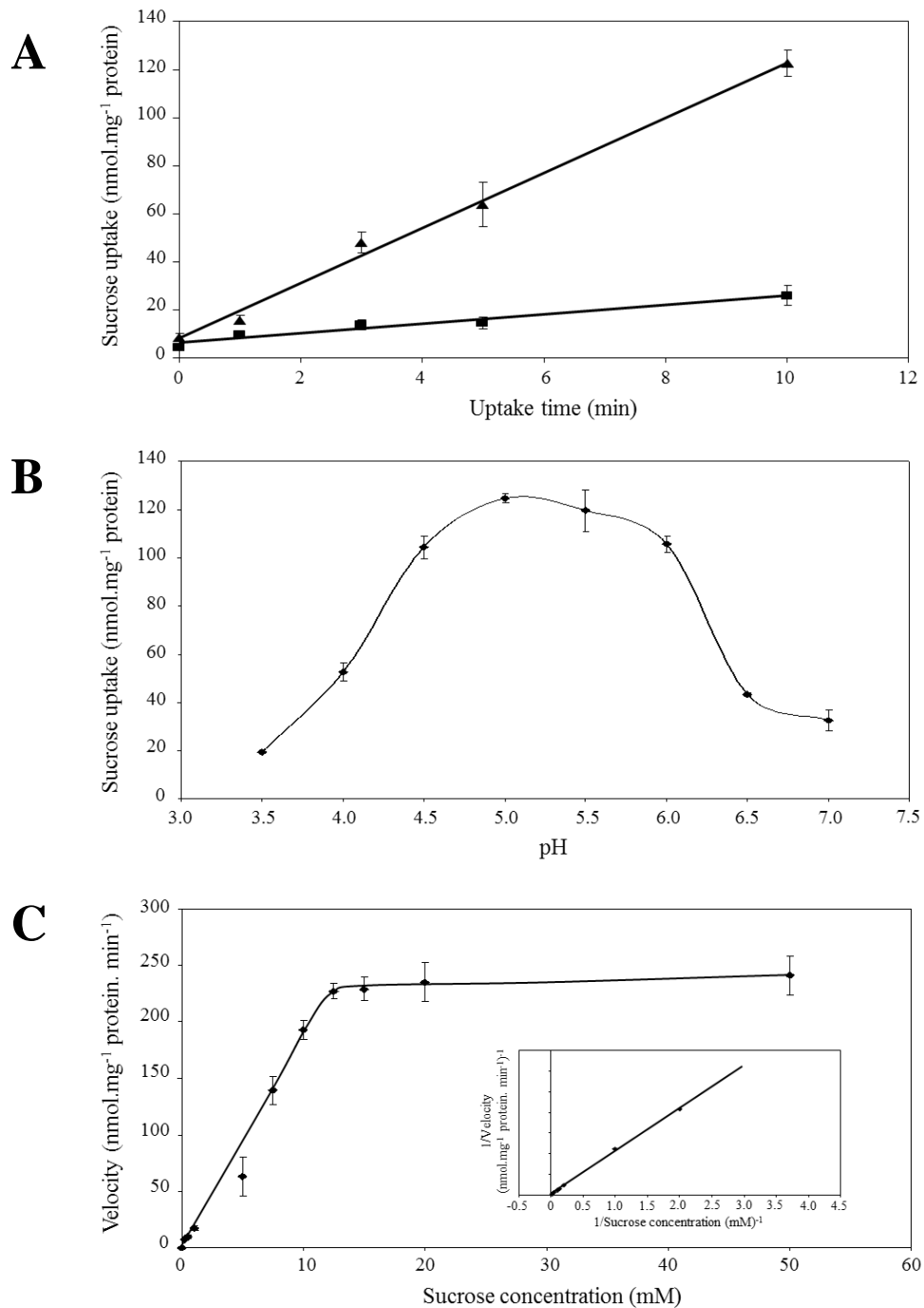


Figure IV.4: (A) Uptake of sucrose by transgenic *Saccharomyces* cells. During uptake, the sucrose concentration was 0.5 mM and the external pH 4.5. Triangles represent uptake by cells transformed with LpSUT2, and squares represent sucrose uptake by control cells transformed with the plasmid YEP112A1XE. The results are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). (B) pH-dependence of sucrose transport in transgenic yeast cells expressing LpSUT2. Measurements were performed at 0.5 mM Suc in YNB medium containing MES buffered at the indicated pH. Incubation time was 3 min. Sucrose uptake rates of SUSY7/trp1 control cells (with the YEP112A1XE plasmid) were subtracted from sucrose uptake rates of LpSUT2-expressing cells. The results are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). C: Concentration-dependence of sucrose transport in transgenic yeast cells expressing LpSUT2. Sucrose uptake rates of SUSY7/trp1 control cells (with the YEP112A1XE plasmid) were subtracted from sucrose uptake rates of LpSUT2-expressing cells to determine the LpSUT2-dependent sucrose uptake rates at different sucrose concentrations. The results are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). The inset shows a Lineweaver-Burk plot of the uptake data which was used for the determination of kinetic parameters (V_{max} and K_m).

Additional transport analyses were then performed in the presence of various unlabeled compounds representing potential substrates or inhibitors of LpSUT1 and LpSUT2 (Figure IV.5). Protonophores such as carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) inhibit sucrose transport catalyzed by the LpSUT1 and LpSUT2 proteins confirming the energy-dependence of both sucrose transporters. Only LpSUT1 transporter was sensitive to thiol-radical inhibitors such as N-ethylmaleimide (NEM) or p-chloro-mercuribenzenesulphonic acid (PCMBS), the thiol group would be less accessible due to a different conformation. Imidazole reagent diethylpyrocarbonate (DEPC) inhibited the sucrose transport by LpSUT1 and LpSUT2 at various degrees (Figure IV.5). Only the synthetic glucoside α -phenylglucoside strongly inhibited transport of sucrose by both LpSUT1 and LpSUT2 (65% and 83%, respectively). Maltose decreased sucrose transport by 40% for LpSUT1 whereas it had no influence for LpSUT2 (Figure IV.5). Esculin (6,7-dihydroxycoumarin- β -D-glucoside) and the plant flavonoid quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) inhibited sucrose uptake by 25% for LpSUT1. Lactulose and turanose only reduced sucrose uptake by 25% and 38% respectively for this protein. Mannose and particularly fructose surprisingly competed with the sucrose transport by LpSUT2, with a reduction of 23% for the latter.

C.4 Expression analysis of LpSUT1 and LpSUT2

In order to study the expression level of *LpSUT* mRNAs in the main source and sink tissues of rye-grass, undefoliated and defoliated plants were harvested and dissected into five 1 cm length segments, starting from the base (Figures IV.6 and IV.7). In undefoliated plants, transcripts of *LpSUT1* increased along the axis of leaf sheaths and elongating leaf bases, so that they became greatest in the fifth segment of each tissue (Figures IV.6.B and IV.6.D). In leaf sheaths, *LpSUT2* transcripts were slightly amplified along the axis whereas they were stable and barely detectable in the different segments of elongating leaf bases. Sucrose content remained stable at about 40 mg. g⁻¹ DM in all segments of leaf sheaths while it increased from 39 (segment 1) to about 60 mg. g⁻¹ DM (segment 4) along the elongating leaf axis and remained at a high level in segment 5 (Figures IV.6.A and IV.6.C).

The removal of leaf blades induced a significant increase of *LpSUT1* transcript levels in all leaf sheath segments after a lag time of 3h (Figure IV.7.A). Transcripts of *LpSUT1* were maximal 6h after defoliation, especially in the fifth segment with 23-fold increased mRNA levels. However, and irrespective of the studied segment, this induction was transient and

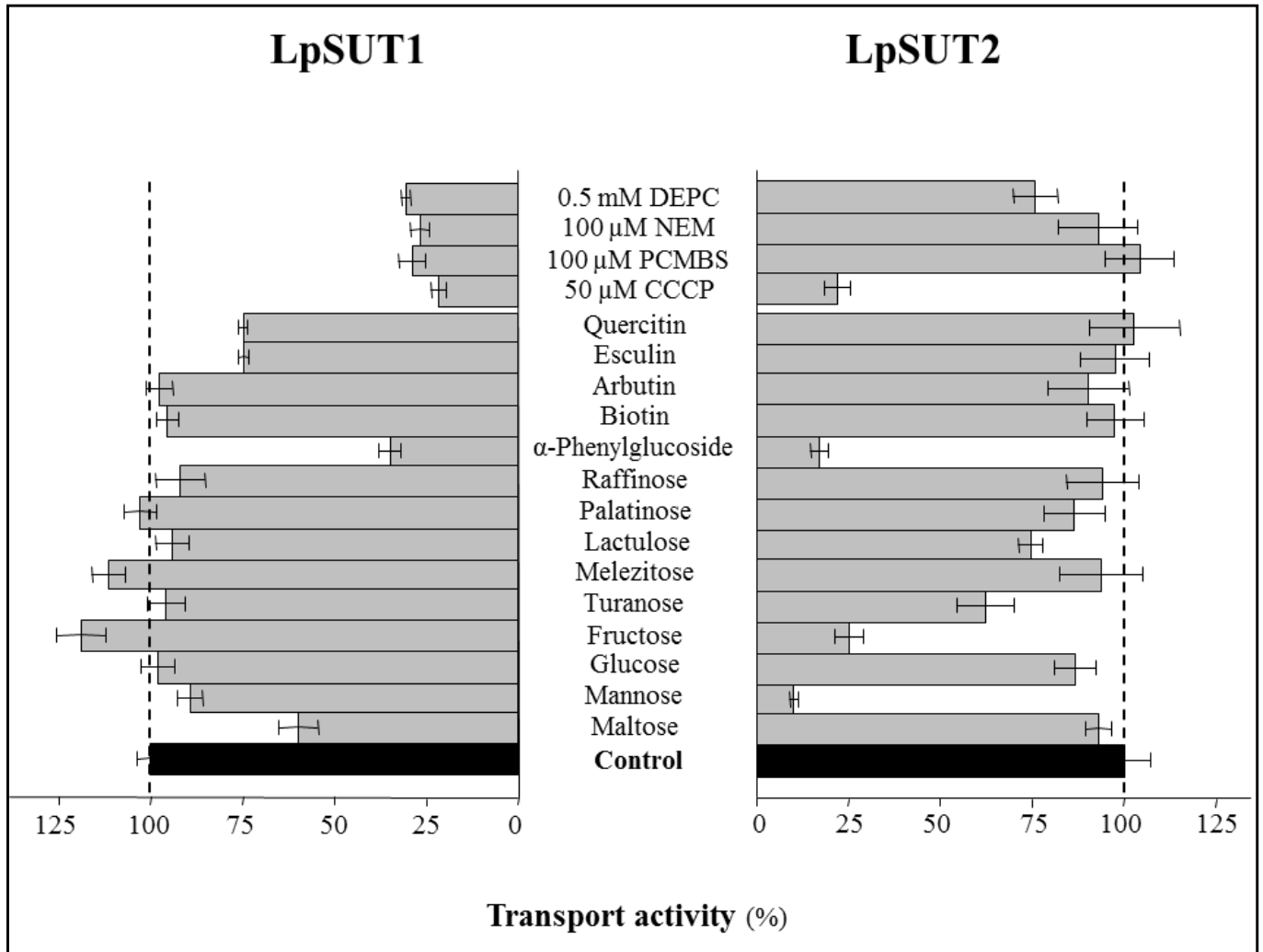


Figure IV.5: Inhibition and substrate specificity of LpSUT1 and LpSUT2 expressed in yeast cells. Inhibitors and competing sugars were added 30 s before the addition of sucrose to the assay. Except for α -phenylglucoside (10 mM), esculin (5 mM), biotin (1 mM) and quercitin (0.25 mM) that were added at their limits of solubility, competing sugars were supplied in 4-fold higher concentrations compared to sucrose. Control samples were treated in parallel: 100% = 22.44 ± 0.84 nmol Suc. mg⁻¹ protein. min⁻¹ for LpSUT1 and 100% = 157.74 ± 11.29 nmol Suc. mg⁻¹ protein. min⁻¹ for LpSUT2. In order to determine the LpSUT-dependent sucrose uptake rates, sucrose uptake rates of control cells (with the empty plasmid) were subtracted from sucrose uptake rates of LpSUT-expressing cells. The results are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment).

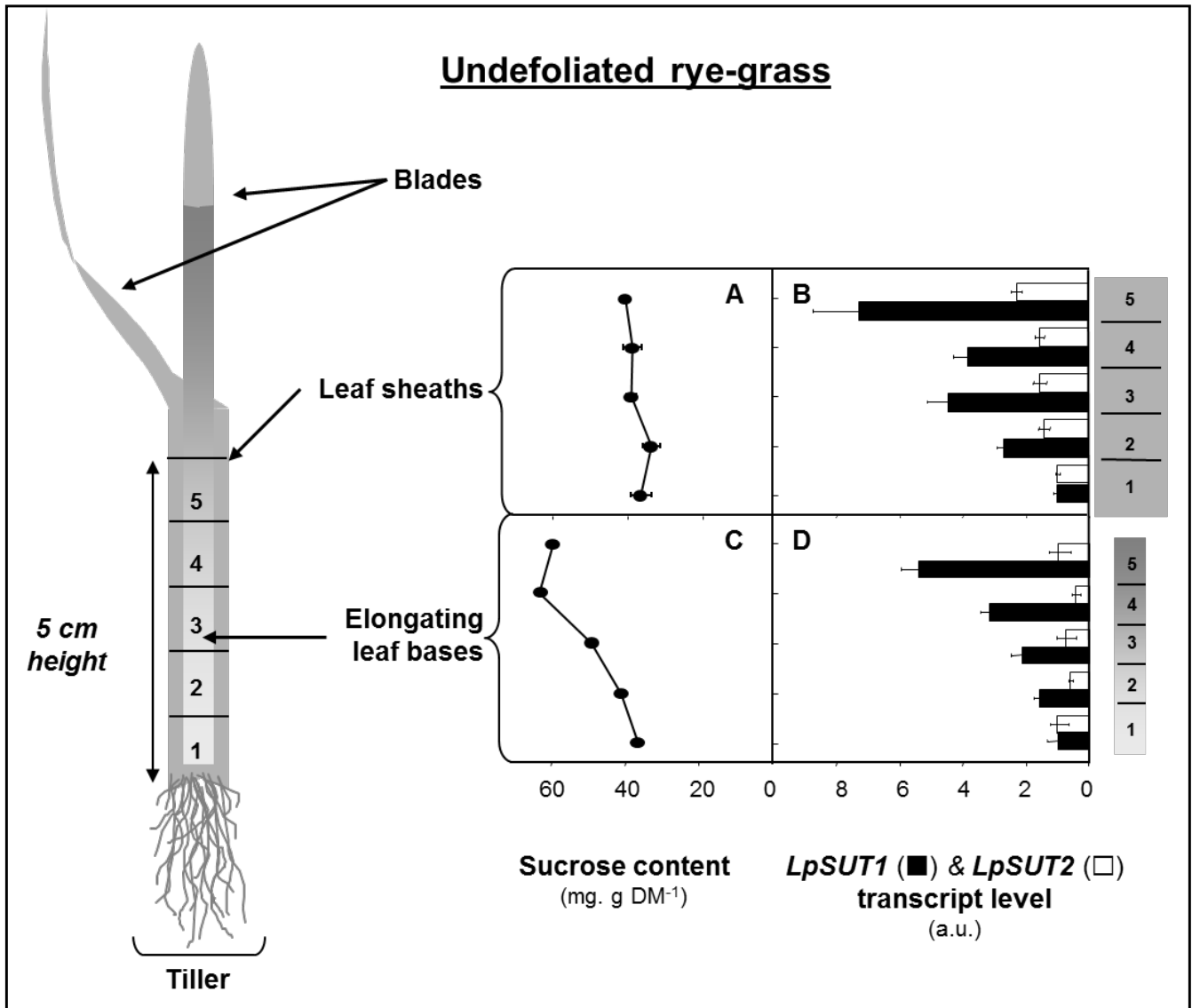


Figure IV.6: Real-time qPCR analysis of LpSUT1 and LpSUT2 expression in elongating leaf bases and leaf sheaths of *Lolium perenne* L. plants. As shown on the schematic view of one tiller, elongating leaf bases and leaf sheaths were dissected longitudinally in five 1 cm length segments. **A, C:** sucrose content in segments of leaf sheaths and elongating leaf bases, respectively. **B, D;** LpSUT1 (closed bars) and LpSUT2 (open bars) transcript levels in segments of leaf sheaths and elongating leaf bases, respectively. The data for sucrose content are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). Expression levels produced by real-time qPCR are normalized with 18S rRNA transcripts and are expressed as a ratio relative to the control point, which was segment 1 (for **B** and **C**) and segment 1 of undeveloped plants (for **D**). Vertical bars were calculated according to the geometric average method (as described by Vandesompele et al., 2002).

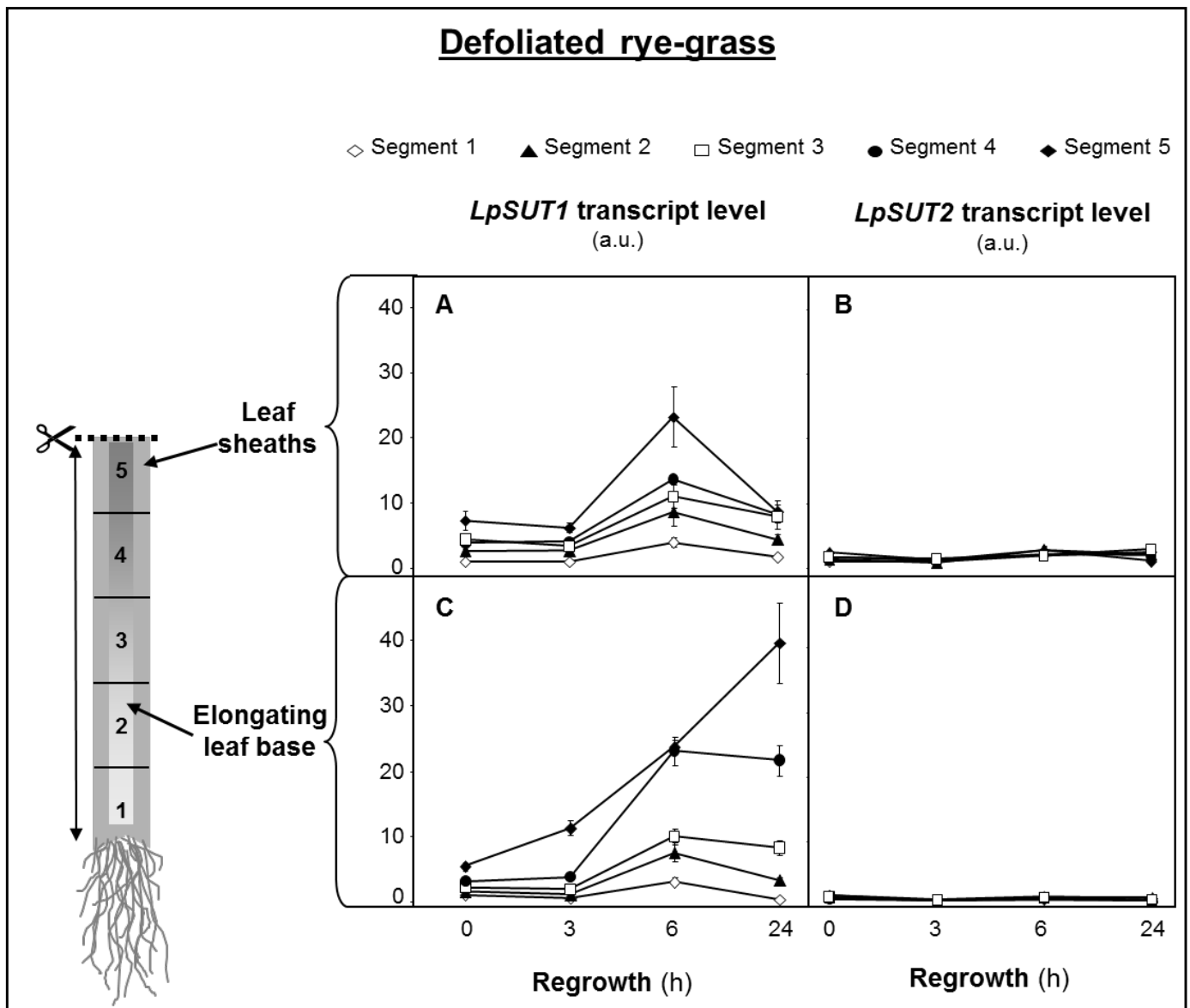


Figure IV.7: Real-time qPCR analysis of LpSUT1 and LpSUT2 expression in elongating leaf bases and leaf sheaths of *Lolium perenne* L. plants regrowing after defoliation. As shown on the schematic view of one tiller, elongating leaf bases and leaf sheaths were dissected longitudinally in five 1 cm length segments. LpSUT1 transcript level (**A, C**) and LpSUT2 (**B, D**) in the segments of leaf sheaths (**A, B**) and elongating leaf bases (**C, D**) of defoliated plants at the time of defoliation (0h) and after 3, 6 and 24 hours of regrowth. Expression levels produced by real-time qPCR are normalized with 18S rRNA transcripts and are expressed as a ratio relative to the control point, which was segment 1 at the time of defoliation (0h). Vertical bars were calculated according to the geometric average method (as described by Vandesompele *et al.*, 2002).

LpSUT1 mRNAs then declined in all segments where final values were thus close to initial ones. The removal of leaf blades also induced a significant increase of *LpSUT1* transcript levels in all elongating leaf bases segments after a lag time of 3h in segments 1 to 4 and from the time of defoliation in segment 5 (Figure IV.7.C). Between 6 and 24h following defoliation, *LpSUT1* transcript levels continued to increase in the fifth segment (40-fold), while it remained stable in the fourth and third segments and declined in the basal segments (Figure IV.7.C). By contrast *LpSUT2* transcript levels were not affected by defoliation in all leaf sheath and elongating leaf base sections during regrowth.

C.5 Localization of *LpSUT1* and *LpSUT2* proteins

Polyclonal antibodies were raised against a peptide located in the C terminus region of *LpSUT1* and in the central loop region of *LpSUT2*. Much attention was paid in the choice of the peptide to avoid any cross-reaction between the two sucrose transporters of *Lolium perenne* L. Indeed, each antiserum recognized a single polypeptide in microsomes and plasma membranes from yeast and rye-grass (data not shown). In accordance with the marked differences between the transcript levels of *LpSUT1* and *LpSUT2*, the signal associated to *LpSUT2* protein was much less important than the signal associated to *LpSUT1*, suggesting that *LpSUT2* was less represented than *LpSUT1*. Although the functional expression of *LpSUT1* and *LpSUT2* in yeast is in favor of plasma membrane localization, no such information was available about the localization in rye-grass. The results are presented on Figures IV.8, IV.9 and IV.10 using a fluorescent second antibody. Tissues were collected in segments 4 and 5, mainly composed of differentiating cells in elongating leaf bases.

Phloem (P) is made of the companion cells/sieve elements complex and veins are surrounded by the parenchyma bundle sheath (PBS) (Figures IV.8.A and IV.8.B). Chloroplasts are present in mesophyll cells of leaf sheaths. In leaf sheaths of control plants, *LpSUT1* was mainly located in mesophyll cells. It was also clearly visible in PBS cells, xylem parenchyma cells and metaxylem (Figure IV.8.C). After 24h of regrowth following defoliation, the same localization with the same intensity was noted for *LpSUT1* within leaf sheaths (Figure IV.8.D). For *LpSUT2*, no signal was detected in any part of leaf sheaths (Figure IV.8.E and IV.8.F). The tissue localization of plasma membrane H⁺-ATPase, which is required for H⁺-cotransport of sucrose and more generally of nutrients, was also investigated. A strong labeling was detected in mesophyll cells and in all phloem cells (Figure IV.9.B). The results showed a clear localization of the signal at the periphery of the cells, in accordance with a

Leaf sheath

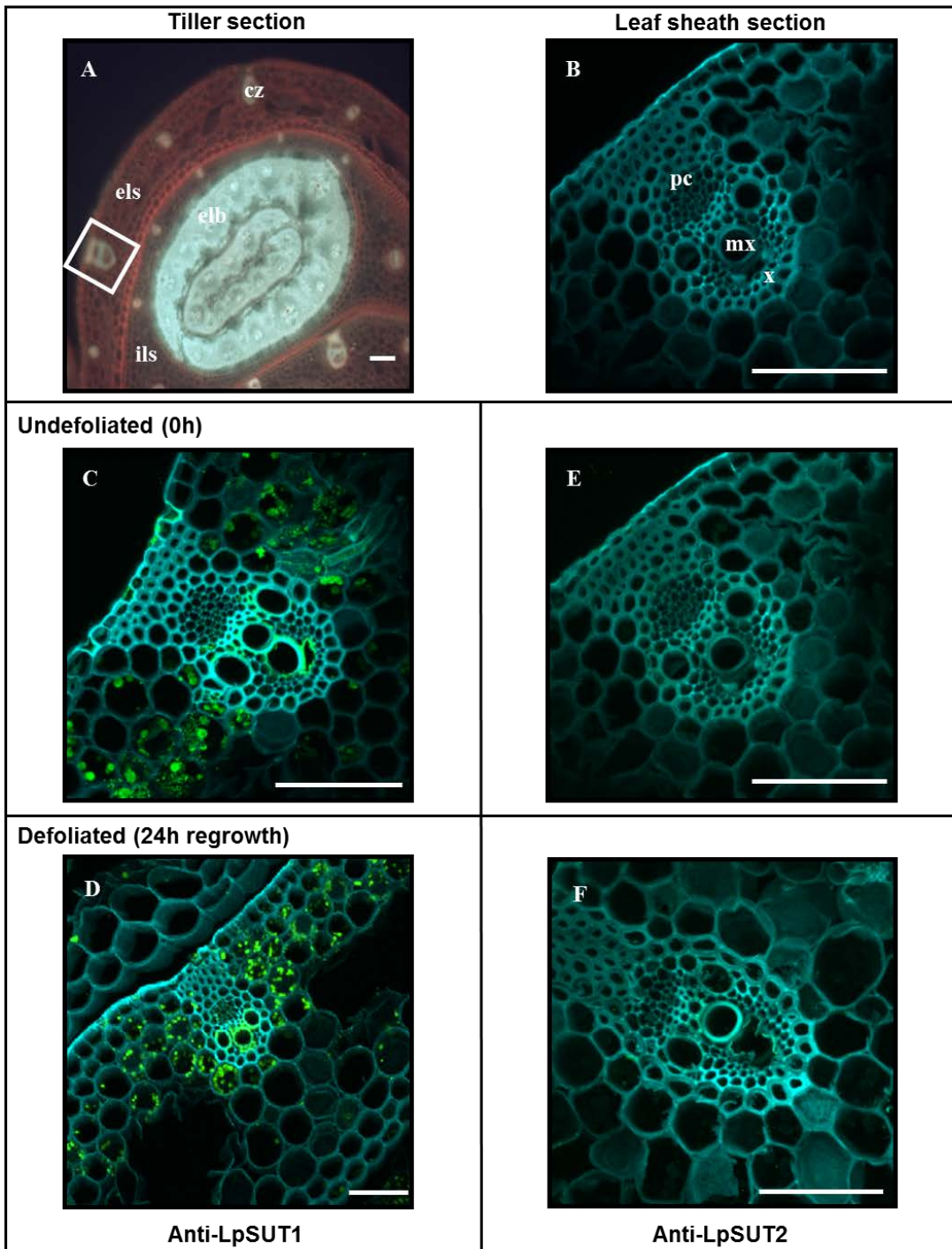


Figure IV.8: Immunolocalization of LpSUT1 (**C** and **D**) or LpSUT2 (**E** and **F**) proteins in leaf sheaths sections (3-5 cm) from ryegrass plants that had been undefoliated (**C** and **E**) or 24 h following defoliation (**D** and **F**). **A** and **B**: Control leaf sheaths section. No labeling was initially detected within these tissues. **C**: Distribution of LpSUT1 protein in leaf sheath from undefoliated plants. **D**: Distribution of LpSUT1 protein in leaf sheath from plants 24 h following defoliation. **E**: Distribution of LpSUT2 protein in leaf sheath from undefoliated plants. **F**: Distribution of LpSUT2 protein in leaf sheath from plants 24 h following defoliation. Green labeling shows detection of LpSUT1 (**C** and **D**) or LpSUT2 (**E** and **F**) by specific antibodies. Chloroplasts appear in blue. cz, conducting zone; els, external leaf sheath; ils, internal leaf sheath; mx, metaxylem; pc, phloem parenchyma cell; x, xylem. Scale bar = 100 μ m.

Leaf sheaths sections

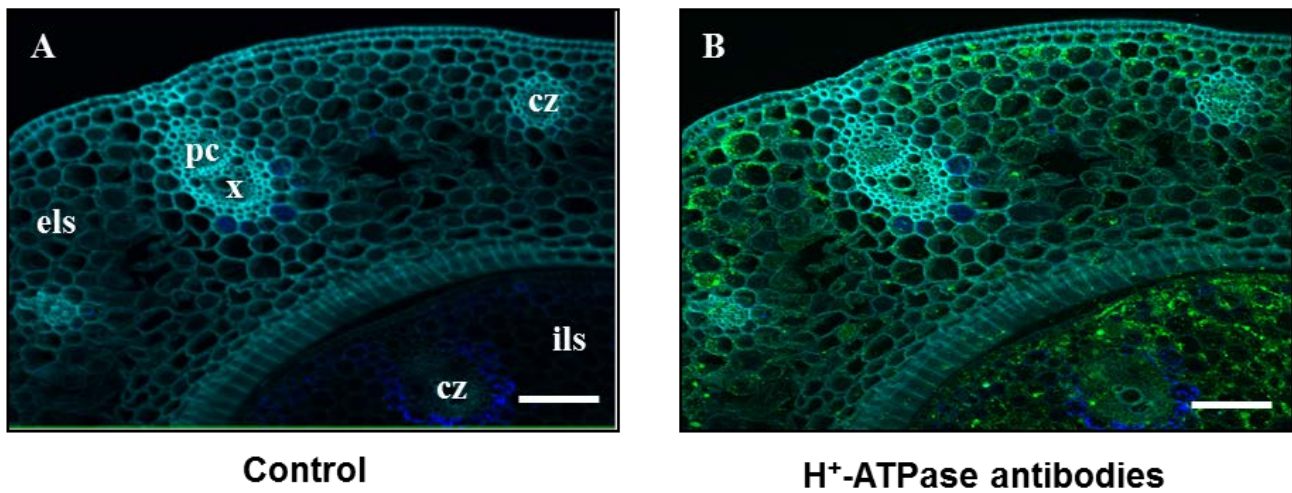


Figure IV.9: Distribution of H⁺-ATPase protein in the leaf sheaths of undefoliated plants. **A:** Control leaf sheaths section. No labeling was detected within these sections. **B:** Leaf sheath section was challenged with anti-H⁺-ATPase antibodies and Alexa-conjugated second antibodies (signal appears in green). cz, conducting zone; els, external leaf sheath; ils, internal leaf sheath; pc, phloem parenchyma cell; x, xylem. Scale bar = 100 μm.

Elongating leaf bases

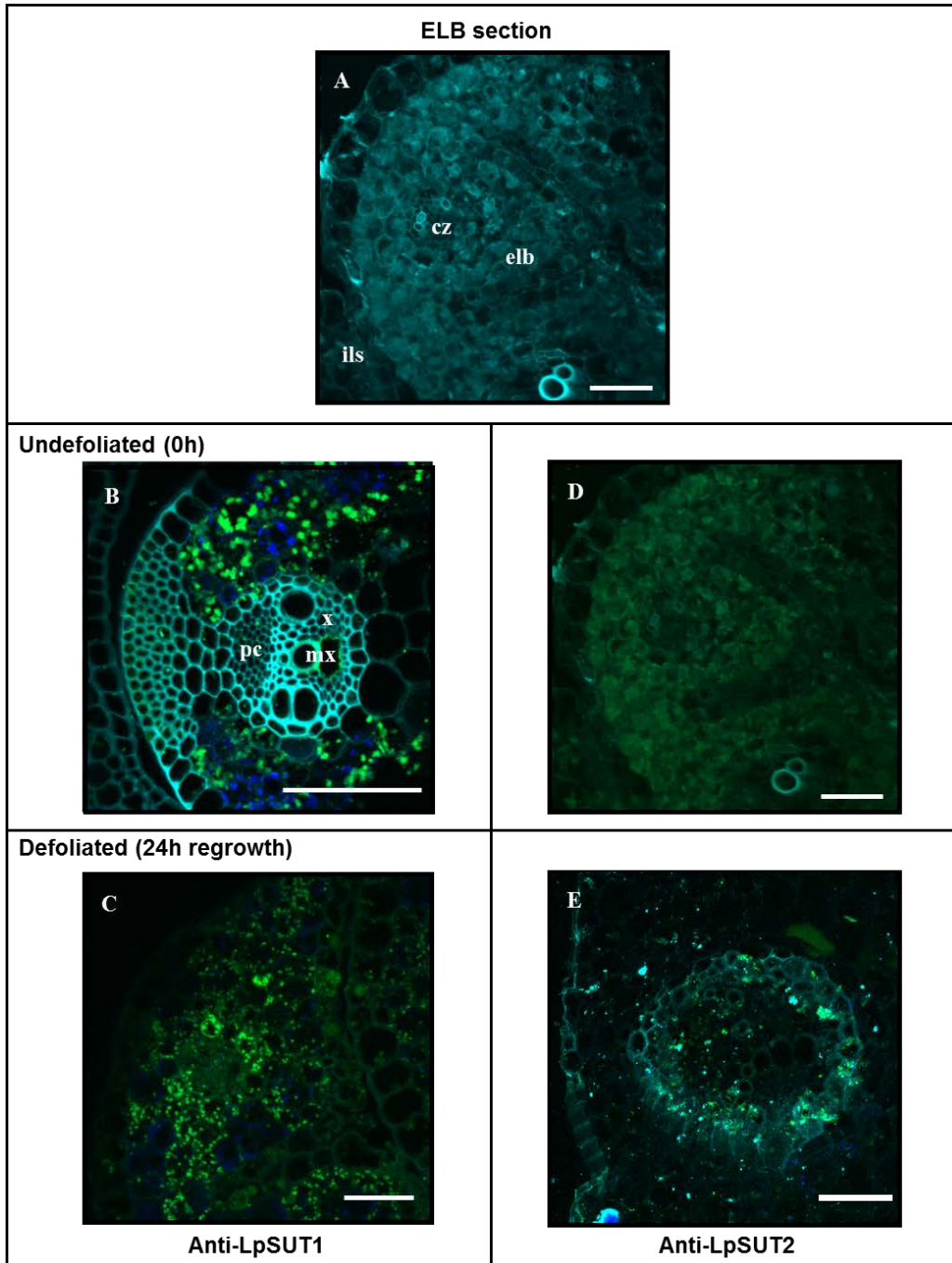


Figure IV.10: Immunolocalization of LpSUT1 and LpSUT2 proteins in elongating leaf bases sections from ryegrass plants that had been undeveloped (**C** and **E**) or 24 h following defoliation. **A**, Control. No labeling was detected in control. **B**, Distribution of LpSUT1 protein in elongating leaf base from undeveloped plants. **C**, Distribution of LpSUT1 protein in elongating leaf base from plants 24 h following defoliation. **D**, Distribution of LpSUT2 protein in elongating leaf base from undeveloped plants. **E**, Distribution of LpSUT2 protein in elongating leaf base from plants 24 h following defoliation. Green labeling shows detection of LpSUT1 (**B** and **C**) or LpSUT2 (**D** and **E**) with specific antibodies. Chloroplasts appear in blue. cz, conducting zone; elb, elongating leaf base; els, external leaf sheath; ils, internal leaf sheath; mx, metaxylem; pc, phloem parenchyma cell; x, xylem. Scale bar = 100 μ m.

plasma membrane localization. These data originally reveal a co-immunodetection of LpSUT1 and H⁺-ATPase.

In elongating leaf bases of control plants (*i.e.* undefoliated) or of defoliated plants, the signal for LpSUT1 was important in mesophyll cells, while epidermal and PBS cells were only slightly labeled (Figure IV.10.B and IV.10.C, respectively). Chloroplasts are present in mesophyll cells of the upper segments of elongating leaves, despite the fact that these segments are still enclosed in leaf sheaths. LpSUT2 could not be detected in elongating leaf bases of control plants (Figure IV.10.D). A signal could be detected in elongating leaf bases 24h following defoliation, but it was very faint and limited to the PBS and to the mesophyll cells adjacent to the conducting zone (Figure IV.10.E).

D. Discussion

Rye-grass has a great ability to regrow after defoliation which is hypothesized to be related to an efficient mobilization of C reserves (mainly fructans) and to their fast and coordinated transport as sucrose from source tissues (leaf sheaths, elongating leaf bases) towards young developing sink tissues (leaf meristems). This implies the presence of one or several sucrose transporters, as in a lot of various plant species (Kühn and Grof, 2010). Therefore, the main objective of this study was to isolate, identify, characterize and immunolocalize sucrose transporters within intact and defoliated rye-grass.

D.1 LpSUT2: a new sucrose transporter with intriguing characteristics

The screening of cDNA libraries obtained from stubble (containing both leaf sheaths and elongating leaf bases) allowed the cloning of a polynucleotidic sequence which was reported to encode a protein that possesses twelve spanning trans-membrane domains, a large internal (cytosolic) loop, and a deduced polypeptidic sequence of 607 amino acids with a molecular mass of 65 kDa. Such characteristics have already been observed for SUTs in several other species like rice (OsSUT4, Aoki *et al.*, 2003), plantain (PmSUC3, Barth *et al.*, 2003) and *Arabidopsis thaliana* (AtSUT2/AtSUC3; Barker *et al.*, 2000). This transporter also showed a quite large identity with other well-known sucrose transporters of monocots like ZmSUT2 (AAS91375, Wang *et al.*, 2004 unpublished) for maize or OsSUT4 (Aoki *et al.*, 2003) for rice (with 81% identity, for both). Moreover, and according to cDNA multiple alignment analysis, these overall results led us to argue that we successfully isolated a

polynucleotidic sequence putatively encoding a new sucrose transporter in rye-grass. Additionally, the phylogenetic tree presented in figure 1 further allowed us to class this transporter in the SUT2 clade and we correspondingly named it *Lolium perenne* Sucrose Transporter 2 (*LpSUT2*). Thereafter, a successful growth complementation of a mutant yeast (*S. cerevisiae*) by *LpSUT2*, with sucrose as the sole source of carbon in the medium, and the observed inhibition of sucrose transport by the protonophore CCCP, both supported that *LpSUT2* protein is a sucrose transporter associated with a proton co-transport symporter (Figure IV.3). However, our results also reported that this sucrose transporter showed a weak inhibition by the imidazole-reagent DEPC, despite the presence of a histidyl residue in position 65 on the deduced polypeptidic sequence which was reported to play an important role for the sucrose transport activity (Lu and Bush, 1998). However, *LpSUT2* presents a long N-terminal region and an extended cytosolic loop, both thought to confer some unique function or activity that are not shared by other transporters. Barker *et al.* (2000) hypothesized that such transporters as *LeSUT2* and *AtSUT2/SUC3* might function as sucrose sensors in sieve elements. This function is still under debate (Eckardt, 2003). Interestingly, and unlike *LpSUT1* for which there is no effect of fructose on its activity, the strong inhibition of sucrose transport by fructose led to hypothesize that *LpSUT2* could be involved in sugar sensing. This hypothesis is of particular interest for a plant that stores C as fructanes. Indeed, fructose is the product of fructan hydrolysis. Pego and Smeekens (2000) speculated on the possible function of fructokinases (FRKs) as sugar sensors. However, when investigating the specific role of three of the four *FRK* genes of Tomato using transgenic plants, Granot (2007) was not able to establish a signaling role for FRKs. *LpSUT2* could be another candidate for fructose/sucrose sensing. Fructose, arising from fructan mobilization, could trigger a signaling pathway by inhibiting sucrose transport through *LpSUT2*.

D.2 *LpSUT1* and *LpSUT2* : key elements of C partitioning for leaf growth before and after defoliation ?

In a recent study, Berthier *et al.* (2009) reported that *LpSUT1* transcript level increased in leaf sheaths as a response to defoliation during the first day of regrowth. *LpSUT1* belong to the monocot specific Clade 3 (Kühn and Grof, 2010). Transporters of this Clade have been immunolocalized to the plasma membrane of sieve elements (SEs) in wheat (Aoki *et al.*, 2004) and both SEs and companion cells of rice (Scofield *et al.*, 2007). Unexpectedly, *LpSUT1* was not immunolocalized in phloem tissue. It was mainly detected in mesophyll

cells and also found in parenchyma bundle sheaths, adjacent to the conducting zone. Consequently, LpSUT1 is not involved in phloem loading/unloading and in longitudinal and long distance transport of sucrose. LpSUT1 would be rather implicated in lateral sucrose transport amongst tissues.

D.2.a. Before defoliation

Leaf growth in grasses is confined to the basal region, which is enclosed by the sheaths of mature leaves (Schnyder *et al.*, 1990). Cells are displaced away from their origin as a result of continued production and elongation of new cells. The tissue that emerged from the enclosed leaf sheaths is almost fully differentiated and photosynthetically active (Wilhelm and Nelson, 1978). Using $^{14}\text{CO}_2$, Allard et Nelson (1991) showed that C is transported from leaf blades and from the emerged part of elongating leaf bases to the leaf meristems. Large fructans store are deposited temporarily in the growth zone (dividing cells and elongating cells). They are degraded when cells moved through the differentiation zone. The products of their hydrolysis are probably used for secondary cell wall synthesis (Allard and Nelson, 1991, Cairns *et al.*, 1991). They could also serve as a source of C to sustain leaf growth. Interestingly, *LpSUT1* transcript levels were not evenly distributed along the axis of leaf sheaths and elongating leaf bases. Expression of *LpSUT1* increased along the leaf axis, together with the formation of the phloem structure (data not shown) and conversely to fructan content in elongating leaves (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001; Lasseur *et al.*, 2006). In the growth zone, where fructans are synthesized from incoming sucrose, LpSUT1 could be involved in sucrose influx in fructan accumulating cells. In the differentiation zone, where fructans are hydrolyzed, LpSUT1 could be involved in sucrose efflux from fructan degrading cells in the apoplasm so that sucrose could be used for the secondary cell wall synthesis or reach the vascular tissue. Moreover, upper segments of elongating leaf bases contained chloroplasts (present results) and chlorophyll. They are still enclosed in the whorl of leaf sheaths but because they are about to emerge, they are probably exposed to some light and already photosynthetically active. In this context, LpSUT1 could catalyze sucrose export from photosynthetic cells.

Leaf sheaths do not correspond to stems, but sucrose produced in leaf blades is transported *via* leaf sheaths to sink tissues. When carbohydrates are produced in excess compared with plant needs, sucrose is unloaded in leaf sheaths and stored as fructanes (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999b). In the present study, leaf sheaths were actively accumulating sucrose, since sucrose was not distributed as a gradient along the leaf sheath axis (Lasseur *et*

al., 2006) and since their fructan content was very high (Berthier *et al.*, 2009). Similarly to *LpSUT1*, *ShSUT1* was expressed predominantly in stem internodes of sugarcane that were actively accumulating sucrose. Similarly to *LpSUT1*, *ShSUT1* was not immunolocalized in phloem tissues. *ShSUT1* has therefore been assigned a role in partitioning of sucrose between the vascular tissue and the sites of sucrose storage in the parenchyma (Rae *et al.*, 2005). *LpSUT1* is proposed to fulfill a similar function, namely the partitioning of sucrose between the vascular tissue of leaf sheaths and the sites of sucrose storage as fructans.

B.2.b. After defoliation

Elongating leaves that were growing before defoliation continued to grow after defoliation but leaf meristems are no longer supplied with sucrose coming from leaf blades. The fructan degrading enzyme increased in leaf sheaths and in all segments of elongating leaves including the division and the elongation zones, suggesting that fructans previously accumulated in these tissues serve as a source of C to sustain leaf growth (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001). Indeed, supply of C to roots was shown to be transiently reduced for the benefit of the leaf growth zone, immediately after defoliation (Amiard *et al.*, 2003). As already reported for *LpSUT1* in leaf sheaths (Berthier *et al.*, 2009), *LpSUT1* transcript levels also increased in all segments of elongating leaf bases, suggesting *de novo* synthesis of transporters. *LpSUT1* is therefore hypothesized to allow sucrose transport from fructan degrading cells to the vascular tissue in order to supply the leaf meristem and sustain its active growth. In leaf sheaths, this step is mediated by an apoplastic mode of phloem loading (Berthier *et al.*, 2009), which would require additional sucrose transporters.

Unlike *LpSUT1*, *LpSUT2* expression was insensitive to defoliation which, together with its kinetic properties supports the idea that *LpSUT2* is not directly implicated in the transport of sucrose. *LpSUT2* transcript levels were low and stable along both leaf axis, which is an argument in favor of a sugar sensing role for *LpSUT2*. Interestingly, *LpSUT2* is not located in sieve elements but was found in mesophyll cells where fructans are accumulated and degraded.

LpSUT1 was mapped on the same linkage group as QTLs for stretched plant height, lamina length and leaf elongation rate in the study of Barre *et al.*, (2009) on perennial ryegrass. *LpSUT2* was mapped on the same linkage group as a lamina length QTL in the study of Barre *et al.* (2009) and QTLs for water soluble carbohydrate in the study of Turner *et al.* (2006). Despite the low number of codominant common markers between studies, these colocations are encouraging for using *LpSUT1* and *LpSUT2* as candidates for QTL

identifications or association studies on plant regrowth (leaf length, leaf elongation rate, plant height, plant height rate) and water soluble carbohydrate content in leaf blades and leaf sheaths.

In conclusion, this is the first time that a grass *LpSUT2* cDNA has been cloned and functionally characterized. LpSUT1 and LpSUT2 play different roles for C partitioning and sucrose distribution at the whole plant level. LpSUT1 has been assigned a role in lateral partitioning of sucrose between the vascular tissue and the sites of fructan synthesis or degradation, depending on the C status of the plant. LpSUT2 displays unusual characteristics and might function as a fructose/sucrose sensor that would trigger a signaling pathway that needs to be further investigated. As neither LpSUT2, nor LpSUT1 were immunodetected in phloem tissues, it is postulated that other sucrose transporters are involved in longitudinal and long distance sucrose transport, which is crucial for regrowth after defoliation.

Funding

This Ph. D research work was equally supported by a grant from the Region Basse-Normandie and INRA Plant Biology and Environment-Agronomy Dept.

Acknowledgments

We are grateful to Sandrine Rezé, Anne-Françoise Ameline, Raphaël Ségura for their excellent technical assistance. Confocal microscopy was achieved at the Confocal Microscopy facility of UMR-CNRS 6187 – ImageUP platform – Dr Anne Cantereau, Poitiers, France. The authors thank Dominique Crouzillat and Michel Rigoreau for their help in HRM genotyping, Stéphane Grenier and Philippe Cormenier for their help in genotyping AFLP and SSR markers.

E. Transition chapitre 2 – chapitre 3.

Les objectifs des deux précédents chapitres étaient dans un premier temps d'isoler et de caractériser le maximum de transporteur de saccharose chez le Ray-grass anglais. Dans un deuxième temps, il s'agissait de montrer une plasticité du transport de saccharose suite à la défoliation. Enfin, dans un troisième temps de savoir si cette modulation de l'expression observée pour les transporteurs de saccharose pouvaient être un élément de la plasticité de repousse du Ray-grass anglais.

Ainsi les deux chapitres précédents ont permis **l'identification d'une famille multigénique de transporteurs de saccharose chez le Ray-grass anglais et la caractérisation fonctionnelle de deux protéines de cette famille (LpSUT1, LpSUT2) présentant des caractéristiques, des expressions et des localisations différentes.** Nos résultats ont mis en évidence la forte implication de LpSUT1 dans le mécanisme de repousse, notamment par sa **localisation** spécifique dans **la gaine péri-fasciculaire** et par **l'induction** de son expression **dès les premières heures de repousse. La protéine LpSUT1 semble ainsi particulièrement intervenir dans le chargement du phloème et l'augmentation de son niveau d'expression par la défoliation semble répondre à la mobilisation du carbone** (*i.e.* des fructanes) observée principalement dans les gaines des feuilles matures, de manière à permettre l'alimentation des parties en repousse (*i.e.* bases de feuilles en croissance). **Pour le transporteur de saccharose LpSUT2, sa faible présence** (que ce soit au niveau des transcrits ou bien de la protéine révélée par immuno-détection) **dans l'ensemble des tissus pourrait indiquer un autre rôle que le chargement/déchargement des faisceaux conducteurs.** Comme par exemple un capteur du statut carboné des tissus où il est présent. **De plus, ses paramètres cinétiques ainsi que sa sensibilité et sa spécificité nous laissent penser que la protéine LpSUT2 possède d'autres rôles physiologiques qui restent encore à élucider.** En effet, la défoliation n'a aucun effet sur le taux de transcrits de ce gène, ni même sur la quantité de protéines observées par immuno-détection. A partir de ce constat, il paraît nécessaire de vérifier si les mécanismes de mobilisation (dégradation de fructanes, consommation de saccharose) coïncident très précisément avec le comportement observé pour LpSUT1 et si LpSUT2 est sensible à une variation de ces paramètres (variation du statut C), démontrant alors une possibilité de capteur du statut en saccharose de la plante entière. La modulation de la quantité lumineuse reçue nous a semblé être un moyen de faire varier les ressources en carbone disponible au sein des plantes.

A cet effet, une expérimentation a été réalisée en serre avec des Ray-grass cultivés en hydroponie et soumis à des traitements lumineux contrastés afin de faire varier le niveau des réserves C préalablement accumulées et leur utilisation lors de la repousse après coupe, tout en modulant la capacité photosynthétique des plantes. Ainsi, les plantes ont été cultivées avec 100% ou 25% (plantes ombrées) du PAR (*i.e.* Rayonnement Photosynthétiquement Actif) perçu au niveau de la canopée pendant 2 semaines avant et/ou après coupe. Le but étant de savoir si la quantité lumière perçue par la plante conditionne le phénomène de repousse aussi bien par les réserves accumulées que par la capacité photosynthétique limitée lors du traitement. Ce déficit en carbone pourrait peut-être constituer un stimulus d'induction ou de répression du gène *LpSUT2*.

Les objectifs de ce troisième chapitre ont alors été de caractériser les effets de l'intensité lumineuse sur l'accumulation et la mobilisation des réserves carbonées ainsi que sur le transport de saccharose lors de la repousse après coupe pour des plantes ayant subi une modulation de l'intensité lumineuse.

Ce travail de recherche a conduit à la rédaction d'un chapitre, présenté ci-après, sous forme d'un article qui a été récemment soumis à Plant Cell and Environment.

Chapitre 3

*Differential regulation of two sucrose
transporters by defoliation and light
conditions in perennial rye-grass*

V. CHAPITRE 3

Differential regulation of two sucrose transporters by defoliation and light conditions in perennial rye-grass

Pierre-Maxime Furet^{1,2}, Alexandre Berthier^{1,2}, Marie-Laure Decau¹, Annette Morvan-Bertrand¹, Marie-Pascale Prud'homme¹, Nathalie Noiraud-Romy¹ and Frédéric Meuriot^{1,3}.

¹ UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie and nutritions NCS, irba, Esplanade de la Paix, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

² both authors equally contributed to this research work.

Corresponding author: Frédéric Meuriot

UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions NCS, irba, Esplanade de la Paix, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

Phone : (33)-2-31-56-51-66 Fax : (33)-2-31-56-53-60

E-mail : frederic.meuriot@unicaen.fr

Article soumis à *Plant Cell and Environment*.

Résumé

Le transport de saccharose entre tissus sources et tissus puits est supposé être une étape-clé pour une repousse efficace du Ray-grass anglais après défoliation, et peut être altérée par les conditions lumineuses. Nous avons testé l'effet de différents régimes d'éclairage (éclairage fort ou faible appliqué avant et/ou après défoliation) sur la croissance, la mobilisation des fructanes et du saccharose, ainsi que sur l'expression de transporteurs de saccharose pendant 14 jours de repousse.

Nos résultats ont montré que la défoliation a conduit à une mobilisation des réserves carbonées (d'abord le saccharose puis les fructanes) qui a été parallèle à une induction de l'expression des transcrits du transporteur de saccharose *LpSUT1* dans les tissus sources et puits (*i.e.* respectivement les gaines foliaires et bases de feuille en croissance), et ce quelles que soient les conditions d'éclairage. Le régime d'éclairage (fort ou faible) a eu peu d'effets sur la repousse et sur la mobilisation des réserves C pendant les 48 premières heures de repousse après coupe. Ensuite, les conditions de faible éclairage, en retardant la restauration des capacités photosynthétiques, a eu un effet négatif sur la ré-accumulation des réserves C (en particulier le saccharose). Avec surprise, un fort éclairage n'a pas augmenté le niveau d'expression des transporteurs de saccharose. Par ailleurs, alors que les conditions d'éclairage n'ont pas eu d'effet sur le niveau d'expression des transcrits *LpSUT1*, les transcrits *LpSUT2* ont été augmentés pour les plantes ombrées.

Ces résultats indiquent que les deux transporteurs de saccharose actuellement identifiés chez *Lolium perenne* sont différenciellement régulés par la lumière et la teneur en saccharose.

Mots-clés :

Saccharose ; Transporteurs de saccharose ; *Lolium perenne* L.; Repousse ; Lumière

Abstract

Sucrose transport between source and sink tissues is supposed to be a key-step for an efficient regrowth of perennial rye-grass after defoliation and might be altered by light conditions. We assessed the effect of different light regimes (high vs low light applied before or after defoliation) on growth, fructans and sucrose mobilization, as well as on sucrose transporter expression during 14 days of regrowth.

Our results reported that defoliation led to the mobilization of C reserves (first sucrose and then fructans), which was parallel to an induction of *LpSUT1* sucrose transporter expression in leaf sheaths and elongating leaf bases, respectively) irrespective to light conditions. Light regime (high or low light) had little effects on regrowth and on C reserve mobilization during the first 48h of regrowth after defoliation. Thereafter, low light conditions, delaying the recovery of photosynthetic capacities, had a negative effect on C reserve re-accumulation (especially sucrose). Surprisingly, high light did not enhance sucrose transporter expression. Indeed, while light conditions had no effect on *LpSUT1* expression, *LpSUT2* transcript level was increased by low light conditions.

These results indicate that the two sucrose transporters currently identified in *Lolium perenne* L. are differentially regulated by light and sucrose and might fulfil specific function which are discussed in the context of regrowth for perennial fructan accumulating plants.

Keywords:

Sucrose; Sucrose Transporters; *Lolium perenne* L; Regrowth; Light

A. Introduction

Grasslands are estimated to be one of the largest source of carbon fixation, which is of particular relevance in the current context of global warming (Smith and Falloon, 2005). Moreover, their high forage production largely sustain livestock consumption worldwide (Edwards *et al.*, 2010), and particularly in the EU where more than 30 million hectares are used for dairy farming. Amongst grasslands, perennial rye-grass (*Lolium perenne* L.) represents more than 60% of overall species and is submitted throughout the growing season to several cut-regrowth cycles by mechanical cutting or animal grazing. It presents an important regrowth (*i.e.* refoliation) capacity (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999), along with a high nutritional forage quality and yield (Cogan *et al.*, 2005), especially due to a high water soluble carbohydrates content within the harvested leaves (*i.e.* the forage).

Even if rye-grass has lost a major part of its photosynthetic tissues after cutting or grazing, the return to carbon autotrophy can be achieved in less than three days (Morvan *et al.*, 1999), with a production of new leaves at high rate (more than 1.4 mm. h⁻¹ in average, in optimal conditions). This is mainly achieved through to the basal localization of leaf meristems which sustain new leaf emergence and development, and by previously stored carbon (C) reserves within perennial tissues (leaf sheaths and elongating leaf bases). Fructans, hydrosoluble polymers of fructose, represent more than 85% of overall C reserves (Amiard *et al.*, 2003) and are largely accumulated in leaf sheaths and in the leaf growth zone of elongating leaf bases (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001). During early regrowth after cutting, they can be largely and rapidly mobilized within these tissues in order to sustain the intense growth of elongating leaves. For example, in optimal conditions of regrowth (*i.e.* high light and high N fertilization), fructans can be hardly mobilized of more than 90% in less than 24h (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). Their mobilization generates the release of fructose. However, this compound is not directly exported from source to sink tissues (*i.e.* roots and meristems) by phloem sap. Fructose is first converted into sucrose, which is the main compound exported through phloem, as in most plant species (Amiard *et al.*, 2004). Phloem loading and unloading require the presence of several sucrose transporters (SUTs; Sauer, 2007) and some of them have been recently identified in rye-grass like *LpSUT1* and *LpSUT2*, (Berthier *et al.*, 2009; 2011). According to their major role for long-distance transport and for resource partitioning between organs, tissues or even cells, such transporters are thought to be tightly controlled (Delrot *et al.*, 2000 ; Aoki *et al.*, 2003 ; Kühn and Grof, 2010).

Nevertheless, very few data relative to the regulation of sucrose transport already exist in literature, especially for rye-grass. Some biotic or environmental parameters such as temperature, plant development (Turgeon, 1989) or light (Fondy *et al.*, 1989), which can either influence C use and/or assimilation efficiency, seem to interact with sucrose transport in *Arabidopsis thaliana* or in wheat (*Triticum aestivum* ; Srivastava *et al.*, 2009 ; Ji *et al.*, 2010). Thus, it has been reported that some consensus sequences responding to circadian cycle were observed on the promoter of sucrose transporters *StSUT1* and *StSUT4* in potato (*Solanum tuberosum* ; Chincinska *et al.*, 2008). Light response boxes (*L-Boxes*) were also found in the promoting sequence of sucrose transporter *AtSUC2* of *Arabidopsis thaliana* and *VvSUC1* of grape (*Vitis vinifera*; Delrot *et al.*, 2000). Moreover, light conditions have been shown to induce the expression of sucrose transporters in rice seedlings (*Oryza sativa* L.; Matsukura *et al.*, 2000). The expression was also induced in seedlings grown in darkness and supplied with sucrose (100mM) or glucose (100mM) in the growing medium during 72h. This therefore suggests that the accumulation of carbohydrates and especially sucrose could modify the expression of sucrose transporters. Overall results then suggest that light may control the expression and activity of sucrose transporters, either directly as a physical signal involving specific receptors such as phytochromes or phototropins, cryptochromes (Gyula *et al.*, 2003 ; Kami *et al.*, 2010), either indirectly by affecting the nutrient status of the cells, in particular the sugar content through photosynthesis (Delrot *et al.*, 2000).

Regrowth capacity of rye-grass seems then to be correlated to i) an efficient mobilization of C reserves (*i.e.* fructans) from source tissues, and to their subsequent transport as sucrose through the phloem towards leaf meristems and ii) to a fast and early recovery of photosynthetic capacities after defoliation and to an efficient resupply of photoassimilates to the growing tissues. In both cases, our hypothesis is that sucrose transport is a central mechanism determining the regrowth capacity. Because efficiency of transport might be significantly altered by light conditions, we assess the role of sucrose transport by modifying light intensity. For this purpose, we initially grew plants under high or low light conditions and then let them regrow under either high or low light conditions during 14 days after defoliation. The plants grown under low light conditions before defoliation are supposed to have reduced transport capacity and regrowth, irrespective to light conditions supplied after defoliation. We therefore followed growth, C reserve mobilization (fructans and sucrose contents), as well as the expression level of two relevant sucrose transporters (*LpSUT1* and *LpSUT2*), during the first 48h of regrowth after defoliation when most physiological responses to defoliation occur.

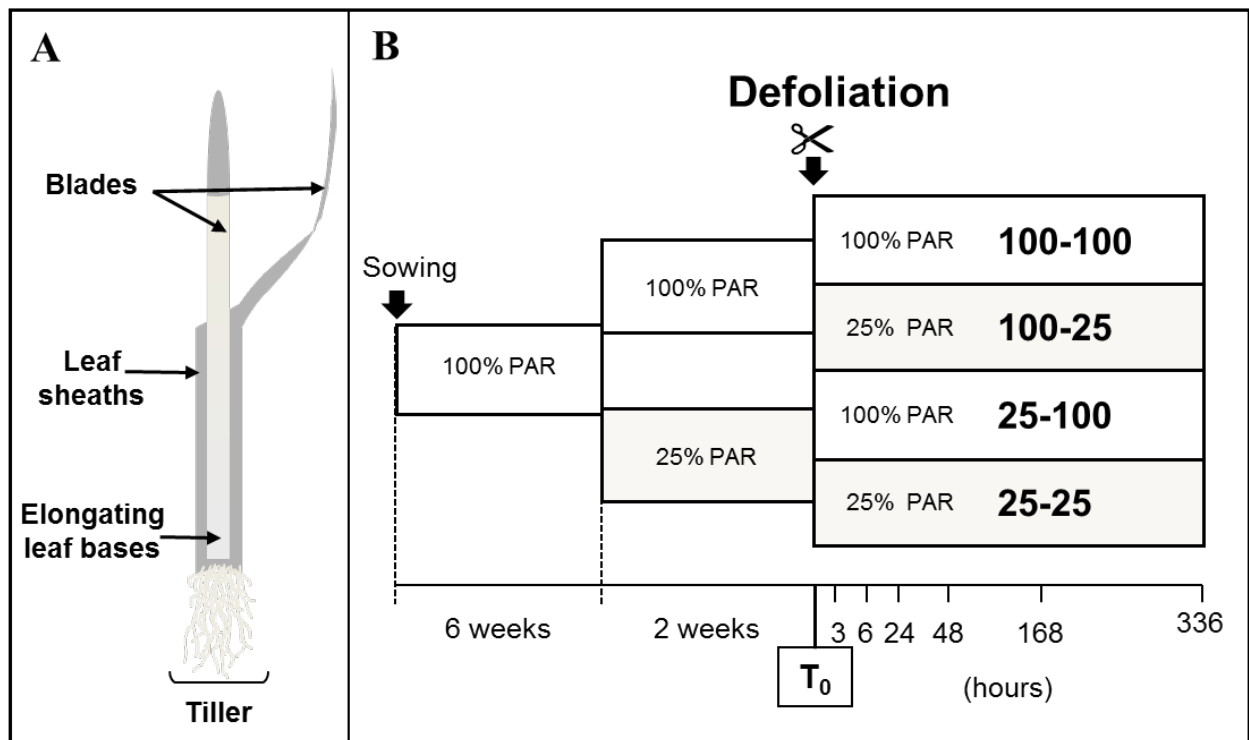


Figure V.1: Schematic representation (A) of a rye-grass tiller (comprising leaf blades, leaf sheaths, elongating leaf base and roots) and (B) plant culture and light treatments. Two weeks prior to defoliation six weeks old, plants were separated in two groups and placed under high light (PAR 100%) or low light (PAR 25%). After, these two initial weeks of treatment, all plants were defoliated at 5 cm height (T_0), and each group of plant was either grown under high (100% PAR) or low (25% PAR) light conditions during 3, 6, 24, 48, 168 and 336h of regrowth. Four treatments were then generated as follows: 100-100; 100-25; 25-100; 25-25.

B. Materials and methods

B.1 Plant materials and growth conditions

Seeds of *Lolium perenne* L. cv. Bravo were sown and grown for 6 weeks in a greenhouse on a Hoagland ¼ optimal nutrient solution in 4 L plastic pots as previously described by [Gonzalez et al., \(1989\)](#). The nutrient solution was continuously aerated and renewed every week in order to avoid any nutrient deficiency. The photoperiod was 16h of natural light supplemented by a Photosynthetic Active Radiation (PAR) to 440 $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$. The thermoperiod was 22°C (day) and 18°C (night). After six weeks of culture, and in order to have a homogenous population, plants were sampled according to their tiller numbers (65 ± 5 tiller. plant⁻¹) and light treatments were then realized.

B.2 Light treatments

As shown on Figure [V.1](#), plants were divided in two groups and initially grown during 2 additional weeks under high (100% PAR) or low light (25% PAR) conditions. Because plant morphogenesis can be significantly modified by light quality (red/far red and blue/light blue ratios ; [Gyula et al., 2003](#) ; [Wang and Deng, 2003](#)), 25% plants were placed under a photographic screen solely reducing light quantity (type: 210 0.6 ND, LEE filters, England) but not light quality (*i.e.* spectrum). After these two initial weeks of treatment, all plants were defoliated at 5 cm height (*i.e.* on T₀), and each group of plant was either grown under high (100% PAR) or low (25% PAR) light conditions during 3, 6, 24, 48, 168 and 336h of regrowth. Four treatments were then generated : 100-100, 100-25, 25-100 and 25-25.

B.3 Tissue sampling

At each date of harvest, the number of tillers was measured, as well as the regrowing leaf area (since its significant development after 48h; LiCor 300 Areameter, LiCor Inc., Lincoln Nebraska, USA) and the main source and sink tissues (leaf sheath and elongating leaf bases) which are of particular importance for rye-grass regrowth ([Morvan-Bertrand et al., 2001](#) ; [Schnyder et al., 2004](#)) were harvested. All plant tissues were frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until further biochemical and molecular analysis. They were finally freeze-dried and ground to fine powder for their dry weight determination.

B.4 Extraction and analysis of water soluble carbohydrates

Twenty five mg freeze dried plant tissue ground to a fine powder were placed in 14 mL polypropylene round-bottom tube (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) with 2 mL of 80 % ethanol with 0.5 g mL⁻¹ mannitol. The tube contents were mixed and incubated for 15 min at 80 °C. After ethanol extraction, the sample was centrifuged at 10000 g for 10 min. The supernatant was preserved and 2 mL of water was added to the pellet. The tube contents were mixed and incubated 15 min at 60°C. After the first aqueous extraction, the sample was centrifuged at 10000 g for 10 min. The supernatant was preserved and the aqueous extraction was repeated once with the pellet. The three supernatant were pooled, evaporated to dryness under vacuum and the residue was dissolved in 0.5 mL water. Aliquots of carbohydrate extract (100 µL) were passed through minicolumns (Mobicols from MoBITec, Göttingen, Germany) packed, from bottom to top, with 150 µL of Amberlite CG-400 II, formiate-form (Fluka, Buchs, Switzerland), 80 µL of polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and 250 µL of Dowex 50W X8-400 H⁺-form (Sigma-Aldrich) to remove charged compounds (Bachmann *et al.*, 1994). Glucose, fructose, sucrose and fructans were separated and quantified by HPLC on a cation exchange column (Sugar-PAK, 300 X 6.5 mm, Millipore Waters, Milford, MA) eluted at 0.5 mL min⁻¹ and 85 °C with 0.1 mM CaEDTA in water, using mannitol as internal standard and a refractometer as a sugar detector.

B.5 RNA isolation, RT-PCR and real-time PCR analysis

Plant tissues were ground in liquid nitrogen and suspended in a pre-warmed (80°C) solution consisting of 750 µL phenol and 750 µL extraction buffer (0.1 M LiCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 8.0). After shaking, 750 µL of chloroform-isoamylalcohol (24:1) were added and the solution was centrifuged for 5 min (4°C) at 12000 g. Total RNA was precipitated with LiCl (final concentration 2 M) overnight at 4°C. Following centrifugation for 30 min (4°C) at 12 000 g, the pellet was suspended in 500 µL of steril water and 500 µL of phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1; v/v/v), mixed and centrifuged for 5 min. RNA in the supernatant was precipitated again with 0.1 vol. of Na-acetate buffer (3 M; pH 5.2) and 2 vol. of absolute ethanol and then stored for a minimum of 1h at -80°C. After centrifugation for 30 min (4°C) at 12 000 g, the pellet was resuspended in 100 µL RNase free ultra-pure water. Then, samples were treated following the Clean-up

protocol of the RNeasy Minikit (Qiagen, France) coupled to a DNase treatment (RNase free-DNase; Qiagen, France). RNA was quantified using an RNA BioPhotometer (Eppendorf, Germany) and visualized after electrophoresis on agarose gels 1.5% (w/v). One μg aliquot was used to generate cDNA with the i-script cDNA synthesis kit (Bio-Rad, France).

To obtain a solid basis for the normalisation of gene expression data, it is advisable to validate the expression stability of candidate reference genes under the studied conditions rather than using reference genes published elsewhere (Lee *et al.*, 2010). Therefore, *GAPDH* and *eIf-4a* were selected, based on their superior stabilities when compared to 18S r RNA, 25S r RNA, eEF1 α (eukaryotic Elongation Factor 1 α), eIF4 α (eukaryotic Initiation Factor 4 α), GAPDH (Glyceraldehyde 3 Phosphate Deshydrogenase), UBC (Ubiquitin Conjugating enzyme). cDNA was then accordingly amplified by polymerase chain reaction (PCR) using SUT1F (5'-CAGGCAAGTATGGACCCAGT-3') and SUT1R (5'-ACCAAACACATGCACAGGAA-3') as specific primers for *LpSUT1*; SUT2F (5'-TTTGGCTGGATGCATATTGA-3') and SUT2R (5'-TTCGCCGAATTAGATTGACC-3') as specific primers for *LpSUT2*; eIF4 α F (5'-CCCTTGAGGGTATCAAGCAG-3') and eIF4 α R (5'-ACTCCCTCATGATGATGTCC-3') as specific primers for eIF4 α genes; GAPDHF (5'-CATCACCATTGTCTCCAACG-3') and GAPDHR (5'-AACCTTCAACGATGCCAAAC-3') as specific primers for GAPDH genes. Amplification was achieved in the following conditions so that the products were analyzed during the exponential phase of the PCR curve: 5 min at 95°C; 27 cycles (*LpSUT1*), 31 cycles (*LpSUT2*), 21.8 cycles (*GAPDH*) or 23 cycles (*eIF4 α*) of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s and elongation at 72°C for 1 min. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

The cDNA was diluted 1/100 with ultra-pure water and 4 μL were used as a template for real-time qPCR analysis. PCR reactions were performed in a total volume of 15 μL with 500 nM for each primer and 10 μL of iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad, France) on the Chromo 4 System (Bio-Rad, France). The qPCR programme included a preliminary step of 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 40 sec. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the dissociation curves after qPCR reactions using the Chromo 4 System (Bio-Rad, France) and by sequencing the qPCR product which confirmed that the correct amplicons were produced from each pair of primers. Fluorescence data was collected after each extension step. A melting curve was run after the PCR cycles; it showed single products for all samples. Changes in RNA transcript level were calculated according to the geometric average method as described by Vandesompele *et al.*, 2002) and using the comparative threshold cycle method described by Livak and Schmittgen (2001). On

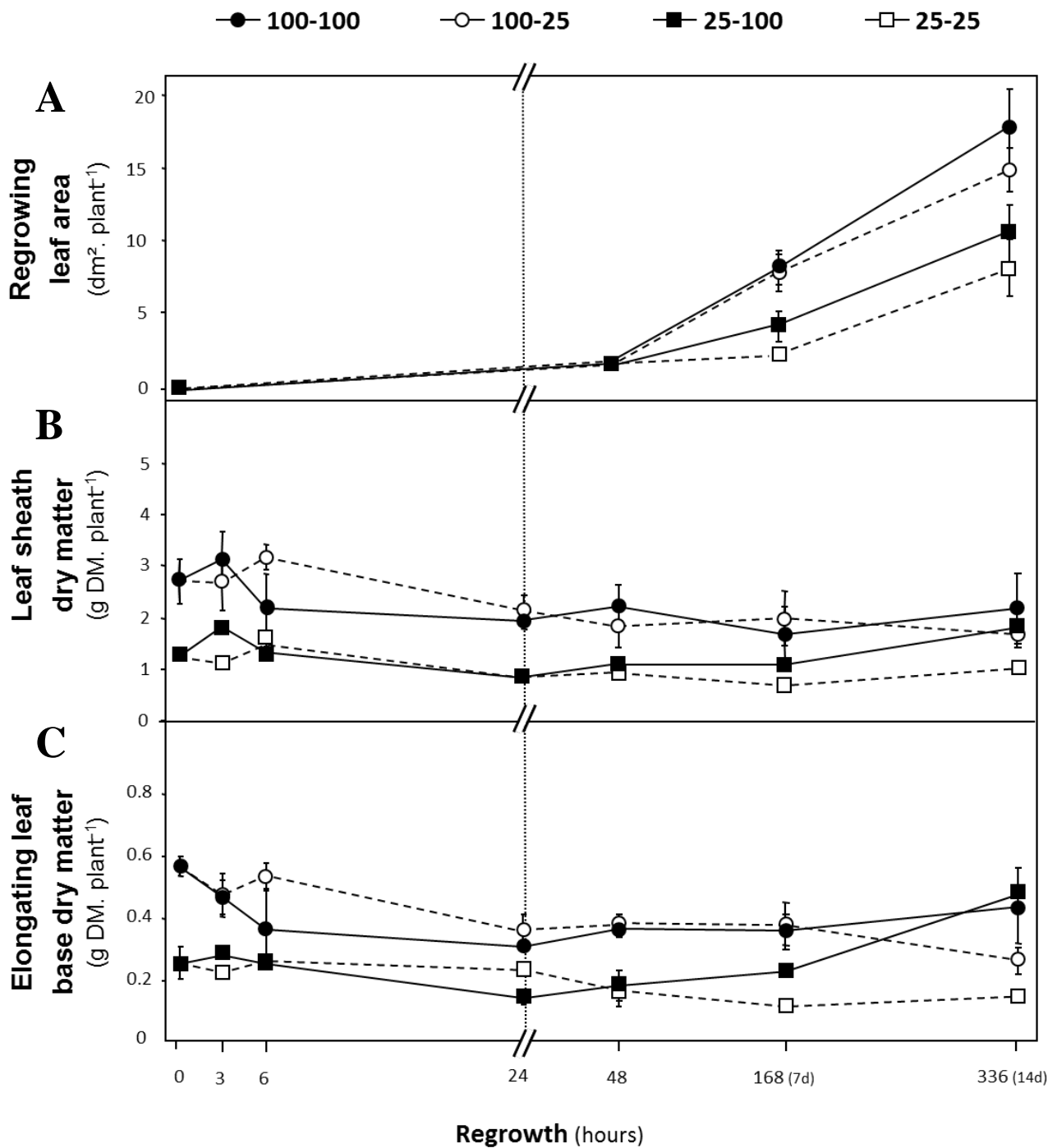


Figure V.2: Whole plant regrowing leaf area (A), leaf sheath dry matter (B) and elongating leaf base dry matter (C) of perennial ryegrass submitted to different light regimes: 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), during the 336h of regrowth after defoliation. When larger than symbols, vertical bars represent \pm S.E. of the mean for $n=3$.

the day of defoliation (*i.e.* T_0), the relative transcript levels of *LpSUT1* and *LpSUT2* were compared within leaf sheaths and elongating leaf bases between plants grown under high (100% PAR) or low light (25% PAR) conditions, and was set to 1 for control plants (100% PAR). Thereafter, and for each treatment, expression levels produced by RT-qPCR were expressed as a ratio relative to the initial (t_0) control point. All the RT-qPCR results were confirmed by three independent reactions from RNA of the same batch of plants.

B.6 Statistical analysis

Results (except those relative to RT-qPCR) are presented as mean values \pm S.E. for three replicates ($n = 3$). The effects on dry matter, fructan or sucrose content were assessed according to a comparison of the means (Tukey t-Test), with MINITAB13 on windows (Minitab Inc, State College, PA, USA). When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal - Wallis was used. Statistical significance was postulated for $P < 0.05$. For transcript expression level, biological variability is reflected by the ΔCq (Yuan *et al.*, 2006), and min and max values of the standard error reflect the variation of the mean (Cumming *et al.*, 2007).

C. Results

C.1 Plant regrowth after defoliation

Figure V.2 shows the effect of different light regimes (100-100; 100-25; 25-100; 25-25) on regrowing leaf area (Figure V.2.A) during 336h (*i.e.* 14 days) of regrowth after defoliation in ryegrass. Irrespective of light regime, and according to plant regrowth, it appeared that there was an increase of the regrowing leaf area for all treatments until the end of the experiment (Figure V.2.A). However, regardless of light conditions during regrowth, the regrowing leaf area was less important for low-light treated plants (*i.e.* 25-100 and 25-25) than for plants receiving high light before defoliation (*i.e.* 100-100 and 100-25) after 48h of regrowth. At the end of the experiment, plants grown under low light conditions before defoliation thus presented reduced regrowing leaf areas ($P < 0.011$). For a given pre-defoliation condition, plants regrowing under high light condition produced a larger leaf area than plants regrowing under low light conditions.

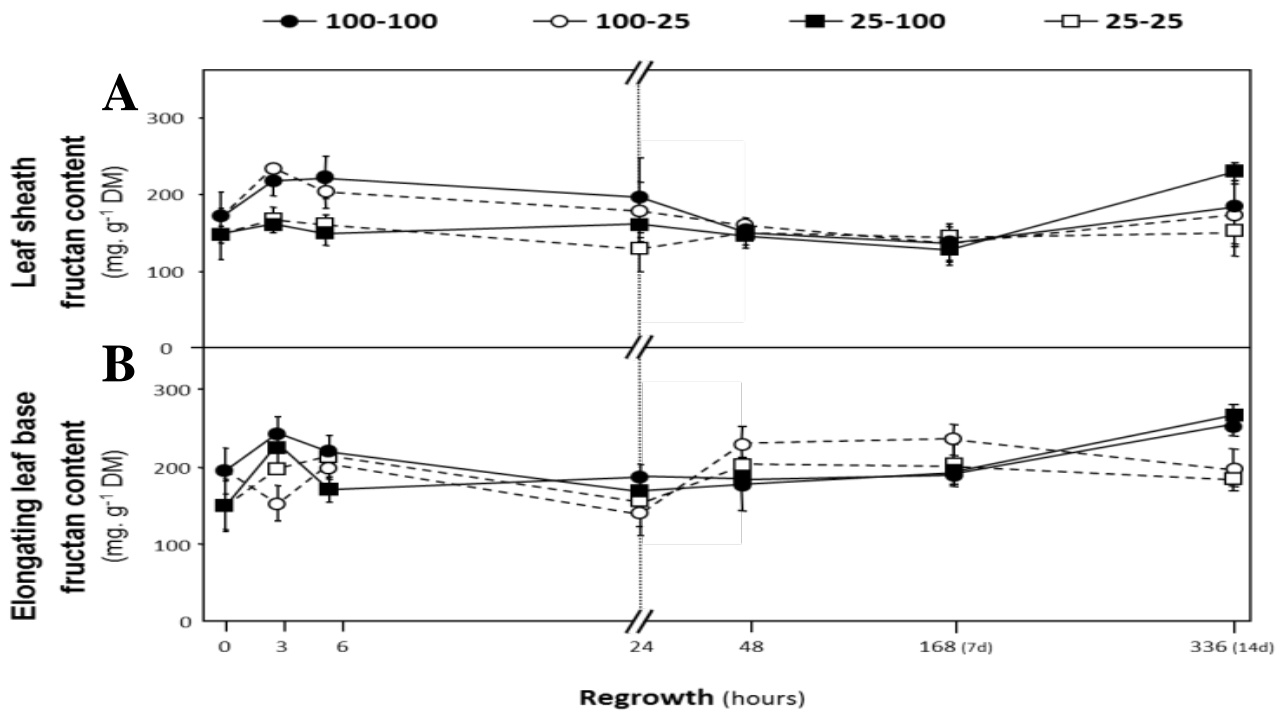


Figure V.3: Content of fructans in leaf sheath (A) and elongating leaf bases (B) of perennial rye-grass for treatments 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), during the 336h of regrowth after defoliation. When larger than symbols, vertical bars represent \pm S.E. of the mean for $n=3$.

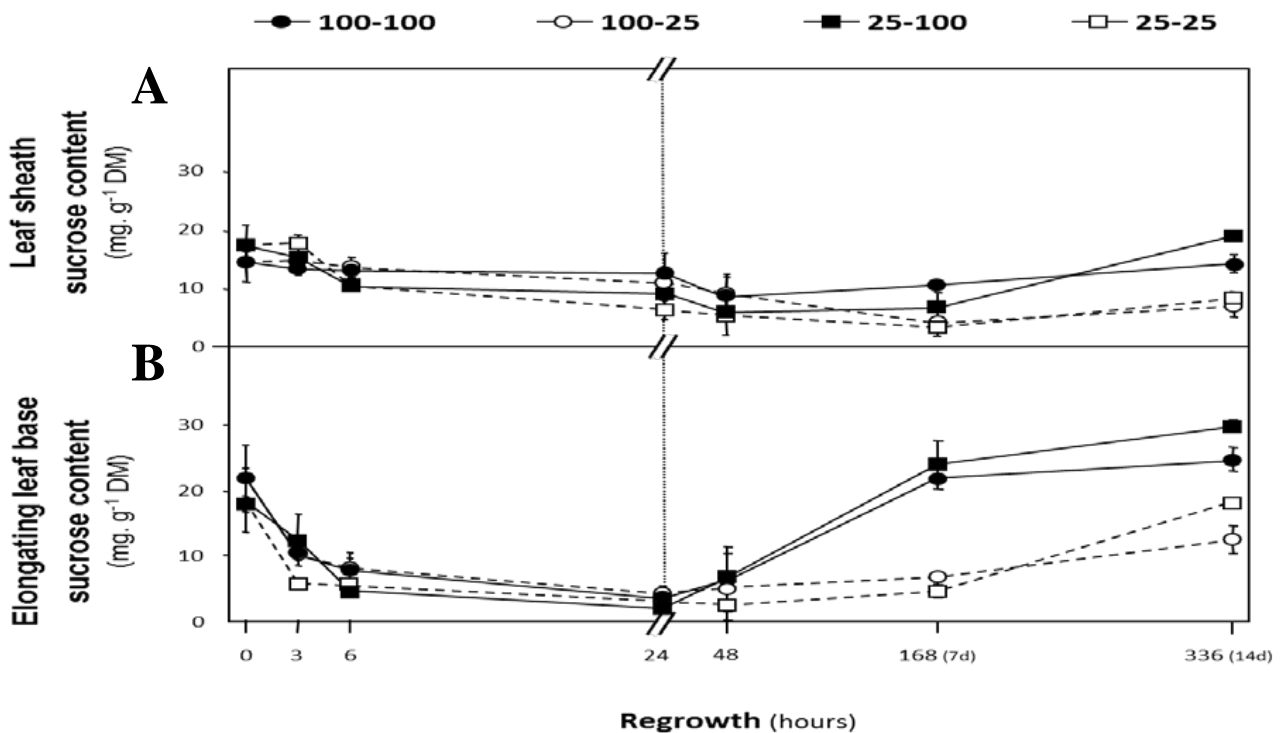


Figure V.4: Content of sucrose in leaf sheaths (A) and elongating leaf bases (B) of perennial ryegrass that were treated with treatments 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), during the 336h of regrowth after defoliation. When larger than symbols, vertical bars represent \pm S.E. of the mean for $n=3$.

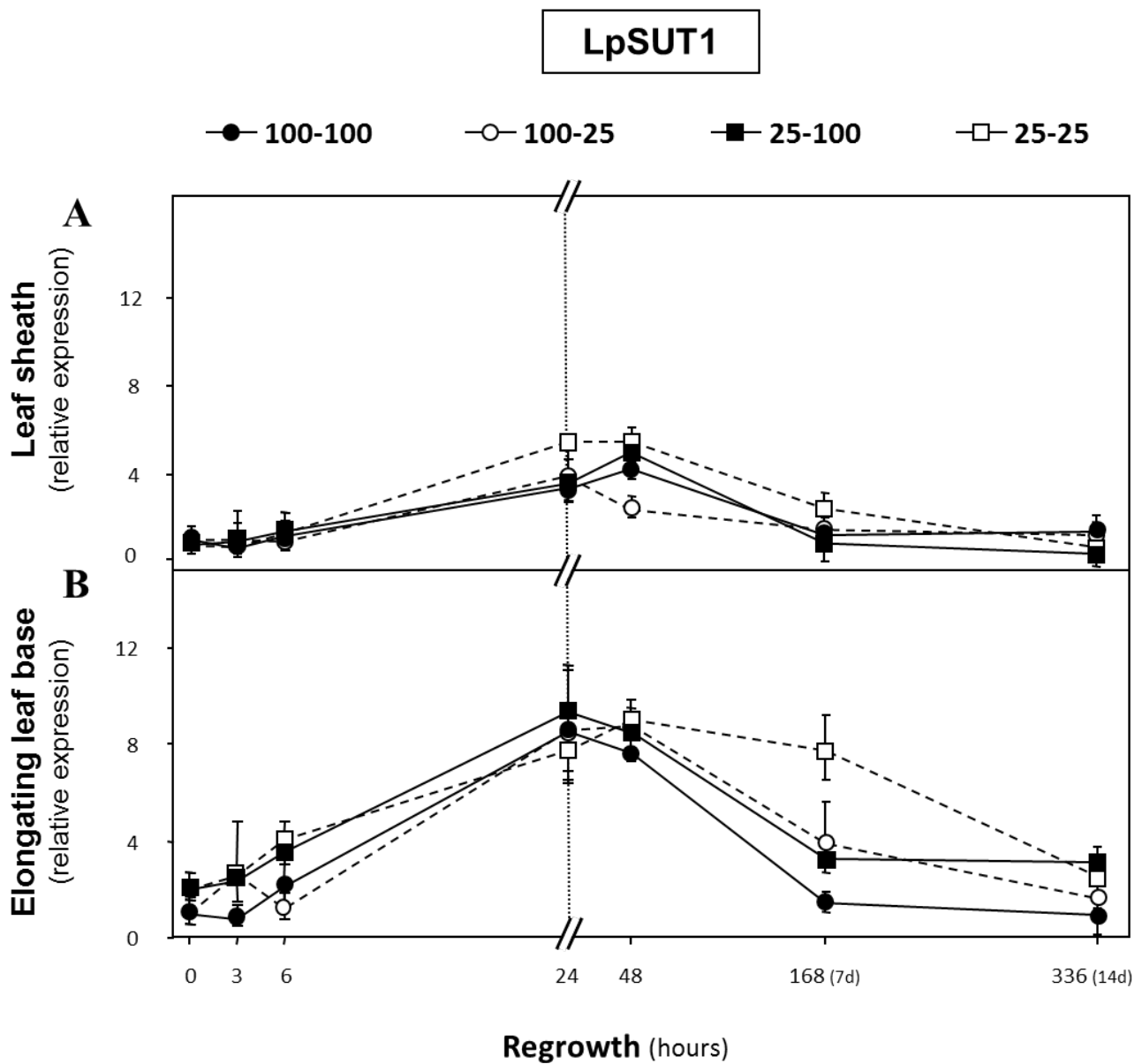


Figure V.5: Relative expression of perennial rye-grass Sucrose Transporter 1 transcript level for treatment 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), in leaf sheaths (**A**) or elongating leaf bases (**B**) during the 336h of regrowth after defoliation. Vertical bars represent + abs max value, - abs min value of the mean for n=3, when larger than symbols. For each treatment, all value are compared to T_0 initial value of the studied treatment.

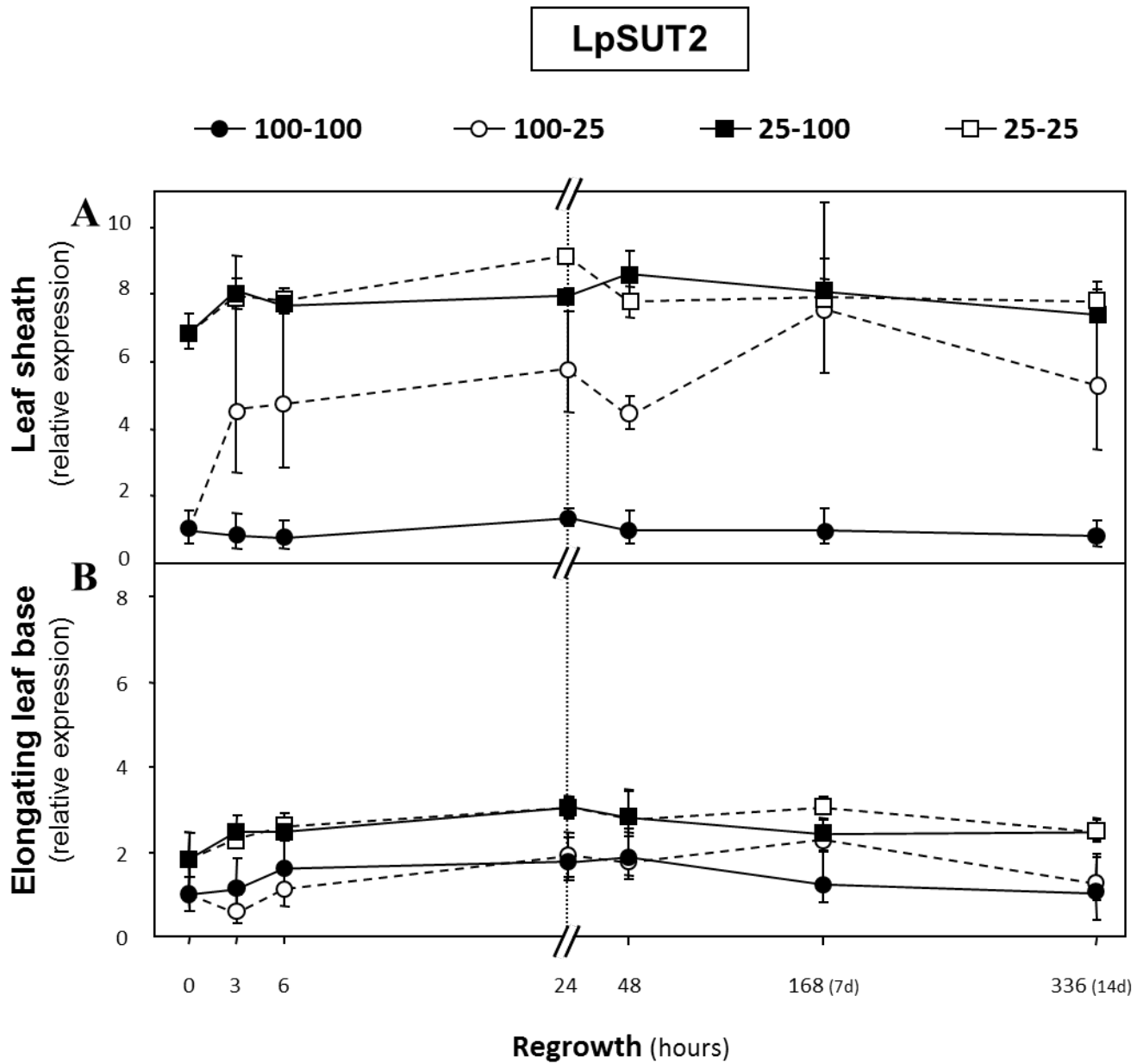


Figure V.6: Relative expression of perennial rye-grass Sucrose Transporter 2 transcript level for treatments 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), in leaf sheaths (A) or elongating leaf bases (B) during the 336h of regrowth after defoliation. Vertical bars represent + abs max value, - abs min value of the mean for n=3, when larger than symbols. For each treatment, all values are compared to t0 initial value of the studied treatment.

The evolution of leaf sheath and elongating leaf base biomass during regrowth after defoliation for the different light regimes are presented in figures V.2.B and V.2.C, respectively. On the day of defoliation, the biomass of both tissues was greatly decreased of more than two times in pre-defoliation low light treated plants (25-100 and 25-25), when compared to control plants initially grown under high light (100-100 and 100-25). During the first day of regrowth after defoliation, all biomass was significantly reduced within both tissues for all treatments, except for elongating leaf bases of 25-25 plants for which biomass remained stable. Moreover, the light regime applied after defoliation had no significant effect on this evolution. Thereafter, and until the end of the experiment, biomass of both tissues in 25-25 plants remained stable, whereas it was significantly reduced in 100-25 plants. Only plants exposed to high light conditions during regrowth presented an increase of leaf biomass between t_{24} and the end of the experiment. Therefore, biomass of leaf sheaths and elongating leaf bases was the lowest in plants always cultivated in low light conditions (25-25). This reduction was of about two fold when compared to control plants (100-100) at the end of the experiment.

C.2 Mobilization of C resources during regrowth

The evolution of fructan content within leaf sheath and elongating leaf bases during regrowth after defoliation for the different light regimes is presented in figures V.3.A and V.3.B, respectively. On the day of defoliation, fructan content was slightly reduced in both tissues of pre-defoliation low light treated plants (25-100 and 25-25). Fructan content was stable (25-100 and 25-25) or slightly increased (100-25 and 100-100) during the first 6h of regrowth. After this lag time, fructan content decreased in both tissues for all treatment except for the treatment (25-100). This decrease continued until 24h after defoliation in elongating leaf bases and 7 days in leaf sheaths. Thereafter, and until the end of the experiment, fructan content remained stable or decreased for low light treated plants, while it increased of more than two times in average in both tissues of plants grown under high light conditions. Increase of fructan contents in both tissues was higher for plant exposed to high light during regrowth, than for plants treated with low light during regrowth.

Figures V.4.A and V.4.B present the evolution of sucrose content during regrowth within leaf sheaths and elongating leaf base, respectively. On the day of defoliation, sucrose content remained unaffected by the previous light conditions. Sucrose content thus averaged $18 \pm 1.5 \text{ mg. g DM}^{-1}$ for all treatments within both tissues. Thereafter, and irrespective of the

light regime, there was a fast decrease of sucrose content which was more massive in elongating leaf bases than leaf sheaths where almost 70% and 25%, respectively, of sucrose content decreased after solely 6h of regrowth after defoliation. Depending on the treatment, this decrease of sucrose content went on from 24h to 7 days of regrowth. After this decrease and irrespective of the light regime, sucrose content increased until the end of the experiment. However, this increase was far less important for plants regrowing under low light (100-25 and 25-25), when compared to plants regrowing under high light (100-100 and 25-100). For example, sucrose content reached solely 15.3 ± 2.7 against 27.3 ± 2.6 mg. g DM⁻¹ for plants grown with 25% and 100% PAR at the end of the experiment, respectively.

Moreover, the results show that irrespective of the light regime, the first soluble sugar to be mobilized after defoliation was sucrose, and this happened faster in elongating leaf bases (between 0h and 24h after defoliation) than in leaf sheaths (between 0h and 7 days). In both tissues, fructan mobilization did not start immediately after defoliation.

C.3 Sucrose transporter expression

The relative expression of *LpSUT1* transcript level is presented in figure V.5 for the four different light regime conditions during regrowth after defoliation in rye-grass leaf sheaths (Figure V.5.A) or elongating leaf bases (Figure V.5.B). On the day of defoliation, and whatever the initial light regime was, the relative expression of *LpSUT1* in both tissues was not significantly different ($P < 0.044$). During the first 24h of regrowth, there was a fast and significant induction of *LpSUT1* transcript levels which was of five times in elongating leaf bases and of nine times in leaf sheaths of control treatment (100-100). The high level was maintained until 48h of regrowth. Thereafter, the relative transcript level of *LpSUT1* decreased and reached values at the end of the experiment which were not significantly ($P > 0.037$) different from initial (t_0) values. However, this decrease was the slowest in both tissues of plants exposed to low light conditions before and after defoliation (25-25).

The relative expression of *LpSUT2* transcript level was also studied in leaf sheath (Figure V.6.A) and elongating leaf bases (Figure V.6.B). On the day of defoliation, plants initially grown under low light conditions presented a greater initial level of *LpSUT2* expression in both tissues, but more particularly within leaf sheaths, when compared to plants grown under high light. During regrowth, and except in leaf sheaths for treatment 100-25, no significant variation of *LpSUT2* relative expression was observed for all treatments within leaf sheaths and elongating leaf bases. A fast increase of *LpSUT2* transcript levels occurred in leaf

sheaths of plants that were transferred from high light conditions to low light conditions at the time of defoliation (100-25). At the end of the experiment, the *LpSUT2* transcript level was five times greater than in leaf sheaths of control plants always exported to high light conditions.

D. Discussion

D.1 Defoliation and regrowth of rye-grass: role of *LpSUT1*

Mostly harvested for livestock feeding, rye-grass is submitted to several cut-regrowth cycles by mechanical cutting or cattle grazing throughout the growing season. Because all photosynthetic leaves are suppressed on the day of defoliation in our conditions, and as observed for control plants (Treatment 100-100), stubble tissues remaining under the bare-cut level (5 cm height) had reduced biomass during the first days of regrowth (Figures V.2.B and V.2.C). Because fructans can represent up to 40% of their biomass (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001), this decrease of biomass was accompanied by a quantitative mobilization of C reserve compounds (sucrose and fructan) within leaf sheaths (the main source organ according to its size; Figures V.3.A and V.4.A) and elongating leaf bases (ELB). In our conditions, the C compound mobilization after defoliation was firstly due to sucrose and secondly to fructan mobilization. In elongating leaf bases, the fast and important decrease of sucrose level could be explained by the decrease of sucrose import from photosynthetic tissues and by the increase of sucrose used to sustain leaf growth (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001). In leaf sheath, the slower decrease of sucrose level suggests that sucrose export was partially counterbalanced by sucrose synthesis from the fructose released by fructan degradation. As already reported Berthier *et al.* (2009) this mobilization of C compounds led to a fast induction of the sucrose transporter *LpSUT1* (Figure V.5.A). This increase was independent of light conditions and thus appears to be mainly a response to defoliation. *LpSUT1* is belonging to the SUT1 group which codes for sucrose transporters particularly implicated in phloem loading and sucrose distribution towards developing tissues (Weschke *et al.*, 2000 ; Aoki *et al.*, 2006). In rye-grass, however, *LpSUT1* was mainly located in mesophyll cells of leaf sheaths and elongating leaf bases (Chapitre 2) and could not be found in phloem cells. The induction of *LpSUT1* could therefore enable an efficient lateral distribution of sucrose towards the phloem cells in order to be loaded and distributed to the leaf meristems which are actively importing C from fructan mobilizing cells of ELB and leaf sheaths. This induction of *LpSUT1*

could be a key step leading to a rapid refoliation (Figure V.2.A), a fast return to autotrophy towards C and a complete replenishment (and even greater accumulation) of C reserves at the end of the experiment (Figure V.3.A and V.4). Thus, the results support the hypothesis that regrowth after defoliation in rye-grass results from two successive and complementary mechanisms *i)* an efficient mobilization of C reserves and *ii)* an increase of sucrose transport capacities within source tissues to feed the leaf meristematic tissues.

During early regrowth, since *LpSUT1* induction by defoliation was insensitive to light conditions but occurred concomitantly to sucrose content decrease, it can be suggested that *LpSUT1* expression and associated sucrose transport, are rather controlled by the decrease of sucrose content itself (*i.e.* trophic regulation after defoliation) rather than by the light perception which would specific require receptors such as phytochromes, cryptochromes or phytohormones (Gyula *et al.*, 2003 ; Wang and Deng, 2003 ; Kami *et al.*, 2010). Defoliation can be viewed as a critical and intense perturbation of plant development similar to the transition from vegetative to reproductive stage. For example, during tuberization in potato (Harmer and Kay, 2005 ; Chinkinska *et al.*, 2008) or flowering in potato and citrus (*Citrus reticulata* ; Li *et al.*, 2003), the allocation of sucrose at the whole plant level is greatly re-orientated towards developing sink tissues (*i.e.* tubers, fruits). These two developmental processes in higher plants are mediated by different signal transduction pathways including the photoperiod-dependent phytochrome pathway and/or the sucrose pathway. Chinkinska *et al.* (2008) reported that the induction of *StSUT1* and *StSUT4* in source leaf tissues of potato was well correlated to a decreasing sucrose content within those tissues as a result of tuberization. Matsukura *et al.* (2000) also reported that, like *LpSUT1*, *OsSUT1* sucrose transporter is regulated by the sucrose status of the rice embryo supplemented with sucrose. Our results therefore give converging arguments leading to assume that the depletion of sucrose C reserves which occurs as an immediate response to defoliation, before depletion of fructan C reserves within source tissues during the first days of regrowth after defoliation, is itself driving *LpSUT1* sucrose transporter induction. Recently, Smeekens *et al.* (2010) reported that despite the fact that sensing and signaling pathways controlling plant growth have been described for different sugars including glucose (Rolland *et al.*, 2006 ; Hanson and Smeekens, 2009), few data are available for sucrose. Increasing sugar signaling knowledge is of particular interest because sugar signaling can significantly contribute to improve yield and product quality as in potato (McKibbin *et al.*, 2006).

D.2 Light conditions and sucrose transport in rye-grass: role of LpSUT2

Sucrose transport might be significantly triggered by high light conditions as already pointed out in *Arabidopsis thaliana* (Delrot *et al.*, 2000) or in potato (*Solanum tuberosum* L.) during tuberization (Chincinska *et al.*, 2008). Rye-grass plants treated with low light conditions were supposed to have a reduced capacity of sucrose transport and a reduced expression of sucrose transporters. If sucrose transport is a key mechanism allowing regrowth after defoliation, low light treated plants were also supposed to show a reduced regrowing rate.

As already reported for rye-grass grown under limited light conditions (Gauthier *et al.*, 1999 ; Bahmani *et al.*, 2000), plants that were subjected to low light conditions before and after defoliation (Treatment 25-25) presented reduced initial whole plant biomass and tillering, when compared to control plants (Treatment 100-100) on the day of defoliation (data not shown). This alteration of plant growth and morphogenesis was the result of the reduction of C supply induced by low light conditions (PAR was reduced by four times), even if it may be transiently and partially compensated for by an increased leaf area and leaf elongation rate (*i.e.* etiolated leaves; Bahmani *et al.*, 2000). Moreover, after only 14 days of pre-defoliation low light treatment (25-25 and 25-100 plants) and probably as a result of limited C supply, the main C reserves contents (fructans and sucrose) were also significantly decreased on the day of defoliation within leaf sheaths (*i.e.* about -15% in average for fructans) and elongating leaf bases (Figures V.3.B and V.4.B).

As a consequence of this overall low initial C status, and because defoliation induced an early mobilization of C reserves which appeared to be independent of light conditions, whole plant growth was thus finally severely reduced and C reserves (especially sucrose) were not fully replenished after 14 days of regrowth under low light conditions. Conversely to our hypothesis, high light conditions do not increase sucrose transporter expression. Indeed, while light conditions had no effect on *LpSUT1* transcript level (Figure V.5), *LpSUT2* expression seems to be induced by low light conditions (Figure V.6). Plants submitted to low light conditions before defoliation had higher level of *LpSUT2* transcript and this high level is maintained when plants were transferred to high light after defoliation (Figure V.6.A, 25-100). Moreover, for plants grown under high light before defoliation *LpSUT2* expression was induced after the transfer to low light condition (Figure V.6.A, 100-25). This effect could not be attributed to a response to defoliation since no induction was observed for plants defoliated and maintained under high light (Figure V.6.A, 100-100).

Thus, *LpSUT2* expression is strongly induced by low light conditions and this induction is not reversed when induced plants were transferred to high light conditions at the time of defoliation (Fig. V.6, 25-100). Moreover, our results showed that *LpSUT2* relative expression was greatly increased within leaf sheaths under low light condition, whereas it remained stable in elongating leaf bases, a tissue which is subjected to low light conditions *in planta* by the surrounding leaf sheaths. *LpSUT2* belongs to the clade 2 of sucrose transporters and is therefore close to *OsSUT4* for rice (*Oryza sativa* L.) and *ZmSUT2* for maize (*Zea mays* L. ; Kühn and Gröf, 2010). In dicots, these transporters have been identified in plasma membrane of sieve elements of tomato (Barker *et al.*, 2000) or Arabidopsis (Meyer *et al.*, 2004), and present a very low affinity for sucrose (Sauer, 2007). They also possess a longer internal central loop than other sucrose transporters. Overall findings then led to hypothesize that they can be much more implicated in sugar sensing rather than in an efficient sucrose transport (Braun and Slewinsky, 2009). As Casal *et al.* (2004) illustrated it for *Lolium multiflorum* submitted to contrasted light conditions (full sunlight with or without supplemented far-red light simulating respectively the presence or absence of neighbouring vegetation), light is the main signal of developmental plasticity within *Lolium* species. Therefore, *LpSUT2* could be one of the genes that confers the high plasticity of ryegrass in response to light regime. It might be involved in sugar sensing, and could also be necessary for the modulation of sucrose transport activity at the whole plant level.

As a conclusion, our results reported that defoliation is a major parameter affecting the mobilization of C reserves (fructans and sucrose) and, by consequence, sucrose transport and especially *LpSUT1* expression during early regrowth. Light regime (high or low light applied before and/or after defoliation) has little effect on these early adaptative processes. *LpSUT1* appears to be not regulated by light conditions but rather by sucrose content itself after defoliation. Conversely, *LpSUT2* expression was unaffected by defoliation but was strongly induced by low light conditions. The analysis of the promoting sequences of *LpSUT1* and *LpSUT2* should be realized in order to assess the presence of sugar and light responsive boxes, respectively. Taken all together, our results originally confirmed that sucrose transport is a central and conserved mechanism leading to the great efficiency of rye-grass regrowth after defoliation, which is commonly traduced by its large dominance and wide spread over grasslands.

Funding

This Ph. D research work was equally supported by a grant from the Region Basse-Normandie and INRA Plant Biology and Environment-Agronomy Dept.

Acknowledgments

We are grateful to Julie Levallois, Anne-Françoise Ameline, Segura Raphaël for their excellent technical assistance.

Discussion
générale

VI. DISCUSSION GENERALE

Mes travaux de thèse, cofinancés à part égale par l'INRA (Départements Environnement-Agronomie et Biologie Végétale) et la région Basse Normandie, ont été essentiellement menés au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA, et plus précisément au sein de l'équipe Carbone-Défoliation qui travaille à la compréhension de la pérennité des prairies pour une exploitation durable. Ils s'inscrivent dans le champ thématique 2, écophysologie végétale, du nouveau schéma stratégique du département EA et dans le projet de l'équipe Carbone-Défoliation qui est d'étudier la fixation du Carbone, sa mise en réserve (fructanes) et son utilisation en relation avec les facteurs environnementaux et les pratiques culturales chez les Poacées prairiales.

Les écosystèmes prairiaux, *via* leur production de fourrage, sont à la base de l'alimentation humaine (produits carnés, laitiers) et sont également au cœur de nombreux développements biotechnologiques (production de molécules d'intérêt thérapeutique, bio-éthanol, etc). Au niveau mondial, ces systèmes de culture **représentent plus de 25% des terres cultivées et plus particulièrement en Basse-Normandie avec une couverture de plus de 60 % de la surface agricole utile, ce qui en fait un déterminant majeur du développement agro-économique régional. Le Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) est l'une des espèces les plus représentées dans ces écosystèmes.** Cette Poacée possède de nombreux avantages tels qu'une très bonne appétence, une bonne digestibilité pour les ruminants ainsi que des rendements fourragers élevés et réguliers au cours de l'année. La récolte du fourrage, que ce soit par fauche mécanique par l'exploitant agricole ou lors du pâturage par le bétail, induit l'élimination plus ou moins sévère de l'appareil photosynthétique aérien. Malgré des capacités photosynthétiques foliaires ainsi réduites, le Ray-grass anglais présente toutefois une vitesse de repousse (ou refoliation) importante après coupe. **L'une des clefs de cette repousse rapide** (et donc en partie de la large prédominance de cette espèce au sein de l'écosystème prairial) **réside généralement dans la mobilisation efficace des réserves carbonées au niveau des tissus épargnés par la coupe que sont principalement les gaines et, dans une moindre mesure, les bases des feuilles en croissance (BFC ; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999, 2001).** Ces réserves en carbone sont essentiellement constituées de fructanes (plus de 80% des sucres totaux), polymères hydrosolubles de fructose. Cependant, les fructanes ne correspondent pas à la forme de transport du carbone. Ce

rôle est dévolu au saccharose (Amiard *et al.*, 2004). **L'hydrolyse des fructanes dans les premières heures de la repousse conduit donc *in fine* à la synthèse de saccharose et à son transport ultérieur vers les tissus puits** (en repousse intense) que sont les bases de feuilles en croissance. L'étude du transport du saccharose et, par voie de conséquence, la distribution des ressources C au sein de la plante entière, est très régulé d'un point de vue physiologique c'est pourquoi il fait l'objet de nombreuses d'études depuis plusieurs années (Lemoine, 2000). Cependant, chez les Poacées comme le Ray-grass anglais, les informations sont assez limitées (voire inexistantes), notamment si l'on compare avec la littérature concernant la dégradation et la mobilisation des réserves carbonées lors de la repousse après coupe.

Au regard de ces différents éléments et de la bibliographie existante, nous avons émis l'hypothèse que la capacité de repousse du Ray-grass anglais était déterminée par un transport efficace de saccharose entre les tissus sources et les tissus puits (méristèmes foliaires) pour le carbone.

Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à déterminer la nature du transport de saccharose dans les tissus sources. Cela nous a ensuite conduit à isoler, identifier et caractériser pour la première fois des transporteurs de saccharose chez le Ray-grass anglais. Nous avons enfin étudié le transport du saccharose dans deux conditions physiologiques particulières affectant le niveau des ressources carbonées, à savoir la repousse après coupe et la diminution de l'intensité lumineuse.

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

♣ La nature du transport du saccharose et les caractéristiques biochimiques et moléculaires de ce transport chez le Ray-grass anglais (ce qui correspond aux chapitres 1 et 2 du manuscrit de thèse) ;

♣ La physiologie du transport de saccharose chez le Ray-grass anglais non défolié en conditions d'éclairement non limitant (chapitres 2 et 3) ;

♣ La physiologie du transport de saccharose chez le Ray-grass anglais défolié en conditions d'éclairement limitant (chapitres 2 et 3).

A. Nature du transport de saccharose et caractéristiques biochimiques et moléculaires de ce transport de saccharose chez le Ray-grass anglais

A.1. Un type de transport de nature apoplastique

En collaboration avec V. Amiard, des coupes de limbes foliaires observées en microscopie électronique ont permis de déterminer la densité de plasmodesmes au sein des faisceaux conducteurs. D'une part, il existe très peu de plasmodesmes entre cellule compagne et cellule de l'élément criblé (CC-CE) du phloème, et d'autre part entre cellule de l'élément criblé et cellule du parenchyme phloémien. (Chapitre 1, Fig. III.1.A). Le nombre très restreint de communications entre ces différentes cellules semble *de facto* écarter l'implication d'un chargement symplastique du phloème. Par ailleurs, des expériences de plasmolyse, réalisées sur ces différents types cellulaires, indiquent que les cellules phloémiennes présentent une osmolarité plus élevée que les cellules voisines du mésophylle (Chapitre 1, Fig. III.1.B).

L'ensemble des résultats obtenus suggère donc que le phloème est chargé de manière apoplastique dans les limbes, et par prolongement dans les gaines foliaires, ce qui est en accord avec les observations faites chez d'autres Poacées telles que le Maïs et le Blé (Evert *et al.*, 1996 ; Botha *et al.*, 2005). Chez ces espèces, la voie de transport apoplastique du saccharose a été confirmée par l'existence d'un mécanisme saturable du chargement du phloème et donc l'implication de protéines de transport. Chez le Ray-grass anglais, des mesures d'absorption de saccharose ont été réalisées sur des vésicules de plasmalemmes préparées à partir de gaines foliaires. Ces travaux, effectués avec le concours de M. Desclos, démontrent l'existence d'un transport actif et saturable de saccharose (Chapitre 1, Fig. III.2).

Au vu de l'ensemble de ces résultats, c'est-à-dire **i) faible densité de plasmodesmes au sein des faisceaux conducteurs, ii) fort gradient osmotique entre les cellules phloémiennes des faisceaux conducteurs et les cellules environnantes du mésophylle, iii) transport plasmalémmique saturable de saccharose**, nous avons alors proposé que **le transport latéral de saccharose au sein des faisceaux conducteurs des gaines s'effectue par voie apoplastique**. Cette voie de transport n'est toutefois pas exclusive. Un transport par voie symplastique est possible en particulier au niveau des cellules du mésophylle. La vérification de cette hypothèse sera présentée dans la première partie des perspectives de recherche.

A.2. Identification de transporteurs de saccharose

Depuis plus d'une vingtaine d'années, des protéines impliquées dans le transport du saccharose appartenant à la superfamille des facilitateurs ont été identifiées (Lemoine, 2000 ; Sauer, 2007).

Nos résultats initiaux ayant montré l'existence d'un phénomène saturable pour le transport du saccharose et impliquant une ou plusieurs protéines (Chapitre 1, Fig. III.2), nos travaux se sont alors orientés vers la recherche de tels transporteurs de saccharose chez le Ray-grass anglais.

Nous avons réalisé le criblage de deux banques phagiques d'ADNc de chaumes de Ray-grass anglais défoliés et non défoliés. **Un premier criblage a permis d'isoler un ADNc pleine longueur nommé *LpSUT1*.** Cet ADNc *LpSUT1* montre un cadre de lecture ouvert de 1566 pb et code une protéine de 522 acides aminés (Chapitre 1, Fig. III.3). L'analyse bioinformatique a révélé une forte homologie avec les séquences des transporteurs de saccharose de l'Orge (*HvSUT1*, Weschke *et al.*, 2000) et du Blé (*TaSUT1*, Aoki *et al.*, 2002). **Les données disponibles dans la littérature font cependant état de l'existence de famille multigénique pour les transporteurs de saccharose chez les Poacées.** Ainsi, chez le Riz, 5 ADNc différents ont été identifiés (Aoki *et al.*, 2003). Il nous a donc semblé important de poursuivre les recherches d'autres transporteurs de saccharose chez le Ray-grass. **A l'issue d'un deuxième criblage des banques phagiques d'ADNc, un second ADNc pleine longueur a été isolé. Cet ADNc, nommé *LpSUT2*,** présente une séquence nucléotidique de 1821 pb et code une protéine de 607 acides aminés (Chapitre 2, Fig. III.1). Une analyse phylogénique montre que cette protéine possède des homologies importantes avec des transporteurs de saccharose tels que *OsSUT4* chez le Riz (Aoki *et al.*, 2003) et *ZmSUT2* (AAS91375) chez le Maïs. Ces protéines (*LpSUT2*, *OsSUT4*, *ZmSUT2*) ont une boucle cytoplasmique centrale plus longue que les autres transporteurs de saccharose. Ainsi, la boucle cytoplasmique centrale de la protéine *LpSUT2* possède une cinquantaine d'acides aminés (Chapitre 2, Fig. III.1). De plus, la protéine *LpSUT2* présente une extrémité N-terminale plus importante que celle de la protéine *LpSUT1*. Des différences structurales similaires ont été observées chez le Riz entre les cinq SUT identifiés (Aoki *et al.*, 2003 ; Sun *et al.*, 2010).

Les transporteurs de saccharose appartiennent à une famille multigénique et sont répartis en 5 groupes (Kuhn et Gröf, 2010). Ainsi, chez le Riz ou *Brachypodium*, un représentant dans chaque groupe a été identifié (Aoki *et al.*, 2003 ; Braun et Slewinski, 2009).

Il est vraisemblable que comme chez ces Poacées, le Ray-grass anglais possède d'autres transporteurs de saccharose que LpSUT1 et LpSUT2. Le criblage de banque phagique d'ADNc de chaumes s'est révélé être une méthode efficace mais présente des limites. Pour rappel, les chaumes d'un Ray-grass sont constitués de gaines et de BFC. Seuls les ADNc codant des transporteurs de saccharose présents dans ces organes ont donc été recherchés. Sont donc exclus de notre étude les transporteurs de saccharose susceptibles d'être spécifiquement présents dans les limbes matures et les racines qui sont des lieux d'échanges importants de carbone (en particulier de saccharose, [Amiard *et al.*, 2004](#)). Par conséquent, nous devons développer une nouvelle stratégie de criblage afin d'isoler de nouveaux gènes codant des transporteurs de saccharose chez le Ray-grass anglais.

A.3. Cartographie des gènes LpSUT

Afin de cartographier les gènes *LpSUT1* et *LpSUT2* sur une population de Ray-grass anglais, une collaboration avec P. Barre, généticien reconnu dans le domaine des plantes prairiales (INRA de Lusignan) a été effectuée. L'utilisation de HRM (high resolution melting curve analysis, [chapitre 2, Fig.IV.2 et IV.3](#)) a permis d'identifier différents parents parmi les populations de Ray-grass anglais disponibles. **Les gènes *LpSUT1* et *LpSUT2* ont été respectivement cartographiés sur le chromosome LG4 et sur le chromosome LG6 (Chapitre 2, Fig. IV.3).** Cette localisation des deux gènes *LpSUT* est éloignée de celle des gènes intervenant dans la dégradation des fructanes comme ceux des FEH qui se situent sur le chromosome LG3 ([Lothier *et al.*, 2007](#)). Par contre, **les gènes *LpSUT* sont localisés dans des QTLs liés à l'élongation foliaire.**

A.4. Caractérisation des protéines LpSUT

Afin de s'assurer de la fonctionnalité des protéines codées par les ADNc *LpSUT1* et *LpSUT2* et d'en déterminer les caractéristiques biochimiques, une expression fonctionnelle dans un système hétérologue a été réalisée. Les systèmes hétérologues classiquement utilisés dans la caractérisation de transporteurs de saccharose sont les oocytes de Xénope ou les levures. Dans notre cas, nous avons opté pour des levures de type *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats sont présentés dans les chapitres 1 ([Berthier *et al.*, 2009](#)) et 2 ([Berthier *et al.*, 2011a](#)). Chez les Monocotylédones, la caractérisation de transporteurs de saccharose comme *LpSUT1*, appartenant au groupe des SUT3 selon la

nomenclature récente de Kühn et Gröf (2010), a déjà été réalisée pour les protéines ShSUT1 (Canne à sucre) ou OsSUT1 (Riz) respectivement dans des levures et dans des oocytes de Xénope (Rae *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2010). **Par contre, chez les Monocotylédones, la caractérisation fonctionnelle d'un transporteur de saccharose doté d'une boucle cytosplamique comme LpSUT2 est une première et mérite d'être soulignée.**

Les premiers résultats obtenus ont montré que les ADNc *LpSUT1* et *LpSUT2* codent des protéines fonctionnelles qui permettent aux levures transformées d'utiliser le saccharose comme seule source de carbone. Par ailleurs, la vitesse accrue d'absorption du saccharose en présence des protéines LpSUT1 et LpSUT2 indique que cela donne aux souches de levures mutantes la capacité d'absorber le saccharose (Chapitre 1, Fig. III.4.C et Chapitre 2, Fig. IV.4.A). La forte inhibition observée avec un protonophore comme le CCCP, en accord avec le pH optimum acide, suggère l'intervention d'un gradient de protons responsable de l'énergisation du transport de saccharose par les protéines LpSUT1 et LpSUT2.

L'étude de la spécificité des transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 a été également suivie (Chapitre 2, Fig. IV.5). A l'exception de quelques glucosides, la spécificité des protéines LpSUT1 et LpSUT2 est similaire. Ainsi, en présence d' α -phénylglucoside, l'inhibition du transport de saccharose rencontrée par les protéines LpSUT1 et LpSUT2 (66% et 83% respectivement) est en accord avec les données déterminées pour les autres transporteurs de saccharose, ce qui indiquerait que la partie glucosyl du saccharose soit responsable du transport (Hitz *et al.*, 1986). **Pour le fructose, les transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 ont des comportements radicalement opposés.** Ainsi, pour la protéine LpSUT1, le fructose n'a pas d'effet significatif sur son activité (Chapitre 2, Fig. IV.5). La protéine LpSUT2 voit quant à elle son activité réduite de 77% en présence de fructose (Chapitre 2, Fig. IV.5). Par contre, le glucose n'a aucun effet sur le transport de saccharose de cette même protéine. **Cette inhibition par le fructose laisse entrevoir un rôle hypothétique très intéressant pour la protéine LpSUT2. En effet, le fructose est le produit résultant de l'hydrolyse des fructanes (polymères hydrosolubles de fructose) qui constituent la principale forme de réserves carbonées chez le Ray-grass.** Pego et Smeekens (2000) ont proposé une nouvelle voie de perception et de transmission du signal sucre impliquant le fructose et les fructokinases. Ainsi, tout comme le glucose est perçu par les hexokinases, le fructose le serait par les fructokinases. Cependant, les résultats obtenus

récemment pour trois des quatre fructokinases identifiées chez la Tomate suggèrent que ces enzymes joueraient un rôle dans le métabolisme du fructose plutôt qu'un rôle dans la perception du signal sucre (Granot, 2007). **Le transporteur de saccharose LpSUT2 pourrait être le site de perception du signal sucre : lorsque la plante est en manque de carbone, elle hydrolyse ses fructanes, le fructose libéré inhibe le transport de saccharose par LpSUT2, il modifie donc le flux de saccharose à travers LpSUT2, ce qui pourrait constituer le point de départ d'une voie de transmission de signal. La protéine LpSUT2 serait donc impliquée dans la détection du statut carboné de la plante (Barker *et al.*, 2000 ; Barth *et al.*, 2003).** Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que le transporteur de saccharose LpSUT2 appartient à une plante qui utilise les fructanes comme réserves carbonées.

La détermination des paramètres cinétiques a permis de mettre en évidence une affinité pour le saccharose sensiblement identique entre les transporteurs de saccharose LpSUT1 (5,6 mM) et LpSUT2 (6,2 mM) (chapitre 1 Fig. III.4.D et chapitre 2 Fig. IV.4.C). La constante de Michaelis apparente mesurée pour la protéine LpSUT1 est comparable à celle observée pour les autres transporteurs de saccharose de Monocotylédones comme l'Orge ($K_M = 10,6$ mM ; Sivitz *et al.*, 2005), le Maïs ($K_M = 3,7$ mM ; Carpaneto *et al.*, 2005), la Canne à sucre ($K_M = 8,26$ mM ; Reinders *et al.*, 2006) ou le Riz ($K_M = 7,50$ mM ; Sun *et al.*, 2010). Pour les Dicotylédones, les transporteurs de type SUT1 classés dans le groupe des SUT1 présentent une K_M apparente de l'ordre de 0,7 à 2 mM (Kühn et Gröf, 2010). L'absence de caractérisation d'un autre transporteur de type SUT2 chez les Poacées ne permet pas de conclure quant à l'affinité observée pour la protéine LpSUT2. Cependant, le transporteur de saccharose LpSUT2 appartient au même groupe que des protéines de Dicotylédones comme AtSUC3 ou PmSUC3. La K_M apparente observée pour la protéine LpSUT2 est proche de celle mesurée chez *Arabidopsis* ($K_M = 11,7$ mM ; Schulze *et al.*, 2000) ou chez le Plantain ($K_M = 5$ mM ; Barth *et al.*, 2003). **L'affinité des transporteurs de saccharose pourrait être intimement liée à leur localisation dans la plante.** Ainsi, dans l'apoplaste de la plupart des cellules, le saccharose est présent à de faibles concentrations. Par exemple, la concentration en saccharose dans l'apoplaste des cellules de mésophylle est inférieure à 1 mM chez des espèces aussi variées que le Plantain, le Céleri ou le Pêcher (Nadwodnik et Lohaus, 2008). Par contre, dans l'apoplaste des cellules proches des faisceaux conducteurs, une concentration en saccharose élevée est attendue (Giaquinta, 1983). **Il est raisonnable d'envisager que les transporteurs de saccharose à forte affinité soient localisés dans les zones ayant de**

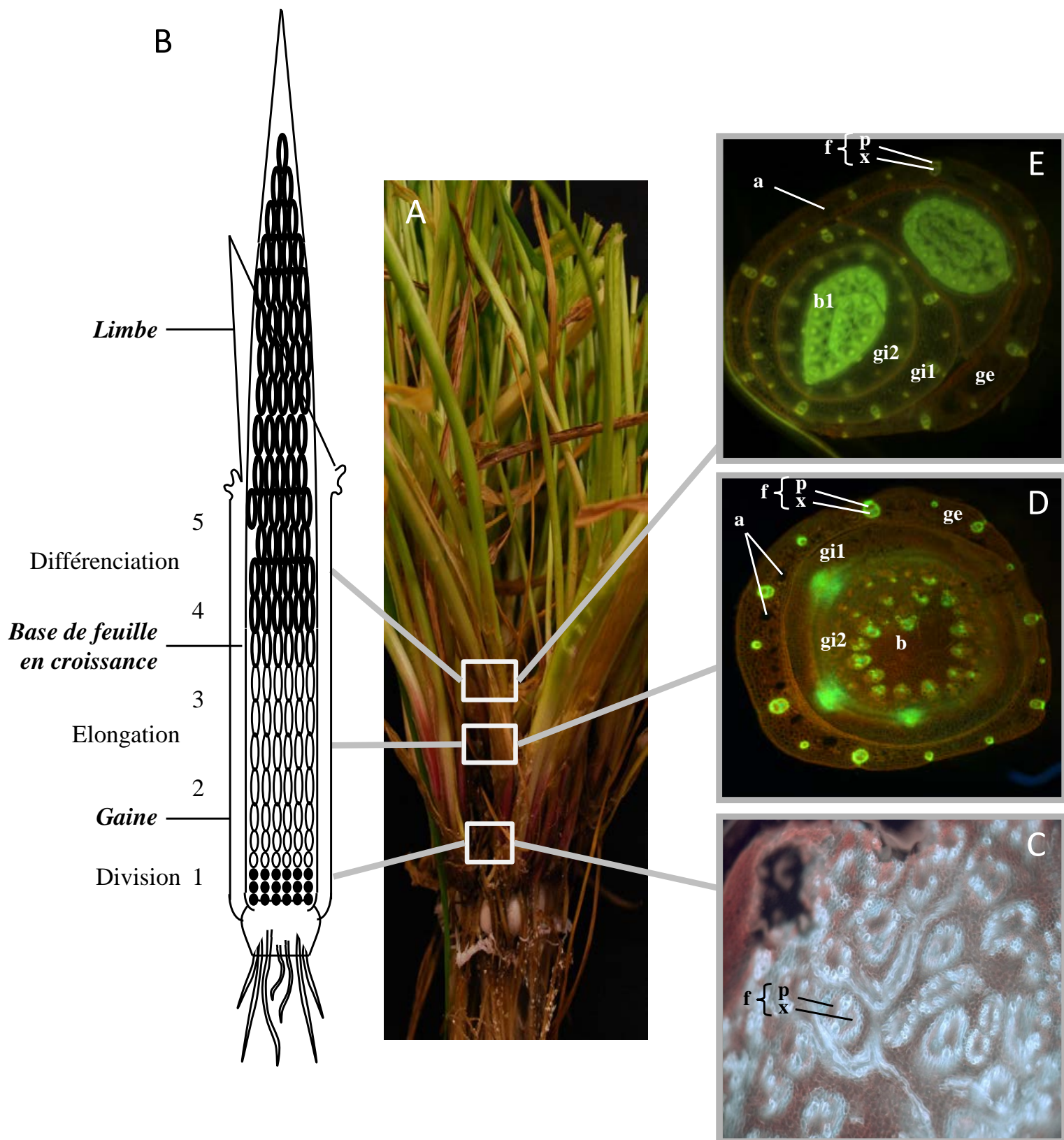


Figure VI.1: (A) Photographie de chaumes de Ray-grass anglais. (B) Représentation schématique de la coupe d'une talle de Ray-grass anglais présentant sa composition et la structure de la base de feuille en croissance. (C) Coupe transversale colorée à l'acridine orange au niveau du collet. (D) Coupe transversale colorée à l'acridine orange dans la zone. (E) Coupe transversale colorée à l'acridine orange de l'étage médian avec gaine âgée et BFC formée. Abréviations : a, aerenchyme ; b, base de feuille en croissance ; f, faisceau conducteur ; ge, gaine externe ; gi, gaine interne ; p, phloème ; x, xylème.

faibles concentrations en saccharose apoplastiques tandis que les transporteurs de saccharose à faible affinité se situent dans les secteurs à forte concentration en saccharose extra-cellulaire.

En résumé, les caractéristiques biochimiques et moléculaires du transport de saccharose dans les gaines de Ray-grass indiquent que celui-ci s'effectue par voie apoplastique et qu'il fait appel à des protéines de transport comme LpSUT1 et LpSUT2. Afin de comprendre le rôle et la physiologie du transport du saccharose chez le Ray-grass anglais, il convient de s'intéresser maintenant à la localisation et à l'expression des transcrits *LpSUT1* et *LpSUT2* (par qRT-PCR) ainsi qu'à la localisation des protéines correspondantes (par immunomarquage).

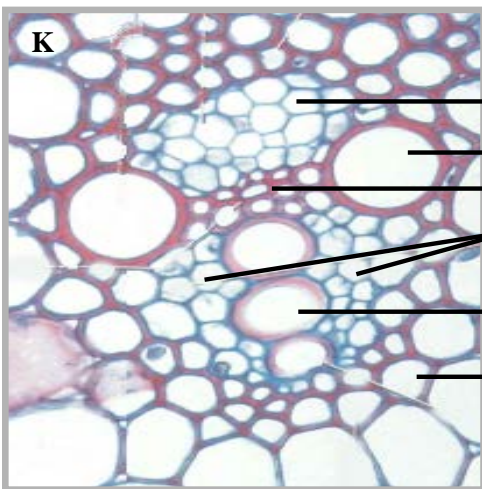
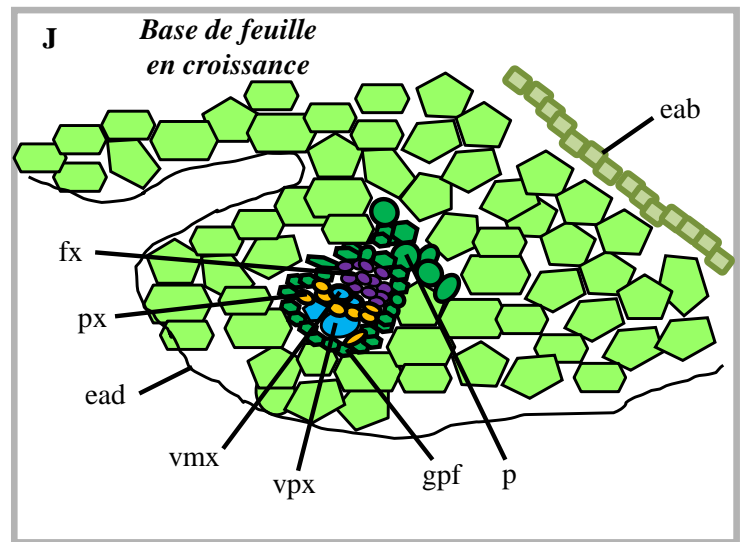
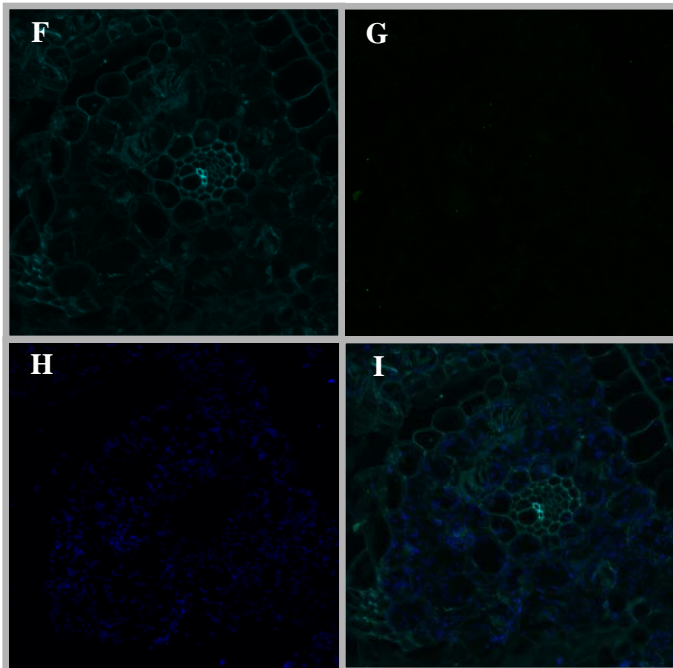
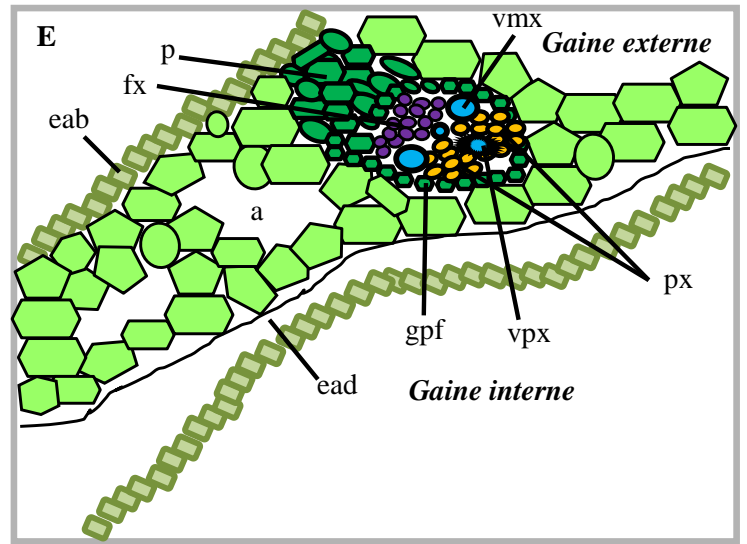
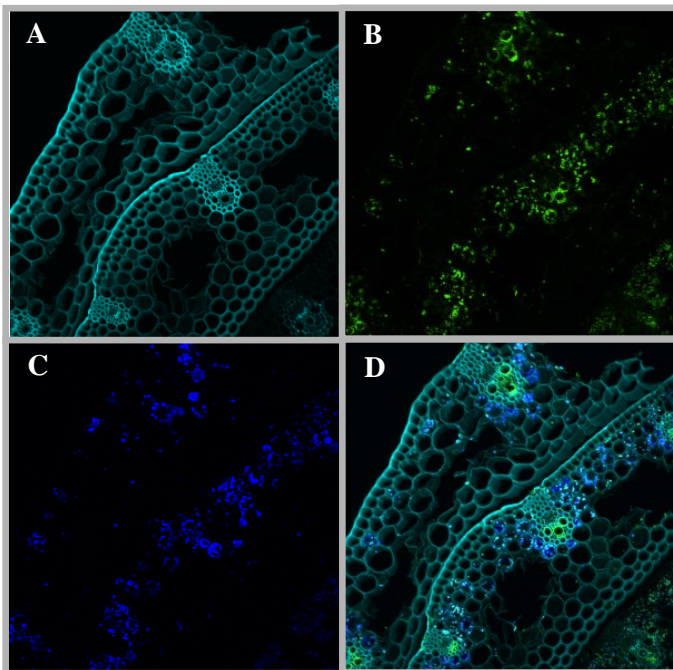
B. Physiologie du transport de saccharose chez le ray-grass anglais non défolié en conditions d'éclairement non modifiées

B1. Anatomie du ray-grass et méthodologie d'immunomarquage

Afin de mieux appréhender le rôle potentiel des transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 chez le Ray-grass anglais, il convient d'avoir quelques notions sur la structure anatomique (histologique) du Ray-grass anglais et plus précisément des zones d'échange entre cellules du mésophylle et faisceaux conducteurs.

A l'état végétatif, les Poacées sont formées de talles. Une talle est constituée d'une tige réduite à quelques millimètres de long qui porte les feuilles et les racines (Fig. VI.1.A). Les feuilles adultes se composent d'une gaine enveloppante et d'un limbe étalé, séparé par la ligule. Les feuilles les plus externes sont les plus âgées. La base de la gaine s'insère sur la tige sur toute sa largeur au niveau de la zone d'insertion foliaire (Fig. VI.1.B). Les feuilles successives d'une talle se développent à l'intérieur des feuilles précédentes. Les feuilles des Poacées possèdent une nervation parallèle qui leur confère un aspect élancé.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la localisation des faisceaux conducteurs dans ces structures. Les observations effectuées ont permis de distinguer des différences en termes de surface d'échange entre les faisceaux conducteurs et les tissus environnants. A la base des parties aériennes nommée collet (ou plateau de tallage), un enchevêtrement de tissus conducteurs peu distincts est visible (Fig. VI.1.C). En effet, ces



Phloème
 Vaisseau du métaxylème
 Fibres du xylème
 Parenchyme xylémien
 Vaisseau du protoxylème
 Gaine périfasciculaire

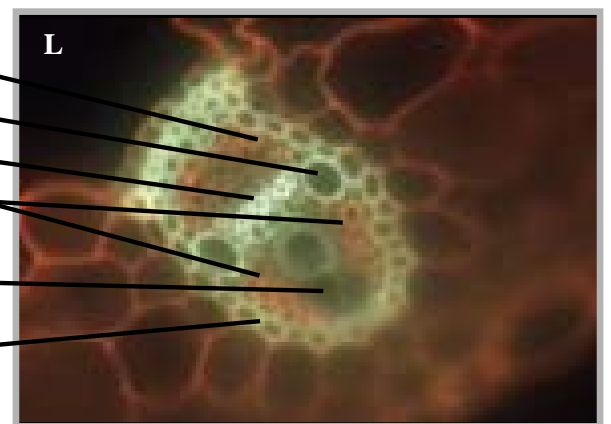


Figure VI.2: A, B, C, D. Coupe transversale d'une gaine de Ray-grass anglais. E. Représentation schématique de la coupe d'une gaine. F, G, H, I. Coupe transversale d'une base de feuille de croissance de Ray-grass anglais. J. Représentation schématique de la coupe d'une base de feuille en croissance. K. Faisceau collatéral fermé dans le chaume de Blé, d'après Speranza et Calzoni, 2004. L. Faisceau conducteur dans le chaume de Ray-grass anglais coloré à l'acridine orange. Le cyan correspond à la structure (A, F), le vert correspond à la fluorescence due à l'Alexa 488 (B, G), le bleu correspond à l'autofluorescence de la chlorophylle (C, H). Abréviations : a, aerenchyma ; eab, épiderme abaxiale ; ead, épiderme adaxiale ; fx, fibre de xylème ; gpf, gaine périfasciculaire ; p, phloème ; px, parenchyme xylémien ; vmx, vaisseau du métaxylème ; vpx, vaisseau du protoxylème.

faisceaux peuvent se trouver parallèles ou perpendiculaires au plan de coupe, suggérant ainsi une importante zone d'échange entre les faisceaux des parties aériennes et les faisceaux des parties racinaires. Cette zone très mince, moins d'un centimètre, possède certainement un rôle clef dans la distribution des ressources carbonées dans la plante entière de par sa position stratégique et de par la structure des tissus qui la composent.

Une seconde zone dite « médiane » présente une structure plus aboutie. En effet, dans cette zone les faisceaux conducteurs sont tous perpendiculaires au plan de coupe et présentent une structure de faisceaux collatéraux fermés (Fig. VI.1.D). Cette structure se compose d'un phloème et d'un xylème qui peuvent être en contact direct, le xylème ayant une tendance à ressortir sur les côtés du phloème. Les faisceaux sont entourés par une gaine sclérenchymateuse dite gaine périfasciculaire. Cette zone médiane peut-être subdivisée en deux sous-parties en fonction de la maturité des tissus. En effet, dans les premiers centimètres, il semble que les gaines foliaires les plus âgées soient complètement formées et présentent par conséquent des faisceaux conducteurs caractéristiques des Poacées. Dans les gaines et la partie supérieure des feuilles en croissance situées en haut des chaumes (4 à 5 cm), les faisceaux conducteurs sont peu nombreux et bien différenciés les uns des autres (Fig. VI.1E).

La gaine externe est formée par une assise de cellules parenchymateuses de grand diamètre qui possèdent des chloroplastes. La gaine interne est constituée d'une couche de cellules de faible diamètre (Fig. VI.2.A-E). Les bases de feuilles en croissance présentent elles aussi des cellules de faible diamètre (Fig. VI.2.F-J).

Le limbe et les gaines sont vascularisés par de nombreux faisceaux conducteurs longitudinaux parallèles qui convergent et fusionnent à la pointe du limbe. Les faisceaux conducteurs sont constitués d'un pôle phloémien situé du côté de l'épiderme abaxiale et d'un pôle xylémien, situé du côté de l'épiderme adaxiale (Fig. VI.2.K et VI.2.L). Ces deux pôles sont séparés par une assise de cellule de parenchyme. Les vaisseaux du protoxylème, au nombre de trois à cinq, occupent une position centrale dans le pôle xylémien. Ils sont entourés par des cellules de parenchyme xylémien et par des vaisseaux de métaxylème de petit diamètre. De chaque côté du faisceau, on rencontre deux vaisseaux de métaxylème de grand diamètre qui sont en contact avec des vaisseaux de métaxylème de petit diamètre et des cellules de parenchyme xylémien. Le métaphloème est constitué de tubes criblés de diamètre assez important, associés à des cellules compagnes. Le protophloème est formé de tubes

criblés aplatis entre le métaphloème et la gaine vasculaire. Dans les gaines et les BFC, des lacunes aérifères sont présentes ce qui est observé chez les tissus matures comme les limbes (Prioul *et al.*, 1980). Les gaines disposent de forte similitude avec les observations de Koroleva *et al.* (2000) sur les limbes d'Orge. Nous pouvons par conséquent supposer que ce tissu est photosynthétiquement actif malgré le faible rayonnement reçu (1/4 du rayonnement global, Prioul *et al.*, 1980). Suite à la défoliation ce tissu étant épargné, il permettra de retrouver une autotrophie rapide grâce à la présence de tissu chlorophyllien potentiellement actif.

J'ai eu l'opportunité d'apprendre au sein du laboratoire PHYMOTS (Physiologie Moléculaire du Transport des Sucres chez les végétaux) dirigé par le Docteur Rémi Lemoine (DR CNRS) l'immunomarquage sur tissus frais. La technique d'immunomarquage est rendue possible grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt. **Le choix de la séquence antigénique a été réalisé dans les zones les moins conservées des séquences des transporteurs pour avoir une plus grande spécificité.** L'utilisation d'anticorps nécessite une validation préalable de la reconnaissance antigène-anticorps par Western blot. Les protéines des fractions microsomales et des fractions enrichies en plasmalemme ont été préparées, à partir de gaines de Ray-grass anglais et de levure *S. cerevisiae*, puis séparées par électrophorèse, transférées sur nitrocellulose et incubées avec les anticorps à tester. L'expression dans la levure de chaque plasmide contenant la séquence ADNc de l'un ou l'autre transporteur, a permis d'étudier la spécificité des anticorps. L'ensemble des observations a confirmé la spécificité de la réaction anticorps-antigène et a permis d'étendre l'emploi des anticorps à l'analyse immunologique. **La technique d'immunomarquage fluorescent sur tissus frais a permis d'observer en microscopie confocale la distribution spécifique des transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 dans les tissus des gaines et de la base des feuilles en croissance.** Les anticorps spécifiques des transporteurs ont été détectés par un anticorps secondaire conjugué à l'Alexa Fluor 488 entraînant l'apparition d'un marquage fluorescent vert. L'avantage de l'utilisation des tissus frais est procuré par la rapidité de préparation des échantillons par rapport au long protocole d'inclusion des échantillons et leurs coupes qui peuvent entraîner des problèmes de conservation des tissus.

B2. Expression des transcrits *LpSUT1* et localisation du transporteur de saccharose *LpSUT1*

- B.2.a Dans les limbes :

Les transcrits *LpSUT1* sont fortement exprimés dans les limbes de Ray-grass anglais. (Chapitre 1, Fig. III.5.A). Il en est de même chez le Riz pour les ARNm d'*OsSUT1* (Aoki *et al.*, 2003). Les limbes fixent et réduisent le CO₂ atmosphérique par photosynthèse et exportent ce carbone sous forme de saccharose (Amiard *et al.*, 2004) vers l'ensemble de la plante. Il semble donc exister un lien entre exportation de saccharose et expression élevée des transcrits *LpSUT1* dans ces tissus.

- B.2.b. Dans les bases de feuille en croissance :

Les feuilles en croissance sont positionnées au centre des talles. Leur base (BFC), qui représente globalement un tissu puits pour le carbone, est protégée par le fourreau formé par l'emboîtement successif des gaines des feuilles adultes. La BFC est constituée de la zone de croissance foliaire (division et élongation cellulaires) située dans les trois premiers cm et de la zone de différenciation cellulaire située dans les deux à trois cm suivants. D'après les expériences de marquage au ¹⁴CO₂ d'un limbe adulte (ou de la partie émergée de la feuille en croissance quand elle est présente), il ressort que la zone de croissance peut être alimentée en carbone par l'un ou l'autre de ces deux tissus (Allard et Nelson, 1991). **Les glucides ne sont pas répartis de façon homogène le long de l'axe de la feuille en croissance. Alors que le saccharose est préférentiellement accumulé dans les segments apicaux (Chapitre 2, Fig. IV.6), les fructanes présentent les teneurs les plus élevées dans les cellules en division et en élongation (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001).** Il a été suggéré que les fructanes y serviraient de stockage à court terme pour être utilisés ensuite, lorsque les cellules traversent la zone de différenciation, en contribuant à l'élaboration de la paroi secondaire (Macadam et Nelson, 1987 ; Allard et Nelson, 1991 ; Cairns *et al.*, 1991). On peut aussi émettre l'hypothèse que les fructanes sont dégradés dans les cellules en différenciation pour alimenter la zone de croissance qui exerce la force puits principale pour le carbone (Allard et Nelson, 1991). L'utilisation des fructanes implique leur hydrolyse et peut s'accompagner d'une synthèse de saccharose à partir du fructose libéré. Le saccharose serait alors exporté dans l'apoplaste pour y être métabolisé ou pour être acheminé vers le phloème. Il est possible aussi que les segments les plus apicaux, qui contiennent des chloroplastes (Chapitre 2, Fig. IV.8.C) et qui sont chlorophylliens, perçoivent la lumière et soient déjà photosynthétiquement actifs.

Les segments apicaux pourraient alors participer à l'alimentation en carbone de la zone de croissance. **L'immunomarquage de la protéine LpSUT1 a montré que le transporteur est principalement localisé dans les cellules du mésophylle (Chapitre 2, Fig. IV.8.C). Il est aussi présent dans les cellules de la gaine périfasciculaire mais il est absent des cellules du complexe phloémien.** Par comparaison avec le marquage obtenu pour l'H⁺-ATPase, il semble que la protéine LpSUT1 soit aussi localisée au niveau de la membrane plasmique mais ce résultat devra être validé par des techniques complémentaires. **Dans la zone de croissance, le transporteur de saccharose LpSUT1 pourrait permettre d'alimenter les cellules en saccharose. Dans la zone de différenciation cellulaire, sa fonction serait d'exporter le saccharose dans l'apoplaste, et/ou de l'acheminer vers le phloème de la BFC pour permettre sa croissance.**

- B.2.c. Dans les gaines foliaires :

Les transcrits *LpSUT1* ne sont pas répartis de façon homogène le long de l'axe des gaines (Chapitre 2, Fig. IV.6). Ainsi, la quantité d'ARNm *LpSUT1* est la plus faible vers la base et la plus élevée dans le segment le plus distal. Chez les Poacées, des transporteurs de saccharose de type SUT1, comme OsSUT1 chez le Riz, sont localisés au niveau du complexe phloémien (CC-SE) des différents organes, ce qui suggère leur implication dans le transport à longue distance du carbone (Scofield *et al.*, 2007). Dans les gaines du Ray-grass anglais, la protéine LpSUT1 a été localisée dans les cellules de la gaine périfasciculaire et surtout dans les cellules du mésophylle (Chapitre 2, Figure IV.8.C). Elle est absente du complexe phloémien. Chez la Canne à sucre, des résultats similaires ont été observés : la protéine ShSUT1 se situe au niveau des cellules du parenchyme situé à la périphérie des tissus conducteurs de la tige ou de la feuille mais pas dans les tissus conducteurs eux-mêmes (Rae *et al.*, 2005). La tige de Canne à sucre est un lieu de stockage à long terme de saccharose. Le transporteur de saccharose ShSUT1 permettrait l'allocation du saccharose entre le tissu vasculaire et le parenchyme de réserve dans les cellules internodales des tiges (Rae *et al.*, 2005). Les gaines du Ray-grass anglais représentent un puits pour les assimilats carbonés qui s'y accumulent principalement sous la forme de fructanes synthétisés à partir de saccharose. **Il est donc vraisemblable que la protéine LpSUT1 intervienne dans le transport latéral du saccharose à partir des faisceaux conducteurs vers les cellules du mésophylle accumulatrices de fructanes de manière à permettre leur synthèse.**

B3. Expression des transcrits *LpSUT2* et localisation du transporteur de saccharose *LpSUT2*

Dans les gaines ou les BFC, le niveau d'expression des transcrits *LpSUT2* est plus faible d'un facteur cinq par rapport à celui des transcrits *LpSUT1* (Chapitre 2, Fig. IV.6). Aucun gradient significatif d'expression n'est par ailleurs observé le long de l'axe des gaines ou des BFC. **Cette faible expression des transcrits *LpSUT2* est à mettre en parallèle avec le faible taux d'expression de la protéine *LpSUT2*** (Chapitre 2, Fig. IV.10.C). Il existe donc une bonne corrélation entre niveau de transcrits et quantité de protéines exprimées. A la différence des autres transporteurs de saccharose de type 2 qui ont été localisés dans les cellules du tube criblé du phloème (SE) (*OsSUT4*, Aoki *et al.*, 2003 ; *PmSUC3*, Barth *et al.*, 2003 ; *AtSUT2/AtSUC3*, Meyer *et al.*, 2004), la protéine *LpSUT2* n'a pas été observée dans les cellules du complexe phloémien. Quand le transporteur de saccharose *LpSUT2* est détectable, il a été localisé dans les cellules adjacentes aux tissus conducteurs (Chapitre 2, Fig. IV.10.C).

Au vu de nos résultats, il paraît évident que les transporteurs de saccharose *LpSUT1* et *LpSUT2* ne remplissent pas les mêmes fonctions physiologiques. Du fait de leur structure particulière, **il a été proposé que les transporteurs de saccharose de type 2 participent à la signalétique sucres et fonctionnent comme des senseurs** (Barker *et al.*, 2000). Nous avons émis cette hypothèse pour *LpSUT2* et nous avons discuté ce rôle dans le cadre d'une plante accumulatrice de fructanes. Ce rôle n'est pas encore démontré et fait toujours l'objet de débat (Eckardt, 2003). Ainsi, chez le Plantain, il semble que la protéine *PmSUC3*, localisée au niveau du SE et des tissus puits, intervienne plutôt dans le chargement du phloème et/ou dans l'importation du saccharose dans les tissus puits (Barth *et al.*, 2003). De plus, l'expression des transcrits *PmSUC3* est plus importante dans les tissus puits que dans les tissus sources. Il en est de même des transcrits *OsSUT4* et *AtSUT2/AtSUC3*, ce qui n'est pas le cas des transcrits *LpSUT2* chez le Ray-grass anglais, présents en quantité équivalente dans tous les tissus testés y compris les limbes et les racines (données non présentées). **Le fait que l'expression du gène *LpSUT2* soit faible et constante le long de l'axe des gaines ou des BFC est un autre argument en faveur d'un rôle senseur pour la protéine *LpSUT2*.**

Dans les gaines, nous avons montré que le chargement du phloème se faisait de façon apoplastique (Chapitre 1, Fig. III.1 et III.2). Mais **ni *LpSUT1*, ni *LpSUT2* n'ont été localisés**

dans les cellules du complexe phloémien, ce qui suggère l'existence d'autres transporteurs de saccharose chez le Ray-grass anglais impliqués dans le chargement/déchargement du phloème.

B4. Intégration des connaissances et cadre conceptuel

Un des objectifs initiaux de la thèse, mais qui n'a pas pu être réalisé faute de temps face à la quantité de travail à fournir pour l'isolement, l'identification et la localisation des deux transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 et leur validation par des données expérimentales (coupe/repousse, lumière), **devait consister à développer un modèle mathématique dynamique aussi mécaniste que possible afin de pouvoir hiérarchiser et intégrer les nombreuses connaissances apportées par la partie expérimentale de ce travail doctoral.** En effet, un modèle doit viser à reproduire l'émergence de propriétés observées dans le système réel, par le jeu de la combinaison des comportements potentiels des éléments qui le composent. Ainsi, même si la modélisation informatique en elle-même ne permet en aucun cas de résoudre la complexité, elle permet toutefois l'intégration d'un nombre de mécanismes suffisant pour qu'ils soient considérés comme représentatifs du système (Delahaye, 2009). Cette complexité chez le Ray-grass anglais découle du nombre important de compartiments structuraux (morphologiques) mis en jeu tels que les gaines, les limbes ou encore les bases de feuilles en croissance, mais aussi cellulaires (cellules du mésophylle, cellules compagnes, etc) et sub-cellulaires (vacuole, cytoplasme, etc). Elle découle aussi du nombre important de compartiments métaboliques mis en jeu tels que les fructanes, le saccharose, le fructose, etc. Face à cette complexité, le modèle est une représentation simplifiée et communicable de la réalité, tendant à reproduire partiellement un phénomène, en vue de son étude (Grimm, 1999). **Au regard des résultats apportés par la partie expérimentale de cette thèse, il apparaît clairement qu'un modèle compartimental centré sur la plante entière (« individual-based model ») et de type métabolique devrait être développé. Les principaux avantages conférés par un tel modèle seraient de pouvoir** *i) reconstituer les propriétés émergentes du système, ii) de tester de nouvelles hypothèses, iii) de pouvoir déconnecter des processus indissociables dans la réalité et difficilement mesurables expérimentalement* (Vos et al., 2007). L'étape préliminaire à un tel développement du modèle consiste néanmoins à définir un cadre conceptuel représentant aussi finement que possible le système étudié et ses limites. **Compte tenu de la complexité**

Avant défoliation

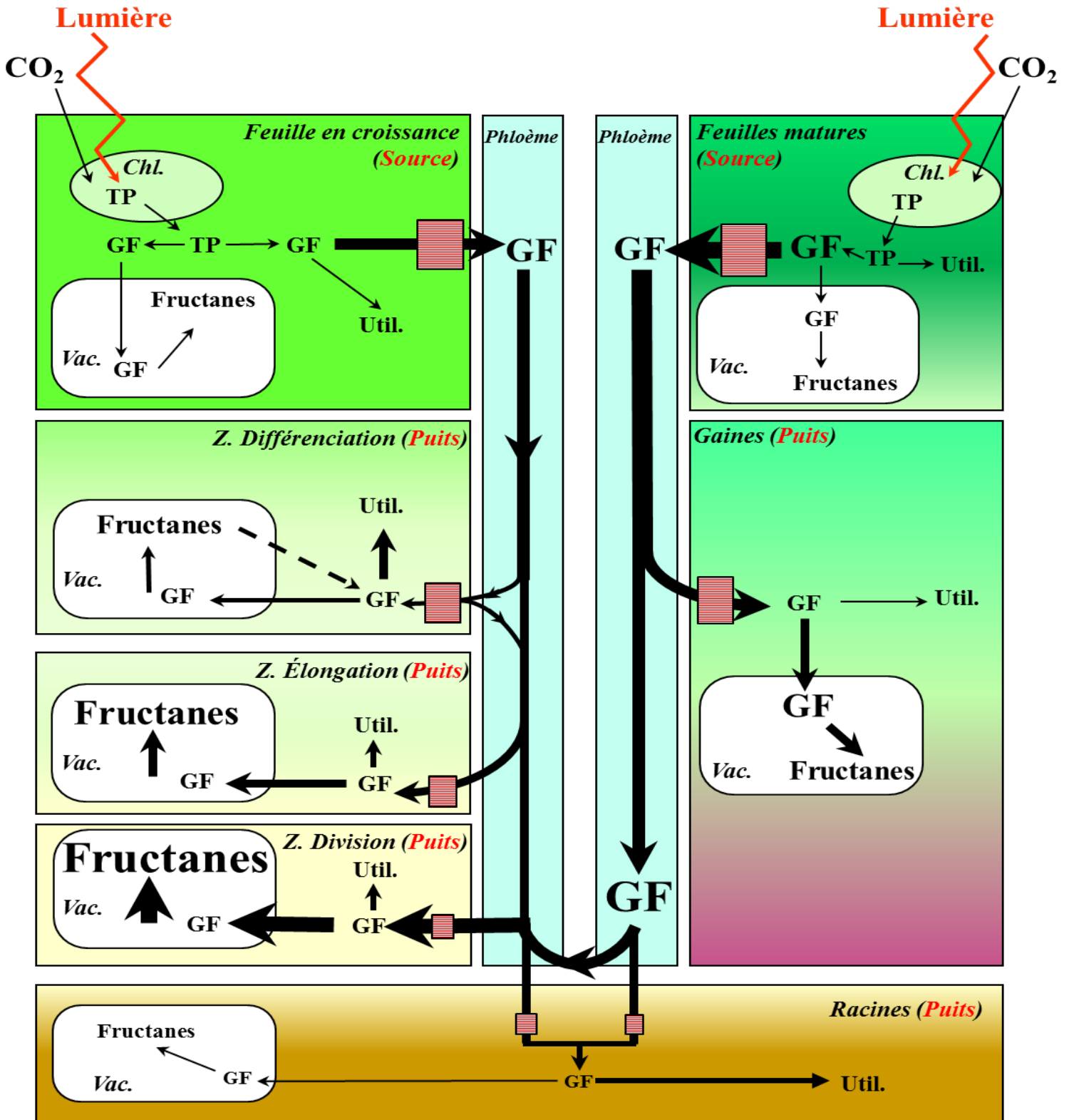


Figure VI.3: Cadre conceptuel représentant le fonctionnement d'une tige de Ray-grass anglais avant défoliation. Les différents compartiments structurels (limbes et gaines des feuilles matures, parties émergées et bases de feuilles en croissance composées de la zone de division, d'élongation et de différenciation cellulaires, racines et phloème). Le statut puits ou source vis-à-vis du carbone est aussi indiqué entre parenthèses. L'épaisseur des flèches (en noir) indique la quantité de C potentiellement mise en jeu, notamment pour son utilisation (*Util.*): respiration et croissance des tissus. Les principaux compartiments métaboliques sont les trioses-phosphate (TP) au niveau des chloroplastes (*Chl.*), les fructanes au niveau des vacuoles (*Vac.*) et le saccharose (GF) circulant au sein des tissus et entre les tissus *via* les faisceaux conducteurs de phloème. Les transporteurs de saccharose (principalement LpSUT1) sont représentés (carrés rouges hachurés) et permettent l'orientation des flux entre organes.

attestée du système à étudier, nous proposons ici un cadre conceptuel simple qui vise à reproduire les principaux flux d'éléments (notamment de saccharose) entre les différents compartiments morphologiques du Ray-grass non défolié en conditions d'éclairement non modifiées. Nous avons également positionné les transporteurs de saccharose dans les différents compartiments structuraux.

L'hypothèse générale de construction du cadre conceptuel est que :

«l'allocation du carbone entre organes et sa répartition au sein de chaque organe sont déterminées par les offres locales en saccharose et par l'aptitude des différents organes ou fonctions métaboliques à utiliser ce saccharose »

Il en ressort que la distribution du carbone au sein des différents compartiments structuraux et métaboliques est déterminée par l'activité des différents organes ou fonctions métaboliques et ne résulte pas de règles de répartition ou d'allocation fixées *a priori*, comme c'est le cas pour de nombreux modèles développés au cours de ces dernières années (Escobar-Gutiérrez *et al.*, 1998). Le cadre conceptuel simple tel que nous l'imaginons pour le Ray-grass doit comporter les tissus principaux tels que, le phloème, les gaines, les BFC, les racines et les parties photosynthétiques (feuilles croissance et feuilles matures ; Fig. VI.3). Compte tenu du fait qu'un gradient d'accumulation de saccharose et de fructanes existe le long de l'axe de la feuille en croissance (représenté dans cette figure par la taille respective du métabolite), notamment au niveau des zones de division, d'élongation et de différenciation, un découpage de la BFC en trois parties apparaît aussi nécessaire. Le statut puits ou source vis-à-vis du carbone est aussi explicité. Ainsi, pour une plante non défoliée, les BFC, les gaines et les racines sont des puits pour le carbone provenant de la photosynthèse réalisée principalement dans les limbes des feuilles matures et, dans une moindre mesure (du point de vue quantitatif) dans la partie émergée des feuilles en croissance. L'épaisseur des flèches indique ainsi la quantité de C potentiellement mise en jeu. Les principaux pools carbonés sont par conséquent les trioses-phosphate (TP) au niveau des chloroplastes (*Chl.*), les fructanes au niveau des vacuoles (*Vac.*) et le saccharose (GF) circulant au sein et entre les tissus. Les transporteurs de saccharose (principalement LpSUT1, au regard de son rôle physiologique) sont représentés (carrés rouges hachurés) et permettent l'orientation des flux entre organes. En effet, nous avons montré que la protéine LpSUT1 n'était pas localisée dans les faisceaux conducteurs et nous avons suggéré qu'elle intervient dans le transport latéral du saccharose à partir des faisceaux conducteurs du phloème vers les cellules accumulatrices de fructanes, de manière à

permettre cette synthèse (gainnes, zones de division et d'élongation cellulaires). Nous avons aussi suggéré que les fructanes de la zone de différenciation cellulaire pouvaient y être hydrolysés pour fournir du saccharose à la zone de croissance. **Au final, un tel cadre conceptuel permet déjà de voir, de manière assez simple, les principaux flux (en terme quantitatif) de saccharose entre les compartiments structuraux de la plante et l'implication des transporteurs de saccharose dans l'orientation de ces flux.** Ainsi, le saccharose est principalement synthétisé dans les limbes des feuilles matures (et dans une moindre mesure dans la feuille en croissance, lorsque celle-ci a émergé). L'essentiel du saccharose produit est destiné aux gainnes (pour la synthèse et la mise en réserve du C sous forme de fructanes), aux racines et aux différentes zones des feuilles en croissance avec, par ordre d'importance, les cellules de la zone de division, puis d'élongation et enfin de différenciation. Les tissus de la feuille en croissance sont donc alimentés à la fois par le saccharose produit dans les tissus adjacents que sont les limbes des feuilles en croissance, mais aussi par les tissus distants que sont les limbes des feuilles matures.

C. Physiologie du transport de saccharose chez le Ray-grass anglais en condition de repousse et d'éclaircissement modulé

C1. Effet de la défoliation sur le transport du saccharose

En sa qualité d'espèce fourragère prairiale, le Ray-grass est soumis à des contraintes d'exploitation pluriannuelles par la fauche ou le pâturage qui conduisent à la suppression partielle ou totale de l'appareil photosynthétique. **Sa capacité à reformer rapidement de nouvelles feuilles est due à la protection des méristèmes foliaires situés en position basale et à son potentiel de remobilisation efficace du carbone précédemment mis en réserve dans les BFC et les gainnes, tissus épargnés par la coupe.** Lors de la repousse, ces tissus deviennent des tissus sources afin d'alimenter en substrats carbonés les parties aériennes en repousse (De Visser, 1997), et ainsi permettre à la plante de retrouver son autotrophie vis-à-vis du carbone en moins de trois jours (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). Nous avons émis l'hypothèse que la capacité de repousse du Ray-grass anglais était aussi déterminée par un transport efficace de saccharose entre tissus sources (gainnes, BFC) et tissus puits (méristèmes foliaires).

La capacité de transport du saccharose des gaines a tout d'abord été évaluée en produisant des vésicules de plasmalemmes et en utilisant du ^{14}C -saccharose. Après la coupe, l'absorption de saccharose par les vésicules de plasmalemmes, et donc l'absorption de saccharose par l'ensemble des cellules des gaines, augmente dans les gaines (**Chapitre 1, Fig. III.6**). Ce résultat suggère que **la plante réagit à la diminution de la production de saccharose par photosynthèse (provoquée par la défoliation) en augmentant sa capacité à transporter le saccharose. Cette augmentation peut être due à une modification post-transcriptionnelle des transporteurs existants (Roblin *et al.*, 1998) et/ou à la synthèse *de novo* de transporteurs.**

L'évolution du niveau d'expression des gènes *LpSUT1* et *LpSUT2* a été suivie dans les gaines et BFC en réponse à la coupe et comparée à celle du saccharose et des glucides de réserve. Les résultats montrent que **l'expression du gène *LpSUT2* n'est pas affectée par la défoliation (Chapitre 2, Fig. IV.7.B et D), à la différence des transcrits *LpSUT1* dont le niveau d'expression augmente en réponse à la défoliation (Chapitre 1, Fig. III.7 ; Chapitre 2, Fig. IV.7 ; Chapitre 3, Fig. V.5).** Cette induction semble parallèle à l'hydrolyse des fructanes et à la diminution des teneurs en saccharose, ce qui suggère **une régulation de ce transporteur au niveau transcriptionnel et son implication importante dans la repousse.** Cette augmentation se produit généralement après un laps de temps de 3h mais peut survenir avant (**Chapitre 2, Fig. IV.7.C**), elle se poursuit pendant plus ou moins longtemps (jusqu'à 48h) avant de diminuer (**Chapitre 3, Fig. III.5**). Elle est également plus ou moins importante selon le tissu considéré. Ainsi, elle est la plus élevée dans les segments apicaux des BFC. Cette augmentation se produit aussi dans la zone de croissance foliaire des BFC comprenant les cellules en division et en élongation, riches en fructanes (**Fig. VI.1**). La défoliation ne modifie pas la localisation cellulaire de *LpSUT1* qui se trouve dans la gaine périfasciculaire et le mésophylle (**Chapitre 2, Fig. IV.8**). **Dans le contexte de la défoliation où les fructanes accumulés dans les gaines et les BFC servent de source de carbone pour alimenter le méristème foliaire (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001 ; Amiard *et al.*, 2003) et assurer la repousse, l'augmentation des transcrits *LpSUT1* suggère que la fonction de la protéine *LpSUT1* est de catalyser l'efflux de saccharose des cellules mobilisatrices de fructanes dans l'apoplaste pour qu'il puisse être acheminé vers les tissus conducteurs.**

Le transporteur de saccharose LpSUT1 assurerait donc un transport latéral et bidirectionnel de saccharose :

- **des tissus conducteurs aux cellules accumulatrices de fructanes pour permettre leur synthèse, en conditions pléthoriques de carbone**
- **des cellules mobilisatrices de fructanes aux tissus conducteurs pour permettre ensuite l'alimentation en carbone des tissus puits, en conditions limitantes en carbone.**

La protéine LpSUT1 participerait donc à la mise en réserve du carbone et à sa mobilisation, à la différence de la protéine LpSUT2 dont le niveau d'expression des transcrits ainsi que de la protéine sont assez largement insensibles à la défoliation (Chapitre 2 Fig. IV.7.B et D ; Chapitre 3, Fig. V.6). Les transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 semblent donc bien posséder des rôles physiologiques différents.

C2. Effet de la variation de l'intensité lumineuse sur les transporteurs de saccharose

La lumière joue directement sur la capacité de synthèse du saccharose. Chez quelques espèces telles que la Tomate ou encore le Tabac, il a été montré que la lumière pouvait moduler la synthèse de saccharose sous l'action des enzymes de synthèse telles que SPS et Susy. Néanmoins, l'effet de la lumière sur le transport du saccharose in planta est très peu documenté. Nous avons voulu valider le rôle physiologique des transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 dans des conditions physiologiques contrastées (défoliation couplée ou non à une modification de l'intensité lumineuse) et voir dans quelle mesure leur niveau d'induction pouvait être corrélé à la synthèse/utilisation de saccharose.

Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons fait varier que l'intensité de la lumière (c'est-à-dire la quantité de photons photosynthétiquement actifs reçus) en soumettant les plantes de Ray-grass anglais à deux conditions lumineuses contrastées (optimale et faible), avant et après coupe, grâce à l'utilisation d'un filtre qui ne modifie pas la qualité (*i.e.* le spectre) du rayonnement incident, et ce pour éviter toute effet morphogénétique. **Le but de ces traitements était de modifier les teneurs initiales en réserves carbonées et leur cinétique de remobilisation/ré-accumulation pour étudier parallèlement le transport de saccharose et évaluer sa plasticité face à la demande et l'offre en carbone.** Le traitement, faible intensité lumineuse avant la coupe – forte intensité lumineuse après la coupe,

correspond à une réalité agronomique dans la mesure où l'élimination des limbes foliaires modifie l'environnement lumineux des chaumes.

Les traitements lumineux appliqués avant défoliation n'ont pas eu d'incidence sur les teneurs en sucres solubles des tissus (**Chapitre 3, Fig. V.3 et V.4**). Par contre, ils ont modifié la biomasse aérienne et la surface foliaire (**Chapitre 3, Fig. V.2**), et par voie de conséquence les quantités de réserves C disponibles dans ces tissus. Les traitements lumineux appliqués après défoliation n'ont pas exercé d'influence sur la cinétique de remobilisation des réserves carbonées (**Chapitre 3, Fig. V.3 et V.4**). Ils n'ont pas modifié non plus la cinétique d'expression du gène *LpSUT1* (**Chapitre 3, Fig. V.5 et V.6**). Par contre, ils ont modulé la cinétique de ré-accumulation des sucres solubles, plus rapide en condition de fort éclaircissement qu'en condition de faible éclaircissement, et qui s'est accompagné généralement d'une diminution plus rapide du taux de transcrits *LpSUT1*.

L'augmentation des transcrits *LpSUT1* est indépendante des conditions d'éclaircissement et semble être principalement une réponse à la défoliation. Elle est vraisemblablement contrôlée par la diminution de la teneur en saccharose. La régulation par les sucres a déjà été rapportée pour d'autres transporteurs de saccharose. La défoliation peut être vue comme une perturbation critique du développement de la plante similaire à la transition entre les stades végétatif et reproducteur. Durant la tubérisation de la Pomme de terre (Harmer et Kay, 2005 ; Chincinska *et al.*, 2008) ou la floraison chez la Pomme de terre et le Citronnier (Li *et al.*, 2003), l'allocation du saccharose est massivement réorientée vers les tissus puits en développement (tubercules, méristèmes floraux). Ces processus que sont la tubérisation et la floraison sont connus pour être médiés par des voies de transduction de signal impliquant la voie du phytochrome (dépendante de la photopériode) et/ou la voie du saccharose. Ainsi, dans les feuilles sources de la Pomme de terre, l'induction des transcrits *StSUT1* et *StSUT4* est bien corrélée à la diminution de la teneur en saccharose (Chincinska *et al.*, 2008). Chez l'embryon de Riz, les transcrits *OsSUT1* sont aussi régulés par le saccharose (Matsukura *et al.*, 2000). La transcription du gène *OsSUT1* augmente à la lumière. Mais étant donné qu'elle augmente aussi à l'obscurité en présence de saccharose ou de glucose après 72h de traitement, cela suggère que la lumière n'a pas d'effet direct *via* un photorécepteur mais que c'est plutôt l'accumulation de saccharose en réponse à l'éclaircissement qui régulerait le taux des transcrits *OsSUT1* en le diminuant. **Chez le Ray-grass anglais, la défoliation conduit à une chute importante et immédiate de la teneur en saccharose dans les tissus épargnés par la coupe qui est provoquée par la perte des limbes photosynthétiquement actifs.**

Cette diminution de la teneur en saccharose entraînerait alors une induction rapide des transcrits du transporteur de saccharose LpSUT1.

Alors que la protéine LpSUT1 exerce une fonction catalytique importante vis-à-vis du mécanisme physiologique de repousse après coupe, le transporteur de saccharose LpSUT2 assumerait plutôt une fonction régulatrice en étant un senseur du statut carboné (cf Paragraphe, VI.A.4) ou en modulant l'activité d'autres transporteurs comme ce qui est proposé pour StSUT4 (Chincinska *et al.*, 2008; Kühn et Grof, 2010). De façon inattendue, l'expression du gène *LpSUT2* est induite en condition de faible éclaircissement, appliqué avant ou après la coupe (Chapitre 3, Fig. V.6). Les résultats sont plus marqués dans les gaines que dans les BFC. Par contre, le transfert des plantes d'un environnement lumineux appauvri à un environnement optimal au moment de la défoliation ne permet pas de supprimer l'induction (Chapitre 3, Fig. V.6). Se pose alors la question de la nature des effecteurs conduisant à cette régulation transcriptionnelle. **L'augmentation des transcrits *LpSUT2* lors d'une réduction de l'intensité lumineuse avant ou après défoliation suggère que la quantité de lumière serait un élément déclencheur.** A l'heure actuelle, les données relatives à l'impact de la perception de la quantité ou de la qualité de la lumière sur les transporteurs de saccharose sont très fragmentaires. Toutefois, des hypothèses sur une régulation *via* la lumière peuvent être émises de part la présence de séquences conservées de motifs de réponse au rythme circadien dans les promoteurs des gènes codant les transporteurs LeSUT1 de la Tomate (*Lycopersicon esculentum*), StSUT1 et StSUT4 de la Pomme de terre (*Solanum tuberosum*) (Harmer et Kay, 2005 ; Chincinska *et al.*, 2008) ou de réponse à la lumière (ou *I box*) retrouvés dans la séquence génétique des promoteurs des gènes codant les transporteurs AtSUC2 d'*Arabidopsis thaliana* et VvSUC1 de la Vigne (*Vitis vinifera*) (Delrot *et al.*, 2000). De plus, chez la Pomme de terre, le transporteur de saccharose StSUT4 semble jouer un rôle important dans l'interconnection entre la disponibilité en carbone et la lumière en terme de quantité et de qualité dans les mécanismes de la floraison et de la tubérisation (Chincinska *et al.*, 2008). **Cependant, nos résultats suggèrent qu'un autre effecteur intervient.** En effet, si seule la faible intensité lumineuse conduit à une augmentation des transcrits *LpSUT2*, un retour à des conditions d'éclaircissement optimales après la coupe devrait se traduire par une diminution du niveau d'expression du gène *LpSUT2*. Nos résultats montrent qu'il n'en est rien, la quantité d'ARNm *LpSUT2* reste stable pendant les quatorze premiers jours de repousse (Chapitre 3, Fig. V.6). **Nous pouvons supposer que, dans ce cas, l'effet conjoint de l'intensité lumineuse et de la défoliation expliquerait cette régulation.**

Immédiatement après défoliation

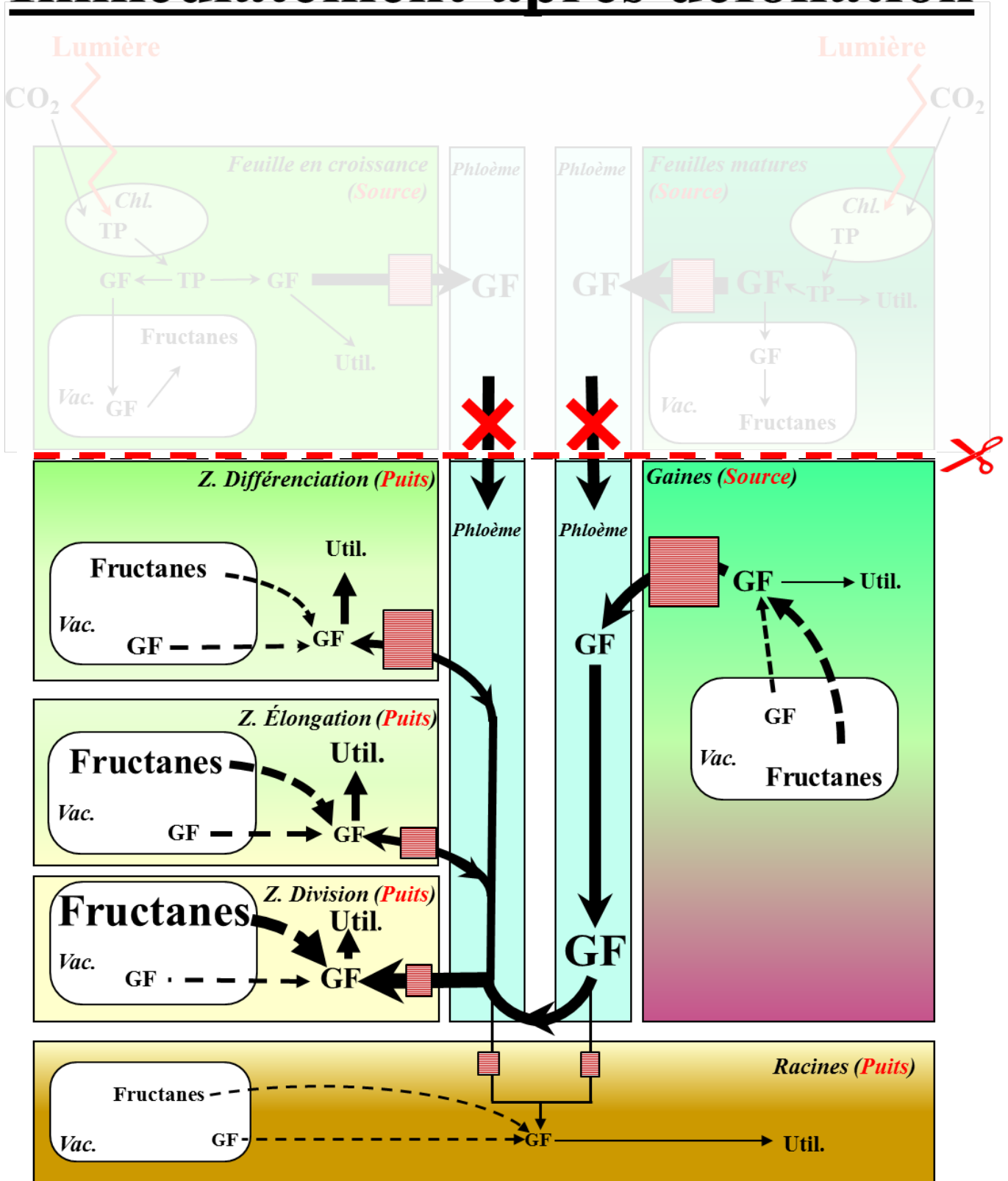


Figure VI.4: Cadre conceptuel représentant le fonctionnement d'une talle de Ray-grass anglais immédiatement après défoliation. Les différents compartiments structuraux (gaines des feuilles matures, bases de feuilles en croissance composées de la zone de division, d'élongation et de différenciation cellulaires, racines et phloème). Les zones de division, d'élongation et de différenciation sont représentées pour la BFC. Le statut puits ou source vis-à-vis du carbone est aussi indiqué entre parenthèses. L'épaisseur des flèches (en noir) indique la quantité de C potentiellement mise en jeu, notamment pour son utilisation (*Util.*): respiration et croissance des tissus. Les principaux compartiments métaboliques sont les trioses-phosphate (TP) au niveau des chloroplastes (*Chl.*), les fructanes au niveau des vacuoles (*Vac.*) et le saccharose (GF) circulant au sein des tissus et entre les tissus *via* les faisceaux conducteurs de phloème. Les transporteurs de saccharose (principalement LpSUT1) sont représentés (carrés rouges hachurés) et permettent l'orientation des flux entre organes.

C3. Intégration des connaissances et cadre conceptuel

Le cadre conceptuel développé précédemment (cf paragraphe, VI.B.4) a été repris pour une plante défoliée (Fig. VI.4). Les différents compartiments structuraux (feuilles matures, feuilles en croissance, racines, phloème) ainsi que les différents compartiments métaboliques (fructanes, saccharose) sont repris dans leur ensemble. La défoliation se traduit par une suppression des parties aériennes (limbes des feuilles matures et en croissance). Par conséquent, la capacité photosynthétique est fortement limitée et la synthèse de saccharose ne peut plus être assurée par ces tissus. Afin d'alimenter le méristème foliaire en carbone et assurer ainsi la repousse, on observe, immédiatement après la coupe, une réorientation des flux de saccharose au sein et entre les différents tissus épargnés par la coupe (De Visser, 1997). Les gaines deviennent alors des tissus sources et les fructanes y sont mobilisés. Ils sont aussi mobilisés dans les différents tissus de la feuille en croissance. La plante réagit à la diminution de la production de saccharose par photosynthèse en augmentant sa capacité à transporter le saccharose. Cette augmentation peut être due à une modification post-transcriptionnelle des transporteurs existants (Roblin *et al.*, 1998) et/ou à la synthèse *de novo* de transporteurs. En effet, alors que l'expression du gène *LpSUT2* n'est pas affectée par la défoliation, le niveau d'expression des transcrits *LpSUT1* augmente en réponse à la défoliation parallèlement à l'hydrolyse des fructanes et à la diminution des teneurs en saccharose. Nous émettons l'hypothèse que l'augmentation du niveau de transcrits s'accompagne d'une augmentation de la quantité de protéines correspondantes. Ceci est représenté par la taille des carrés rouges qui est modulée dans les différents compartiments structuraux. Elle est ainsi plus importante dans les gaines et la zone de différenciation cellulaire des bases de feuilles en croissance que dans les autres tissus. D'après les données de la littérature, la défoliation modifie l'allocation du flux de carbone qui alimente prioritairement les méristèmes foliaires (Amiard *et al.*, 2003).

Conclusions et
Perspectives de
recherche

VII. CONCLUSIONS et PERSPECTIVES DE RECHERCHE

A. Etude de la nature du transport latéral de saccharose

Au cours de la repousse après coupe du Ray-grass, l'utilisation du carbone de réserve (issu majoritairement des fructanes) au niveau des tissus en croissance est subordonnée à la synthèse et au transport de saccharose. Nous avons identifié la voie utilisée pour le transport du saccharose par des observations en microscopie électronique, des expériences de plasmolyse et la mesure de la capacité globale d'absorption du saccharose dans des vésicules de plasmalemme issues de gaines. **L'ensemble de ces résultats** (faible densité des plasmodesmes au sein des faisceaux conducteurs, fort gradient osmotique, épaisseur des parois et présence d'un phénomène de transport de saccharose saturable), **suggère que le transport latéral de saccharose au sein des faisceaux conducteurs des gaines s'effectue par voie apoplastique. Cette voie de transport n'est toutefois pas exclusive.** Un transport par voie symplastique est possible, en particulier au niveau des cellules du mésophylle. Pour vérifier cette hypothèse, **il conviendra d'étudier le déplacement de substances de faible poids moléculaire** Ceci pourrait être réalisé en utilisant la **6-carboxyfluorescéine diacétate (6-CFDA)**. En effet, suite à l'apport exogène de 6-CFDA à l'extrémité d'un limbe mature ou d'une feuille en croissance, nous pourrions ainsi visualiser la distribution spatiale de cette sonde histochimique en réalisant des coupes tissulaires de limbes et de BFC, voire de gaines foliaires. L'utilisation de la microscopie confocale pourrait s'avérer à cet effet d'un appui précieux, notamment pour un suivi fin au niveau cellulaire de cette sonde.

B. Localisation tissulaire et cellulaire de LpSUT1 et

LpSUT2

Après avoir précisé la nature de ce transport, nous avons cherché à mettre en évidence l'implication de un ou plusieurs transporteurs de saccharose. Dans ce but, nous avons criblé des banques d'ADNc phagique de chaumes de Ray-grass avec des sondes homologues, obtenues par RT-PCR, en utilisant des amorces oligonucléotidiques correspondant à des régions présentes chez les transporteurs de saccharose de Poacées. **Nous avons ainsi cloné, pour la première fois chez le Ray-grass anglais, deux ADNc appelés LpSUT1 et LpSUT2 présentant respectivement une forte homologie avec les transporteurs SUT1 de l'Orge et**

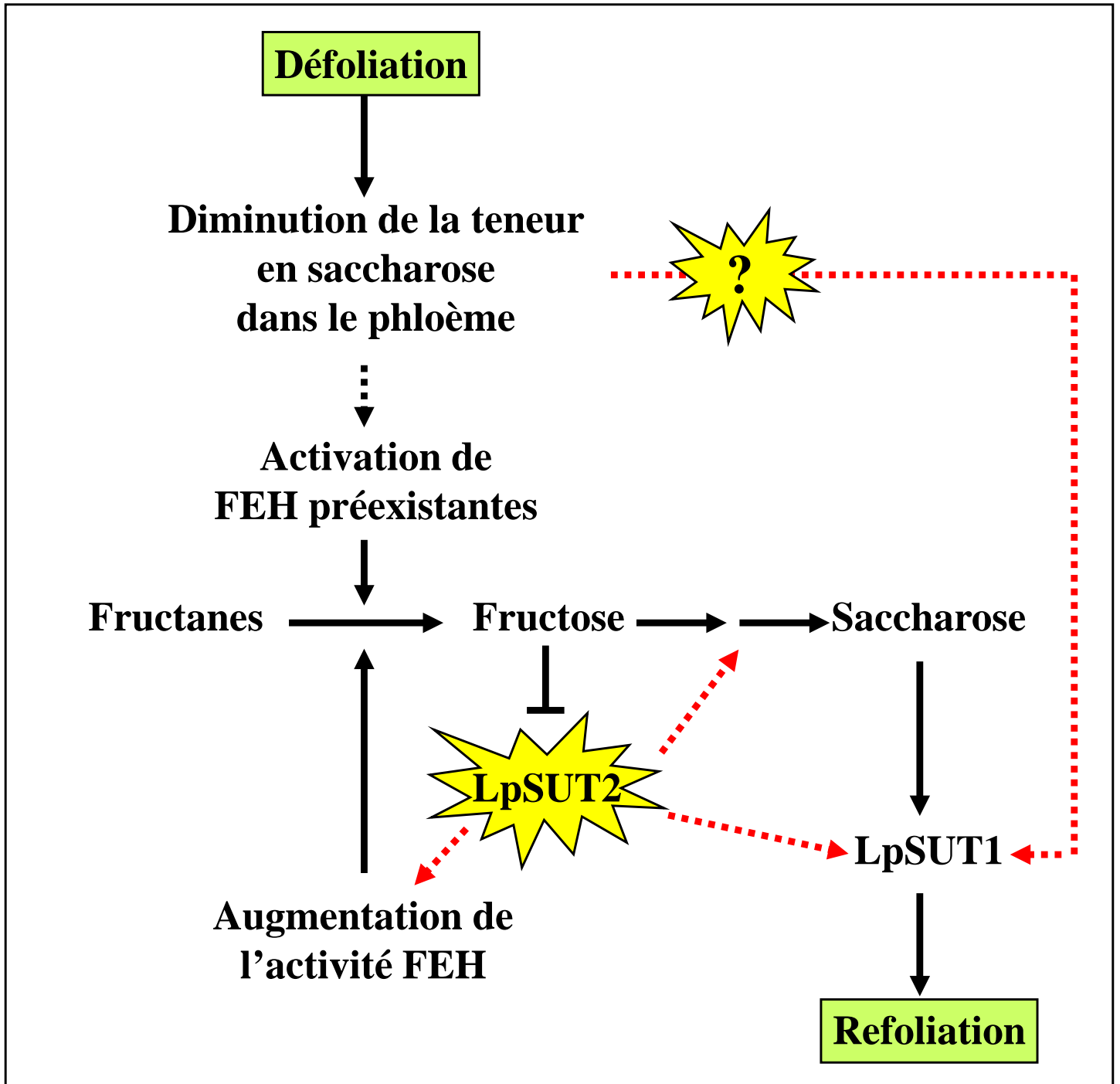


Figure VII.1: Schéma hypothétique des mécanismes concourant à la repousse des Poacées prairiales pérennes comme le Ray-grass anglais. La défoliation entraîne une diminution immédiate de la teneur en saccharose dans le phloème (Amiard *et al.*, 2004). Cette diminution pourrait provoquer l'efflux de saccharose des vacuoles des cellules des gaines et des BFC contenant les fructanes. Il s'ensuivrait une activation des fructane-exohydrolases (FEHs) préexistantes (Marx *et al.*, 1997) et le déclenchement de l'hydrolyse des fructanes. Le fructose produit inhiberait le transport de saccharose par LpSUT2, ce qui déclencherait une voie de transmission de signal aboutissant à l'augmentation de l'activité FEH (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001), l'augmentation de l'activité de synthèse du saccharose et/ou l'augmentation de la transcription du gène *LpSUT1*. Cette dernière pourrait aussi être déclenchée à la suite de la perception de la diminution de la teneur en saccharose dans le phloème. L'ensemble de ces mécanismes participent à la production foliaire et donc à la repousse. Les flèches rouges (→) correspondent à des voies de transmission de signal; les formes étoilées (★) symbolisent les sites de perception du signal.

du Blé et avec les transporteurs SUT2 du Riz. Leur expression fonctionnelle a permis de montrer que les protéines LpSUT1 et LpSUT2 présentent une affinité très proche pour le saccharose (respectivement 5,6 mM et 6,2 mM). **Dans les gaines et les BFC, la protéine LpSUT1 est principalement localisée dans les cellules du mésophylle.** Sa présence a aussi été observée dans les cellules de la gaine périfasciculaire mais elle est absente des cellules du complexe phloémien. La localisation des protéines LpSUT1 et LpSUT2 a été effectuée sur des coupes de gaines ou de BFC situées dans les segments 4-5 avant défoliation et après 24h de repousse. Pour compléter cette étude et affiner les hypothèses relatives aux fonctions physiologiques de LpSUT1 et LpSUT2, **nous suivrons la localisation de ces transporteurs de saccharose en réalisant une cinétique le long de l'axe des gaines et des BFC et à différents temps de repousse. Afin de déterminer l'adressage des transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2, des constructions de fusion de la protéine LpSUT1 ou LpSUT2 à la GFP (Green Fluorescent Protein) pourront être réalisées.** Elles seront ensuite introduites dans des systèmes hétérologues tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* ou même de Ray-grass anglais (ce qui nécessitera au préalable de mettre au point leur méthode d'extraction) pour localiser les protéines au niveau membranaire (membrane plasmique ou tonoplaste).

C. Rôles physiologiques de LpSUT1 et LpSUT2

D'après nos résultats, **il paraît évident que les transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 ne remplissent pas les mêmes fonctions physiologiques.** Au vu de sa localisation cellulaire et tissulaire et au vu du niveau d'expression de ses transcrits, il a été proposé que **LpSUT1 était impliqué dans la mise en réserve du carbone sous forme de fructanes et de sa mobilisation en assurant respectivement le transport de saccharose dans les cellules accumulatrices de fructanes ou hors des cellules mobilisatrices de fructanes.** Concernant LpSUT2, son faible taux d'expression de transcrits est à mettre en parallèle avec le faible taux d'expression de sa protéine. LpSUT2 est le premier transporteur muni d'une boucle cytoplasmique mis en évidence chez les Monocotylédones. Il est original dans la mesure où il est inhibé par le fructose. Ces particularités, combinées à une expression faible et constante le long de l'axe des gaines ou des BFC des transcrits *LpSUT2* et à son insensibilité à la défoliation plaident en faveur d'**un rôle senseur pour la protéine LpSUT2.** Si LpSUT2 est un senseur, il serait intéressant d'identifier les gènes de la voie dont l'expression est modifiée et de tester l'hypothèse selon laquelle ces gènes pourraient être

impliqués dans le catabolisme des fructanes, la synthèse de saccharose ou encore son transport (Figure VII.1). Une première approche consistera à produire des plantes de Ray-grass transgéniques dépourvues de LpSUT2, par stratégie RNAi par exemple, et de caractériser le phénotype des plantes obtenues. La transformation pourra se faire en collaboration avec l'équipe de G. Spangenberg (La Trobe, Australie) ou de J. Gallagher (IBERS, Aberystwyth, UK).

D. Régulation des transporteurs LpSUT1 et LpSUT2

Suite à une modulation de l'intensité lumineuse, il est apparu que la transcription du gène *LpSUT1* est insensible aux conditions d'éclairement alors que celle du gène *LpSUT2* est induite par un faible éclairement. L'augmentation des transcrits du gène *LpSUT1* semble être principalement une réponse à la défoliation qui survient parallèlement à une diminution des teneurs en saccharose. **En conséquence, nous émettons l'hypothèse que l'expression des transcrits *LpSUT1* est contrôlée par la diminution de la teneur en saccharose. L'augmentation des transcrits *LpSUT2* lors d'une réduction de l'intensité lumineuse avant ou après défoliation suggère que la quantité de lumière serait un élément déclencheur.** Cependant, d'après nos résultats, un autre effecteur interviendrait. Nous pouvons supposer que l'effet conjoint de l'intensité lumineuse et de la défoliation expliquerait cette régulation. Pour dissocier l'effet défoliation de l'effet lumière, il conviendra d'appliquer un traitement supplémentaire où des plantes placées en conditions de faible éclairement soient soumises à des conditions d'éclairement optimales sans subir de défoliation. **L'identification des régions promotrices des gènes *LpSUT1* et *LpSUT2* permettrait de rechercher la présence d'éléments de régulation comme les SURE-box (élément de réponse aux glucides) et les I-box (élément de réponse à la lumière).** Afin de déterminer les régions potentiellement impliquées dans la régulation par les sucres, les hormones, la lumière, des constructions de délétion des promoteurs pourront être réalisées. Elles seront ultérieurement utilisées en transfection transitoire de cellules de Tabac (BY2).

Pour savoir si la modification des niveaux de transcrits *LpSUT1* et *LpSUT2* s'accompagne d'une modification de la quantité de protéines correspondantes, nous quantifierons LpSUT1 et LpSUT2 par western blots sur des fractions microsomaux préparées à partir de gaines ou de BFC de Ray-grass anglais.

E. Recherche d'autres transporteurs de saccharose

L'absence de localisation des transporteurs de saccharose LpSUT1 et LpSUT2 dans les cellules du complexe phloémien suggère l'existence d'autres transporteurs de saccharose chez le Ray-grass anglais impliqués dans le chargement/déchargement du phloème. Un argument en faveur de cette hypothèse est que l'absorption du saccharose par les PMV de gaines a une affinité apparente pour le saccharose beaucoup plus élevée (0,6 mM) que celles des protéines LpSUT1 et LpSUT2 mesurées dans la levure (respectivement 5,6 mM et 6,2 mM). **Il serait donc particulièrement intéressant de rechercher les différents transporteurs de saccharose présents chez le Ray-grass anglais.** Pour cela, plusieurs approches sont possibles. Le génome de plusieurs Poacées comme *Brachypodium*, le Sorgho, le Maïs ou le Riz est maintenant disponible. Une analyse bio-informatique nous permettrait de déterminer des amorces spécifiques des différents transporteurs. Les sondes ainsi obtenues pourraient être utilisées pour le criblage des banques d'ADNc phagique déjà existantes. **Parallèlement à ce criblage, il est envisageable de construire une banque d'ADN génomique et rechercher directement les gènes. Cette dernière approche présenterait l'avantage d'identifier par la même occasion les promoteurs des gènes, y compris ceux des gènes *LpSUT1* et *LpSUT2*.** Les régions promotrices pourront être placées en amont du gène *GUS* codant la β -glucuronidase dans un plasmide de type pBI et ainsi introduites *via Agrobacterium tumefaciens* dans *Arabidopsis* et dans le Ray-grass anglais. Il sera ainsi possible de déterminer les zones d'expression du gène *GUS* sous le contrôle du promoteur des gènes *LpSUT1* ou *LpSUT2*.

F. LpSUTs : des marqueurs moléculaires pour la sélection variétale ?

Chez le Ray-grass anglais, les sucres solubles (fructanes et saccharose) présentent un double intérêt agronomique. Premièrement, ils sont impliqués dans la repousse durant les premières heures après la défoliation et participent donc à la pérennité de l'espèce (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a, 1999b, Amiard *et al.*, 2003b). Deuxièmement, ils améliorent la production de lait et de viande en augmentant l'efficacité d'utilisation de l'azote par les bactéries du rumen des vaches (Miller *et al.*, 2001). **Ainsi, à l'heure actuelle, un des objectifs de la sélection variétale est de produire des variétés de Ray-grass capables d'accumuler de fortes quantités de sucres solubles dans les tissus récoltés.** Dans ce cadre,

nous nous proposons d'intervenir *via* nos connaissances sur le métabolisme glucidique du Ray-grass. **En effet, les gènes codant les transporteurs de saccharose pourraient à l'avenir fournir à la sélection variétale des marqueurs moléculaires simples corrélés positivement avec des teneurs en fructanes élevées synonymes d'une meilleure valeur nutritionnelle, d'une bonne capacité de repousse (en accord avec notre hypothèse de départ) et d'une résistance accrue à différents types de stress abiotiques comme le froid ou la sécheresse.** A côté des marqueurs génétiques classiques, ces marqueurs fonctionnels pourraient être les niveaux d'expression génique des transporteurs de saccharose impliqués dans la repousse. Dans ce contexte, une collaboration avec P. Barre (URP3F, INRA de Lusignan) pourrait être envisagée afin de poursuivre la cartographie des gènes codant ces transporteurs de saccharose. ces informations pourraient être mises en relation avec les QTL liés aux teneurs en sucres (Cogan *et al.*, 2005, Turner *et al.*, 2006).

Références
bibliographiques

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Allard G. and Nelson C.J.** (1991). Growth rates and carbohydrate fluxes within the elongation zone of tall fescue leaf blades. *Plant Physiology*, **95**: 663-668.
- Ames B.N.** (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In: Neufeld E, Ginsburg V, eds. *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, NY, **8**: 115-118.
- Amiard V., Morvan-Bertrand A., Billard J.P., Huault C., Prud'homme M.P.** (2003). Fate of fructose supplied to leaf sheaths after defoliation of *Lolium perenne* L.: assessment by ¹³C-fructose labelling. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 1231-1243.
- Amiard V., Morvan-Bertrand A., Cliquet J.B., Billard J.P., Huault C., Sandström J.P., Prud'homme M.P.** (2004). Carbohydrate and amino acid composition in phloem sap of *Lolium perenne* L. before and after defoliation. *Canadian Journal of Botany*, **82**: 1594-1601.
- Amiard V., Mueh K.E., Demmig-Adams B., Ebbert V., Turgeon R., Adams W.W.^{III}** (2005). Anatomical and photosynthetic acclimation to light environment in species with differing mechanisms of phloem loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **102**: 12968-12973.
- 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 and Physiology*, **40**: 1072-1078.
- Aoki N., Whitfeld P., Hoeren F., Scofield G., Newell K., Patrick J., Offler C., Clarke B., Rahman S., Furbank R.T.** (2002). Three sucrose transporter genes are expressed in the developing grain of hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology*, **50**: 453-462.
- Aoki N., Hirose T., Scofield G.N., Whitfeld P.R., Furbank R.T.** (2003). The sucrose transporter gene family in rice. *Plant and Cell Physiology*, **44**: 223-232.
- Aoki N., Scofield G.N., Wang X.D., Patrick J.W., Offler C.E., Furbank R.T.** (2004). Expression and localisation analysis of the wheat sucrose transporter *TaSUT1* in vegetative tissues. *Planta*, **219**: 176-184.
- Aoki N., Scofield G.N., Wang X.D., Offler C.E., Patrick J.W., Furbank R.T.** (2006). Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. *Plant Physiology*, **141**: 1255-1263.
- Archbold H.K.** (1940). Fructosans in the monocotyledons : A review. *New Phytologist*, **39**: 185-219.
- Arnon D.I.** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, **24**: 1-15.

Atkinson C.J. (1986). The effect of clipping on net photosynthesis and dark respiration rates of plants from an upland grassland, with reference to carbon partitioning in *Festuca ovina*. *Annals of botany*, **58** (1): 61-72.

-B-

Bachmann M., Matile F., Keller F. (1994). Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. *Plant Physiology*, **105**: 1335-1345.

Bagnall N., Wang X.D., Scofield G.N., Furbank R.T., Offler C.E., Patrick J.W. (2000). Sucrose transport-related genes are expressed in both maternal and filial tissues of developing wheat grains. *Australian Journal of Plant Physiology*, **27**: 1009-1020.

Bahmani I., Hazard L., Varlet-Grancher C., Betin M., Lemaire G., Matthew C., Thom E.R. (2001). Differences in tillering of long- and short-leaved perennial ryegrass genetic lines under full light and shade treatments. *Crop Science*, **40**: 1095-1102.

Balfourier F., Charmet G., Betin M., Betin B., Bourgoin B. (1992). Les ray-grass ; dans A. Gallais & H. Bannerot : Amélioration des espèces végétales cultivées. 310-321.

Barker L., Kühn C., Weise A., Schulz A., Gebhardt C., Hirner B., Hellmann H., Schulze W., Ward J.M., Frommer W.B. (2000). SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell*, **12**: 1153-1164.

Barre P. and Julier B. (2005). Recherche de QTL chez les espèces fourragères pérennes des régions tempérées. *Fourrages*, **183**: 405-418.

Barre P., Moreau L., Mi F., Turner L., Gastal F., Julier B., Ghesquiere M. (2009). Quantitative trait loci for leaf length in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Grass and Forage Science*, **64**: 310-321.

Barth I., Meyer S., Sauer N. (2003). PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *Plant Cell*, **15**:1375-1385.

Bearden J.C. (1978). Quantification of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochimica et Biophysica Acta*, **533**: 525-529.

Berthier A., Desclos M., Amiard V., Morvan-Bertrand A., Demmig-Adams B., Adams W.W^{III}., 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**: 1329-1344.

Bhowmik P.K., Tamura K., Sanada Y., Tase K., Yamada T. (2006). Sucrose metabolism of perennial ryegrass in relation to cold acclimation. *Z. Naturforschung*, **61c**: 99-104.

Bianchi G., Gamba A., Murelli C., Salamini F., Bartels D. (1991). Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* *Plant Journal*, **1**: 355-359.

Borland A.M. and Farrar J.F. (1989). The partitioning of photosynthetically fixed carbon in the leaf blade and leaf sheath of *Poa pratensis* L. *Journal of Experimental Botany*, **40**: 1247-1254.

- Botha C.E.J.** (2005). Interaction of phloem and xylem during phloem loading: functional symplasmic roles for thin- and thick-walled sieve tubes in monocotyledons. *In*: Holbrook NM, Zwieniecki MA, eds. *Vascular transport in plants*. Elsevier Academic Press, New York, 115-130.
- Boucaud J. and Bigot J.** (1989). Changes in the activities of nitrogen assimilation enzymes of *Lolium perenne* L. during regrowth after cutting. *Plant and Soil*, **114** (1): 121-125.
- Braun D.M., Slewinski T.L.** (2009). Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology*, **149**: 71-81.
- Brégard A. and Allard G.** (1999). Sink to source transition in developing leaf blades of tall fescue. *New Phytologist*, **141**: 45-50.
- Bryant J., Taylor G., Frehner M.** (1998). Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ is modified by source : sink balance in three component species of chalk grassland swards grown in a free air carbon dioxide enrichment (FACE) experiment. *Plant Cell and Environment*, **21** (2): 159-168.
- Bürkle L., Hibberd J.M., Quick W.P., Kühn C., Hirner B., Frommer W.B.** (1998). The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology*, **118**: 59-68.
- Bush D.R.** (1989). Proton-coupled sucrose transport in plasmalemma vesicles isolated from sugar beet leaves. *Plant Physiology*, **68**: 706-711.
- Bush D.R.** (1993). Inhibitors of the proton-sucrose symport. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **307**: 355-360.
- C-
- Cairns A.J., Ashton J.E.** (1991). The interpretation of *in vitro* measurements of fructosyl transferase activity: analysis of patterns of fructosyl transfer by fungal invertase. *New Phytologist*, **118**: 23-34.
- Cairns A.J.** (1993). Evidence for the *de novo* synthesis of fructan by enzymes from higher plants - a reappraisal of the SST-FFT model. *New Phytologist*, **123**: 15-24.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 21437-21443.
- Cartwright S.C., Lush W.M., Canny, M.J.** (1977). A comparison of translocation of labelled assimilate by normal and lignified sieve elements in wheat leaves. *Planta* **134**: 207-208.
- Casal JJ, Fankhauser C, Coupland G, Blázquez MA.** (2004). Signalling for developmental plasticity. *Trends in Plant Science* **9**: 309-314.

- Castelden C.K., Aoki Naohiro., Gillespie J.V., MacRae E.A., Quick W.P., Buchner P., Foyer C.H., Furbank R.T., Lunn J.E.** (2004). Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiology*, **135**: 1753-1764.
- Chapman D.F.** Morphogenetic and structural determinant of plant regrowth after defoliation. *Proceeding of the XVII International Grassland Congress* 95-104.
- Chandran D., Reinders A., Ward J.M.** (2003). Substrate specificity of the *Arabidopsis thaliana* sucrose transporter AtSUC2. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 44320-44325.
- Chatterton N.J., Harrison P.A., Bennett J.H., Asay K.H.** (1989). Carbohydrates partitioning in 185 accessions of gramineae grown under warm and cool temperatures. *Journal of Plant Physiology*, **134**: 169-179.
- Chen H.J. and Wang S.J.** (2008). Molecular regulation of sink-source transition in rice leaf sheaths during the heading period. *Acta Physiologica Plantarum*, **30**: 639-649.
- Chen S., Hajirezaei M., Börnke F.** (2005). Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiology*, **139**: 1163-1174.
- Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G.** (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, **31**: 3497-3500.
- Chincinska I.A., 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**: 515-528.
- Chiou T.J. and Bush D.R.** (1998). Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**: 4784-4788.
- Cogan N.O.I., Smith K.F., Yamada T., Francki G.M., Vecchies A.C., Jones E.S., Spangenberg G.C., Forster J.W.** (2005). QTL analysis and comparative genomics of herbage quality traits in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied genetics*, **110**: 364-380.
- Comparot S., Lingiah G., Martin T.** (2003). Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *Journal Experimental of Botany*, **54**: 595-604.
- Corpet F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, **16**: 10881-10890.
- Cumming G., Fidler F., Vaux D.L.** (2007). Error bars in experimental biology. *The journal of cell biology*, **177**: 7-11.

-D-

- Davidson J.L. and Milthorpe F.L.** (1966a). Leaf growth in *Dactylis glomerata* following defoliation. *Annals of Botany*, **30**:173-184.
- Davidson J.L. and Milthorpe F.L.** (1966b). The effect of defoliation on the carbon balance in *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany*, **30**:185-198.
- Delahaye J.P.** (2009). *Complexité aléatoire et complexité organisée*. Versailles. INRA eds Quae. 75p.
- Delrot S.** (1981). Proton fluxes associated with sugar uptake in *Vicia faba* leaf tissues. *Plant Physiology*, **68**: 706-711.
- Delrot S., Atanassova R., Maurousset L.** (2000). Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**: 281-306.
- Delting J.K., Duer M.I., Winn D.T.** (1979). Effects of simulated grasshopper grazing on CO₂ exchange rates of western wheatgrass leaves. *Journal of Economic Entomology* **72**: 403-406.
- De Visser R., Vianden H., Schnyder H.** (1997). Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* L. after defoliation: assessment by ¹³C and ¹⁵N steady-state labelling. *Plant, Cell and Environment*, **20**: 37-46.
- Dohmen R.J., Strasser A.W.M., Höner C.B., Hollenberg C.P.** (1991). An efficient transformation procedure enabling long term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast*, **7**: 691-692.
- Duchateau N., Bortlik K., Simmen U., Wiemken A., Bancal P.** (1995). Sucrose:fructan 6 fructosyltransferase, a key enzyme for diverting sucrose to fructan in barley leaves. *Plant Physiology*, **107**: 1249-1255.

-E-

- Eckardt N.A.** (2003). The function of SUT2/SUC3 sucrose transporters: the debate continues. *Plant Cell*, **14**: 1259-1262.
- Edelman J. and Jefford T.G.** (1968). The mechanism of fructosan in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus* L. *New phytologist*, **67**: 517-531.
- Edwards E.J., Osborne C.P., Strömberg C.A.E., Smith S.A., C4 grasse Consortium.** (2010). The origins of C4 grasslands: integrating evolutionary and ecosystem. *Science*, **328**: 587-591.
- Endler A., Meyer S., Schelbert S., Schneider T., Weschke W., Peters S.W., Keller F., Baginsky S., Martinoia E., Schmidt U.G.** (2006). Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol*, **141**: 196-207.

- Escobar-Gutiérrez A.J., Daudet F.A., Gaudillère J.P., Maillard P., Frossard J.S.** (1998). Modelling of allocation and balance of carbon in walnut (*Juglans regia* L.) seedling during heterotrophy-autotrophy transition. *Journal of Theoretical Biology*, **194**: 29-47.
- Evert R.F., Eschrich W., Heyser W.** (1978). Leaf structure in relation to solute transport and phloem loading in *Zea mays* L. *Planta*, **138**: 279-294.
- Evert R.F., Russin W.A., Bosalbalidis A.M.** (1996a). Anatomical and ultrastructural changes associated with sink-to-source transition in developing maize leaves. *International Journal of Plant Science*, **157**: 247-261.
- Evert R.F., Russin W.A., Botha C.E.J.** (1996b). Distribution and frequency of plasmodesmata in relation to photoassimilate pathway and phloem loading in the barley leaf. *Planta*, **198**: 572-579.

-F-

- Faville M., Vecchies A., Schreiber M., Drayton M., Hughes L., Jones E., Guthridge K., Smith K., Sawbridge T., Spangenberg G., Bryan G., Forster J.** (2004). Functionally associated molecular genetic marker map construction in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical Applied Genetics*, **110**: 12-32.
- Fleurat-Lessard P., Bouché-Pillon S., Leloup C., Bonnemain J.L.** (1997). Distribution and activity of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Mimosa pudica* L. in relation of ionic fluxes and leaf movements. *Plant Physiol*, **113**: 747-754.
- Fondy B.R., Geiger D.R., Servaites J.C.** (1989). Photosynthesis, carbohydrate metabolism, and export in *Beta vulgaris* L. and *Phaseolus vulgaris* L. during square and sinusoidal light regimes. *Plant Physiology*, **89**: 396-402.
- Fritz E., Evert R.F., Heyser W.** (1983). Microautoradiographic studies of phloem loading and transport in the leaf of *Zea mays* L. *Planta*, **159**: 193-206.
- Furbank R.T., Scofield G.N., Hirose T., Wang X.D., Patrick J.W., Offler C.E.** (2001). Cellular localisation and function of a sucrose transporter OsSUT1 in developing rice grains. *Australian Journal of Plant Physiology*, **28**: 1187-1196.

-G-

- Gahrtz M., Schmelzer E., Stolz J., Sauer N.** (1996). Expression of the PmSUC1 sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced during seed development. *Plant Journal*, **9**: 93-100.

- Gallagher S.R. and Leonard R.T.** (1982). Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiology*, **70**: 1335-1340.
- Gautier H., Varlet-Grancher C., Hazard L.** (1999). Tillering responses to the light environment and to defoliation in populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) selected for contrasting leaf length. *Annals of Botany*, **83**: 423-429.
- Geiger D.R.** (1975). Phloem loading. In: Transport in Plants 1. Phloem Transport. M.H. Zimmerman, J.A. Milburn (eds) Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 395-431.
- Giaquinta R.T.** (1983). Phloem loading of sucrose. *Annual Review of Plant Physiology*, **34**: 347-387.
- Gill G., Wilcox P., Whittaker D., Winz R., Bickerstaff P., Echt C., Kent J., Humphreys M., Elborough K., Gardner R.** (2006). A framework linkage map of perennial ryegrass based on SSR markers. *Genome*, **49**: 354-364.
- 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**: 411-415.
- Gottwald J.R., Krysan P.J., Young J.C., Evert R.F., Sussman M.R.** (2000). Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, **97**: 13979-13984.
- Granot D.** (2007). Role of tomato hexose kinases. *Functional Plant Biology*, **34**: 564-570.
- Grimes H.D., Overvoorde P.J., Ripp K., Franceschi V.R., Hitz W.D.** (1992). A 62 kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. *Plant Cell*, **4**: 1561-1574.
- Grimm V.** (1999). Ten years of individual-based modelling in ecology: what have we learned and what could we learn in the future? *Ecological Modelling*, **115**: 129-148.
- Guerrand D., Prud'homme M.P., Boucaud J.** (1996). Fructan metabolism in expanding leaves, mature leaf sheaths and mature leaf blades of *Lolium perenne*: fructan synthesis, fructosyltransferase and invertase activities. *New Phytologist*, **134**: 205-214.
- Gyula P., Schäfer E., Nagy F.** (2003). Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 446-452.

-H-

- Hackel A., Schauer N., Carrari F., Fernie A.R., Grimm B., Kühn C.** (2006). Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Planta*, **45**: 180-192.

- Hanson J., Smeekens S.** (2009). Sugar perception and signaling-an update. *Current Opinion in Plant Biology*, **12** (5): 562-567.
- Harmer S.L., Kay S.A.** (2005). Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**: 1926-1940.
- Haupt S., Duncan G.H., Holzberg S., Oparka K.J.** (2001). Evidence for symplastic phloem unloading in sink leaves of barley. *Plant Physiology*, **125**: 209-218.
- Hazard L., Ghesquière M., Betin M.** (1994). Breeding for management adaptation in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L). I. Assessment of yield under contrasting cutting frequencies and relationships with leaf morphogenesis components. *Agronomie*, **14** (4).
- Hendry G.A.F.** (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*, **123**: 3-14.
- Hitz W.D., Card P.J., Ripp K.G.** (1986). Substrate recognition by a sucrose transporting protein. *Journal of Biological Chemistry*, **261** (26): 11986-11991.
- Hirata M., Cai H., Inoue M., Yuyama N., Miura Y., Komatsu T., Takamizo T., Fujimori M.** (2006). Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) *Theoretical Applied Genetics*, **113** (2): 270-279.
- Hirose T., Imaizumi N., Scofield G.N., Furbank R.T., Ohsugi R.** (1997). cDNA cloning and tissue-specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiology*, **38**: 1389-1396.
- Hirose T., Endler A., Ohsugi R.** (1999). Gene expression of enzymes for starch and sucrose metabolism and transport in leaf sheaths of rice (*Oryza sativa* L.) during the heading period in relation to the sink to source transition. *Plant Production Sciences*, **2** (3): 178-183.
- Hirose T., Scofield G.N., Terao T.** (2008). An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice. *Plant Science*, **174**: 534-543.
- Housley T.L. and Volenec J.J.** (1988). Fructan content and synthesis in leaf tissue of *Festuca arundinacea*. *Plant Physiology*, **86**: 1247-1251.
- Hume D.E.** (1991). Effect of cutting on production and tillering in prairie grass (*Bromus willdenowii* Kunth) compared with two ryegrass (*Lolium*) species. 1. Vegetative plants. *Annals of Botany*, **67** (6): 533-541.
- Humphreys M.O.** (1989). Water soluble carbohydrates in perennial ryegrass breeding. I. Genetic differences among cultivars and hybrid progeny grown as spaced plants. *Grass and Forage Science*, **44**: 231-236.
- Huyghe C., Duru M., Peyraud J.L., Lherm M., Gensollen V., Bournoville R., Couteaudier Y.** (2005). Prairies et cultures fourragères : au carrefour des logiques de production et des enjeux environnementaux. *INRA éd* 209 p.

Huyghe C. (2007). Place des prairies dans les territoires français: regard historique. *Fourrages*, **189**: 3-18.

Hyder D.N. (1972). Defoliation in relation to vegetative growth. In: The biology and utilization of grass. Younger VB, Mackell CM. (eds) Academic Press, London, 304-317.

-I-

Ishimaru K., Hirose T., Aoki N., Takahashi S., Ono K., Yamamoto S., Wu J., Saji S., Baba T., Ugaki M. (2001). Antisense expression of a rice sucrose transporter OsSUT1 in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiology*, **42**: 1181-1185.

-J-

Jarvis S.C., Macduff J.H. (1989). Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation: recovery of uptake and growth and their interactions. *Journal Experimental of Botany*, **40** (9): 965-975.

Jensen L.B., Andersen J.R., Frei U., Xing Y., Taylor C., Holm P.B., Lübberstedt T. (2005a). QTL mapping of vernalization response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals co-location with an orthologue of wheat VRN1. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**: 527-536.

Jensen L.B., Muylle H., Arens P., Andersen C.H., Holm P.B., Ghesquière M., Julier B., Lübberstedt T., Nielsen K.K., De Riek J., Roldan-Ruiz I., Roulund N., Taylor C., Vosman B., Barre P. (2005b). Development and mapping of a public reference set of SSR markers in *Lolium perenne* L. *Molecular Ecology Notes*, **5**: 951-957.

Ji X., Shiran B., Wan J., Lewis D.C., Jenkins C.L.D., Condon A.G., Richards R.A., Dolferus R. (2010). Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant Cell Environment*, **33**: 926-942.

Jürgensen K., Scholz-Starke J., Sauer N., Hess P., Van Bel A.J.E., Grundler F. (2003). The gene of the companion cell-specific Arabidopsis sucrose carrier AtSUC2 is expressed in nematode-induced syncytia. *Plant Physiology*, **131**: 61-69.

-K-

Kami C., Lorrain S., Hornitschek P., Fankhauser C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*, **91**: 29-66.

- Kawakami A., Yoshida M.** (2002). Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **66**: 2297-2305.
- Kawakami A., Yoshida M.** (2005). Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta*, **223**: 90-104.
- Koch K.E.** (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, **47**: 509-540.
- Komor E.** (1977). Sucrose uptake by cotyledons of *Ricinus communis* L. *Planta*, **137**: 119-131.
- Koroleva O.A., Farrar J.F., Tomos A.D., Pollock C.J.** (1997). Patterns of solute in individual mesophyll, bundle sheath and epidermal cells of barley leaves induced to accumulate carbohydrate. *New Phytologist*, **136**: 97-104.
- Koroleva O.A., Farrar J.F., Tomos A.D., Pollock C.J.** (1998). Carbohydrates in individual cells of epidermis, mesophyll, and bundle sheath in barley leaves with changed export or photosynthetic rate. *Plant Physiology*, **118**: 1525-1532.
- Koroleva O.A., Tomos A.D., Farrar J., Roberts P., Pollock C.J.** (2000). Tissue distribution of primary metabolism between epidermal, mesophyll and parenchymatous bundle sheath cells in barley leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, **27**: 747-755.
- Kühn C., Franceschi V.R., Schulz A., Lemoine R., Frommer W.B.** (1997). Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science*, **275**: 1298-1300.
- Kühn C., Hajirezaei M., Fernie A., Roessner-Tunali U., Czechowski T., Hirner B.** (2003). The sucrose transporter *StSUT1* localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology*, **131**: 102-113.
- Kühn C. and Grof C.P.L.** (2010). Sucrose transporters in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**: 1-11.
- Kuo J. and O'Brien T.P.** (1974). Lignified sieve elements in the wheat leaf. *Planta*, **117**: 349-353.

-L-

- Lalonde S., Tegeder M., Thorne-Holst M., Frommer W.B., Patrick J.W.** (2003). Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell Environment*, **26**: 37-56.
- Langenkämper G., Fung R.W.M., Newcomb R.D., Atkinson R.G., Gardner R.C., MacRae E.A.** (2002). Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *Journal of Molecular Evolution*, **54**: 322-332.
- Larsson C., Widell S., Sommarin M.** (1988). Inside-out plant plasma membrane vesicles of high purity obtained by aqueous two-phase partitioning. *FEBS Letters*, **229**: 289-292.

- Lasseur B., Lothier J., Djoumad A., De Coninck B., Smeekens S., Van Laere A.** (2006). Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT) / fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal Experimental of Botany*, **57**: 2719-2734.
- Lasseur B., Schroeven L., Lammens W., Le Roy K., Spangenberg G., Manduzio H., Vergauwen R., Lothier J., Prud'homme M-P., Van den Ende W.** (2009). Transforming a fructan:fructan 6G-fructosyltransferase from perennial ryegrass into a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *Plant Physiology*, **149**: 327-339.
- Lasseur B., Lothier J., Wiemken A., Van Laere A., Morvan-Bertrand A., Ende WV den, Prud'homme M-P.** (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* L.). *Journal Experimental in Botany*, **62**: 1871-1885.
- Lauvergeat V., Barre P., Bonnet M., Ghesquière M.** (2005). Sixty simple sequence repeat markers for use in the Festuca-Lolium complex of grasses. *Molecular Ecology Notes*, **5**: 401-405.
- Lee J., Roche J., Donaghy D., Thrush A., Sathish P.** (2010). Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies of gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Molecular Biology*, **11**: 8.
- Lemoine R. and Delrot S.** (1989). Proton-motive-force-driven sucrose uptake in sugar beet plasma membrane vesicles. *FEBS Letters*, **249**: 129-133.
- Lemoine R., Bourquin S., Delrot S.** (1991). Active uptake of sucrose by plant plasma membrane vesicles: determination of some important physical and energetical parameters. *Physiology Plantarum*, **82**: 377-384.
- Lemoine R., Bürkle L., Barker L., Sakr S., Kühn C., Regnacq M., Gaillard C., Delrot S., Frommer W.B.** (1999). Identification of a pollen specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters*, **454**: 325-330.
- Lemoine R.** (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**: 246-262.
- Lestienne F., Thornton B., Gastal F.** (2006). Impact of defoliation intensity and frequency on N uptake and mobilization in *Lolium perenne*. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 997-1006.
- Levitt J.** (1980). Responses of plants to environmental stresses. *Vol. 1, 2nd. Edn., Academic Press*, New York.
- Li C.Y., Weiss D., Goldschmidt E.E.** (2003). Effects of carbohydrate starvation on gene expression in citrus root. *Planta* **217** (1):11-20.
- Li Z.S., Gallet O., Gaillard C., Lemoine R., Delrot S.** (1991). Reconstitution of active sucrose transport in plant proteoliposomes. *FEBS Letters*, **286**: 117-120.

- Livak K.J. and Schmittgen T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Lothier J., Lasseur B., Le Roy K., Van Laere A., Prud'homme M.P., Barre P.** (2007). 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 Experimental of Botany*, **58**: 1969-1983.
- Louahlia S., Macduff J.H., Ourry A., Humphreys M., Boucaud J.** (1999). Nitrogen reserve status affects the dynamics of nitrogen remobilization and mineral nitrogen uptake during recovery of contrasting cultivars of *Lolium perenne* from defoliation. *New Phytologist*, **142** (3): 451-462.
- Lu J.M.Y. and Bush D.R.** (1998). His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increase transport activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**: 9025-9030.
- Ludlow M.M. and Charles-Edwards D.A.** (1980). Analysis of the regrowth of grass/legume subjected to different frequencies and intensities of defoliation. *Australian Journal of Agricultural Research*, **31**: 673-692.

-M-

- Macadam J.W. and Nelson C.J.** (1987). Specific leaf weight in zones of cell division, elongation and maturation in tall fescue leaf blades. *Annals of Botany*, **59**: 369-376.
- Macduff J.H. and Jackson S.B.** (1992). Influx and efflux of nitrate and ammonium in italian ryegrass and white clover roots - comparisons between effects of darkness and defoliation. *Journal of Experimental Botany*, **43** (249): 525-535.
- MacKibbin R.S., Muttucumaru N., Paul M.J., Powers S.J., Burrell M.M., Coates S., Purcell P.C., Tiessen A., Geigenberger P., Halford N.G.** (2006). Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnology Journal*, **4**: 409-418.
- Madore M.A., Oross J.W., Lucas W.J.** (1986). Symplastic transport in *Ipomea tricolor* source leaves. Demonstration of functional symplastic connections from mesophyll to minor veins by a novel dye-tracer method. *Plant Physiology*, **82**: 432-442.
- Marx S.P., Nösberger J., Frehner M.** (1997). Hydrolysis of fructan in grasses: a beta-(2-6)-linkage specific fructan-beta-fructosidase from stubble of *Lolium perenne* L. *New Phytologist*, **135**: 279-290.
- 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**: 85-93.

- Maurousset L., Lemoine R., Delrot S., Pichelin-Poitevin D.** (1992). Solute uptake in plasma membrane vesicles from broad bean (*Vicia faba* L.) leaves. *Acta Botanica Neerlandica*, **41**: 151-159.
- Meyer S., Lauterbach C., Niedermeier M., Bart I., Sjolund R.D., Sauer N.** (2004). Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. *Plant Physiology*, **134**: 684-693.
- Miller L.A., Moorby J.M., Davies D.R., Humphreys M.O., Scollan N.D., Macrae J.C., Theodorou M.K.** (2001). Increase concentration of water soluble carbohydrate in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Milk production from late-lactation dairy cows. *Grass and Forage Science*, **56**: 383-394.
- Morel I., Wyss U., Collomb M.** (2006). Influence de la composition botanique de l'herbe ou de l'ensilage sur la composition du lait. *Revue suisse d'Agricultur*, **38** (3): 115-120.
- Morvan A., Challe G., Prud'homme M.P., Le Saos J., Boucaud J.** (1997). Rise of fructan exohydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. *New Phytologist*, **136**: 81-88.
- Morvan-Bertrand A.** (1998). Dynamique de repousse et mobilisation des réserves glucidiques des gaines et des feuilles en croissance de *Lolium perenne* L. Après une défoliation; estimation du rôle des gibbérellines sur la repousse et sur la régulation de l'activité fructane exohydrolase *Thèse Université de Caen*.
- Morvan-Bertrand A., Boucaud J., Prud'homme M.P.** (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**: 1817-1826.
- Morvan-Bertrand A., Pavis N., Boucaud J., Prud'homme M.P.** (1999b). Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after defoliation: assessment by ¹³C steady-state labelling and carbohydrate analysis. *Plant, Cell and Environment*, **22**: 1097-1108.
- 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**: 109-120.
- Münch E.** (1930). Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Gustav Fisher, Jena.

- Nadwodnik J. and Lohaus G.** (2008). Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta*, **227**: 1079-1089.
- Noiraud N., Delrot S., Lemoine R.** (2000). The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiology*, **122**: 1447-1455.
- Nowak R.S. and Caldwell M.M.** (1984). A test of compensatory photosynthesis in the field: implications for herbivory tolerance. *Oecologia*, **61**: 311-318.

-O-

- Oparka K.J. and Van Bel A.J.E.** (1992). Pathways of phloem loading and unloading-a plea for uniform terminology. In Carbon Partitioning Within and Between Organisms (Pollock, C.J., Farrar, J.F. and Gordon, A.T., eds). Oxford: BIOS Scientific Publishers, 249-254.
- Oparka K.J., Santa Cruz S.** (2000). The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**: 323-347.
- Ourry A., Boucaud J., Salette J.** (1988). Nitrogen mobilization from stubble and roots during re-growth of defoliated perennial ryegrass. *Journal of Experimental Botany*, **39**: 803-809.

-P-

- Parsons A.J., Leafe E.L., Collett B., Penning P.D., Lewis J.** (1983). The physiology of grass production under grazing. II Photosynthesis, crop growth and animal intake of continuously-grazed swards. *Journal of Applied Ecology*, **20**: 127-139.
- Pavis N., Boucaud J., Prud'homme M.P.** (2001). Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytologist*, **150**: 97-109.
- Pavis N., Chatterton N.J., Harrison P.A., Baumgartner S., Praznik W., Boucaud J., Prud'homme M.P.** (2001). Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* L. *New phytologist*, **150**: 83-95.
- Pego J.V. and Smeekens S.C.M.** (2000). Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends in Plant Science*, **5**: 531-536.
- Pflimlin A., Hubert B., Leaver D.** (2001). Pâturage: importance actuelle et nouveaux enjeux. *Fourrages*, **166**: 117-135.
- Pollock C.J.** (1984). Sucrose accumulation and the initiation of fructan biosynthesis in *Lolium temulentum* L. *New Phytologist*, **96**: 527-534.

- Pollock C.J. and Cairns A.J.** (1991). Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Molecular Biology*, **42**: 77-101.
- Pollock C.J. and Farrar J.F.** (1996). Source-sink relations: the role of sucrose. In *Photosynthesis and the Environment*. Baker. NR (ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 226-279.
- Pollock C.J. and Jones T.** (1979). Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. *New Phytologist*, **83**: 9-15.
- Pontis H.G. and Del Campillo E.** (1985). Fructans. In: *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*. Dey PM, Dixon RA (eds). London: Academic Press. pp 205-227.
- Prioul J.L., Brangeon J., Reyss A.** (1980). Interactions between external and internal conditions in the development of photosynthetic features in a grass leaf. *Plant Physiology*, **66**: 762-769.
- Prud'homme M.P., Gonzalez B., Billard J.P., Boucaud J.** (1992). Carbohydrate content, fructan and sucrose enzyme activities in roots, stubble and leaves of ryegrass (*Lolium perenne* L.) as affected by source/sink modification after cutting. *Journal of Plant Physiology*, **140**: 282-292.

-Q-

- Qiu Q.S., Hardin S.C., Mace J., Brutnell T.P., Huber S.C.** (2007). Light and metabolic signals control the selective degradation of sucrose synthase in maize leaves during deetiolation. *Plant Physiology*, **144**: 468-478.

-R-

- Rae A.L., Perroux J.M., Grof C.P.L.** (2005). Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta*, **220**: 817-825.
- Ransom-Hodgkins W.D., Vaughn M.W., Bush D.R.** (2003). Protein phosphorylation plays a key role in sucrose-mediated transcriptional regulation of a phloem-specific proton sucrose symporter. *Planta*, **217**: 483-489.
- Reinders A., Schulze W., Kühn C., Barker L., Schulz A., Ward J.M., Frommer W.B.** (2002). Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *Plant Cell*, **14**: 1567-1577.
- Reinders A., Sivitz A.B., Hsi A., Grof C.P.L., Perroux J.M., Ward J.M.** (2006). Sugarcane ShSUT1: analysis of sucrose transport activity and inhibition by sucralose. *Plant Cell Environment*, **10**: 1871-80.

- Reinders A., Sivitz A.B., Starker C.G., Gantt J.S., Ward J.M.** (2008). Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*, **68**: 289-299.
- Rentsch D., Laloi M., Rouhara I., Schmelzer E., Delrot S., Frommer W.** (1995). *NTR1* encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **370**: 264–268.
- Richards J.H.** (1993). Physiology of plants recovering from defoliation. In Bakes MJ, ed. *Grasslands for our world*. SIR Publishing, Wellington, New Zealand, 46-54.
- Riesmeier J.W., Willmitzer L., Frommer W.B.** (1992). Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO Journal*, **11**: 4705-4713.
- Riesmeier J.W., Hirner B., Frommer W.B.** (1993). Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell*, **5**: 1591-1598.
- Riesmeier J.W., Willmitzer L., Frommer W.B.** (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO J*, **13**: 1-7.
- Ripp K.G., Viitanen P.V., Hitz W.D., Franceschi V.R.** (1988). Identification of a membrane protein associated with sucrose transporter into cells of developing soybean cotyledons. *Plant Physiology*, **88**: 1435-1445.
- Ritsema T. and Smeekens S.** (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 223-230.
- Roblin G., Sakr S., Bonmort J., Delrot S.** (1998). Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Letters*, **424**: 165-168.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 675-709.
- Roth A., Lüscher M., Sprenger N., Boller T., Wiemken A.** (1997). Fructan and fructan metabolizing enzymes in the growth zone of barley leaves. *New Phytologist*, **136**: 73-79.
- Ryle G.J.A. and Powell C.E.** (1975). Defoliation and regrowth in the graminaceous plants: the role of current assimilate. *Annals of Botany*, **39**: 297-310.

-S-

- Sakr S., Lemoine R., Gaillard C., Delrot S.** (1993). Effect of cutting on solute uptake by plasma membrane vesicles from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiology*, **103**: 49-58.
- Sakr S., Noubhani A.M., Bourbonloux A., Riesmeier J.W., Frommer W.B., Sauer N.** (1997). Cutting, ageing and expression of plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1330**: 207-216.

- Salmon S., Lemoine R., Jamai A., Bouché-Pillon S., Fromont J.C.** (1995). Study of sucrose and mannitol transport in plasma membrane vesicles from phloem and non-phloem tissues of celery (*Apium graveolens* L.) petioles. *Planta*, **197**: 76-83.
- Sauer N. and Stolz J.** (1994). SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. *Plant Journal*, **6**: 67-77.
- Sauer N.** (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters*, **581**: 2309-2317.
- 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**: 187-199.
- Schnyder H. and Nelson C.J.** (1987). Growth rates and carbohydrate fluxes within the elongation zone of tall fescue leaf blades. *Plant Physiology*, **85**: 548-553.
- Schnyder H. and Nelson C.J.** (1988). Diurnal growth of tall fescue leaf blades. I. Spatial distribution of growth, deposition of water, and assimilate import in the elongation zone. *Plant Physiology*, **86**: 1070-1076.
- Schnyder H., Seo S., Rademacher I.F., Kühbauch W.** (1990). Spatial distribution of growth rates and of epidermal cell lengths in the elongation zone during leaf development in *Lolium perenne* L. *Planta*, **181**: 423-431.
- Schnyder H., Schäufele R., Wenzel R.** (2004). Mobile, outdoor continuous-flow isotope-ratio mass spectrometer system for automated high-frequency ¹³C- and ¹⁸O-CO₂ analysis for leeling plot applications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**: 3068-3074.
- Schulze W., Weise A., Frommer W.B., Ward J.M.** (2000). Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Letters*, **485** (2-3):189-194.
- Schulze W.X., Reinders A., Ward J., Lalonde S., Frommer W.B.** (2003). Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochemistry*, **4**: 3.
- Scofield G.N., Hirose T., Gaudron J.A., Upadhyaya N.M., Ohsugi R., Furbank R.T.** (2002). Antisense suppression of the rice sucrose transporter gene, OsSUT1, leads to impaired grain filling and germination but does not affect photosynthesis. *Functional Plant Biology*, **29**: 815-826.
- Scofield G.N., Hirose T., Aoki N., Furbank R.T.** (2007). Involvement of the sucrose transporter, OsSUT1, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 3155-3169.
- Shakya R. and Sturm A.** (1998). Characterization of source-and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiology*, **118**: 1473-1480.

- Sivitz A.B., Reinders A., Ward J.M.** (2005). Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter HvSUT1. *Plant and Cell Physiology*, **46**: 1666-1673.
- Sivitz A.B., Reinders A., Johnson M.E., Krentz A.D., Grof C.P.L., Perroux J.M.** (2007). Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant Physiology*, **143**: 188-198.
- Skøt L., Humphreys J., Humphreys M.O., Thorogood D., Gallagher J., Sanderson R., Armstead I.P., Thomas I.D.** (2007). Association of candidate genes with flowering time and water-soluble carbohydrate content in *Lolium perenne* (L.). *Genetics*, **177**: 535-547.
- Slewinski T.L., Meeley R., Braun D.M.** (2009). Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *Journal Experimental of Botany*, **60**: 881-892.
- Smeekens S. and Rook F.** (1997). Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiology*, **115**: 7-13.
- Smeekens S., Ma J., Hanson J., Rolland F.** (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**: 274-279.
- Smith D.** (1967). Carbohydrates in grasses. II. Sugar and fructosan composition of the stem bases of brome grass and timothy at several growth stage, and in different plant parts at anthesis. *Crop Science*, **7**: 62-70.
- Smith D., Bula R.J., Walgenbach R.P.** (1986). Forage management. Fifth edition. Smith D, Bula RJ, Walgenbach RP (eds). Kendall-Hunt publishing. Dubuque. Iowa. USA. 305 p.
- Smith P. and Falloon P.** (2005). Carbon sequestration in European croplands. *SEB Experimental Biology Series*, 47-55.
- Sokal R.R. and Rohlf F.J.** (1995). Biometry. Ed. W.H. Freeman, New York.
- Sokal R.R. and Rohlf F.J.** (2003) Biometry. Ed. W.H. Freeman, New York.
- Sovonick S.A., Geiger D.R., Fellows R.J.** (1974). Evidence for active phloem loading in the minor veins of sugar beet. *Plant Physiology*, **54**: 886-891.
- Speranza A. et Calzoni G.L.** (2004). Guide de l'anatomie microscopique des plantes vasculaires en 285 photos. *Atlas de la structure des plantes*, eds Belin Sup, Paris, France. 223 p.
- Sprenger N., Schellenbaum L., Van Dun K., Boller T., Wiemken A.** (1997). Fructan synthesis in transgenic tobacco and chicory plants expressing barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase. *FEBS Letters*, **400**: 355-358.
- Srivastava A.C., Ganesan S., Ismail I.O., Ayre B.G.** (2008). Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 Sucrose/H⁺ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiology*, **148**: 200-211.
- Srivastava A., Ganesan S., Ismail I., Ayre B.** (2009). Effective carbon partitioning driven by exotic phloem-specific regulatory elements fused to the Arabidopsis thaliana AtSUC2 sucrose-proton symporter gene. *BMC Plant Biology*, **9**: 7.

- Stadler R. and Sauer N.** (1996). The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta*, **109**: 299-306.
- Stitt M., Huber S., Kerr P.** (1987). Control of photosynthetic sucrose formation. In: Hatch MD, Boardman N, eds. *The biochemistry of plants, (Photosynthesis)*, San Diego, CA, USA: Academic Press, **10**: 327-407.
- Studer B., Asp T., Frei U., Hentrup S., Meally H., Guillard A., Barth S., Muylle H., Roldan-Ruiz I., Barre P., Koning-Boucoiran C., Uenk-Stunnenberg G., Dolstra O., Skot L., Skot K.P., Turner L.B., Humphreys M.O., Kolliker R., Roulund N., Nielsen K.K., Lübberstedt T.** (2008). Expressed sequence tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Molecular Breeding*, **21**: 533-548.
- Sturm A., Lienhard S., Schatt S., Hardegger M.** (1999). Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Molecular Biology*, **39**: 349-360.
- Sun Y., Reinders A., LaFleur K.R., Mori T., Ward J.M.** (2010). Transport activity of rice sucrose transporters OsSUT1 and OsSUT5. *Plant Cell Physiology*, **51** (1): 114-122.

-T-

- Taiz L. and Zeiger E.** (1998). Translocation in the phloem. In: *Plant Physiology*. L. Taiz, E. Zeiger (eds) Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA, 251-286.
- Tate K.R. and Ross D.J.** (1997). Elevated CO₂ and moisture effects on soil carbon storage and cycling in temperate grasslands. *Global Change Biology*, **3**: 225-235.
- Thornton B. and Millard P.** (1996). Effects of severity of defoliation on root functioning in grasses. *Journal of Range Management*, **49**: 443-447.
- Truernit E. and Sauer N.** (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta*, **196**: 564-570.
- Turner L.B., Humphreys M.O., Cairns A.J., Pollock C.J.** (2001). Comparison of growth and carbohydrate accumulation in seedlings of two varieties of *Lolium perenne* L. *Journal of Plant Physiology*, **159**: 891-897
- Turner L.B., Humphreys M.O., Cairns A.J., Pollock C.J.** (2002). Carbon assimilation and partitioning into non-structural carbohydrate in constring varieties of *Lolium perenne* L. *Journal of Plant Physiology*, **159**: 257-263.
- Turner L., Cairns A., Armstead I., Ashton J., Skøt K., Whittaker D., Humphreys M.** (2006). Dissecting the regulation of fructan metabolism in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) with quantitative trait locus mapping. *New Phytologist*, **169**: 45-58.

- Turgeon R.** (1989). The Sink-Source Transition in Leaves. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**: 119-138.
- Turgeon, R.** (1996). Phloem loading and plasmodesmata. *Trends in Plant Science*, **1**: 418-423.
- Turgeon R. and Medville R.** (1998). The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **95**: 12055-12060.
- Tusnady G.E. and Simon I.** (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Application to topology prediction. *Journal of Molecular Biology*, **283**: 489-506.
- Tymowska-Lalanne Z. and Kreis M.** (1998). The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Advances in Botanical Research*, **28**: 71-117.

-V-

- Van Bel A.J.E.** (1993). Strategies of phloem loading. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **44**: 253-281.
- Van Laere A. and Van den Ende W.** (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 803-813.
- Van Ooijen J.W. and Voorrips R.E.** (2001) *JOINMAP 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps*. Wageningen, the Netherlands: Plant Research International.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3** (7): 34.
- Vaughn M.W., Harrington G.N., Bush D.R.** (2002). Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, **99**: 10876-10880.
- Vignault C., Vachaud M., Cakir B., Glissant D., Dedaldechamps F., Büttner M., Atanassova R., Fleurat-Lessard P., Lemoine R., Delrot S.** (2005). VvHT1 encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1409-1418.
- Volenc J.J.** (1986). Nonstructural carbohydrates in stem base components of tall fescue during regrowth. *Crop Science*, **26**: 122-127.
- Volenc J.J. and Nelson C.J.** (1984). Carbohydrate metabolism in leaf meristems of tall fescue. I. Relationship to leaf elongation rates modified by nitrogen fertilization. *Plant Physiology*, **74**: 595-600.
- Vos J., Marcelis L.F.M., De Visser P.H.B, Struik P.C., Evers J.B.** (2007). *Functional Structural Plant Modelling in Crop Production*, Eds Springer, Dordrecht. Pays-Bas. 1-12.

-W-

- Wagner W., Keller F., Wiemken A.** (1983). Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **112**: 359-372.
- Wahl R., Zahiri A., Kämper J.** (2010). The *Ustilago maydis* mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in planta. *Molecular Microbiology*, **75**: 208-220.
- Wang N. and Nobel P.S.** (1998). Phloem transport of fructans in crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology*, **116**: 709-714.
- Wang H and Deng XW.** (2003). Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends in Plant Science*, **8**: 172-178.
- Weise A., Barker L., Kühn C., Lalonde S., Buschmann H., Frommer W.B., Ward J.M.** (2000). A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell*, **12**: 1345-1355.
- Weschke W., Panitz R., Sauer N., Wang Q., Neubohn B., Weber H., Wobus U.** (2000). Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant Journal*, **21**: 455-467.
- Wilhelm W.W. and Nelson C.J.** (1978). Leaf growth, leaf aging and photosynthetic rate of tall fescue genotype. *Crop science*, **18**: 769-772.
- Wilkins P.W. and Humphreys M.O.** (2003). Progress in breeding perennial forage grasses for temperate agriculture. *Journal of Agricultural Science*, **140**: 129-150.
- Williams L.E., Bick J.A., Neelam A., Weston K.N., Hall J.L.** (1996). Biochemical and molecular characterization of sucrose and amino acid carriers in *Ricinus communis*. *Journal Experimental of Botany*, **47**: 1211-1216.
- Williams L.E., Lemoine R., Sauer N.** (2000). Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Science*, **5**: 283-290
- Woledge J.** (1977). The effects of shading and cutting treatments on the photosynthetic rates of ryegrass leaves. *Annals of Botany*, **41**: 1279-1286.
- Wright K.M., Duncan G.H., Pradel K.S., Carr F., Wood S., Oparka K.J., Cruz SS.** (2000). Analysis of the N gene hypersensitive response induced by a fluorescently tagged tobacco mosaic virus. *Plant Physiology*, **123**: 1375-1386.
- Wright K.M., Roberts A.G., Martens H.J., Sauer N., Oparka, K.** (2003). Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to AtSUC2 promoter activity. *Plant Physiology*, **131**: 1555-1565.

-Y-

Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85.

Sites internet consultés :

www.agreste.agriculture.gouv.fr

www.brachypodium.org (Rubrique database)

www.genomenetwork.org/articles/04_00/what_makes_chart.shtml (Arabidopsis Initiative Genome)

www.geves.fr/rubrique.php?rub_id=186 (catalogue officiel des semences)

www.grassohol.org

www.inra.fr/phototheque/

<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>

www.maizegdb.org (Rubrique Database)

www.prairies-gnis.org

Table des
illustrations

IX. Table des illustrations

Table des figures

Figure I.1: (A) Prairie de Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) artificielle exploitée de manière intensive (fauchage). (B) Prairie naturelle exploitée de manière extensive (pâturage). Crédit photothèque INRA (www.inra.fr/photothèque/). (C) Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) Crédit photographie (www.plantcare.com/oldSite/httpdocs/images/namedImages/Lolium.perenne.jpg).

Figure II.1: (A) Evolution des surfaces prairiales en Normandie depuis la fin du XVIII^{ème} siècle. (B) Evolution des surfaces de prairies artificielles, temporaires et permanentes au cours des deux derniers siècles en France (Huyghe, 2007; d'après P. Brunet, Musée de Normandie).

Figure II.2: Carte de l'Europe géographique désignant les quatre grandes zones possédant des types prairiaux différents. La zone 1 désigne une zone de cultures fourragères. La zone 2 désigne une zone herbagère de plaine et de plateau. La zone 3 désigne une zone herbagère de montagne humide. La zone 4 désigne une zone de montagne et piémont secs, de type méditerranéen (Huyghe *et al.*, 2005).

Figure II.3: Répartition (en %) des surfaces prairiales en France en 2009 (prairies artificielles, prairies temporaires et surfaces toujours en herbe). Ces valeurs sont établies par l'AGRESTE sur l'ensemble du territoire français pour l'année 2009 (Agreste; 2009).

Figure II.4: (A) Deux variétés différentes de ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) cultivées en plein champ, (B) Photographie de la ligule (séparant la gaine du limbe), et inflorescence (supportant les épillets) chez le ray-grass anglais. Photographies libres de droits.

Figure II.5: Amélioration variétale et principaux points de sélection des Poacées cultivées dans les systèmes prairiaux, en particulier pour le Ray-grass anglais. Source (www.prairies-gnis.org).

Figure II.6: Différence de largeur (en mm) du limbe entre une variété de Ray-grass anglais diploïde (2n ; Salem) et une variété de Ray-grass anglais tétraploïde (4n ; Sébastien). Les plantes sont âgées de quatre semaines et sont soumises à des conditions de cultures identiques, photo personnelle, Berthier 2010.

Figure II.7: (A) Logo du projet Grassohol.

Figure II.8: (A) Plant de Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) composé de plusieurs talles. (B) Représentation schématique des différents organes d'une talle de Ray-grass anglais. Le stade présenté est celui comportant deux feuilles matures, la troisième étant en train d'apparaître

Figure II.9: Représentation des réponses physiologiques séquentielles généralement observées après une défoliation qui élimine l'ensemble des tissus photosynthétiques sans supprimer les méristèmes caulinares ou foliaires, d'après Morvan-Bertrand A., *Thèse de l'Université de Caen*, 1998.

Figure II.10: Evolution de la vitesse d'absorption du nitrate dans les racines au cours des 48 heures suivant la défoliation de ray-grass anglais précultivés pendant 10 jours sur 1.0 mM de KNO₃. Les barres verticales représentent ± S.E. de la moyenne pour n = 3 (Louahlia *et al.*, 1999).

Figure II.11: Structure des quatre types de fructanes. (A) type inuline, (B) type lévane, (C) type néosérie, (D) type graminane. La molécule de saccharose est entourée en pointillé et le numéro dans un rond noir correspond au numéro de l'atome de carbone dans la molécule (Ritsema et Smeekens, 2003).

Figure II.12: Modèle de synthèse des différents types de fructanes observés: inuline, lévane, néosérie inuline, néosérie levane (Lasseur et al., 2011).

Figure II.13: (A) Cristaux de saccharose (Photographie libre de droits). (B) Représentation de Fischer d'une molécule de saccharose constituée d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose.

Figure II.14: Métabolisme du saccharose dans une cellule photosynthétique (cellule source) et dans une cellule non photosynthétique (cellule puits). Les numéros correspondent aux principales enzymes: ❶ hexose phosphate isomérase, ❷ phosphoglucomutase, ❸ UDP-glucose pyrophosphorylase, ❹ saccharose-phosphate synthase (SPS), ❺ saccharose-phosphate phosphatase (SPP), ❻ invertase cytosolique, ❼ saccharose synthase (SuSy), ❽ invertase vacuolaire, ❾ invertase pariétale.

Figure II.15: Analyse des niveaux de transcrits des différents gènes SPS (A, B, C, D_{III}, D_{IV}) chez le Blé (*Triticum aestivum* L.) par northern blot. Les ARN ont été extraits dans différents tissus (Limbes, tiges, épis, gaines à partir de plantes non défoliées et défoliées (Castelden *et al.*, 2004).

Figure II.16: Changements diurnes de l'expression de la saccharose phosphate synthase (SPS) dans des feuilles sources (matures) de tabac. Quantification des signaux hybridés en utilisant un phospho-imageur. Les signaux ont été normalisés avec l'ARNr 25S (Chen *et al.*, 2005).

Figure II.17: Graphique représentant la densitométrie des spots d'un immunoblot avec des anticorps dirigés contre la SuSy de maïs dans des conditions d'éclairage varié (lumière blanche ▲, rouge ●, bleue ■) suite à un période d'obscurité chez les feuilles émergentes de graines de maïs après 7 jours de culture dans l'obscurité. Les valeurs sont exprimées (en %) de manières relatives en prenant comme référence les valeurs obtenues pour chaque jour pour le traitement laissé à l'obscurité (◆, 100%), (Qiu *et al.*, 2007).

Figure II.18: Graphique représentant l'activité du transport de saccharose dans des vésicules de plasmalemmes, réalisées à partir de feuilles de Betteraves sucrières, traitées sur différentes périodes (4, 8, 12, ou 24h) de traitements avec de l'eau (□) ou 100 mM de saccharose (■), (Chiou and Bush, 1998).

Figure II.19: Schéma représentant le chemin des molécules de saccharose d'une cellule du mésophylle par la voie symplastique et apoplastique, partant ainsi d'une cellule de tissu source vers une cellule de tissu puit (flèche grise, à droite). Les ronds rouges représentent les transporteurs de saccharose au sein des différentes membranes cellulaires et les flèches indiquent la direction du transport de saccharose. SE : tubes criblés du phloème; CC : cellule compagne; MC : cellule du mésophylle; PD : plasmodesme ; SC : cellule puits ; ULD : domaine de déchargement ; Vac : vacuole (Sauer, 2007).

Figure II.20: Tentative de prédiction de la protéine AgSUT1. Les segments transmembranaires ont été prédits grâce au logiciel HMMTOP (Tusnady et Simon, 1998) qui se base sur une comparaison différentielles des séquences de transporteurs de saccharose validés. L'alignement de séquences a été réalisé avec le programme Multialin de pbil.univ-lyon1.fr (Corpet, 1998). Les résidus peptidyl (cercle vert) sont conservés dans toutes les séquences. Les résidus de cystéine conservés sont indiqués par une flèches et les résidus chargés (+ ou -) proches des segments transmembranaires sont indiqués par un point. Le résidu asparagine localisé dans un segment transmembranaire est indiqué par une double flèche et le résidu histidine 65, qui a été le sujet d'une étude de mutagenèse est indiqué par une étoile. (Lu *et al.*, 1998 ; D'après Lemoine, 2000).

Figure II.21: Localisation intracellulaire des protéines de transport du saccharose. Ces localisations sont obtenues par mise en évidence à l'aide de marqueurs génétiques, d'immunolocalisation et d'analyses biochimiques. Suc : saccharose (Kühn and Gröf, 2010).

Figure II.22: Arbre phylogénétique représentant les transporteurs de saccharose identifiés chez les poacées ainsi que chez certaines dicotylédones. L'arbre est créé grâce au logiciel PHYLIP. Il est basé sur l'alignement des séquences protéiques de chaque transporteur par comparaison au transporteur de saccharose de *Aspergillus fumigatus* (*AfSUT*). Les transporteurs de saccharose chez le Riz (*Oryza sativa* L.) servant à former les groupes sont surlignés en bleu (Braun *et al.*, 2009).

Figure II.23: Plants d'*Arabidopsis thaliana* L. transformés et âgés de 21 jours homozygotes pour le gène *AtSUC2* (+: valide; -: invalide) (A) +/+ croissance normale, (B) +/- croissance réduite, (C) -/- croissance nulle. (D) Expression du gène XGal (coloration bleue) sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* dans un plant d'*Arabidopsis thaliana* L. âgé de 21 jours. Le marquage (flèche) met en avant une expression de *AtSUC2* au sein du complexe vasculaire. (Srivastava *et al.*, 2008).

Figure II.24: Section longitudinale d'une plantule après trois jours de germination à partir d'une graine de blé (*Triticum aestivum* L.), S; Graine; C; Coléoptile ; R; Radicelle. (Aoki *et al.*, 2006)

Figure II.25: Hybridation in situ des ARN *TaSUT1* sens (A, C) et anti-sens (B, D) sur une coupe longitudinale de graine de blé après trois jours de germination. La révélation est faite grâce à la phosphatase alcaline permettant de distinguer une coloration bleue lorsqu'il y a eu liaison entre la sonde et le réactif. A et B présentent les tissus aleurones et péricarpe. Les transcrits *TaSUT1* sont localisés dans les cellules de l'aleurone (flèches). C et D présentent une section de la région du scutellum, le signal des transcrits de *TaSUT1* (flèches) se situe à la base des cellules du scutellum. al, Aleurone; p, pericarp; se, scutellum epidermis (Aoki *et al.*, 2006).

Figure II.26: (A) Feuille cinq de Maïs (*Zea mays* L.) sauvage (1 et 2) et maïs mutant *SUT1* (3 et 4). Les images 1 et 3 sont celles sans coloration à l'IKI (Iodide de potassium iodine) en lumière du jour, et permettent de voir la sénescence qui est plus avancée pour le mutant *SUT1*. Les images 2 et 4 présentent les résultats d'une coloration sur les feuilles cinq des deux individus, il apparaît une forte accumulation d'amidon dans la feuille du mutant *SUT1*. (B) Coupes transversales (5 et 6) des feuilles 2 et 4 ayant un marquage à l'IKI. Les flèches montrent l'accumulation d'amidon dans les cellules du mésophylle et cette accumulation apparaît nettement plus marquée pour les mutants. (Slewinski *et al.*, 2009).

Figure II.27: Localisation subcellulaire de *HvSUT2* (Transporteur de saccharose chez l'Orge : *Hordeum vulgare* L.). Cette localisation est faite grâce à la construction d'un gène exprimant la protéine GFP sous le contrôle du gène *HvSUT2* dans des cellules épidermiques d'oignon. Le noyau est indiqué par la flèche blanche, mettant en évidence la position du tonoplaste, lieu où la présence de *HvSUT2* est révélée grâce à la GFP (A et B). La photographie C représente la même cellule observée au microscope à transmission sans excitation de la GFP. D'après Endler *et al.*, 2006.

Figure II.28: Analyse de l'expression des transcrits, par RT-PCR semi quantitative, des cinq gènes (*OsSUT1,2,3,4,5*), pour différents tissus : graines germées et racines âgées de sept jours après germination, feuilles puits récoltées trois semaines avant épiaison, gaines source et feuilles source récoltées une semaine après épiaison, gaines sources récoltées une semaine avant épiaison, panicules entières récoltées 10 jours après épiaison, (Aoki *et al.*, 2003).

Figure II.29: Modèle de l'interface de la compétition bi-directionnelle pour le saccharose extracellulaire entre la plante et le champignon pathogène. (SUC : transporteur de saccharose végétal, SRT1: transporteur de saccharose fongique à haute affinité, Inv: invertase extracellulaire végétale, STP: transporteur d'hexoses végétal, H⁺: protons). (Wahl *et al.*, 2010).

Figure II.30: Localisation de l'activité du promoteur d'*AtSUC3* dans les grains de pollen d'*Arabidopsis thaliana* L. (A) Expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur d'*AtSUC3* (*AtSUC3*-promoteur::GUS). Le marquage bleu indique la présence d'*AtSUC3* dans les grains de pollen dans une anthère fermée. (B) Fluorescence verte des grains de pollen d'une anthère ouverte, le marquage est réalisé à l'aide d'une construction GFP (*AtSUC3*-promoteur::GFP). (C) Fluorescence verte dans le tube pollinique en croissance. Le marquage est réalisé à l'aide d'une construction GFP (*AtSUC3*-promoteur::GFP) (Meyer *et al.*, 2004).

Figure II.31: Abondance de la protéine BvSUT1 et activité de transport de saccharose de BvSUT1 en fonction de la concentration de l'apport de saccharose dans les 24 heures chez la Betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.). (A) Western blot de la protéine BvSUT1 sur des extraits de vésicules de plasmalemmes de betterave en fonction de l'apport en saccharose. (B) Force proton motrice (■) et transport d'alanine (témoin; □) sur les mêmes vésicules de plasmalemmes de betterave (Vaughn *et al.*, 2002).

Figure III.1: (A) Transverse section of a vein in a leaf blade of *Lolium perenne*. Companion cells (CC); mestome sheath (MS); parenchymatous bundle sheath (PBS); phloem parenchyma cells (PC); thick walled sieve element (Tk); thin walled sieve element (Tn); xylem vessels (X). (B) Percentage of plasmolyzed cells (\pm SE) at different osmolarities. Companion cells (CC), phloem parenchyma cells (PC), thick-walled sieve elements (SE_{Tk}), thin-walled sieve elements (SE_{Tn}). n.s., cell types were not significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA). Cell types showing the different letters were statistically different at $p < 0.05$ for each osmolarity.

Figure III.2: (A) Proton-motive-force-dependent uptake of 1 mM Suc as a function of time in plasma membrane vesicles from ryegrass leaf sheaths. The results are expressed as pmf-dependent uptake (total uptake – uptake in the presence of 10 μ M CCCP). The results are the mean \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). (B) Proton-motive-force-dependent uptake rate of Suc (measured during the first 15 s) as a function of Suc concentration in plasma membrane vesicles from ryegrass leaf sheaths. The results are expressed as pmf-dependent uptake (total uptake – uptake in the presence of 10 μ M CCCP). The results are the mean \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). The inset shows a Lineweaver-Burk plot of the uptake data.

Figure III.3: Phylogenetic tree for 52 confirmed Suc transporter sequences from publicly accessible databases. The transporters presented are: AbSUT1 (*Asarina barclaiana*; AAF04294), AmSUT1 (*Alonsoa meridionalis*; AAF04295), AtSUC1 (*Arabidopsis thaliana*; At1g71880), AtSUC2 (At1g22710), AtSUC3 (At2g02860), AtSUC4 (At1g09960), AtSUC5 (At1g71890), AtSUC6 (At5g43610), AtSUC7 (At1g66570), AtSUC8 (At2g14670), AtSUC9 (At5g06170), BoSUC1 (*Brassica oleracea*; AAL58071), BoSUC2 (*B. oleracea*; AAL58072), BoSUT5 (*Bambusa oldhamii*; AAY43226), CsSUT2 (*Citrus sinensis*; AAM29153), DcSUT1 (*Daucus carota*; BAA89458), EuSUT2 (*Eucommia ulmoides*; AAX49396), HbSUT2a (*Hevea brasiliensis*; ABJ51934), HbSUT2b (*H. brasiliensis*; ABJ51932), HbSUT5 (*H. brasiliensis*; ABK60189), HvSUT1 (*Hordeum vulgare*; CAB75882), HvSUT2 (*H. vulgare*; CAB75881), JrSUT1 (*Juglans regia*; AAU11810), LeSUT2 (*Lycopersicon esculentum*; AAG12987), LeSUT4 (*L. esculentum*; AAG09270), LjSUT4 (*Lotus japonicus*; CAD61275), LpSUT1 (*Lolium perenne*; EU255258), MdSUT1 (*Malus x domestica*; AAR17700), MeSUT2 (*Manihot esculenta*; ABA08445), MeSUT4 (*M. esculenta*; ABA08443), NtSUT3 (*Nicotiana tabacum*; AAD34610), OsSUT1 (*Oryza sativa*; AAF90181), OsSUT2 (*O. sativa*; BAC67163), OsSUT3 (*O. sativa*; BAB68368), OsSUT4 (*O. sativa*; BAC67164), OsSUT5 (*O. sativa*; BAC67165), PmSUC1 (*Plantago major*; CAI59556), PmSUC2 (*P. major*; X75764), PmSUC3 (*P. major*; CAD58887), Pt X PtSUT1-1 (*Populus tremula* •

Populus tremuloides; CAJ33718), PsSUT1 (*Pisum sativum*; AAD41024), RcSCR1 (*Ricinus communis*; CAA83436), ShSUT1 (*Saccharum hybridum*; AAV41028), SoSUT1 (*Spinacea oleracea*; Q03411), StSUT1 (*Solanum tuberosum*; CAA48915), StSUT4 (*S. tuberosum*; AAG25923), TaSUT1A (*Triticum aestivum*; AAM13408), TaSUT1B (*T. aestivum*; AAM13409), TaSUT1D (*T. aestivum*; AAM13410), ZmSUT1 (*Zea mays*; BAA83501), ZmSUT2 (*Z. mays*; AAT51689), ZmSUT4 (*Z. mays*; AAS91375). Protein sequences were aligned with the program CLUSTAL (Chenna et al., 2003) and the tree was calculated using the program PHYLODENDRON© (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>). Bar indicates the evolutionary distance. The sequences fall into five groups: Group 1 (red) and 5 (purple) contain only sequences from monocot, group 2 (green) contain only sequences from dicot, while the two other groups (3, blue and 4, yellow) contain sequences from both monocot and dicot species (Braun and Slewinski, 2009).

Figure III.4: Growth of yeast transformants on complete media (YNB glucose, tryptophan and uracil) (A) and on media supplemented with Suc as the sole carbon source (B). No transformed yeasts and empty vector pDR195 were used as negative controls. In (B), yeasts were plated on synthetic minimal media containing 2% (w/v) Suc at pH 4.0 and 20 mg l⁻¹ tryptophan and grown for 10 days at 28°C. (C) Time course of Suc uptake. SUSY7/ura3 yeast transformed with LpSUT1 in pDR195 (triangles) or empty pDR195 vector (squares) were assayed for ¹⁴C-Suc uptake at 1 mM Suc and pH 4.0. The results are means ± SD of two independent experiments (four replicates per experiment). (D) Concentration dependence of Suc transport in transgenic yeast cells expressing LpSUT1. Suc uptake rates of SUSY7/ura3 control cells (with the pDR195 plasmid) were subtracted from Suc uptake rates of LpSUT1-expressing cells to determine the LpSUT1-dependent Suc uptake rates at different Suc concentrations. The results are means ± SD of two independent experiments (four replicates). The inset shows a Lineweaver-Burk plot of the uptake data.

Figure III.5: (A). Schematic view of a tiller of *Lolium perenne* L. In a tiller at vegetative stage, stems are reduced to a few mms. A mature leaf is composed of a blade and a sheath. The growing part of the leaves is confined to their basal region, which is enclosed by the sheaths of older leaves. Accumulation of *LpSUT1* mRNA in *L. perenne* tissues. Total RNA was isolated from various tissues as indicated and subjected to semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis using *L. perenne* 18S rRNA as an internal control. R, roots; ELB, elongating leaf bases; S, sheaths; (B), blades. (B) After defoliation, leaf sheaths do not regrow. Elongating leaf bases reproduced their own length in two days. Sheaths were separated from elongating leaves and were dissected longitudinally in five 10 mm-long segments (numbers 1 to 5).

Figure III.6: Proton-motive-force-dependent uptake of 1 mM Suc as a function of time in plasma membrane vesicles from undefoliated ryegrass leaf sheaths (◇), 1 h-defoliated leaf sheaths (▲) and 6 h-defoliated leaf sheaths (●). The results are expressed as pmf-dependent uptake (total uptake – uptake in the presence of 10 μM CCCP). The results are the mean ± SD of two independent experiments (three replicates per experiment).

Figure III.7: Distribution of fructans (■) and Suc (○) (mg g⁻¹ dry wt) as well as real time qPCR analysis of LpSUT1 expression in leaf sheaths of *Lolium perenne*. After 8 weeks of growing, plants were defoliated (A) and allowed to regrow for 6 h (B), 24 h (C) and 72 h (D). Sheaths were dissected longitudinally in five 10 mm-long segments (Fig. III.5). Transcript levels produced by real-time qPCR are compared with 18S rRNA transcripts and expressed as a ratio relative to the control point, i.e. segment 1 of undefoliated plants. Vertical bars represent ± SE (n=3). Where no error bar is included, the error was smaller than the symbol.

Figure IV.1: Phylogenetic tree for 53 confirmed Suc transporter sequences from publicly accessible databases. The transporters presented are: AbSUT1 (Asarina barclaiana; AAF04294), AmSUT1 (Alonsoa meridionalis; AAF04295), AtSUC1 (Arabidopsis thaliana; At1g71880), AtSUC2 (At1g22710), AtSUC3 (At2g02860), AtSUC4 (At1g09960), AtSUC5 (At1g71890), AtSUC6 (At5g43610), AtSUC7 (At1g66570), AtSUC8 (At2g14670), AtSUC9 (At5g06170), BoSUC1 (Brassica oleracea; AAL58071), BoSUC2 (B.oleracea; AAL58072), BoSUT5 (Bambusa oldhamii; AAY43226), CsSUT2 (Citrus sinensis; AAM29153), DcSUT1 (Daucus carota; BAA89458), EuSUT2 (Eucommia ulmoides; AAX49396), HbSUT2a (Hevea brasiliensis; ABJ51934), HbSUT2b (H. brasiliensis; ABJ51932), HbSUT5 (H. brasiliensis; ABK60189), HvSUT1 (Hordeum vulgare; CAB75882), HvSUT2 (H. vulgare; CAB75881), JrSUT1 (Juglans regia; AAU11810), LeSUT2 (Lycopersicum esculentum; AAG12987), LeSUT4 (L. esculentum; AAG09270), LjSUT4 (Lotus japonicus; CAD61275), LpSUT1 (Lolium perenne; EU255258), LpSUT2 (L. perenne; GQ396637), MdSUT1 (Malus x domestica; AAR17700), MeSUT2 (Manihot esculenta; ABA08445), MeSUT4 (M. esculenta; ABA08443), NtSUT3 (Nicotiana tabacum; AAD34610), OsSUT1 (Oryza sativa; AAF90181), OsSUT2 (O. sativa; BAC67163), OsSUT3 (O. sativa; BAB68368), OsSUT4 (O. sativa; BAC67164), OsSUT5 (O. sativa; BAC67165), PmSUC1 (Plantago major; CAI59556), PmSUC2 (P. major; X75764), PmSUC3 (P. major; CAD58887), Pt X PtSUT1-1 (Populus tremula • Populus tremuloides; CAJ33718), PsSUT1 (Pisum sativum; AAD41024), RcSCR1 (Ricinus communis; CAA83436), ShSUT1 (Saccharum hybridum; AAV41028), SoSUT1 (Spinacea oleracea; Q03411), StSUT1 (Solanum tuberosum; CAA48915), StSUT4 (S. tuberosum; AAG25923), TaSUT1A (Triticum aestivum; AAM13408), TaSUT1B (T. aestivum; AAM13409), TaSUT1D (T. aestivum; AAM13410), ZmSUT1 (Zea mays; BAA83501), ZmSUT2 (Z. mays; AAT51689), ZmSUT4 (Z. mays; AAS91375). Protein sequences were aligned with the program CLUSTAL (Chenna et al., 2003) and the tree was calculated using the program PHYLODENDRON© (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/>). The horizontal bar (right bottom of the figure) indicates the evolutionary distance. The sequences fall into five clades: Group 1 (red) and 5 (purple) only contain sequences from monocot, group 2 (green) only contains sequences from dicot, while the two other groups (3, blue and 4, yellow) contain sequences from both monocot and dicot species (Braun and Slewinski, 2009).

Figure IV.2: (A) LpSUT1 HRM profiles of 96 plants of the F2 progeny showing three distinct groups of genotypes (blue, red and green). Upper graph represents the normalized and temperature shifted melting curves for all genotypes and the lower graph represents the difference between a reference normalized and temperature shifted melting curve (a blue one) and the one of each genotype. (B) LpSUT2 HRM profiles of 96 plants of the F2 progeny showing two distinct groups of genotypes (blue and red). Upper graph represents the normalized and temperature shifted melting curves for all genotypes and the lower graph represents the difference between a reference normalized and temperature shifted melting curve (a blue one) and the one of each genotype.

Figure IV.3: Map locations of LpSUT1 and LpSUT2 on linkage group (LG) four and six of perennial ryegrass

Figure IV.4: (A) Uptake of sucrose by transgenic Saccharomyces cells. During uptake, the sucrose concentration was 0.5 mM and the external pH 4.5. Triangles represent uptake by cells transformed with LpSUT2, and squares represent sucrose uptake by control cells transformed with the plasmid YEP112A1XE. The results are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). (B) pH-dependence of sucrose transport in transgenic yeast cells expressing LpSUT2. Measurements were performed at 0.5 mM Suc in YNB medium containing MES buffered at the indicated pH. Incubation time was 3 min. Sucrose

uptake rates of SUSY7/trp1 control cells (with the YEP112A1XE plasmid) were subtracted from sucrose uptake rates of LpSUT2-expressing cells. The results are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). C: Concentration-dependence of sucrose transport in transgenic yeast cells expressing LpSUT2. Sucrose uptake rates of SUSY7/trp1 control cells (with the YEP112A1XE plasmid) were subtracted from sucrose uptake rates of LpSUT2-expressing cells to determine the LpSUT2-dependent sucrose uptake rates at different sucrose concentrations. The results are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). The inset shows a Lineweaver-Burk plot of the uptake data which was used for the determination of kinetic parameters (V_{max} and K_m).

Figure IV.5: Inhibition and substrate specificity of LpSUT1 and LpSUT2 expressed in yeast cells. Inhibitors and competing sugars were added 30 s before the addition of sucrose to the assay. Except for α -phenylglucoside (10 mM), esculin (5 mM), biotin (1 mM) and quercetin (0.25 mM) that were added at their limits of solubility, competing sugars were supplied in 4-fold higher concentrations compared to sucrose. Control samples were treated in parallel: 100% = 22.44 ± 0.84 nmol Suc. mg⁻¹ protein. min⁻¹ for LpSUT1 and 100% = 157.74 ± 11.29 nmol Suc. mg⁻¹ protein. min⁻¹ for LpSUT2. In order to determine the LpSUT-dependent sucrose uptake rates, sucrose uptake rates of control cells (with the empty plasmid) were subtracted from sucrose uptake rates of LpSUT-expressing cells. The results are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment).

Figure IV.6: Real-time qPCR analysis of LpSUT1 and LpSUT2 expression in elongating leaf bases and leaf sheaths of *Lolium perenne* L. plants. As shown on the schematic view of one tiller, elongating leaf bases and leaf sheaths were dissected longitudinally in five 1 cm length segments. **A, C:** sucrose content in segments of leaf sheaths and elongating leaf bases, respectively. **B, D;** LpSUT1 (closed bars) and LpSUT2 (open bars) transcript levels in segments of leaf sheaths and elongating leaf bases, respectively. The data for sucrose content are means \pm SD of two independent experiments (three replicates per experiment). Expression levels produced by real-time qPCR are normalized with 18S rRNA transcripts and are expressed as a ratio relative to the control point, which was segment 1 (for **B** and **C**) and segment 1 of undefoliated plants (for **D**). Vertical bars were calculated according to the geometric average method (as described by Vandesompele *et al.*, 2002).

Figure IV.7: Real-time qPCR analysis of LpSUT1 and LpSUT2 expression in elongating leaf bases and leaf sheaths of *Lolium perenne* L. plants regrowing after defoliation. As shown on the schematic view of one tiller, elongating leaf bases and leaf sheaths were dissected longitudinally in five 1 cm length segments. LpSUT1 transcript level (**A, C**) and LpSUT2 (**B, D**) in the segments of leaf sheaths (**A, B**) and elongating leaf bases (**C, D**) of defoliated plants at the time of defoliation (0h) and after 3, 6 and 24 hours of regrowth. Expression levels produced by real-time qPCR are normalized with 18S rRNA transcripts and are expressed as a ratio relative to the control point, which was segment 1 at the time of defoliation (0h). Vertical bars were calculated according to the geometric average method (as described by Vandesompele *et al.*, 2002).

Figure IV.8: Immunolocalization of LpSUT1 (**C** and **D**) or LpSUT2 (**E** and **F**) proteins in leaf sheaths sections (3-5 cm) from ryegrass plants that had been undefoliated (**C** and **E**) or 24 h following defoliation (**D** and **F**). **A** and **B:** Control leaf sheaths section. No labeling was initially detected within these tissues. **C:** Distribution of LpSUT1 protein in leaf sheath from undefoliated plants. **D:** Distribution of LpSUT1 protein in leaf sheath from plants 24 h following defoliation. **E:** Distribution of LpSUT2 protein in leaf sheath from undefoliated plants. **F:** Distribution of LpSUT2 protein in leaf sheath from plants 24 h following defoliation. Green labeling shows

detection of LpSUT1 (**C** and **D**) or LpSUT2 (**E** and **F**) by specific antibodies. Chloroplasts appear in blue. cz, conducting zone; els, external leaf sheath; ils, internal leaf sheath; mx, metaxylem; pc, phloem parenchyma cell; x, xylem. Scale bar = 100 μ m.

Figure IV.9: Distribution of H⁺-ATPase protein in the leaf sheaths of undefoliated plants. **A:** Control leaf sheaths section. No labeling was detected within these sections. **B:** Leaf sheath section was challenged with anti-H⁺-ATPase antibodies and Alexa-conjugated second antibodies (signal appears in green). cz, conducting zone; els, external leaf sheath; ils, internal leaf sheath; pc, phloem parenchyma cell; x, xylem. Scale bar = 100 μ m.

Figure IV.10: Immunolocalization of LpSUT1 and LpSUT2 proteins in elongating leaf bases sections from ryegrass plants that had been undefoliated (**C** and **E**) or 24 h following defoliation. **A,** Control. No labeling was detected in control. **B,** Distribution of LpSUT1 protein in elongating leaf base from undefoliated plants. **C,** Distribution of LpSUT1 protein in elongating leaf base from plants 24 h following defoliation. **D,** Distribution of LpSUT2 protein in elongating leaf base from undefoliated plants. **E,** Distribution of LpSUT2 protein in elongating leaf base from plants 24 h following defoliation. Green labeling shows detection of LpSUT1 (**B** and **C**) or LpSUT2 (**D** and **E**) with specific antibodies. Chloroplasts appear in blue. cz, conducting zone; elb, elongating leaf base; els, external leaf sheath; ils, internal leaf sheath; mx, metaxylem; pc, phloem parenchyma cell; x, xylem. Scale bar = 100 μ m.

Figure V.1: Schematic representation (**A**) of a rye-grass tiller (comprising leaf blades, leaf sheaths, elongating leaf base and roots) and (**B**) plant culture and light treatments. Two weeks prior to defoliation six weeks old, plants were separated in two groups and placed under high light (PAR 100%) or low light (PAR 25%). After, these two initial weeks of treatment, all plants were defoliated at 5 cm height (T_0), and each group of plant was either grown under high (100% PAR) or low (25% PAR) light conditions during 3, 6, 24, 48, 168 and 336h of regrowth. Four treatments were then generated as follows: 100-100; 100-25; 25-100; 25-25.

Figure V.2: Whole plant regrowing leaf area (**A**), leaf sheath dry matter (**B**) and elongating leaf base dry matter (**C**) of perennial rye-grass submitted to different light regimes: 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), during the 336h of regrowth after defoliation. When larger than symbols, vertical bars represent \pm S.E. of the mean for n=3.

Figure V.3: Content of fructans in leaf sheath (**A**) and elongating leaf bases (**B**) of perennial rye-grass for treatments 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), during the 336h of regrowth after defoliation. When larger than symbols, vertical bars represent \pm S.E. of the mean for n=3.

Figure V.4: Content of sucrose in leaf sheaths (**A**) and elongating leaf bases (**B**) of perennial ryegrass that were treated with treatments 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), during the 336h of regrowth after defoliation. When larger than symbols, vertical bars represent \pm S.E. of the mean for n=3.

Figure V.5: Relative expression of perennial rye-grass Sucrose Transporter 1 transcript level for treatment 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), in leaf sheaths (**A**) or elongating leaf bases (**B**) during the 336h of regrowth after defoliation. Vertical bars represent + abs max value, - abs min value of the mean for n=3, when larger than symbols. For each treatment, all value are compared to T_0 initial value of the studied treatment.

Figure V.6: Relative expression of perennial rye-grass Sucrose Transporter 2 transcript level for treatments 100-100 (closed circles), 100-25 (open circles), 25-100 (closed squares), 25-25 (open squares), in leaf sheaths (A) or elongating leaf bases (B) during the 336h of regrowth after defoliation. Vertical bars represent + abs max value, - abs min value of the mean for n=3, when larger than symbols. For each treatment, all values are compared to t0 initial value of the studied treatment.

Figure VI.1: (A) Photographie de chaumes de Ray-grass anglais. (B) Représentation schématique de la coupe d'une talle de Ray-grass anglais présentant sa composition et la structure de la base de feuille en croissance. (C) Coupe transversale colorée à l'acridine orange au niveau du collet. (D) Coupe transversale colorée à l'acridine orange dans la zone. (E) Coupe transversale colorée à l'acridine orange de l'étage médian avec gaine âgée et BFC formée. Abréviations : a, aérénchyme ; b, base de feuille en croissance ; f, faisceau conducteur ; ge, gaine externe ; gi, gaine interne ; p, phloème ; x, xylème.

Figure VI.2: A, B, C, D. Coupe transversale d'une gaine de Ray-grass anglais. E. Représentation schématique de la coupe d'une gaine. F, G, H, I. Coupe transversale d'une base de feuille de croissance de Ray-grass anglais. J. Représentation schématique de la coupe d'une base de feuille en croissance. K. Faisceau collatéral fermé dans le chaume de Blé, d'après Speranza et Calzoni, 2004. L. Faisceau conducteur dans le chaume de Ray-grass anglais coloré à l'acridine orange. Le cyan correspond à la structure (A, F), le vert correspond à la fluorescence due à l'Alexa 488 (B, G), le bleu correspond à l'autofluorescence de la chlorophylle (C, H). Abréviations : a, aérénchyme ; eab, épiderme abaxiale ; ead, épiderme adaxiale ; fx, fibre de xylème ; gpf, gaine périfasciculaire ; p, phloème ; px, parenchyme xylémien ; vmx, vaisseau du métaxylème ; vpx, vaisseau du protoxylème.

Figure VI.3: Cadre conceptuel représentant le fonctionnement d'une talle de Ray-grass anglais avant défoliation. Les différents compartiments structuraux (limbes et gaines des feuilles matures, parties émergées et bases de feuilles en croissance composées de la zone de division, d'élongation et de différenciation cellulaires, racines et phloème). Le statut puits ou source vis-à-vis du carbone est aussi indiqué entre parenthèse. L'épaisseur des flèches (en noir) indique la quantité de C potentiellement mise en jeu, notamment pour son utilisation (*Util.*): respiration et croissance des tissus. Les principaux compartiments métaboliques sont les trioses-phosphate (TP) au niveau des chloroplastes (*Chl.*), les fructanes au niveau des vacuoles (*Vac.*) et le saccharose (GF) circulant au sein des tissus et entre les tissus *via* les faisceaux conducteurs de phloème. Les transporteurs de saccharose (principalement LpSUT1) sont représentés (carrés rouges hachurés) et permettent l'orientation des flux entre organes.

Figure VI.4: Cadre conceptuel représentant le fonctionnement d'une talle de Ray-grass anglais immédiatement après défoliation. Les différents compartiments structuraux (gaines des feuilles matures, bases de feuilles en croissance composées de la zone de division, d'élongation et de différenciation cellulaires, racines et phloème). Les zones de division, d'élongation et de différenciation sont représentées pour la BFC. Le statut puits ou source vis-à-vis du carbone est aussi indiqué entre parenthèses. L'épaisseur des flèches (en noir) indique la quantité de C potentiellement mise en jeu, notamment pour son utilisation (*Util.*): respiration et croissance des tissus. Les principaux compartiments métaboliques sont les trioses-phosphate (TP) au niveau des chloroplastes (*Chl.*), les fructanes au niveau des vacuoles (*Vac.*) et le saccharose (GF) circulant au sein des tissus et entre les tissus *via* les faisceaux conducteurs de phloème. Les transporteurs de saccharose (principalement LpSUT1) sont représentés (carrés rouges hachurés) et permettent l'orientation des flux entre organes.

Figure VII.1: Schéma hypothétique des mécanismes concourant à la repousse des Poacées prairiales pérennes comme le Ray-grass anglais. La défoliation entraîne une diminution immédiate de la teneur en saccharose dans le phloème (Amiard *et al.*, 2004). Cette diminution pourrait provoquer l'efflux de saccharose des vacuoles des cellules des gaines et des BFC contenant les fructanes. Il s'ensuivrait une activation des fructane-exohydrolases (FEHs) préexistantes (Marx *et al.*, 1997) et le déclenchement de l'hydrolyse des fructanes. Le fructose produit inhiberait le transport de saccharose par LpSUT2, ce qui déclencherait une voie de transmission de signal aboutissant à l'augmentation de l'activité FEH (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001), l'augmentation de l'activité de synthèse du saccharose et/ou l'augmentation de la transcription du gène *LpSUT1*. Cette dernière pourrait aussi être déclenchée à la suite de la perception de la diminution de la teneur en saccharose dans le phloème. L'ensemble de ces mécanismes participent à la production foliaire et donc à la repousse. Les flèches rouges correspondent à des voies de transmission de signal; les formes étoilées symbolisent les sites de perception du signal.

Table des tableaux

Tableau II.1: Composition chimique et valeurs nutritives de l'ensilage et de différents mélanges (graminées, graminée-Luzerne, graminée-Trèfles) cultivés sur prairies. Les valeurs de composition et les valeurs nutritives sont indiquées en g/kg MS et la composition botanique est exprimée en pourcentage total. NDF : Neutral Detergent Fibre; ADF : Acid Detergent Fibre; NEL : Energie Nette pour la production Laitière; PAIE : Protéine Assimilable dans l'Intestin synthétisées à partir de l'énergie fermentescible; PAIN : Protéine Assimilable dans l'Intestin synthétisées à partir de la matière azotée dégradable (Morell *et al.*, 2006).

Tableau II.2: Tableau représentant la souplesse d'utilisation (intervalle de temps entre le départ en végétation et le début d'épiaison) au travers de la précocité d'épiaison de différentes espèces telles que la fétuque, le brome, etc. Ces valeurs correspondent aux dates relevées en moyenne dans le bassin parisien. Source www.prairies-gnis.org

Tableau II.3: Nombre de talles (\pm S.E.) par plante immédiatement (J0) et après 7 jours de repousse (J7) pour des Ray-grass anglais cultivées sur un milieu riche (2mM) ou non (0,2 mM) en azote. SD: simple défoliation RD: défoliations répétées. (le nombre indiqué entre parenthèses indique le pourcentages de parties aériennes supprimées; 100% : suppression totale (Lestienne *et al.*, 2006).

Table III.1: Effect of various inhibitors and competing sugars on Suc uptake into plasma membrane vesicles obtained from ryegrass leaf sheaths. The Suc concentration was 3 mM and the incubation time was 15 s. The results are expressed as pmf-dependent uptake (total uptake – uptake in the presence of 10 μ M CCCP). Control samples were treated in parallel: 100% = 42.58 ± 0.58 nmol Suc mg⁻¹protein 15s⁻¹. The results are the mean of two independent experiments (three replicates per experiment). Because some data did not fit the parametric tests conditions, we choose to analyze transport activity by the non parametric test of Kruskal-Wallis (Sokal and Rohlf, 2003), and then by the signed-ranks test. Letters beside the activity indicate statistical significance.

Table III.2: Inhibition and substrate specificity of LpSUT1 expressed in yeast cells. The Suc concentration was 10 mM and the incubation time was 3 min. Inhibitors were added 30 s before the addition of Suc to the assay. Control samples were treated in parallel: 100% = 22.44 ± 0.84 nmol Suc mg⁻¹protein min⁻¹. In order to determine the LpSUT1-dependent Suc uptake rates, Suc uptake rates of SUSY7/ura3 control cells (with the

pDR195 plasmid) were subtracted from Suc uptake rates of LpSUT1-expressing cells. The results are means \pm SD of two independent experiments (four replicates). Some data did not fit the parametric tests conditions, we choose to analyse transport activity by the non parametric test of Kruskal-Wallis (Sokal and Rohlf, 2003), and then by the signed-ranks test. Letters beside the activity indicate statistical significance.

Annexes

X. ANNEXES

Annexes 1 : Poster - 8th National Meeting of the French Society of Plant Biology, 2009, Strasbourg (France)

Activation of sucrose transport in defoliated *Lolium perenne* L.: an example of apoplastic phloem loading plasticity

Berthier¹ A., Desclos M., Amiard V., Morvan-Bertrand¹ A., Demmig-Adams B., Adams III W.W., Turgeon R., Prud'homme M-P., Noiraud-Romy N.

alexandre.berthier@etu.unicaen.fr

¹UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie and nutrition NCS, irba, Esplanade de la Paix, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.

- Forage grasses are the backbone of sustainable agriculture and contribute extensively to the world economy.
- *Lolium perenne* (perennial ryegrass) is the major food source for grazing sheep and cattle.
- It is therefore submitted to repeated cut/regrowth cycles during year.

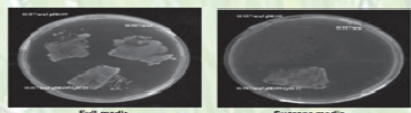
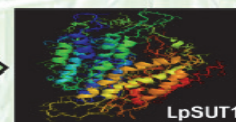


Why perennial ryegrass has a great regrowth potential after defoliation ?

- The position of leaf meristem and reserves are beyond the reach of animals and machines.
- Perennial ryegrass uses fructans (fructose polymers) as carbon storage compounds which are located mainly in leaf sheaths and in ELB.
- Fructose arising from fructan degradation is not transported *per se*, but is instead converted to sucrose and transported in the phloem sap from leaf sheaths to ELB after defoliation.

Objective: Identification and characterization of sucrose transporters in ryegrass

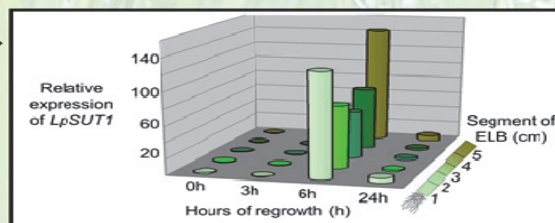
The first sucrose transporter in *Lolium perenne* L. was isolated from stubble (including leaf sheaths) cDNA libraries. After repeated screenings positive clones were isolated and sequenced. The longest cDNA was fully sequenced and named *LpSUT1* (*Lolium perenne* SUCroseTransporter 1, GenBank accession EU255258). The deduced protein is 522 amino acids long and showed highest homology with HvSUT1.



To determine whether *LpSUT1* protein is functional as a Suc transporter, *LpSUT1* cDNA was cloned into a yeast expression vector (pDR195) and transformed into the *Saccharomyces* strain SUSY7/ura3 that contains a deletion of the *SUC2* gene (invertase). Growth of the transformed yeasts on media containing sucrose as sole carbon source indicate that *LpSUT1* encodes a functional sucrose transporter.

What is the effect of defoliation on sucrose transporter expression in ryegrass ?


The level of expression of *Lolium perenne* Sucrose Uptake Transporter 1 (*LpSUT1*) was therefore followed in elongating leaf bases (ELB) during the 24 hours following defoliation. *LpSUT1* transcript levels increase specifically after 6h of regrowth all along the ELB.



In conclusion, amongst all putative transporters (see phyl tree) which will be further studied, *LpSUT1* was the first Sucrose transporter which was identified and characterized in *Lolium perenne* L. The final aim of this work will be to better explain and understand the mechanisms of sucrose transport during regrowth after defoliation.

This work was funded by INRA dept. Environnement Agronomie, dept. Biologie Végétale and région Basse-Normandie.


Annexe 2 : Oral-Poster - 15th International Workshop Plant Membrane Biology, 2010, Adélaïde (South Australia).



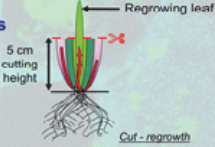
Activation of sucrose transport in defoliated *Lolium perenne* L.: an example of apoplastic phloem loading plasticity

Berthier¹ A., Desclos¹ M., Meuriot¹ F., Amiard^{2,4} V., Morvan-Bertrand¹ A., Demmig-Adams³ B., Adams³ III W.W., Turgeon² R., Dedaldechamp⁵ F., Lemoine⁵ R., Prud'homme M-P¹., Noiraud-Romy N¹.

¹UMR INRA-UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments NCS, rba, Esplanade de la Paix, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France.
²Department of Plant Biology, Cornell University, Plant Science Building, Ithaca, NY 14853, USA
³Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Colorado, Boulder, CO 80309-0334, USA
⁴Present address: Centro de Genética Nutricional Agropecuaria, Unidad de Biotecnología de Plantas, INIA-Carilanca, Casilla 68-D, Temuco, Chile
⁵UMR 6503, CNRS/Université de Poitiers, PHYMOTS, Avenue du recteur Pineau, 82022 Poitiers, France.



Leaf blade (mature leaf)
Elongating leaf
Leaf sheath (mature leaf)
Ryegrass tiller

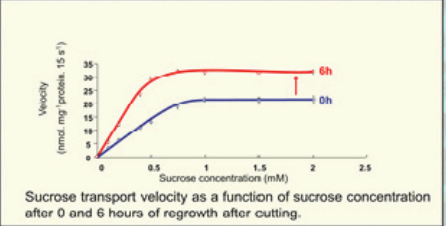


Regrowing leaf
5 cm cutting height
Cut - regrowth

- Amongst grassland, perennial rye-grass is the most represented forage species.
- Grown for livestock feeding, it has great regrowth capacity after cutting, which seems to be related to the fast mobilization of C storage compounds like fructans.
- Sucrose arising from fructan mobilization is loaded in the phloem sap from leaf sheaths towards regrowing leaves.
- Sucrose transporters have been identified in several grasses, but not in ryegrass.

Objective: Identification, characterization and localization of rye-grass sucrose transporter(s).

1 Sucrose uptake in PM vesicles

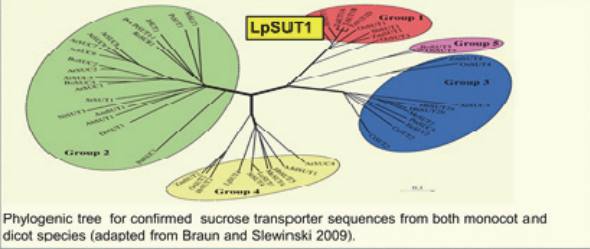


Sucrose transport velocity as a function of sucrose concentration after 0 and 6 hours of regrowth after cutting.

Berthier et al., 2009, Plant and Cell Physiology.

Sucrose transport appeared as an active, transient and saturable phenomenon, therefore implicating proteic transporter regulated by defoliation.

2 Identification of sucrose transporter(s)

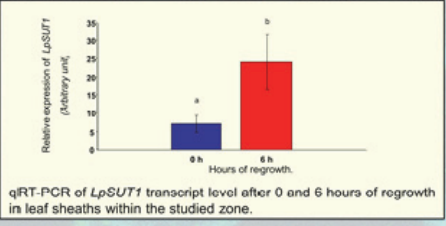


Phylogenetic tree for confirmed sucrose transporter sequences from both monocot and dicot species (adapted from Braun and Slewinski 2009).

Berthier et al., 2009, Plant and Cell Physiology.

A sucrose transporter was successfully isolated, identified, functionally expressed in yeast, and named *Lolium perenne* Sucrose Transporter 1 (*LpSUT1*).

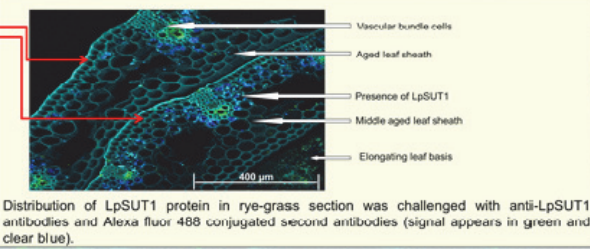
3 LpSUT1 expression



qRT-PCR of *LpSUT1* transcript level after 0 and 6 hours of regrowth in leaf sheaths within the studied zone.

LpSUT1 transcript level was induced during regrowth after defoliation.

4 LpSUT1 immuno-localization



Distribution of LpSUT1 protein in rye-grass section was challenged with anti-LpSUT1 antibodies and Alexa fluor 488 conjugated second antibodies (signal appears in green and clear blue).

LpSUT1 was mainly immunolocalized around leaf sheaths bundle cells, which supports an active apoplastic phloem plasticity.

The fast regrowth capacity of rye-grass is supported by one or several sucrose transporters, fastly induced after cutting and LpSUT1 could be the most promising.

Berthier et al., 2009, Plant and Cell Physiology. This work was funded by INRA (Environnement Agronomie et Biologie Végétale Dept.) and Région Basse-Normandie. Background picture: Confocal microscopy of leaf sheath bundle cells.

BERTHIER Alexandre, 2011.

Transport du saccharose chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) : réponse à la défoliation et à l'intensité lumineuse. Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement / Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée / Thèse de l'Université de Caen.

Résumé :

Nous avons cherché à *i*) déterminer la nature du transport de saccharose, *ii*) isoler, caractériser et localiser un ou des transporteurs de saccharose (SUTs) et *iii*) voir si ces SUTs répondent à la défoliation ou à une variation d'intensité lumineuse avant et/ou après coupe chez le Ray-grass anglais.

Le transport de saccharose est de nature apoplastique. Il fait intervenir une famille multigénique de SUTs, pour la première fois identifiés chez le Ray-grass (LpSUT1, LpSUT2). La caractérisation fonctionnelle de LpSUT2, qui possède une boucle cytoplasmique interne, est une première chez les Monocotylédones. LpSUT2 est inhibé par le fructose, résultat remarquable chez une plante à fructanes, suggérant qu'il pourrait être le site de perception d'un signal sucre. Le suivi de l'expression ainsi que la localisation de ces transporteurs, principalement au niveau du mésophylle, suggèrent qu'ils jouent un rôle clé dans la distribution des ressources C au sein de la plante entière en repousse. Le niveau d'expression des transcrits *LpSUT1* augmente dans les premières heures suivant la coupe et semble régulé par la teneur en saccharose. LpSUT1 serait impliqué dans le transport latéral de saccharose associé à la mise en réserve et/ou à la mobilisation des fructanes. Les transcrits *LpSUT2* sont insensibles à la coupe, par contre ils sont modulés par l'intensité lumineuse avant et/ou après coupe, ce qui semble aller de pair avec le rôle suggéré de LpSUT2. Etant donné que ni LpSUT1, ni LpSUT2 n'est localisé dans les tissus du phloème, cela suggère l'existence d'autres SUTs. Les résultats acquis permettent de mieux comprendre la repousse d'une Poacée prairiale pérenne accumulatrice de fructanes.

Mots-clés-Indexation rameau :

Plantes, *Lolium*, Transporteurs, Ecophysiologie

Mots-clés Libres :

Lolium perenne L., Transporteurs de saccharose, Défoliation, Intensité lumineuse

Sucrose transport in ryegrass (*Lolium perenne* L.): response to defoliation and light intensity. Ecole Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement / Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée / Thèse de l'Université de Caen.

Abstract :

We wanted to *i*) determine the nature of sucrose transport, *ii*) isolate, characterize and localize one or more sucrose transporters (SUTs) and *iii*) assess if these SUTs respond to defoliation or to a modulation of light intensity before and/or after defoliation in rye-grass.

Sucrose transport is apoplastic. It depends on a multigenic family of SUTs that were identified for the first time in rye-grass (LpSUT1, LpSUT2). The functional characterization of LpSUT2, which possess a cytoplasmic inner loop, was also successfully realized for the first time in a Monocot species. LpSUT2 is inhibited by fructose, which is a remarkable result for a fructan-accumulating plant, thus suggesting that this SUT could be the perception site of a sugar signal. The expression and the localization of these SUTs, mainly in the mesophyll, suggest that they play a great role for the distribution of C resources within the regrowing plant. The *LpSUT1* transcript level increases in the few hours following defoliation and might be regulated by sucrose content. LpSUT1 could be implicated in the lateral sucrose transport associated to the storage and/or the mobilization of fructans. The LpSUT2 transcripts are not sensitive to defoliation, but they are surprisingly modulated by light intensity before and/or after defoliation, which could strikingly match their putative role of sugar sensors. Because neither LpSUT1 nor LpSUT2 are localized within phloem tissues, this suggest the existence of other SUTs. The present results allow to better understand regrowth mechanism within a perennial forage species accumulating fructans.

Discipline : Physiologie, Biologie, Environnement, Populations.

UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S. IFR 146 ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen cedex, France.

BERTHIER Alexandre, 2011.