



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2015-2016

MASTER FAGE
Biologie et Ecologie pour la Forêt,
l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité BIA
Biologie Intégrative de l'Arbre
et des plantes cultivées

Impact d'une modification du transport des sucres
sur le développement du système vasculaire
chez *Arabidopsis thaliana*

AUBRY Emilie

Mémoire de stage, soutenu le 05/09/2016

Maître de stage : LE HIR Rozenn, Chargée de Recherche

Enseignant référent : ROUHIER Nicolas, Directeur de Recherche

Structure d'accueil : Institut Jean Pierre Bourgin (IJPB)
Institut National de Recherche Agronomique (INRA)
Rd 10 – Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Sylvie Dinant, Directrice de recherche à l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Versailles de m'avoir accueilli au sein de l'équipe Phloème, Allocation, Transport et Signalisation (PATS) et de m'avoir permis de réaliser ce stage de fin d'étude dans de très bonnes conditions. Je remercie particulièrement mon encadrante de stage Rozenn Le Hir, Chargée de recherche, qui, par son sens de l'écoute et ses qualités de pédagogue m'a permis de mener à bien ce projet avec rigueur et bonne humeur. Je remercie également les membres de l'équipe PATS, Catherine Bellini Directrice de Recherche, Françoise Vilaine Chargée de recherche, Laurence Bill et Nelly Wolff Assistantes Ingénieur, Sahar Sellani Doctorante pour leur écoute et leurs conseils. Enfin, je remercie les autres étudiants stagiaires Anfina, Ouad, Mélanie et Baptiste pour leur bonne humeur. Pour finir, je remercie également Camille Verly Doctorant, Julien Di Berardino Doctorant, Mathilde Fagard et les membres des autres équipes pour leur sympathie et leur aide en cas de besoins.

Sommaire

<u>I. Introduction</u>	1-5
<u>II. Matériels et méthodes</u>	5-9
1. <u>Matériel végétal</u>	5-6
2. <u>Conditions de culture</u>	6
3. <u>Mesures des paramètres de croissance</u>	6
4. <u>Analyses phénotypiques de la hampe florale</u>	6-7
➤ 4.1. <u>Préparation des échantillons</u>	6
➤ 4.2. <u>Caractérisation morphologique</u>	6-7
➤ 4.3. <u>Analyses quantitatives du xylème</u>	7
5. <u>Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF)</u>	7
6. <u>Quantification des sucres solubles par voie enzymatique</u>	7-9
➤ 6.1. <u>Dosage du glucose et du fructose</u>	8
➤ 6.2. <u>Dosage du saccharo</u>	8-9
7. <u>Localisation tissulaire</u>	9
<u>III. Résultats</u>	9-20
1. <u>Série du double mutant <i>sweet16sweet17</i></u>	9-15
➤ 1.1. <u>Localisation tissulaire</u>	9-10
➤ 1.2. <u>Analyse phénotypique de la hampe florale</u>	10-12
➤ 1.3. <u>Analyse de la composition de la paroi des cellules de xylème</u>	13-14
➤ 1.4. <u>Quantification des sucres solubles des plantes</u>	15
2. <u>Série du triple mutant <i>sweet11sweet12sweet16</i></u>	16-19
➤ 2.1. <u>Analyse phénotypique de la hampe florale</u>	16-18
➤ 2.2. <u>Analyses de la composition de la paroi des cellules du xylème</u>	17-19
<u>IV. Discussion</u>	20-23
<u>V. Conclusion</u>	23
<u>VI. Bibliographie</u>	24-25

I. Introduction

Chez les végétaux, la photosynthèse permet la transformation de l'énergie lumineuse en matières organiques. C'est au cours de ce processus que les principaux sucres utilisés par les plantes sont synthétisés (ex : saccharose, glucose et fructose). Ces sucres sont majoritairement produits dans les feuilles matures (organes sources) et participent ainsi à la croissance de la plante (Figure 1A). Ces sucres peuvent également être stockés sous forme d'amidon, de sucres solubles et de polyols dans les organes puits (ex : organes de réserves comme les tubercules, racines et les fruits) ou bien être séquestrés sous forme de polysaccharides dans les parois des cellules végétales. Les sucres sont transportés à longue distance des organes sources vers les organes puits selon un transport bidirectionnel médié par le gradient hydrostatique résultant de la différence de pressions osmotiques entre les différents organes (Figure 1A) (Turgeon, 1989; Ludewig and Flügge, 2013). Le phloème, un des tissus composant le système vasculaire, assure ainsi la distribution des sucres ainsi que celle d'autres métabolites (ex : acide aminés, acides organiques), des ions et de certaines hormones. Le xylème est quant à lui responsable du transport ascendant d'eau et d'éléments minéraux puisés par les racines (Figure 1A). Au niveau intercellulaire, les sucres peuvent suivre différentes voies de transport. La voie symplasmique qui consiste en un transport passif reposant sur la diffusion des sucres au travers de plasmodesmes selon un gradient de concentration et la voie apoplasmique qui permet la prise en charge des sucres par des transporteurs spécifiques (Williams et al., 2000) (Figure 1B).

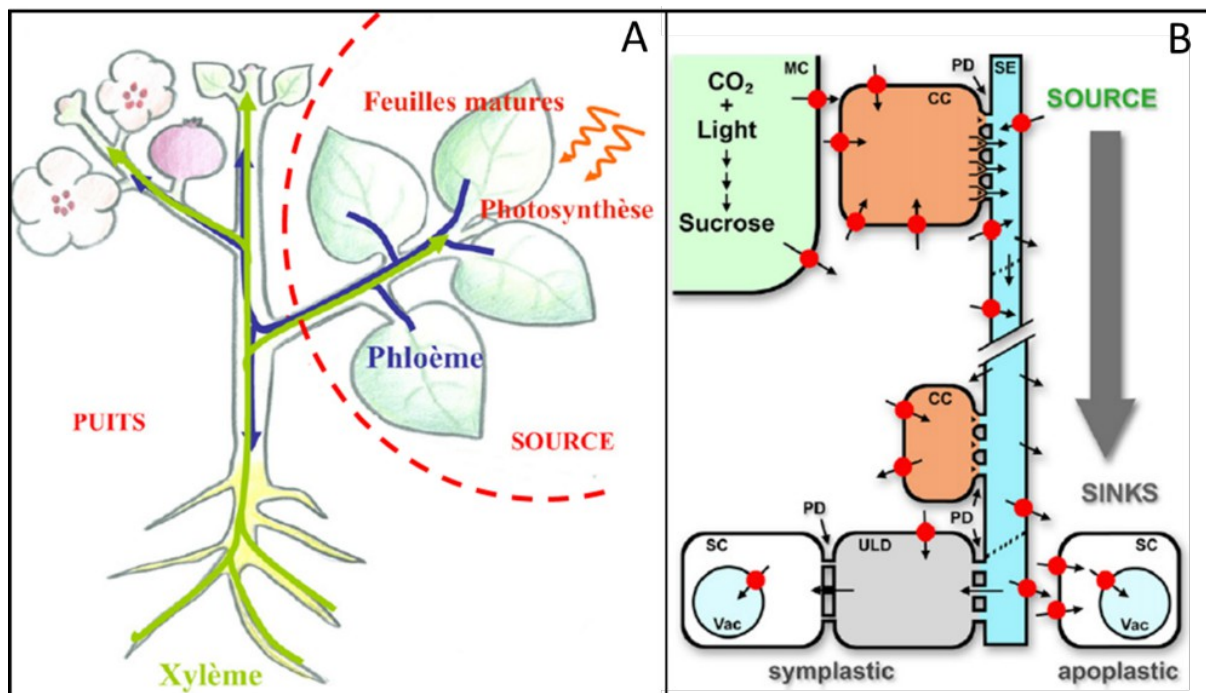


Figure 1 : Représentation schématique du transport entre organes sources et organes puits. (A) Circulation de la sève élaborée et de la sève brute entre les organes sources et les organes puits (d'après Dinant, 2008) ; (B) Transport du saccharose à longue distance et à courte distance par la voie symplasmique ou la voie apoplasmique. Les transporteurs sont représentés en rouge. Abréviations : CC : cellule compagne ; MC : cellule du mésophylle ; PD : plasmodesme ; SC : cellule puit ; SE : Elément criblé ; ULD : Domaine de déchargement ; Vac : vacuole (d'après Sauer, 2007).

Au niveau structural, le phloème se compose de cellules parenchymateuses, de cellules compagnes et d'éléments criblés (Figure 2B). Les cellules allongées dépourvues de noyaux qui composent les tubes criblés sont perforées transversalement par des plages de cribles laissant librement circuler la sève élaborée. Il a également été décrit que les parois latérales des tubes criblés présentent des épaississements mais leur composition chimique reste à déterminer (Cronshaw, 1975). Le xylème est, quant à lui, constitué de cellules parenchymateuses, de fibres, responsables du support structural, et de vaisseaux conducteurs de sève brute (Schuetz et al., 2012) (Figure 2C). Les fibres et les vaisseaux sont des cellules mortes qui se distinguent par le type de lignine composant leur paroi secondaire. Ainsi les fibres sont riches en lignine de type S alors que les vaisseaux possèdent une paroi composée majoritairement de lignine de type G et H (Schuetz et al., 2012).

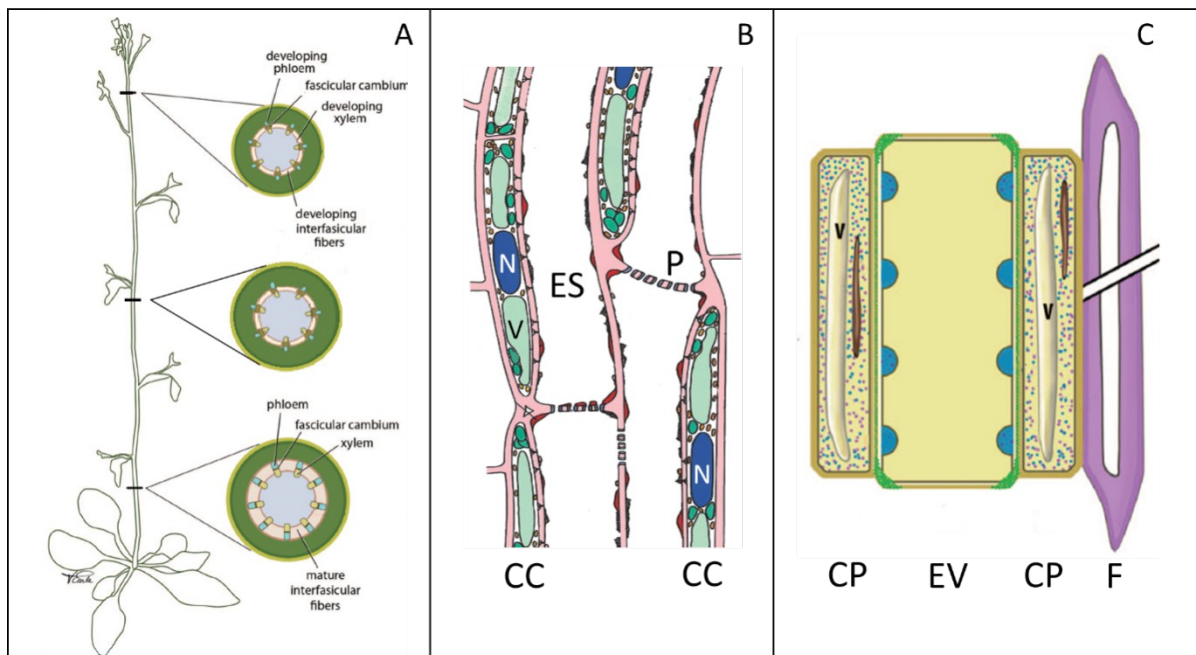


Figure 2 : Représentation schématique de l'anatomie du système vasculaire chez *Arabidopsis thaliana*. (A) Développement du système vasculaire à différentes sections de hampes florales (d'après Schuetz et al., 2012) ; (B) Structure du phloème et (C) Structure du xylème ; Abréviations : CC : Cellule compagne; CP : Cellule parenchymateuse ; ES : Élément de Sève ; EV : Élément de Vaisseau ; F : Fibres ; N : Noyau ; V : Vacuole.

Tant au niveau de leur structure que de leur fonction, le phloème et le xylème ont longtemps été considéré comme des systèmes de transport séparés. Pourtant de nombreux échanges latéraux entre les tissus vasculaires ont été décrits (Minchin and McNaughton, 1987; Minchin and Thorpe, 1987; van Bel, 1990; Zhang et al., 2010). Ces échanges permettraient d'assurer l'ajustement des besoins en eau et la coordination des flux de sèves (Dinant, 2008). Plus précisément, chez les espèces ligneuses il a été montré qu'un transport symplasmique à longue distance existait entre les cellules parenchymateuses du xylème et les cellules cambiales (Sokołowska and Zagórska-Marek, 2012). Chez l'eucalyptus, ces échanges ont même été décrits comme étant bidirectionnels entre le phloème et le xylème (Pfautsch et al., 2015). Chez cette espèce, l'eau et les molécules organiques et inorganiques circuleraient principalement au travers des plasmodesmes grâce à la transpiration et à la différence de pressions osmotiques entre les deux tissus (Pfautsch et al., 2015). Parmi les hypothèses émises quant au rôle d'un tel système de transfert au sein du système vasculaire, il a également été suggéré l'existence d'un transfert de sucres depuis le phloème vers le xylème (essentiellement au niveau des rayons) qui permettrait d'apporter les squelettes carbonés utilisés pour les besoins énergétiques au sein du xylème ainsi que pour la synthèse de la paroi secondaire (Schmitt et al., 2008; Mahboubi et al., 2013).

La paroi végétale est en effet majoritairement composée de polysaccharides pariétaux qui sont produits à partir d'un précurseur commun l'UDP-glucose issu notamment du clivage du saccharose par l'action de la saccharose synthase et de l'UDP-glucose pyrophosphorylase (Endler and Persson, 2011). Plus précisément, cette paroi est qualifiée de primaire lorsqu'elle se compose principalement de cellulose, d'hémicellulose et de pectines (Figure 3A). Puis au cours du développement la paroi se complexifie et forme une paroi secondaire qui se compose majoritairement de cellulose, d'hémicellulose et de lignines (Figure 3B). Plus précisément, les polymères de cellulose sont constitués de chaînes linéaires de glucose organisées en microfibrilles et qui forment ainsi un réseau de fibres robustes. Les hémicelluloses, bordant les fibres de cellulose, sont essentiellement constituées de xylanes, de glucanes et de mananes. Ces deux polymères confèrent une armature solide aux cellules végétales (Cosgrove et al., 2005). La lignine est quant à elle un polymère aromatique complexe qui contribue à la rigidité et l'imperméabilité des parois cellulaires, permettant ainsi le transport de l'eau et des éléments nutritifs à travers le système vasculaire et protégeant les végétaux des infections par des agents pathogènes (Nakano et al., 2015).

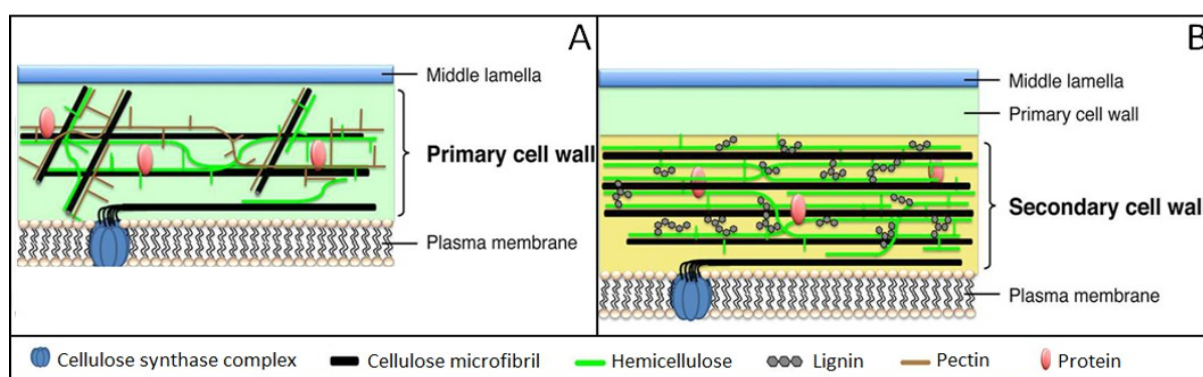


Figure 3 : Représentation schématique des parois végétales. (A) Paroi primaire pectocellulosique et (B) Paroi secondaire lignocellulosique (d'après Nakano et al., 2015).

La présence de parois secondaires est typique de certains types cellulaires tels que les cellules du xylème, les fibres et les anthères (Nakano et al., 2015). Chez la plante modèle *Arabidopsisthaliana*, la paroi secondaire se forme principalement lors du développement du système vasculaire de la hampe florale (Figure 2A). Bien que la biosynthèse des composés pariétaux et les étapes de la formation des parois primaires et secondaires soient bien connus (McFarlane et al., 2014), la question de la provenance des sucres qui serviront à la synthèse des polysaccharides pariétaux et leur transport jusqu'aux cellules cibles, se pose. Au niveau intercellulaire et intracellulaire, le transport des métabolites, dont les sucres, est orchestré par de nombreuses protéines (Chen et al., 2015). La superfamille des « Major Facilitator Superfamily » (MFS) regroupent la famille des « Sugar Transporters » (SUT). Ces transporteurs exercent un co-transport permettant la circulation de saccharose et de proton (Figure 4). Ces transporteurs sont impliqués dans le chargement et le déchargement du phloème. Il existe également des transporteurs permettant le transport des sucres entre les différents compartiments subcellulaires. Ainsi la famille des transporteurs de type « Tonoplast Monosaccharide Transporter » (TMT) comporte des transporteurs situés au niveau de la membrane tonoplastique et qui contribuent au transport d'hexoses de la vacuole vers le cytoplasme, notamment en cas de stress (Wormit et al., 2006) (Figure 4). Une autre grande famille de transporteurs est la superfamille des « Monosaccharides Transporters » (MSTs) qui a été identifiée chez de nombreuses espèces et dont les membres contribuent au transport tissulaire et cellulaire d'hexoses et de polyols. Ainsi, les hexoses résultant de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase dans les espaces pariétaux sont pris en charge par ces MSTs lors du déchargement du phloème dans les organes puits (Lalonde et al., 2004) (Figure 4).

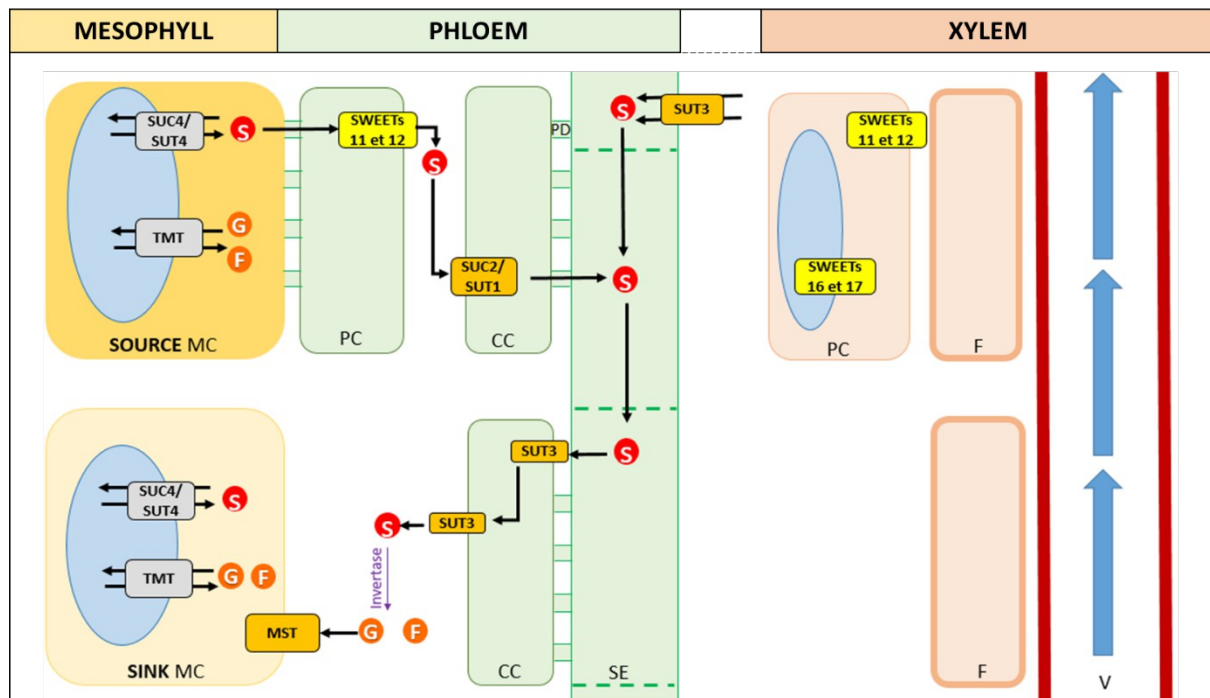


Figure 4 : Représentation schématique des principales familles de transporteurs présentes dans les tissus vasculaires (d'après Lalonde et al., 2004) avec MC : cellule du mésophylle ; PC : cellule du parenchyme ; CC : cellule compagne ; SE : élément criblé ; PD : plasmodème ; F : fibre ; V : vaisseau ; S : Saccharose ; G : Glucose ; F : fructose.

Plus récemment une autre famille de transporteurs de sucres a été identifiée, il s'agit de la famille des transporteurs « Sugar Will Eventually be Exported Transporters » (SWEET) (Chen et al., 2010). Il s'agit de facilitateurs permettant le transport de sucres (sucrose, glucose et/ou fructose) selon un gradient de concentration au niveau de la membrane plasmique ou du tonoplaste (Figure 4). Ces transporteurs comprennent 17 membres chez *Arabidopsis thaliana* répartis en quatre clades (Baker et al., 2012; Eom et al., 2015). Contrairement aux membres de la superfamille des MFS, les transporteurs SWEETs sont des protéines à 7 domaines transmembranaires qui doivent former des homo-oligomères et/ou des hétéro-oligomères pour créer un pore fonctionnel (Xuan et al., 2013). Chez *Arabidopsis thaliana*, la caractérisation fonctionnelle des lignées dérégulées dans l'expression de certains gènes appartenant à la famille des transporteurs SWEETs a permis de suggérer un rôle de ces gènes dans la nutrition du pollen (*SWEET8* et *SWEET12*), la sécrétion du nectar (*SWEET9*), la nutrition de l'embryon (*SWEET11*, *SWEET12* et *SWEET15*), le chargement du phloème (*SWEET11* et *SWEET12*), la séquestration du carbone dans le cadre de l'interaction *Arabidopsis-Phytium* (*SWEET2*), la tolérance au froid (*SWEET16*) ou la modulation du contenu en fructose des vacuoles des feuilles (*SWEET17*) (Pour revue Chen et al., 2015). Plus précisément, les protéines *SWEET11* et *SWEET12* ont été décrites comme étant des transporteurs de saccharose (Chen et al., 2012), de glucose et de fructose (Le Hir et al., 2015) localisées dans les plasmalemmes des cellules parenchymateuses du phloème et du xylème (Chen et al., 2012; Le Hir et al., 2015). Ils contribueraient au chargement du phloème des feuilles sources et auraient également un rôle dans la formation de la paroi secondaire du xylème (Chen et al., 2012; Le Hir et al., 2015). Les transporteurs *SWEET16* et *SWEET17* sont quant à eux des transporteurs tonoplastiques permettant l'export de fructose de la vacuole vers le cytosol. Les gènes codant ces protéines se localisent dans les cellules parenchymateuses du xylème (Chardon et al., 2013; Klemens et al., 2013). Compte tenu des localisations tissulaires similaires entre ces 4 gènes, la question du rôle des gènes *SWEET16* et *SWEET17* dans le développement du système vasculaire et de la composition de la paroi secondaire se pose.

L'objectif de ce stage de Master 2 est donc d'approfondir le rôle des facilitateurs SWEET dans le développement du système vasculaire, notamment dans la formation de la paroi secondaire du xylème. J'ai effectué mon stage à l'INRA de Versailles à l'Institut Jean Pierre Bourgin (IJPB) dans l'équipe Phloème, Allocation, Transport et Signalisation (PATS). La thématique de recherche de l'équipe se concentre essentiellement sur le rôle de l'allocation carbonée dans le développement des plantes soumises à des contraintes environnementales. Les membres de l'équipe s'intéressent particulièrement aux mécanismes d'allocation des sucres à différentes échelles à savoir entre organes et au sein des tissus vasculaires, à l'impact d'une perturbation de cette distribution sur les métabolismes azoté et carboné ainsi qu'aux conséquences sur la production de biomasse, le rendement et la tolérance aux stress abiotiques.

Quatre gènes candidats appartenant à la famille des SWEETs sont actuellement étudiés dans l'équipe. Des lignées mutantes (allèles nuls) des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16*, et/ou *SWEET17*, ainsi que des lignées doublement et triplement mutées chez *Arabidopsisthaliana* ont été précédemment produites dans l'équipe. Lors de ce stage, j'ai analysé les lignées doublement mutées *sweet16sweet17* et triplement mutées *sweet11sweet12sweet16*. Différents paramètres de croissance ont été mesurés, tels que les surfaces foliaires et les hauteurs de hampes florales afin de déterminer les éventuels conséquences phénotypiques de ces mutations. L'anatomie du xylème a été plus finement étudiée par l'acquisition d'images obtenues en microscopie photonique (en fond clair et microscopie confocale) permettant d'appréhender les modifications tissulaires et cellulaires. La composition des parois du xylème a également été analysée par spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF). Nous nous sommes également intéressés au métabolisme carboné dans les lignées *sweet16sweet17*, cultivées en jours courts et en jours longs, en quantifiant les teneurs en sucres solubles contenus dans les feuilles matures. Finalement la localisation de l'expression des promoteurs *SWEET16* et *SWEET17* a été réalisée par des colorations GUS sur la hampe florale à différents stades de développement. Ces analyses à différentes échelles ont permis d'appréhender le rôle de ces gènes dans le développement du système vasculaire et de mieux comprendre comment le réservoir de molécules carbonées nécessaires à la formation de la paroi secondaire du xylème y est constitué.

II. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal :

Des lignées d'*Arabidopsisthaliana* portant une insertion T-DNA au niveau des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16*, ou *SWEET17* ont été précédemment obtenues dans l'équipe. Ces lignées ont été caractérisées comme étant des allèles nuls (Chardon et al., 2013; Le Hir et al., 2015) (Figure supplémentaire n°1). Des lignées doublement et triplement mutées dans ces différents gènes ont été produites par croisement dans l'équipe. Lors de ce stage, deux séries de génotypes ont été analysées:

1- une série comprenant la lignée sauvage (écotype Col-0), les lignées simplement mutées *sweet16*, *sweet17* et la lignée doublement mutée *sweet16sweet17*. Nous parlerons par la suite de la série du double mutant *sweet16sweet17*.

2- une série comprenant la lignée sauvage (écotype Col-0), les lignées simplement mutées *sweet11*, *sweet12* et *sweet16*, les lignées doublement mutées *sweet11sweet12*, *sweet11sweet16* et *sweet12sweet16* et la lignée triplement mutée *sweet11sweet12sweet16*. Nous parlerons par la suite de la série du triple mutant *sweet11sweet12sweet16*.

Pour chacune de ces séries une analyse détaillée de la structure du système vasculaire et de la composition de la paroi secondaire des cellules du xylème a été effectuée (Figure 5).

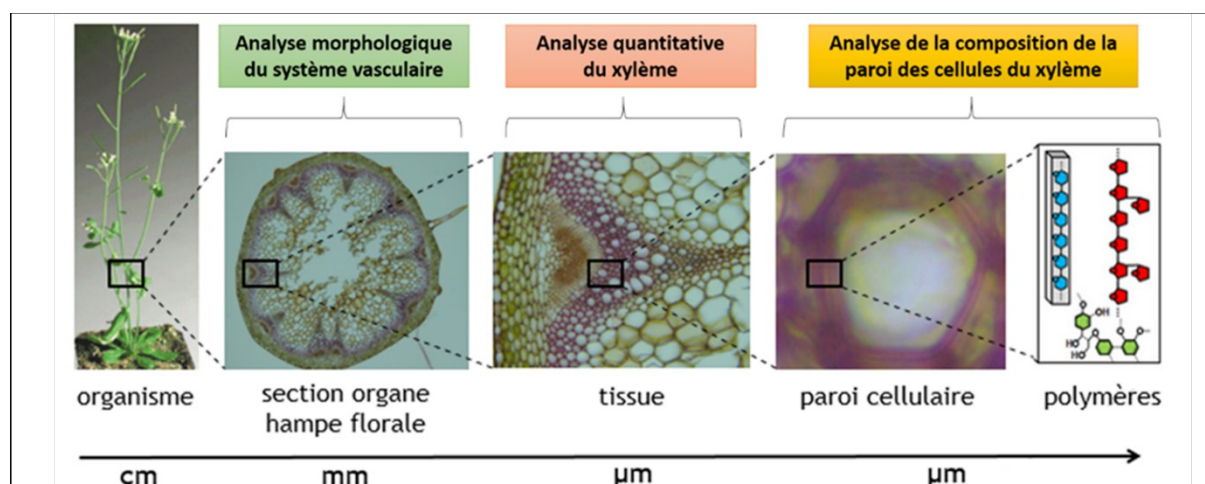


Figure 5 : Représentation schématique des analyses effectuées à différentes échelles sur la série du double et du triple mutant.

2. Conditions de croissance :

Afin de synchroniser leur germination, les graines des différents génotypes étudiés ont été stratifiées à 4°C pendant 48h. Les graines ont ensuite été semées en sol en chambre de culture en conditions de jours longs (16h/8h, jour/nuit) pendant huit semaines. Les plantes ont été réparties de manière aléatoire au sein de chaque plateau et dans la chambre de culture. Dans ces chambres, la température de jour était de 22°C, celle de nuit était de 18°C. Les installations lumineuses sont des lampes à sodium avec une irradiance de 150 µmol/m²/s au niveau de la rosette. Les plantes sont arrosées à l'aide d'une solution nutritive de type NPK tous les deux à trois jours.

3. Mesures des paramètres de croissance :

Après 5 semaines de croissance, des photographies des rosettes ont été prises afin de mesurer les surfaces vertes projetées pour chaque génotype sur le logiciel ImageJ (ImageJ 1.37; NIH, Bethesda, MD, USA). Les hauteurs des hampe florales ont ensuite été mesurées après huit semaines de croissance.

4. Analyses phénotypiques de la hampe florale :

➤ 4.1 Préparation des échantillons :

La récolte du matériel végétal s'est effectuée après huit semaines de croissance. Pour ce faire, des échantillons de 2 cm de longueur à la base de chaque hampe ont été prélevés et inclus dans de l'agarose 8 % (w/v). Un mL d'agarose a été déposé dans chacun des tubes eppendorf de 1.5 mL préalablement placés au bain marie. Chaque morceau de hampe florale a été placé le plus verticalement possible dans un tube une fois ce dernier refroidi quelques secondes afin d'éviter de brûler le matériel végétal. Les échantillons ont alors été placés une nuit au réfrigérateur à 4°C. Des coupes de 50µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un vibratome Leica VT100S. Les coupes obtenues ont été conservées dans de l'éthanol 70% afin d'être utilisées pour les analyses phénotypiques ainsi que pour les analyses de spectroscopie Infra-Rouge.

➤ 4.2 Caractérisation morphologique :

Les coupes de hampe florales précédemment obtenues ont été colorés dans un mélange contenant 5 mL de safranine O et 5 mL de bleu Alcian. Cette double coloration permet de différencier les tissus lignifiés (en rouge), des tissus non lignifiés (en vert). Les coupes de

hampes florales ont été plongées 30 secondes dans ce colorant, puis rincées dans trois bains d'eau stérile. Un montage à l'eau entre lame et lamelle a été effectué pour chaque génotype. Des photographies de chaque coupe ont été prises au microscope photonique de type Axio zoom V16 équipé d'un objectif Plan-NEOFLUARZ 2.3x/0.57 FWD 10.6mm à différents grossissements. Sur les images obtenues des mesures de la surface totale des hampes et du nombre de pôles vasculaires par génotype ont été réalisées grâce au logiciel ImageJ (ImageJ 1.37; NIH, Bethesda, MD, USA). De plus, les surfaces des tissus phloémiens, cambiaux et xylémiens ont été mesurées.

➤ 4.3 Analyses quantitatives du xylème :

Les coupes précédemment colorées ont également été observées au microscope confocal Leica TCS-SP2-AOBS avec un objectif HC PL APO x-20. La lignine composant la paroi du xylème auto-fluoresce naturellement. Les échantillons ont donc été excités par un laser Argon à 488 nm et l'auto-fluorescence qui en résulte a été collectée entre 512 et 590 nm. Neuf réplicats biologiques par génotype ont été observés et quatre photographies de pôles de xylème différents ont été réalisées au même grossissement pour chaque échantillon. Ces photographies ont par la suite été traitées sous ImageJ (ImageJ 1.37; NIH, Bethesda, MD, USA) à l'aide d'une méthode utilisée en routine dans l'équipe et qui permet d'individualiser chaque cellule de xylème et de mesurer ainsi leurs aires respectives (Le Hir et al., 2015). Ces données ont été traitées sous Excel afin de dénombrer les cellules du xylème selon leurs tailles et ainsi comparer la morphologie du xylème des différents génotypes.

5. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF) :

L'analyse de la composition des parois du xylème a été réalisée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) grâce au FT-IR 10 Nicolet™iN™ disponible au synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique) situé à Paris-Saclay. Les acquisitions ont été réalisées en mode transmission sur une surface de 30 µm*30 µm ciblant les cellules du xylème. Pour ce faire, les coupes précédemment obtenues ont été déposées et séchées sur des lames BaF₂, matériau plus transparent que le verre permettant le passage des rayons infra-rouge. Une quinzaine de points d'acquisition couvrant l'ensemble des cellules composant un pôle de xylème ont été placés sur tous les pôles de xylème d'une coupe. Au total 9 réplicats biologiques par génotype ont été analysés. Le logiciel OmnicSpectra permet de collecter les spectres dans la région 800-1800 cm⁻¹ à une résolution spectrale de 4 cm⁻¹ avec 128 scans pour les spectres des échantillons et du bruit de fond. Après un tri rapide de ces spectres, la correction de la ligne de base a été effectuée avant de normaliser et d'analyser statistiquement ces spectres. Les étapes de correction de la ligne de base, de normalisation et d'analyse statistique ont été réalisées à l'aide de scripts sous R fournis par G. Mouille (Mouille et al., 2003). Plus précisément, l'analyse statistique correspond à un test *t* de Student permettant d'évaluer pour chaque nombre d'onde, la robustesse des différences entre génotypes. En effet, les différences sont significatives si les valeurs du test *t* sont supérieures ou égales à 2, ou inférieures ou égales à -2.

6. Quantification des sucres solubles par voie enzymatique :

Le saccharose, le glucose et le fructose ont été dosés par voie enzymatique sur les feuilles les plus âgées (feuilles sources) de la série du double mutant *sweet16sweet17*. Il s'agit d'un dosage de pouvoir réducteur (réduction du NAD⁺ en NADH) décrit par Bergmeyer et Bernt (1974) reposant sur une succession de réactions enzymatiques (Figure 6). Ces réactions étant stœchiométriques, la quantité d'hexoses est par conséquent mesurée indirectement grâce à la quantité proportionnelle de NADH produit et dont on peut mesurer l'absorption spécifique à 340 nm.

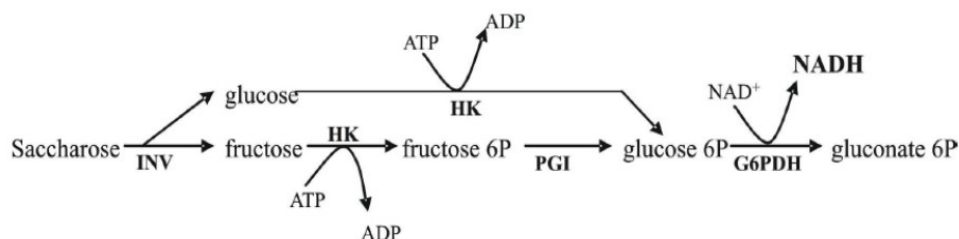


Figure 6 : Représentation schématique des réactions couplées impliquées dans le dosage des sucres solubles. INV : INVertase ; HK : HexoKinase ; PGI : PhosphGlucoIsomérase ; G6PDH : Glucose-6-Phosphate DesHydrogénase ; ATP : Adénosine Tri-Phosphate ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée) ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite)

Après broyage dans l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à billes, une aliquote d'environ 50 mg est pesée pour chaque échantillon. Les sucres solubles sont ensuite extraits par une double extraction alcoolique à froid avec de l'éthanol 80°. Plus précisément, 500µl d'Éthanol 80° sont ajoutés à chaque échantillon. L'extraction se déroule dans la glace et les échantillons sont mélangés au vortex toutes les 10 minutes pendant 1 heure. Une centrifugation à 4°C à 14000 rpm durant 10 minutes permet de séparer les débris cellulaires des sucres. Après récupération du surnageant, une deuxième extraction alcoolique est effectuée en ajoutant 500µl d'éthanol 80% dans le culot précédemment obtenu. De la même manière, ces échantillons sont mélangés au vortex toutes les 10 minutes durant 1 heure. Une seconde centrifugation permet de récupérer le surnageant et de l'ajouter au premier. Les deux surnageants sont ensuite séchés au speedvac. Les extraits sont repris dans 50µl d'eau stérile afin de quantifier le saccharose, le glucose et le fructose. Les dosages ont été effectués en plaques de 96 puits, et comparés à une gamme étalon. Deux réplicats techniques ont été réalisés pour chaque échantillon. L'ensemble des mesures de DO est réalisé dans un spectrophotomètre à plaque de type IEMS (Thermo IEMS microplatereader, MTX Labsystems) à 340 nm. Les dosages de saccharose, glucose et fructose ont été réalisés grâce aux enzymes présentes dans le kit « Roche Yellow line » (RBioPharm). Le détail des dosages est présenté ci-après.

➤ 6.1 Dosage du glucose et du fructose:

Après dépôt de 130µl d'eau stérile et 10 µl d'échantillon par puit, 60µl de NADP/ATP ont été déposés dans chaque puit et mis à incuber durant 15 minutes à 30°C. La densité optique mesurée à la fin de cette incubation (DO1) représente la quantité de pouvoir réducteur avant réaction enzymatique. Par la suite, 5µl d'un mélange d'HexoKinase et de Glucose-6-Phosphate DesHydrogénase (HK+G6PDH) diluée au 5^{ème} est ajouté à chaque puit. Ces enzymes sont responsables de la formation du gluconate 6-P à partir de glucose et de fructose. La densité optique mesurée (DO2) après 40 minutes d'incubation représente la quantité de pouvoir réducteur libéré lors de cette réaction enzymatique. La DO1 précédemment mesurée est alors soustraite à la DO2. Cette soustraction représente la quantité de pouvoir réducteur libéré lors de la phosphorylation soit la quantité de glucose. Ensuite, 5µl de PhosphoGlucose Isomérase(PGI) est ajoutée à chaque échantillon et les échantillons sont mis à incuber durant 20 minutes afin de transformer toutes les molécules de fructose 6-P en glucose 6-P. La DO2 précédemment obtenue est alors soustraite à la DO3 afin de quantifier la teneur en fructose.

➤ 6.2 Dosage du saccharose :

Le dosage du saccharose repose sur le même principe que le dosage du glucose et fructose. Cependant il est nécessaire au préalable d'hydrolyser le saccharose en glucose et fructose par l'ajout de 15µl d'invertase pour chaque réaction. Les échantillons sont mis à incuber pendant au moins 30 minutes. Par la suite, 60µl de NADP-ATP sont ajoutés et mis à incubation durant 15 minutes (DO1) puis 5µl d'enzyme HK+G6PDH sont ajoutés aux

échantillons et incubés pendant 20 minutes (DO2). La soustraction de la DO2 – DO1 révèle la variation de saccharose et de glucose. Finalement la soustraction de cette valeur à la valeur de glucose endogène mesurée précédemment permet d'obtenir la quantité de saccharose dans chaque échantillon. Les quantités de sucres sont exprimées en nmol sucre/mg de matière fraîche.

7. Localisation tissulaire :

Afin d'évaluer la localisation tissulaire de l'expression des promoteurs des gènes *SWEET16* et *SWEET17* au cours du développement de la hampe florale, des lignées exprimant le gène rapporteur de la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle des promoteurs des gènes *SWEET16* ou *SWEET17* ont été analysées. Ces lignées ont été cultivées pendant 10 semaines dans les mêmes conditions que le matériel végétal utilisé dans les autres expériences (cf paragraphe 1). La hampe florale a été divisée en trois sections (Figure 2) : une section basale, une section à mi-hauteur et une section sous le bouton floral et sur chaque échantillon une coloration histochimique GUS a été réalisée. Plus précisément, les échantillons ont été incubés dans de l'acétone 80% (v/v) durant 20 minutes à 4°C. Trois lavages successifs à l'eau distillée ont ensuite été réalisés avant d'incuber les sections dans le tampon GUS. A l'aide d'une pompe à vide, une infiltration de 10 minutes a été réalisée afin d'optimiser la pénétration du tampon GUS dans la totalité des tissus. Les échantillons sont ensuite incubés à 37°C dans le noir durant 12 heures afin que la réaction enzymatique se produise. La réaction enzymatique est stoppée dans de l'éthanol 70° et les échantillons sont conservés à 4°C avant inclusion dans de l'agarose 8%. Comme décrit précédemment, des coupes de 50µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un vibratome. Les coupes ainsi obtenus sont montées entre lames et lamelles en présence de 100µl de phloroglucinol 2% (w/v) et de 100µl d'acide chlorhydrique 50% (v/v) afin de contre-colorer les lignines en rouge. Les échantillons ont été observés en microscopie à fond clair avec un microscope Leica DMR B DIC épifluorescence.

III. Résultats

1. Série du double mutant *sweet16sweet17*

L'objectif de cette partie est d'évaluer l'impact de la suppression de l'expression de deux gènes codant pour les transporteurs tonoplastiques de sucres *SWEET16* et *SWEET17* sur le développement du système vasculaire, la composition des parois cellulaires et sur le métabolisme des sucres.

➤ 1.1 Localisation tissulaire de l'expression des promoteurs de *SWEET16* et *SWEET17*

Il a précédemment été montré que les promoteurs des gènes *SWEET16* ou *SWEET17* s'expriment dans les cellules du xylème lorsque les plantes sont cultivées en serre (Chardon et al., 2013; Klemens et al., 2013). Dans le cadre de ce travail, l'ensemble des lignées a été cultivé en chambre de culture, nous avons donc voulu contrôler si l'expression de ces promoteurs était similaire dans ces conditions et ceci à différent stade de développement de la hampe florale. Les lignées exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle des promoteurs des gènes *SWEET16* ou *SWEET17* ont été utilisées afin d'observer la localisation de leurs expressions à différents stade de développement de la hampe florale (Figure 7). L'expression du promoteur du gène *SWEET17* est détectée uniquement dans les cellules de la pointe du xylème qui sont très probablement des cellules de parenchyme xylémien et ceci quel que soit le stade de développement de la hampe florale (Figure 7D, 7E et 7F). En revanche, la localisation de l'expression du promoteur du gène *SWEET16* varie au cours du développement de la hampe florale. En effet, à un stade de développement précoce (haut de la hampe florale et peu de lignification), un signal GUS est observé dans le phloème, dans les

fibres inter-fasciculaires ainsi qu'à la jonction du cambium et du xylème (Figure 7A). Dans la partie médiane de la hampe florale, l'expression du promoteur du gène *SWEET16* est toujours détectée dans le phloème et également dans les cellules de petites tailles du xylème que l'on pourrait assimiler à de petits vaisseaux ou des fibres ainsi que dans les cellules du parenchyme xylémien (Figure 7B). Finalement à la base de la hampe florale, où la lignification est la plus importante, un signal GUS est uniquement observé dans les cellules de la pointe du xylème et dans le phloème. (Figure 7C).

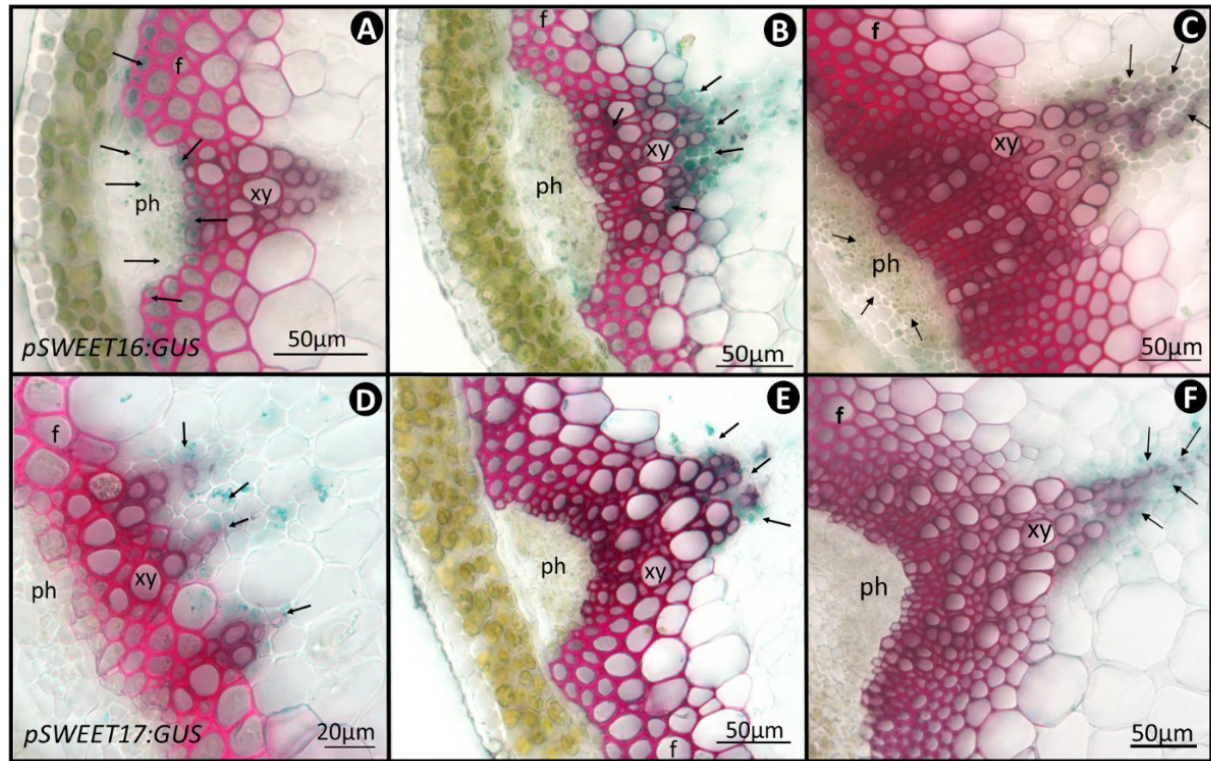


Figure 7 : Profils d'expression GUS des promoteurs des gènes *SWEET16* (A-C) ou *SWEET17* (D-F) dans les hampes florales de plantes d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en jours longs pendant 10 semaines. Les échantillons ont été prélevés à différentes hauteurs de la hampe florale. (A) et (D) sections effectuées sous le bouquet floral; (B) et (E) sections à mi-hauteur ; (C) et (F) sections basales. Les coupes ont été montées dans un mélange de Phloroglucinol 2% et HCl 50% afin de colorer les lignines en rouge. f : fibre inter-fasciculaire ; ph : phloème ; xy : xylème.

➤ 1.2 Analyse phénotypique de la hampe florale

Compte tenu de l'expression des promoteurs *SWEET16* et *SWEET17* dans les cellules xylémiennes, une analyse phénotypique détaillée de la hampe florale des simples mutants *sweet16* et *sweet17* et du double mutant *sweet16sweet17* a été entreprise (Figure 8). Dans un premier temps, la mesure des surfaces vertes projetées des rosettes des différents génotypes a été réalisée après 5 semaines de croissance en conditions de jours longs (Figure 8A et Figure supplémentaire 2A). Dans ces conditions, seul le simple mutant *sweet16* présente une surface verte projetée significativement plus petite par rapport au type sauvage (Figure 8A). La hauteur des hampes florales des différents génotypes a également été mesurée et aucune différence significative n'a été observée en fonction des génotypes (Figure 8B). Enfin, la surface de la hampe florale et le nombre de faisceaux cribro-vasculaires ont également été mesurés à partir de sections transversales de la base de la hampe florale (Figures 8C et 8D).

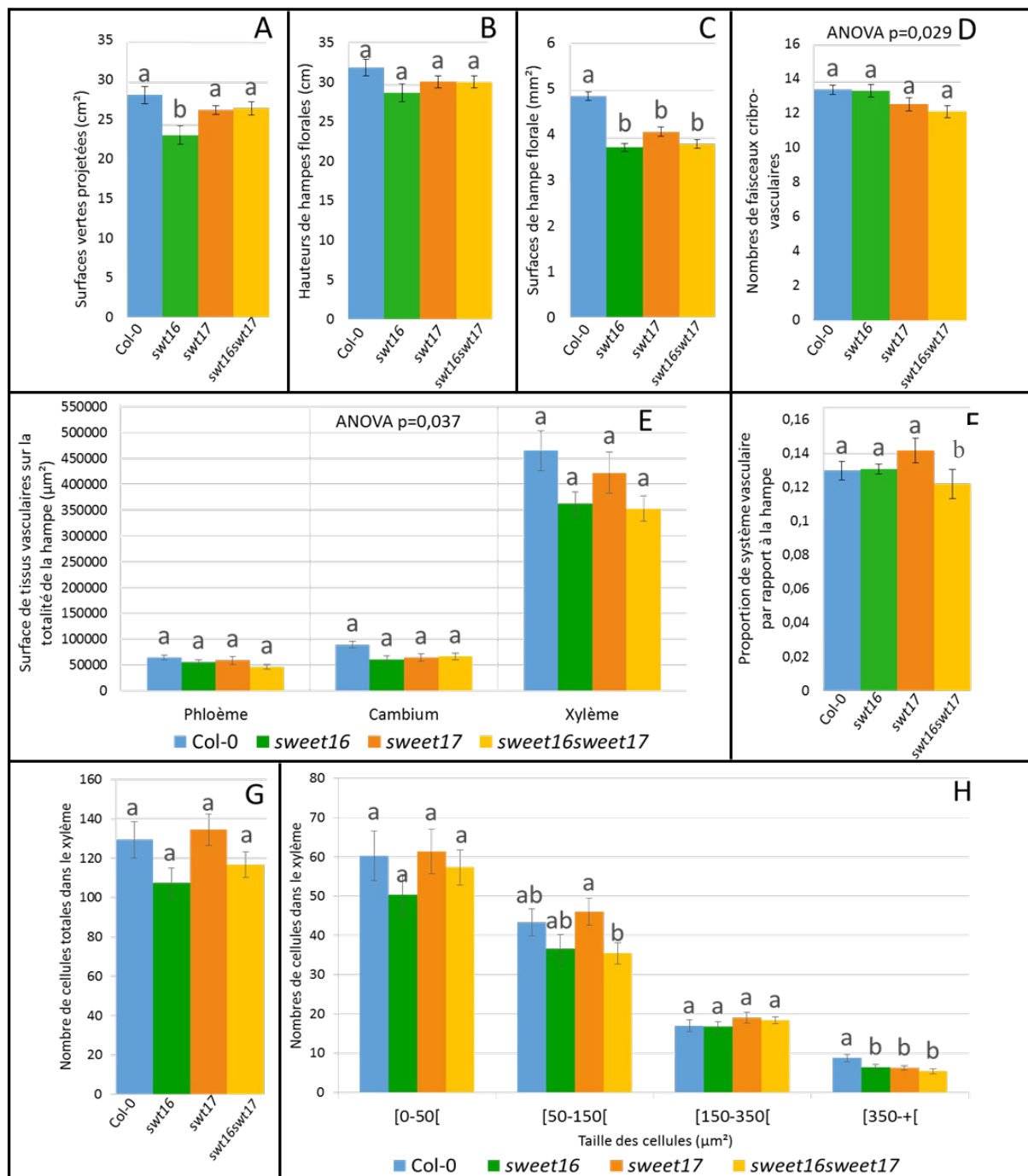


Figure 8 : Mesures des paramètres de croissance et mesures anatomiques du système vasculaire des différents génotypes. (A) Surfaces vertes projetées ; (B) Hauteurs des hampe florales ; (C) Surfaces des hampe florales (coupes transversales) ; (D) Nombre de faisceaux cribro-vasculaires ; (E) Total des surfaces de phloème, cambium ou xylème par hampe florale ; F : Proportion de système vasculaire (phloème + cambium + xylème) rapportée à la surface de la hampe ; G : Nombre total de cellules contenues dans un pôle de xylème ; H : Nombre de cellules xylémiennes par classe de taille [0-50[: fibres ; [50-150[: population mixte de fibres et de vaisseaux ; [150-350[: vaisseaux, et [350-+] : gros vaisseaux. Abréviations : *swt* : *sweet*. Moyenne \pm erreur type ($n=12$ (A et B) ; $n=24$ (C) ; $n\geq 20$ (D) ; $n\geq 4$ (E et F) ; $n=32$ (G et H)). Test statistique par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et post test de Tukey. Les génotypes portant la même lettre ne sont pas significativement différents alors que les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P<0.05$).

Bien qu'aucune différence significative du nombre de faisceaux cribro-vasculaires n'a été révélée par le post-test de Tukey, l'analyse de variance montre l'existence d'un effet génotype et semble suggérer que les lignées *sweet17* et *sweet16sweet17* présentent un nombre plus faible de faisceaux cribro-vasculaires que le type sauvage (Figure 8D). Finalement la surface de la hampe florale des simples mutants *sweet16* et *sweet17* et du double mutant *sweet16sweet17* est significativement réduite d'environ 15 % par rapport à celle du type sauvage (Figure 8C).

Afin d'étudier plus finement le développement du système vasculaire des plantes, la somme des surfaces occupées par le phloème, le cambium ou le xylème pour tous les pôles d'une coupe transversale de hampe florale a été calculée (Figures 8E). Les surfaces de phloème et de xylème des différentes lignées ne sont pas significativement différentes (Figure 8E). En revanche, le test de variance ANOVA effectué sur les surfaces de cambium révèle un effet génotype ($P=0,037$) bien que le post-test de Tukey ne mette en évidence aucune différence significative entre les moyennes des différentes lignées. On peut cependant suggérer que les simples mutants et le double mutant tendent à avoir une surface de cambium réduite par rapport au sauvage (Figure 8E). Compte tenu du fait que la surface des hampes florales des différents mutants est significativement plus petite que celle du sauvage, la surface totale de système vasculaire (phloème+cambium+xylème) a été reportée à la surface totale de la hampe florale afin d'estimer le pourcentage de système vasculaire sur la totalité de la hampe de chaque lignée (rapport SV/SH) (Figure 8F et Figure supplémentaire 2A). Globalement, le rapport SV/SH représente environ 12% de la surface totale de hampe. Aucune différence significative n'est observée entre le type sauvage et les simples mutants *sweet16* et *sweet17*, suggérant que la diminution de la surface totale de système vasculaire est proportionnelle à la diminution de la surface totale de la hampe florale (Figure 8C, 8E et 8F). Par contre une différence significative est observée entre le type sauvage et le double mutant *sweet16sweet17*, suggérant que le développement du système vasculaire du double mutant est plus diminué que le diamètre de la hampe florale (Figure 8F).

Enfin, une analyse quantitative du xylème a été réalisée en calculant d'abord le nombre total moyen de cellules contenues dans un pôle de xylème (Figure 8G). Puis le nombre de cellules par classe de taille a été mesuré pour chaque génotype (Figure 8H). Le nombre moyen de cellules contenues dans un pôle de xylème varie entre environ 107 et 135 cellules selon le génotype (Figure 8G). Aucune différence significative entre ces génotypes n'a été observée (Figure 8G) bien que les mutants *sweet16* et *sweet16sweet17* tendent à avoir moins de cellules que les deux autres lignées (Figure 8G). Les cellules ont ensuite été groupées par classe de taille afin de séparer les fibres, des vaisseaux de xylème. La classe contenant les petites cellules comprises entre 0 et 50 μm^2 représente la majorité des cellules présentes au sein du xylème et qui peuvent être attribuées à des fibres (Figure 8H). Au sein de cette classe de taille, aucune différence significative n'a été observée (Figure 8H). Les cellules comprises entre 50 et 150 μm^2 regroupent les fibres et les petits vaisseaux de xylème. Dans cette classe, seul le double mutant *sweet16sweet17* présente significativement moins de cellules que le type sauvage (Figure 8H). La classe suivante comprenant des cellules de taille comprise entre 150 et 350 μm^2 et qui regroupent des vaisseaux de xylème n'est pas statistiquement différente en fonction des génotypes. Par contre les gros vaisseaux de xylème contenus dans la classe de taille de plus de 350 μm^2 sont significativement moins nombreux chez les simples mutants *sweet16* et *sweet17* et chez le double mutant *sweet16sweet17* que chez le type sauvage (Figure 8H).

➤ 1.3 Analyse de la composition de la paroi des cellules de xylème

La composition pariétale des cellules du xylème a été analysée par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (Figure 9). Les spectres moyens représentent la moyenne des absorbances de chaque nombre d'onde compris entre 830 et 1800 cm^{-1} pour les différents génotypes (Figure 9A). L'observation de ces spectres moyens met en évidence des décalages à certains intervalles de nombre d'ondes (Figure 9A). Afin de déterminer si ces différences sont significatives, un test *t* de Student a été réalisé. Les valeurs de *t* supérieures à +2 ou inférieures à -2 correspondent aux nombres d'ondes significativement différents par rapport au génotype de référence (Col-0) (Figure 9B). Ainsi, la valeur de *t* reflète la robustesse de la différence observée par rapport au génotype de référence. L'analyse des spectres moyens permet ensuite de conclure sur la différence d'intensité de chaque nombre d'onde entre les différents génotypes.

Afin de simplifier l'analyse, je me suis concentrée sur les nombres d'ondes caractéristiques des principaux composés pariétaux décrits dans la littérature (Mouille et al., 2003). Les trois lignées mutantes présentent des différences significatives par rapport à la lignée sauvage (Figure 9B). En effet, pour les lignées *sweet16*, *sweet17* et *sweet16sweet17* les valeurs du test *t* sont très significativement différentes pour les nombres d'ondes suivants : 898 cm^{-1} ; 1041 cm^{-1} ; 1049 cm^{-1} et 1060 cm^{-1} (Figure 9B). Ces nombres d'ondes sont caractéristiques des liaisons anomériques de polymère de β -glucanes (898 cm^{-1}) contenus dans la cellulose et des carbohydrates ou des xyloglucanes (1041 cm^{-1} ; 1049 cm^{-1} ; 1060 cm^{-1}) et peuvent être assimilés à des composés cellulosiques. Cependant, l'analyse des spectres moyens indiquent que les parois mutant *sweet16* contiendraient plus de composés cellulosiques que le type sauvage alors que les parois des mutants *sweet17* et *sweet16sweet17* seraient moins riches en composés cellulosiques (Figure 9A). Pour les trois lignées mutantes, des différences significatives ont également été observées à des nombres d'ondes correspondants aux groupements COOH des pectines acides (1639 et 1677 cm^{-1}) (Figure 9B). Ainsi les parois du mutant *sweet16* contiendraient moins de pectines acides que celle du type sauvage alors que celles du simple mutant *sweet17* et du double mutant *sweet16sweet17* en contiendraient plus (Figure 9A). De plus, les mutants *sweet17* et *sweet16sweet17* présentent des différences significatives avec le génotype sauvage aux nombres d'ondes 1207 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} et 1595 cm^{-1} . Ces nombres d'ondes sont associés préférentiellement aux lignines, notamment des lignines de type G (Faix, 1991). Ainsi, les parois des cellules du xylème de ces lignées présenteraient une modification des contenus en lignine de type G. Finalement, uniquement chez le double mutant *sweet16sweet17* des différences significatives sont observées aux nombres d'ondes suivants : 1230 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} et 1245 cm^{-1} qui correspondent aux vibrations de liaisons C-O et C=O présentes dans les pectines de type rhamnogalacturonane I et rhamnogalacturonane II ou aux fractions O-acetyl des polymères pariétaux (Kačuráková et al., 2002; Mohebbi, 2010).

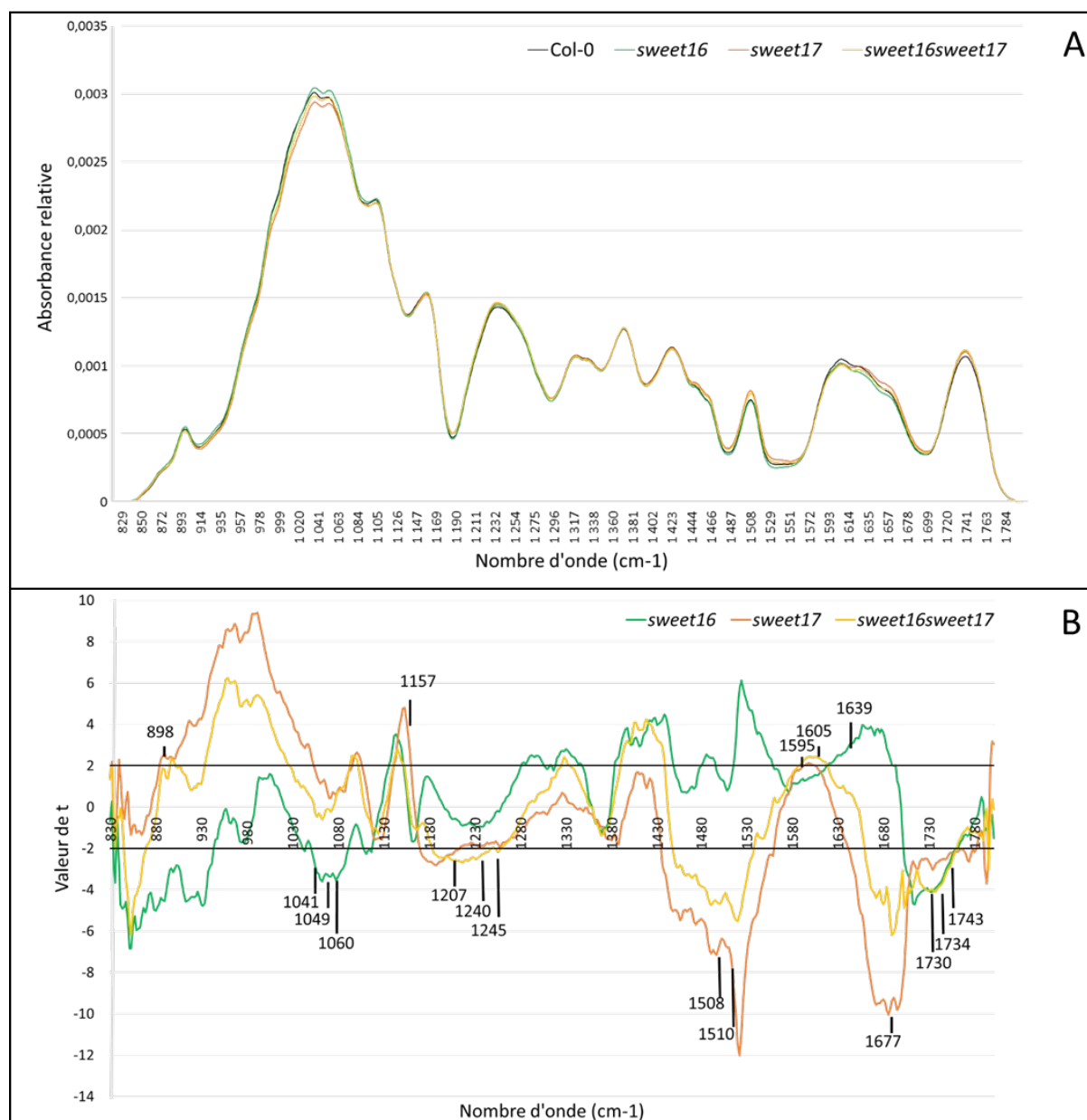


Figure 9 : Analyse de la composition chimique des parois des cellules de xylème de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*. (A) Spectres moyens des différents génotypes Col-0 (type sauvage) et les mutants *sweet16*, *sweet17* et *sweet16sweet17*; (B) Comparaison statistique entre le type sauvage et les différents lignées mutées. Un test *t* de Student a permis de comparer les absorbances obtenus chez les plantes sauvages à celles obtenus chez les différents mutants étudiés. Les résultats du test *t* obtenus (axe des ordonnées) ont été reportés pour chaque nombre d'ondes (axe des abscisses). Les valeurs du test comprises entre -2 et 2 correspondent aux différences non significatives entre les génotypes testés. Les valeurs du test supérieures à 2 ou inférieures à -2 correspondent aux absorbances significativement différentes par rapport au génotype de référence.

➤ 1.4 Quantification des sucres solubles des plantes

Les quantités de saccharose, de glucose, et de fructose contenus dans les hampes florales et dans les feuilles matures des lignées Col-0, *sweet16*, *sweet17* et *sweet16sweet17* ont été dosées par voie enzymatique (Figure 10). Ces dosages ont été réalisés sur des plantes cultivées en chambre de culture en conditions de jours longs (Figure 10A et 10C) ou en conditions de jours courts (Figure 10B). En conditions de jours longs, les feuilles matures du simple mutant *sweet16* et du double mutant *sweet16sweet17* présentent significativement plus de fructose que le génotype sauvage Col-0 (Figure 10A), alors qu'aucune différence significative n'est mesurée pour les contenus en saccharose et en glucose entre les différents génotypes (Figure 10A). En conditions de jours courts, les teneurs en fructose du simple mutant *sweet17* et du double mutant *sweet16sweet17* sont significativement 3 fois plus élevées que pour les autres génotypes (Figure 10B). De même qu'en jours longs, aucune différence significative des teneurs en saccharose et glucose n'est mise en évidence entre les différents génotypes cultivés en jours courts (Figure 10B).

Les teneurs en sucres solubles contenues dans la hampe florale ont également été dosées (Figure 10C). Les quantités de fructose des différentes lignées ne sont significativement pas différentes par rapport au type sauvage (Figure 10C). En revanche, la concentration en saccharose est significativement plus faible chez le simple mutant *sweet17* que chez le type sauvage (Figure 10C). Alors que les teneurs en glucose des lignées *sweet16* et *sweet16sweet17* sont significativement plus importantes que celles du type sauvage (Figure 10C). En terme, de ratio hexoses/saccharose on observe donc un ratio significativement plus important chez le simple mutant *sweet17* et le double mutant *sweet16sweet17* (Figure supplémentaire 3C).

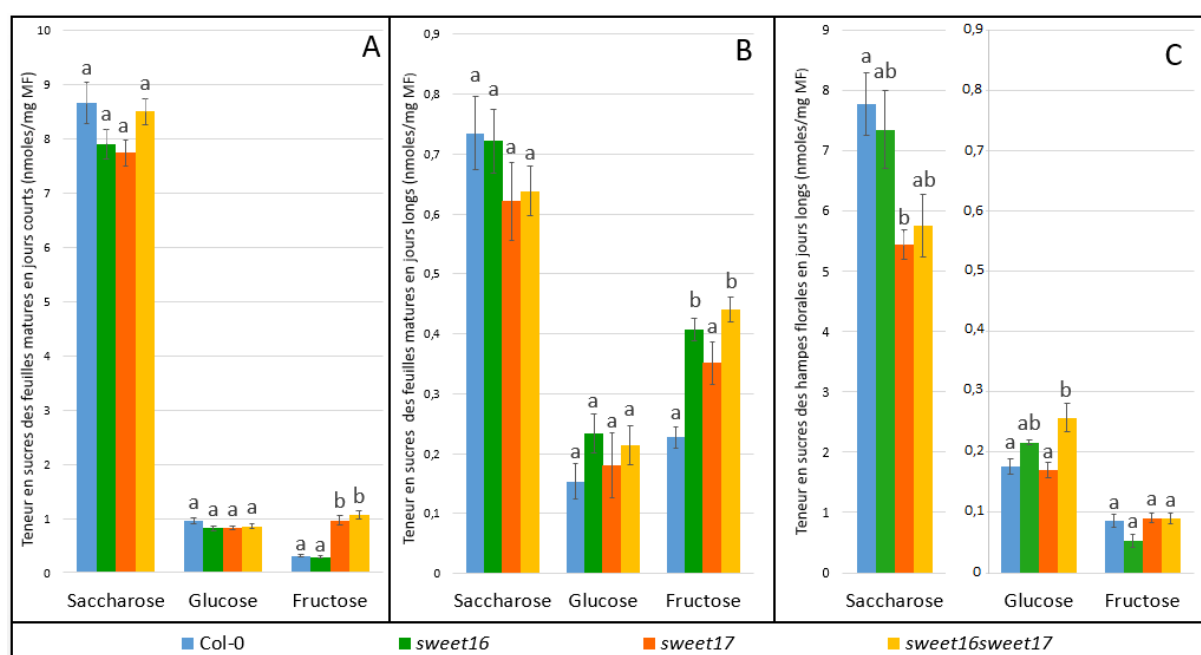


Figure 10: Teneurs en sucres solubles (saccharose, glucose et fructose) dans les feuilles matures d'*Arabidopsis thaliana* après 8 semaines de croissance en chambre de culture en conditions de jours longs (A) ou en conditions de jours courts (B) et dans les hampes florales d'*Arabidopsis thaliana* en conditions de jours longs (C). Moyenne \pm erreur type ($n=12$ (A et B) ; $n=4$ (C)). Test statistique par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et post test de Tukey. Les génotypes portant la même lettre ne sont pas significativement différents alors que les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents ($P<0.05$).

2. Série du triple mutant *sweet11sweet12sweet16*

Les résultats présentés dans la première partie du rapport suggèrent que dans ces conditions de croissance le simple mutant *sweet16* présente des défauts similaires à ceux observés chez le double mutant *sweet11sweet12* au niveau du développement vasculaire et des modifications de la composition de la paroi secondaire (Le Hir et al., 2015). L'objectif de cette seconde partie de résultats est donc d'évaluer l'impact de la suppression de l'expression des gènes codant pour deux transporteurs plasmalemmiques (SWEET11 et SWEET12) et pour un transporteur tonoplastique (SWEET16) sur le développement du système vasculaire et sur la composition des parois cellulaires.

➤ 2.1 Analyse phénotypique de la hampe florale

Après 5 semaines de croissance en chambre de culture en conditions de jours longs, les plantes des lignées *sweet11sweet12* et *sweet11sweet12sweet16* présentent des surfaces vertes projetées significativement plus petites d'environ 50 % par rapport aux autres lignées (Figure 11A et Figure supplémentaire 2B). Après 8 semaines de croissance, on observe une diminution d'environ 15% de la hauteur de la hampe florale chez le simple mutant *sweet12* ainsi que chez le double mutant *sweet11sweet12* et le triple mutant *sweet11sweet12sweet16* (Figure 11B). Des sections transversales dans les hampes florales des différents génotypes a permis de mesurer la surface totale de chaque hampe florale (Figure 11C). De façon intéressante, même si la hauteur moyenne d'une hampe n'est pas significativement différentes pour tous les génotypes, la surface moyenne d'une hampe est significativement plus petite pour toutes les lignées mutées comparées au type sauvage (Figure 11C et Figure supplémentaire 2B). Les lignées les moins affectées sont les simples mutants *sweet12* et *sweet16* avec une réduction de la surface de 26% et 28%, respectivement. Le double mutant *sweet12sweet16* est quant à lui plus affecté avec une réduction d'environ 35%. Le simple mutant *sweet11* a une surface plus réduite avec une diminution de 39%. Le double mutant *sweet11sweet16* présente quant à lui une surface de la hampe florale réduite de 44% (Figure 11C). Les lignées les plus affectées sont les lignées *sweet11sweet12* et *sweet11sweet12sweet16* qui présentent des réductions de surface de l'ordre de 62% et 59% par rapport au sauvage (Figure 11C). Le nombre de faisceaux cribro-vasculaires varie également en fonction du génotype (Figure 11D). En effet, seuls les simples mutants *sweet12* et *sweet16* comportent le même nombre de pôles vasculaires que le sauvage avec une valeur moyenne comprise entre 12 et 13 pôles. Quant aux lignées *sweet11*, *sweet11sweet16* et *sweet12sweet16*, le nombre de faisceaux se situe entre 10 et 11 alors que pour *sweet11sweet12* et *sweet11sweet12sweet16* le nombre moyen se situe autour de 9 faisceaux cribro-vasculaires (Figure 11D). De façon intéressante, ces résultats montrent que, bien que la surface de la hampe florale soit affectée, le nombre de faisceaux cribro-vasculaires ne l'est pas nécessairement (ex : lignées *sweet12* et *sweet16*). Dans le cas où les deux paramètres sont corrélés cette diminution n'est pas toujours proportionnelle (Figure supplémentaire 3).

La surface totale de système vasculaire (phloème+cambium+xylème) a également été mesurée et les résultats obtenus sont présentés sous forme de pourcentage de système vasculaire par rapport à la surface totale de la hampe de chaque lignée (Figure 11E). Dans ces conditions de culture, le pourcentage de système vasculaire présent dans la hampe florale est d'environ 14% chez le type sauvage, ce qui est assez similaire au pourcentage calculé pour le type sauvage de la série du double mutant *sweet16sweet17*. De plus, seul le triple mutant présente une proportion de système vasculaire significativement plus petite que le sauvage et que les autres lignées (Figure 11E). Ces analyses suggèrent donc que la réduction de système

vasculaire observée chez le triple mutant n'est pas proportionnelle à la diminution de la surface de la hampe contrairement aux autres génotypes et que cette réduction de système vasculaire est notamment plus importante chez le triple mutant (Figure 11C et 11E).

Enfin, une analyse quantitative du xylème a été réalisée en calculant dans un premier temps la moyenne du nombre total de cellules contenues dans un pôle de xylème (Figure 11F). Dans nos conditions de culture, le nombre total de cellules contenues dans un pôle de xylème est significativement plus faible pour les lignées *sweet11sweet12* et *sweet11sweet12sweet16* par rapport au type sauvage et aux autres lignées mutées (Figure 11F). Dans un second temps, les cellules ont été classées par catégorie de taille afin de mettre en évidence ou non des différences plus fines entre les différents génotypes (Figure 11G). Les simples mutants ne présentent pas de différences significatives avec le génotype sauvage pour les cellules de tailles comprises entre 0 et 350 μm^2 , seul le nombre de gros vaisseaux de taille supérieure à 350 μm^2 est significativement plus petit que celui du sauvage mais plus grand que ceux des mutants *sweet11sweet12* et *sweet11sweet12sweet16* (Figure 11G). Les pôles de xylème des lignées doublement mutées *sweet11sweet12* et triplement mutées *sweet11sweet12sweet16* contiennent autant de petites cellules de 0 à 50 μm que le génotype sauvage mais moins de cellules de tailles comprises entre 50 et 150 μm^2 , entre 150 et 350 μm^2 et de gros vaisseaux ($> 350 \mu\text{m}^2$) (Figure 11G). Ces différences significatives corroborent la diminution totale du nombre de cellules contenues dans un pôle de xylème (Figure 11F). Le phénotype observé chez le double mutant *sweet11sweet16* est un peu différent puisque le nombre de cellules comprises entre 0-50 μm^2 est significativement plus important chez le double mutant que chez le type sauvage ce qui pourrait expliquer la tendance observée quant au nombre total de cellule dans un pôle (Figure 11F et 11G).

➤ 2.2 Analyses de la composition de la paroi des cellules de xylème

La composition de la paroi des cellules du xylème a finalement été analysée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Les spectres obtenus pour le double mutant *sweet11sweet12* et le triple mutant *sweet11sweet12sweet16* ont été comparés à celles du sauvage (Figure 12A). Les valeurs de t de Student en fonction du nombre d'onde sont également présentées (Figure 12B). Pour rappel, les valeurs de t supérieures à +2 ou inférieures à -2 correspondent aux nombres d'ondes significativement différents par rapport au génotype de référence (Col-0).

L'analyse de la Figure 12B montre que les nombres d'ondes caractéristiques des polysaccharides ou des xyloglucanes (1041 cm^{-1} ; 1049 cm^{-1} ; 1060 cm^{-1}) et des liaisons C-O-C de cellulose (1157 cm^{-1}) sont très significativement différentes entre les deux lignées mutées et le type sauvage. La comparaison des spectres moyens à ces nombres d'ondes permet de suggérer que les parois du double mutant *sweet11sweet12* et du triple mutant *sweet11sweet12sweet16* comportent significativement moins de composés cellulotiques que le sauvage (Figure 12A). Des différences significatives ont également été observées à 1230 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} et 1245 cm^{-1} , ce qui correspond aux liaisons C-O et C=O des pectines de type rhamnogalacturonane ou aux fractions O-acetyl des polymères de paroi et indiquent que les parois du double mutant *sweet11sweet12* et du triple mutant *sweet11sweet12sweet16* comporteraient plus de pectines et/ou d'hémicellulose que le type sauvage (Figure 12). Les valeurs de t aux nombres d'ondes 1730 cm^{-1} , 1743 cm^{-1} correspondant aux groupements acétyl (1730 cm^{-1}) et aux groupements carbonyle (1743 cm^{-1}) sont également inférieures à -2 pour les deux génotypes. En complément, des différences significatives sont également observées aux nombres d'ondes 1639 cm^{-1} et 1677 cm^{-1} . Ces nombres d'ondes correspondent aux groupements COOH de polysaccharides de pectines correspondant notamment aux pectines

acides. Globalement, les parois du xylème du double mutant *sweet11sweet12* et du triple mutant *sweet11sweet12sweet16* sont fortement affectées dans leur composition au niveau des contenus en polysaccharides pariétaux (cellulose, hémicelluloses et/ou pectines). Au niveau des bandes caractéristiques des lignines, des différences significatives sont également observées (Figure 12B). Ainsi le nombre d'onde à 1128 cm^{-1} , qui correspond aux lignines de type S est significativement différent chez le double mutant *sweet11sweet12* mais pas chez le triple (Figure 12B). De plus des différences significatives sont observées à des nombres d'ondes caractéristiques des lignines de type G (1207 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} et 1510 cm^{-1}). L'ensemble de ces modifications tendent à suggérer qu'en plus de la modification en sucres pariétaux, le double mutant et le triple mutant présente également des modifications de la composition en lignines des parois du xylème.

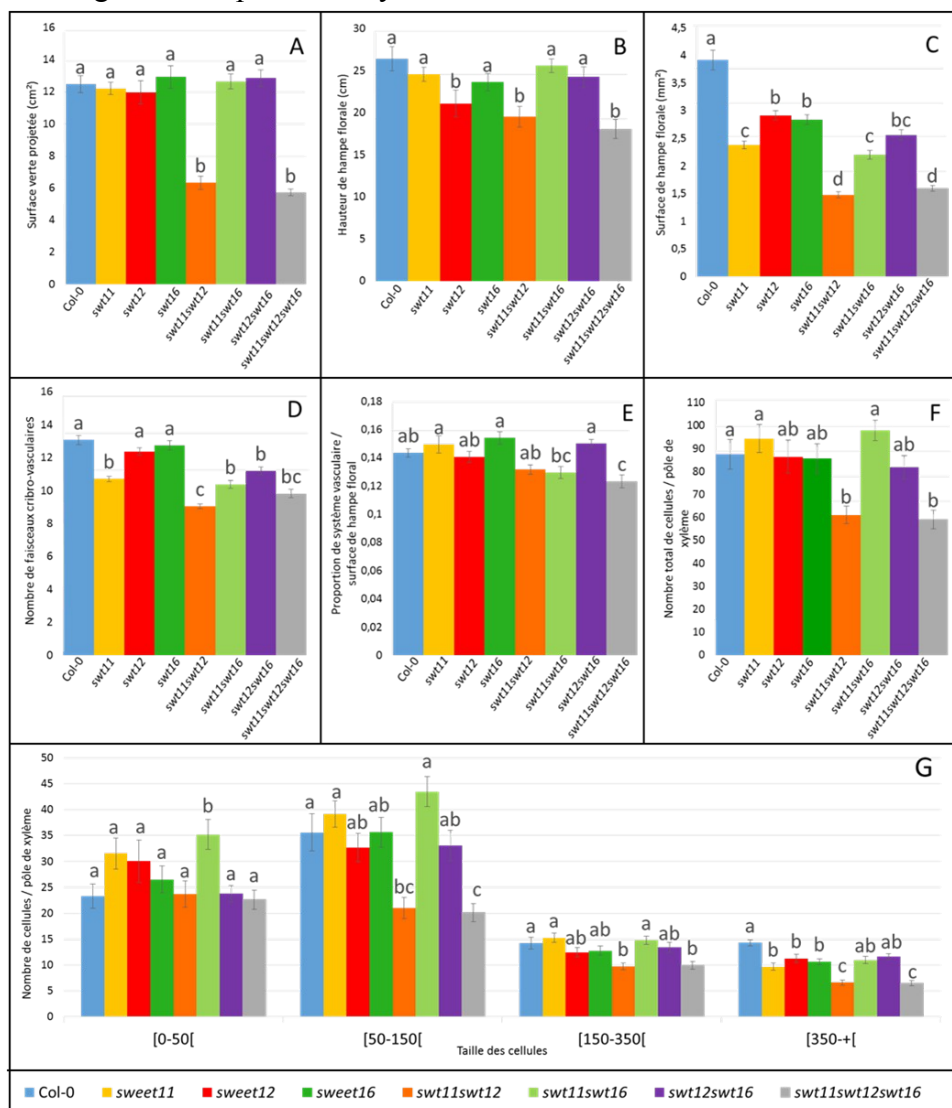


Figure 11 : Mesures des paramètres de croissance et mesures anatomiques du système vasculaire des différentes lignées de la série du triple mutant *sweet11sweet12sweet16*. (A) Surface verte projetée; (B) Hauteur de la hampe florale ; (C) Surface de la hampe florale ; (D) Nombre de faisceaux cribro-vasculaires ; (E) Proportion de système vasculaire total sur la totalité de la section transversale de hampe ; (F) Nombre total de cellules contenues dans un pôle de xylème ; (G) Nombre de cellules de xylème par classe de taille avec [0-50[: fibres ; [50-150[: population mixte de fibres et de vaisseaux ; [150-350[: vaisseaux, et [350-+ : gros vaisseaux (n=32). Abréviations : swt : sweet. Moyenne \pm erreur type (n=9 (A et B) ; n=24 (C) ; n=27 (D) ; n \geq 4 (E et F) ; n=32 (G et H)). Test statistique par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et post test de Tukey. Les génotypes portant la même lettre ne sont pas significativement différents alors que les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différents (P<0.05)

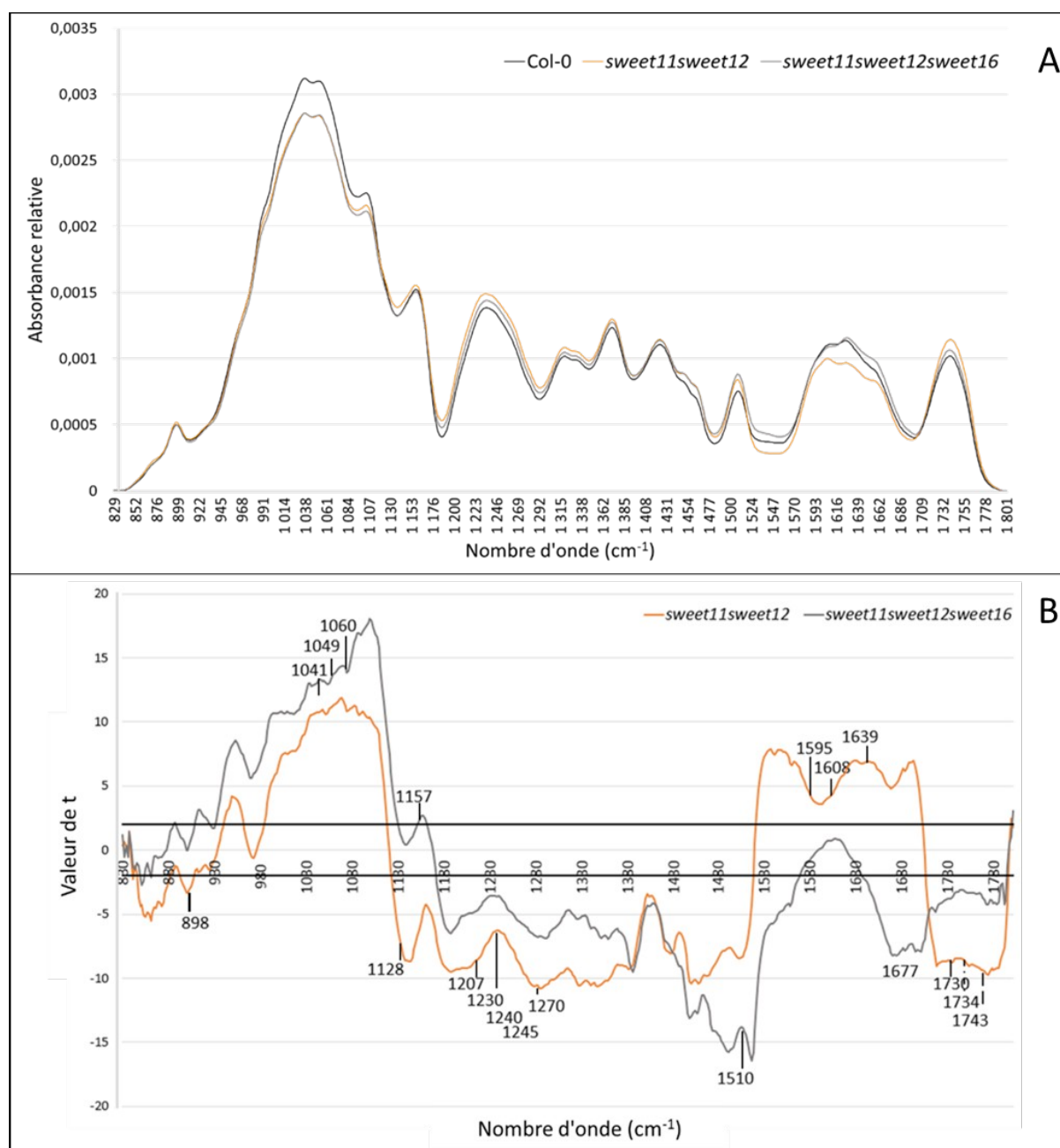


Figure 12 : Analyse de la composition chimique des parois des cellules de xylème de la hampe florale d'*Arabidopsis thaliana*. (A) Spectres moyens des génotypes sauvage, *sweet11sweet12* et *sweet11sweet12sweet16*; (B) Analyse statistique des spectres infrarouge à transformée de Fourier obtenus sur les pôles de xylème de hampes florales des différents génotypes. Un test *t* de Student a permis de comparer les absorbances des plantes sauvages aux différents mutants étudiés. Les résultats du test *t* obtenus (axe des ordonnées) ont été reportés au nombre d'ondes (axe des abscisses). Les valeurs du test *t* comprises entre -2 et 2 correspondent aux différences non significatives entre les génotypes testés. Les valeurs du test supérieures à 2 ou inférieures à -2 correspondent aux absorbances significativement différentes par rapport au génotype de référence.

IV. Discussion

Dans le cadre de ce stage, j'ai étudié les conséquences sur le développement du système vasculaire, de mutations dans quatre gènes codant pour des protéines transporteurs de sucres de la famille des SWEET (Chen et al., 2010). Les transporteurs SWEET11 et SWEET12 sont localisées dans la membrane plasmique de cellules du phloème (Chen et al., 2012) et du xylème (Le Hir et al., 2015), alors que les transporteurs SWEET16 et SWEET17 sont localisés dans la membrane vacuolaire de cellules du xylème (Chardon et al., 2013; Klemens et al., 2013). De par leur profil d'expression qui se superpose il est apparu logique de produire le double mutant *sweet16sweet17* et un triple mutant *sweet11sweet12sweet16* afin de préciser le rôle des protéines SWEET16 et SWEET17 dans le développement du système vasculaire et dans la formation de la paroi secondaire du xylème.

Les transporteurs SWEET16 et SWEET17 auraient un rôle différent en fonction du régime lumineux

Des études suggèrent que le transporteur tonoplastique SWEET16 serait impliqué dans la régulation subcellulaire de l'homéostasie du glucose, du fructose et du saccharose au niveau cellulaire (Klemens et al., 2013), alors que SWEET17 aurait un rôle plus spécifique en tant qu'exporteur du fructose de la vacuole vers le cytoplasme (Chardon et al., 2013; Klemens et al., 2013). Afin de préciser le rôle de ces deux transporteurs, le contenu en sucres solubles dans les feuilles matures et/ou dans la hampe florale de plantes cultivées en jours longs ou jours courts a été quantifié (Figure 10). Nous avons confirmé que le mutant *sweet17* accumule significativement plus du fructose dans les feuilles sources en conditions de jours courts comme cela avait été précédemment décrit (Figure 10A, Chardon et al., 2013). Il est intéressant de noter que le double mutant *sweet16sweet17* accumule également du fructose alors qu'aucune augmentation significative de fructose n'est observée dans le simple mutant *sweet16* (Figure 10B). En revanche, en conditions de jours longs, l'inverse est observé car le simple *sweet16* et le double mutant accumulent du fructose dans les feuilles sources alors qu'aucune différence n'est observée pour le mutant *sweet17* (Figure 10B). Ces résultats suggèrent que les transporteurs SWEET16 et SWEET17 pourraient avoir un rôle différent en fonction du régime lumineux. Ainsi, SWEET16 contribuerait à la régulation subcellulaire de fructose en jours longs tandis que SWEET17 agirait principalement en jours courts. En 2009, Gibon et collaborateurs (Gibon et al., 2009) ont en effet montré que les plantes adaptent leur métabolisme des sucres en fonction du régime lumineux. De plus, ces modifications seraient corrélées à des modifications du métabolisme azoté (Sulpice et al., 2013). Par ailleurs, Chardon et al. (2013) ont démontré une forte corrélation entre le métabolisme carboné et azoté chez le mutant *sweet17*. Il serait donc intéressant de quantifier le contenu en azote des différentes lignées mutantes en fonction des conditions de culture des plantes afin de mieux comprendre comment l'équilibre carbone/azote est contrôlé dans les différents organes de la plante (organe source vs organe puits).

La mutation du gène *SWEET16* affecte préférentiellement le développement du système vasculaire de la hampe florale

Chez *Arabidopsis thaliana* les transporteurs tonoplastiques SWEET16 et SWEET17 sont exprimés dans le système vasculaire de la hampe florale, des pétioles, des feuilles, et des racines, spécifiquement dans les cellules de parenchyme xylémien (Chardon et al., 2013; Klemens et al., 2013; Guo et al., 2014). Dans nos conditions de culture, nous avons

également observé l'expression du promoteur du gène *SWEET17* dans les cellules de parenchyme xylémien de la hampe florale spécifiquement (Figure 7D, 7E, et 7F). En revanche, nous n'avons pas observé exactement le même profil d'expression du promoteur du gène *SWEET16* que celui précédemment décrit (Klemens et al., 2013). Dans nos conditions l'expression s'est avérée plus étendue et variable au cours du développement de la hampe florale (Figure 7A, 7B et 7C). Nous avons observé l'expression du promoteur du gène *SWEET16* dans les fibres inter fasciculaires et dans les cellules à la jonction du cambium et du xylème à un stade de développement précoce où les cellules sont peu lignifiées (Figure 7A). A un stade de développement plus avancé, l'expression apparaît dans le phloème et dans les fibres ou les petits vaisseaux du xylème (Figure 7B). Finalement, à un stade où la lignification est très avancée, le profil d'expression se restreint pour se limiter uniquement aux cellules parenchymateuses du xylème et probablement également du phloème (Figure 7C). Ces différences de localisation de l'expression peuvent s'expliquer par les différentes conditions de culture utilisées par les différents laboratoires (serre avec plus d'intensité lumineuse) et nos conditions (chambre de culture avec 150 µE). Pour confirmer le profil d'expression que nous observons il sera indispensable d'effectuer une hybridation *in situ*. Néanmoins, nous pouvons déjà proposer un rôle plus important pour le transporteur *SWEET16*, que celui précédemment suggéré.

Afin de mieux comprendre le rôle de ces transporteurs dans le développement des tissus vasculaires nous avons plus précisément analysé le phénotype de la hampe florale des différents mutants. Les transporteurs *SWEET16* et/ou *SWEET17* seraient préférentiellement impliqués dans la croissance radiale des plantes car la hauteur de la hampe florale n'est affectée chez aucun des mutants. Le rapport surface du système vasculaire / surface de la hampe florale (SV/SH) nous apporte également des indications intéressantes. Ainsi chez les simples mutants ce rapport n'est pas significativement différent de celui du type sauvage et le pourcentage de système vasculaire représente environ 13% de la surface totale de la hampe. Chez les simples mutants, la diminution du diamètre des hampes florales s'accompagne d'une réduction proportionnelle de la quantité de système vasculaire. En revanche, chez le double mutant le ratio SV/SH est plus petit que chez les autres génotypes. Ainsi lorsque les deux gènes sont mutés, le développement du système vasculaire est moins important. Plus précisément, il semble que ces mutations impactent préférentiellement le développement du cambium et du xylème. De plus, pour un même nombre de cellules dans un pôle de xylème, le double mutant *sweet16sweet17* possède moins de fibres ou de petits vaisseaux et moins de vaisseaux de grande taille (Figure 8E). Enfin, chez le double mutant les gros vaisseaux contenus dans un pôle de xylème sont plus petits (Figure supplémentaire 3C). En conclusion une double mutation dans les gènes *SWEET16* et *SWEET17* affecte l'homéostasie des sucres dans la hampe florale et cela a pour conséquence une perturbation du développement des tissus vasculaires et plus spécifiquement du xylème. Nos résultats suggèrent que la modification des échanges de sucres entre la vacuole et le cytosol dans les cellules de parenchyme xylémien constitue une étape importante qui définit le nombre de vaisseaux de xylème et leur taille. Des résultats similaires ont été obtenus chez le double mutant *sweet11sweet12* (Le Hir et al., 2015) ce qui suggère un rôle important des protéines *SWEET* dans le développement du système vasculaire de la hampe florale chez *Arabidopsis thaliana*.

Afin d'approfondir le rôle du transporteur *SWEET16* dans ce processus développemental, une analyse similaire a été réalisée sur une série de lignées mutées dans les gènes *SWEET11*, *SWEET12* et/ou *SWEET16*. Conformément aux résultats précédemment publiés nous avons observé que le double mutant *sweet11sweet12* présente une croissance végétative et radiale affectée (Figure 11 ; Le Hir et al., 2015). Le triple mutant présente un

phénotype similaire (Figure 11) toutefois avec une différence significative par rapport au double mutant en ce qui concerne le rapport SV/SH. Ainsi, la mutation des deux transporteurs plasmalemmiques n'affecte pas ce rapport alors que qu'une mutation supplémentaire dans le gène *SWEET16* induit une diminution significative de ce rapport. Une même diminution de ce rapport a été observée chez le double mutant *sweet16sweet17*. L'ensemble de ces données montrent que la suppression de l'expression du gène *SWEET16* induit des conséquences sur le développement du système vasculaire probablement à travers une modification de l'activité du cambium. Le croisement de ces lignées avec un marqueur spécifique du cambium (ex : *WOX4* (Hirakawa et al., 2010)) ainsi que leur analyse phénotypique dans des conditions qui stimulent l'activité cambiale, permettraient de réaliser une analyse plus fine du cambium, et donc d'approfondir le rôle du transporteur *SWEET16* dans ce processus.

La suppression de l'expression du gène *SWEET17* induit des modifications de la composition de la paroi des cellules du xylème

Les sucres solubles constituent le réservoir pour la production des polysaccharides pariétaux présents dans les parois primaires et secondaires. Afin d'évaluer le rôle des transporteurs *SWEET16* et *SWEET17* dans ce processus, des analyses de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont été effectuées sur les parois de cellules de xylème des différents mutants.

En l'absence de *SWEET16*, les parois secondaires sont globalement peu modifiées et présentent une plus grande quantité de composés cellulosiques et de pectines méthylées mais une plus faible quantité de pectines acides que le génotype sauvage (Figure 9B). Il a été montré qu'au sein des parois primaires, les pectines s'associent aux microfibrilles de cellulose afin de les maintenir et de les orienter convenablement (Endler and Persson, 2011). De plus, l'affinité de ces liaisons dépend de la méthylation des pectines (Endler and Persson, 2011). L'augmentation des quantités de cellulose et de pectines méthylées observées chez le simple mutant *sweet16* semble en adéquation avec les résultats décrits dans la littérature. De plus, les modifications de la composition des parois du double mutants *sweet16sweet17* sont similaires à celles observées chez le simple mutant *sweet17* alors qu'elles sont quasiment opposées à celles du simple mutant *sweet16*. Finalement la comparaison de la composition de la paroi secondaire du xylème entre le double mutant *sweet11sweet12* et le triple mutant *sweet11sweet12sweet16* ne montre que peu de différences (Figure 12B). Donc l'ensemble de ces résultats suggère que les activités de transport de la protéine *SWEET16* n'ont que peu d'impact sur la formation de la paroi secondaire du xylème. Cependant une implication dans la formation de la paroi primaire à travers un rôle dans la synthèse des pectines est possible. Afin de confirmer ou non cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser la composition de la paroi primaire sur ces différents mutants comme cela a précédemment été effectué sur l'hypocotyle en élongation (Mouille et al., 2003).

En revanche, la paroi secondaire des cellules du xylème des mutants *sweet17* et *sweet16sweet17* contient moins de cellulose que celle du génotype sauvage. De façon intéressante, il a précédemment été montré une relation entre le contenu en cellulose et le contenu en sucres dont le fructose (Hossain et al., 2012). Ce phénotype semble donc cohérent avec le rôle de transporteur de fructose de *SWEET17* (Chardon et al., 2013). De plus, les parois des cellules de xylème de *sweet17* et *sweet16sweet17* sont plus riches en lignine que celles du sauvage. Dans ce contexte, l'augmentation de lignine permettrait de compenser le défaut de cellulose afin de maintenir une structure rigide de la paroi (Boudet et al., 2003). De plus, le ratio hexoses/saccharose mesuré dans la hampe florale du simple mutant *sweet17* et

du double mutant *sweet16sweet17* révèle une augmentation significative par rapport au type sauvage (Figure supplémentaire 4C). Dans la littérature, il a été suggéré qu'une telle augmentation de ce ratio serait liée à une augmentation de l'activité invertase au dépend de l'activité saccharose synthase (Tomlinson et al., 2004). Hors c'est l'activité de la saccharose synthase qui permet la production d'UDP-glucose qui est le précurseur commun pour la biosynthèse des polysaccharides de parois (Endler and Persson, 2011). Ainsi ces résultats suggèrent une plus faible production d'UDP-glucose et donc de sucres pariétaux chez le simple mutant *sweet17* et le double mutant et corroborent ainsi les résultats obtenus en spectroscopie infrarouge. Finalement la localisation spécifique de l'expression du promoteur de *SWEET17* permet de suggérer que l'homéostasie du fructose dans les cellules de parenchyme xylémien est un facteur important pour une formation adéquate de la paroi secondaire des vaisseaux du xylème. Ces observations font écho au travail réalisé par l'équipe de Lacey Samuels (Université de British Columbia) qui a montré l'importance des cellules adjacentes aux vaisseaux dans le processus de lignification de la paroi secondaire (« good neighbour hypothesis ») (Smith et al., 2013). Dans le cadre de notre étude, l'hypothèse d'un transfert similaire de sucres ou d'intermédiaires de la voie de biosynthèse des polysaccharides de paroi entre les cellules de parenchyme xylémien et les vaisseaux en développement, et faisant intervenir SWEET17, semble donc envisageable. Une hypothèse similaire a été proposée pour le rôle des transporteurs plasmalemmiques SWEET11 et SWEET12 (Le Hir et al., 2015). L'analyse du triple mutant *sweet11sweet12sweet17*, qui est en cours de production, devrait permettre d'affiner cette hypothèse.

V. Conclusion

L'objectif de ce stage était d'explorer le rôle des transporteurs SWEET16 et SWEET17 dans le développement du système vasculaire chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. Les résultats obtenus nous ont permis d'émettre plusieurs nouvelles hypothèses. Ainsi, SWEET17 assurerait l'export du fructose contenu dans la vacuole des cellules de parenchyme xylémien. Ce fructose serait transporté vers les vaisseaux en cours de formation par l'intermédiaire des protéines SWEET11 et/ou SWEET12, puis utilisé dans le cytosol des vaisseaux pour produire de l'UDP-glucose, précurseur de la synthèse de composés pariétaux. Le transporteur SWEET16, quant à lui, serait peu impliqué dans la formation de la paroi secondaire du xylème mais pourrait participer à la formation de la paroi primaire. De plus, un rôle préférentiel dans le développement du système vasculaire, à travers une modification de l'activité cambiale, peut également être envisagé. Ce travail a ainsi permis de mieux comprendre les rôles des transporteurs SWEET16 et SWEET17 dans le développement de la hampe florale ou la formation de la paroi secondaire des cellules de xylème, respectivement. L'analyse phénotypique du triple mutant *sweet11sweet12sweet17* ainsi que du quadruple mutant *sweet11sweet12sweet16sweet17* devrait permettre d'affiner les hypothèses émises dans ce rapport et donc de mieux comprendre le rôle des protéines SWEETs dans le transport des sucres entre les différents types cellulaires composant le système vasculaire.

VI. Bibliographie

- Baker RF, Leach KA, Braun DM** (2012) SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Molecular plant* **5**: 766-768
- Bergmeyer HV, Bernt E** (1974) Sucrose. In HV Bergmeyer, ed, *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp 1176-1179
- Boudet AM, Kajita S, Grima-Pettenati J, Goffner D** (2003) Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science* **8**: 576-581
- Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens PA, Spinner L, Clement G, Chietera G, L  ran S, Ferrand M, Lacombe B, Loudet O, Dinant S, Bellini C, Neuhaus E, Daniel-Vedele F, Krapp A** (2013) Leaf Fructose Content Is Controlled by the Vacuolar Transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology* **23**: 697-702
- Chen L-Q, Cheung LS, Feng L, Tanner W, Frommer WB** (2015) Transport of sugars. *Annual Review of Biochemistry* **84**: 865-894
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527-532
- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB** (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**: 207-211
- Cronshaw J** (1975) Sieve element cell walls. In *Phloem transport*. Springer, pp 129-152
- Dinant S** (2008) Phloem, transport between organs and long-distance signalling. *Comptes Rendus Biologies* **331**: 334-346
- Endler A, Persson S** (2011) Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*. *Molecular plant* **4**: 199-211
- Eom J-S, Chen L-Q, Sosso D, Julius BT, Lin I, Qu X-Q, Braun DM, Frommer WB** (2015) SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology* **25**: 53-62
- Faix O** (1991) Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* **45**: 21-28
- Gibon Y, PYL ET, Sulpice R, Lunn JE, Hoehne M, Guenther M, Stitt M** (2009) Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant, Cell & Environment* **32**: 859-874
- Guo W-J, Nagy R, Chen H-Y, Pfrunder S, Yu Y-C, Santelia D, Frommer WB, Martinoia E** (2014) SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology* **164**: 777-789
- Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H** (2010) TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**: 2618-2629
- Hossain Z, McGarvey B, Amyot L, Gruber M, Jung J, Hannoufa A** (2012) DIMINUTO 1 affects the lignin profile and secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Planta* **235**: 485-498
- Ka  ur  kov   M, Smith AC, Gidley MJ, Wilson RH** (2002) Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **337**: 1145-1153
- Klemens PA, Patzke K, Deitmer J, Spinner L, Le Hir R, Bellini C, Bedu M, Chardon F, Krapp A, Neuhaus HE** (2013) Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **163**: 1338-1352
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB** (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 341-372
- Le Hir R, Spinner L, Klemens P, Chakraborti D, Vilaine F, Wolff N, Lemoine R, Percheron B, G  ry C, T  oul   E, Chabout S, Mouille G, Neuhaus E, Dinant S, Bellini C** (2015) Disruption of the sugar transporters *AtSWEET11* and *AtSWEET12* affects vascular development and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **8**: 1687-1690
- Ludewig F, Flügge U-I** (2013) Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Frontiers in plant science* **4**: 231

Mahboubi A, Ratke C, Gorzsas A, Kumar M, Mellerowicz E, Niittylä T (2013) Aspen SUCROSE TRANSPORTER3 allocates carbon into wood fibers. *Plant Physiology* **163**: 1729-1740

McFarlane HE, Döring A, Persson S (2014) The cell biology of cellulose synthesis. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 69-94

Minchin P, McNaughton G (1987) Xylem transport of recently fixed carbon within lupin. *Australian Journal of Plant Physiology* **14**

Minchin P, Thorpe M (1987) Measurement of unloading and reloading of photo-assimilate within the stem of bean. *Journal of Experimental Botany* **38**: 211-220

Mohebbi B (2010) Application of ATR infrared spectroscopy in wood acetylation. *Journal of Agricultural Science and Technology* **10**: 253-259

Mouille G, Robin S, Lecomte M, Pagant S, Hofte H (2003) Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant Journal* **35**: 393-404

Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, Rejab NA, Ohtani M (2015) NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Frontiers in plant science* **6**: 288

Pfautsch S, Renard J, Tjoelker MG, Salih A (2015) Phloem as capacitor: radial transfer of water into xylem of tree stems occurs via symplastic transport in ray parenchyma. *Plant Physiology* **167**: 963-971

Sauer N (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* **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 Physiology* **148**: 187-199

Schuetz M, Smith R, Ellis B (2012) Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of Experimental Botany*

Smith RA, Schuetz M, Roach M, Mansfield SD, Ellis B, Samuels L (2013) Neighboring parenchyma cells contribute to Arabidopsis xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *The Plant Cell* **25**: 3988-3999

Sokolowska K, Zagórska-Marek B (2012) Symplasmic, long-distance transport in xylem and cambial regions in branches of *Acer pseudoplatanus* (Aceraceae) and *Populus tremula* × *P. tremuloides* (Salicaceae). *American Journal of Botany* **99**: 1745-1755

Sulpice R, Nikoloski Z, Tschöep H, Antonio C, Kleessen S, Larhlmi A, Selbig J, Ishihara H, Gibon Y, Fernie AR (2013) Impact of the carbon and nitrogen supply on relationships and connectivity between metabolism and biomass in a broad panel of Arabidopsis accessions. *Plant Physiology* **162**: 347-363

Tomlinson KL, McHugh S, Labbe H, Grainger JL, James LE, Pomeroy KM, Mullin JW, Miller SS, Dennis DT, Miki BL (2004) Evidence that the hexose-to-sucrose ratio does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplasmic invertase. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2291-2303

Turgeon R (1989) The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **40**: 119-138

van Bel AJE (1990) Xylem-phloem exchange via the rays: the undervalued route of transport. *Journal of Experimental Botany* **41**: 631-644

Williams LE, Lemoine R, Sauer N (2000) Sugar transporters in higher plants - A diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci* **5**: 283-290

Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE (2006) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *The Plant Cell* **18**: 3476-3490

Xuan YH, Hu YB, Chen L-Q, Sosso D, Ducat DC, Hou B-H, Frommer WB (2013) Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: E3685-E3694

Zhang L, Tan Q, Lee R, Trethewy A, Lee YH, Tegeder M (2010) Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **22**: 3603-3620

Annexes

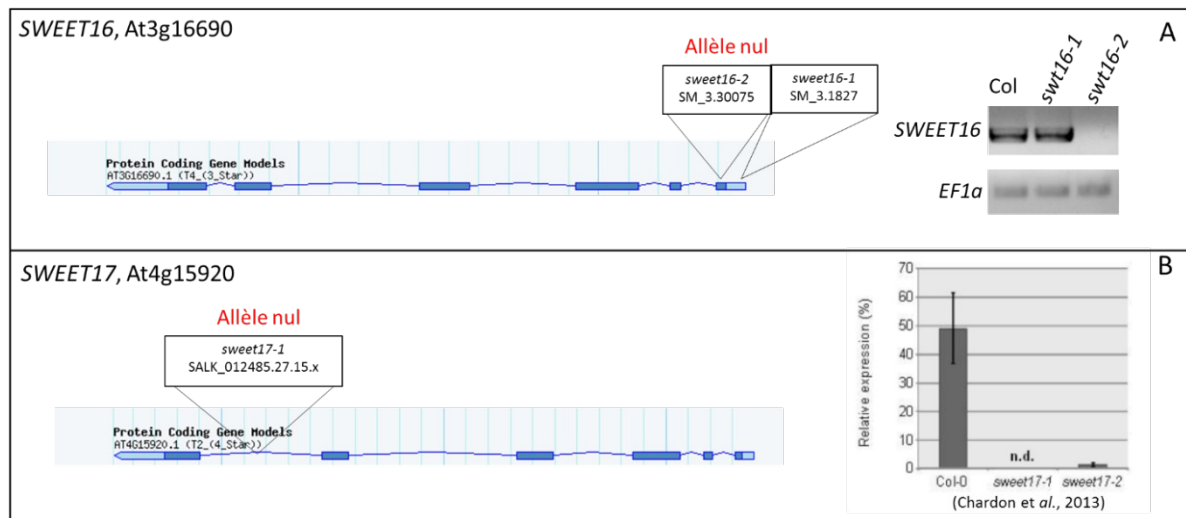


Figure supplémentaire 1 : Représentation schématique de la structure des gènes *SWEET16* (A) et *SWEET17* (B) et localisation des différents allèles testés. Sur la partie droite est présenté les résultats des expériences caractérisant les allèles nuls.

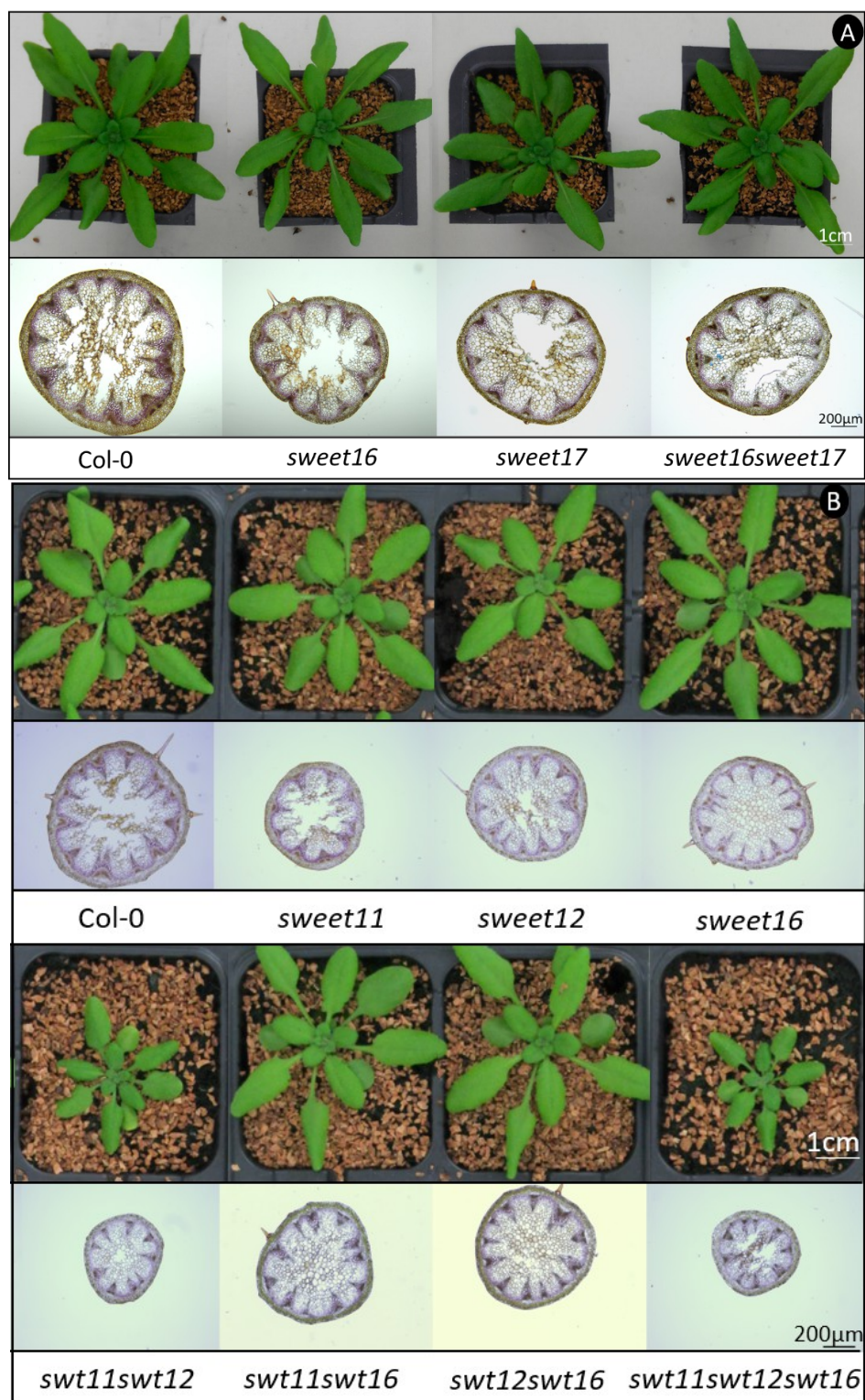


Figure supplémentaire 2 : Photographies des phénotypes des plantes de la série du double mutant *sweet16sweet17* (A) ; et de la série du triple mutant *sweet11sweet12sweet16* (B). Pour chaque génotype une photographie de la rosette à 5 semaines de croissance et une image de section basale de hampe florale de plantes âgées de 8 semaines sont présentées. Abréviations : *swt*: *sweet*

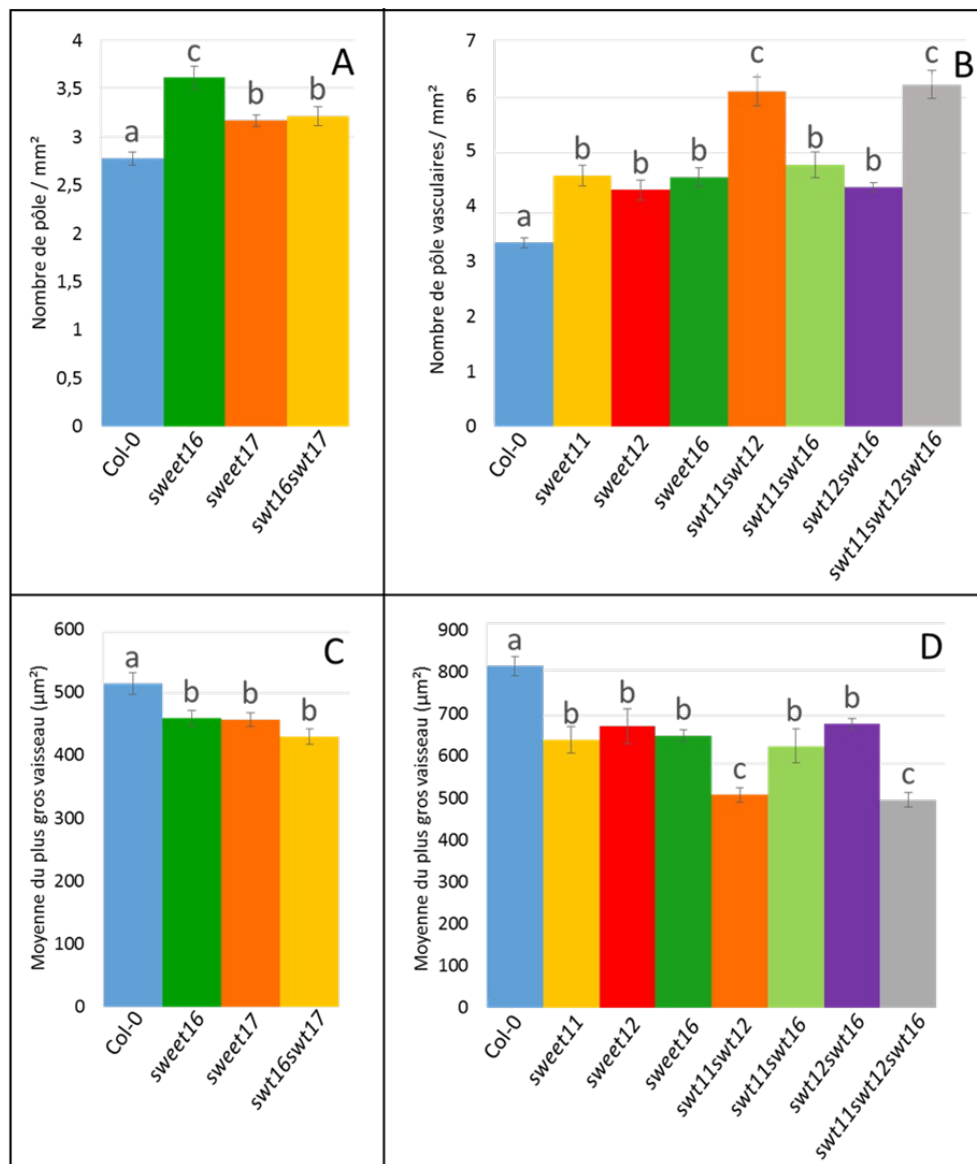


Figure supplémentaire 3 : Représentation graphique du nombre de pôle / mm² (A) de la série du double mutant ; (B) de la série du triple mutant ; et de la taille moyenne du plus gros vaisseau de xylème (C) de la série du double mutant et (D) de la série du triple mutant. Moyenne \pm erreur type (n=24 (A), n=27 (B), n= 32*5 (C et D)). Test statistique par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et post test de Tukey. Les génotypes portant la même lettre ne sont pas significativement différents alors que les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différent (P<0.05). Abréviations : swt : sweet.

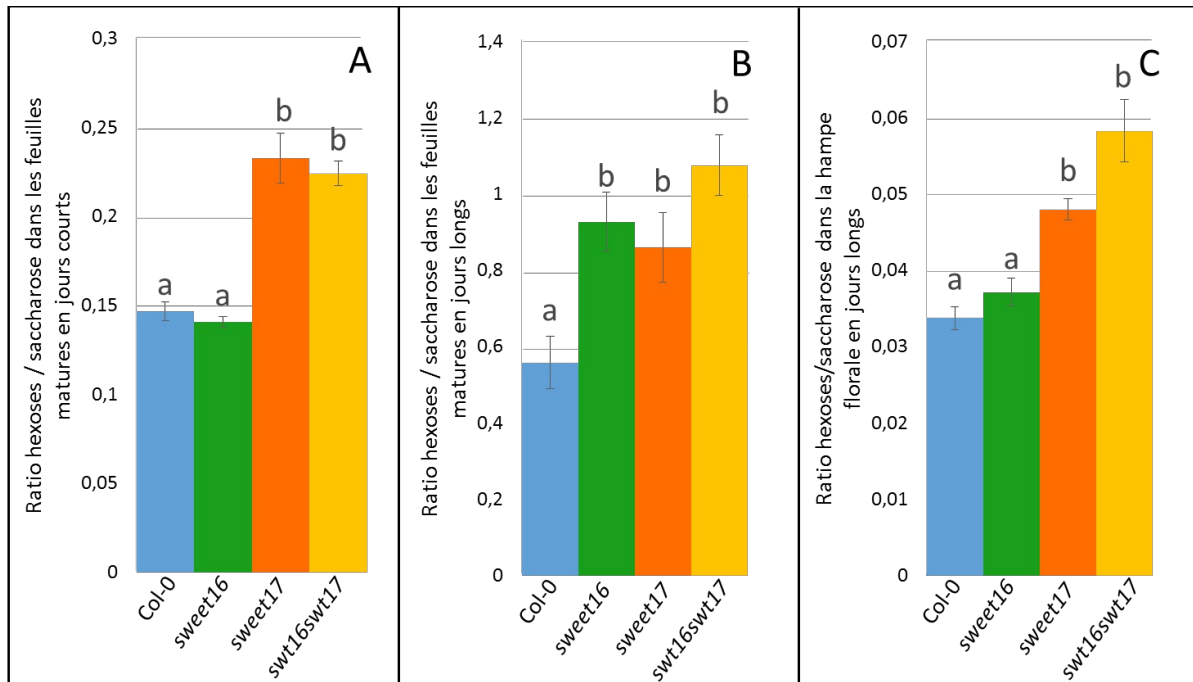


Figure supplémentaire 4 : Ratio des quantités d'hexoses (glucose + fructose) par rapport au saccharose des génotypes sauvage, *sweet16*, *sweet17* et *sweet16sweet17* dans les (A) : feuilles matures en jours courts ; (B) feuilles matures en jours longs ; (C) hampes florale en jours longs. Moyenne \pm erreur type ($n > 10$ (A et B) ; $n = 4$ (C)). Test statistique par analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA) et post test de Tukey. Les génotypes portant la même lettre ne sont pas significativement différents alors que les génotypes portant des lettres différentes sont significativement différent ($P < 0.05$). Abréviations : swt : sweet.

Résumé

Chez les végétaux, la famille des transporteurs de type SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) est impliquée dans le transport intercellulaire et intracellulaire des sucres. Il a notamment été montré que les promoteurs des gènes *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* et *SWEET17* s'expriment dans les cellules xylémiennes. De plus, un rôle des protéines SWEET11 et SWEET12 dans le développement du système vasculaire de la hampe florale a été suggéré. L'objectif de ce stage est donc d'approfondir les rôles des transporteurs SWEET16 et SWEET17 dans le développement du système vasculaire et dans la formation de la paroi secondaire des plantes. Ainsi, des lignées d'*Arabidopsis thaliana* doublement mutées *sweet16sweet17* et triplement mutées *sweet11sweet12sweet16* ont été analysées à différentes échelles (ex : morphologie et anatomie de la hampe florale, composition de la paroi secondaire par spectroscopie infrarouge, et/ou mesures des contenus en sucres). Les résultats obtenus suggèrent que le fructose exporté par SWEET17 participe directement ou indirectement à la synthèse de la paroi secondaire des vaisseaux. Le transporteur SWEET16 contribuerait préférentiellement au développement du système vasculaire en modulant l'homéostasie des sucres dans les cellules vasculaires en développement.

Mots Clés : SWEET, transport, allocation des sucres, développement, système vasculaire, phloème, xylème, cambium, paroi secondaire.

Abstract

In higher plants, the members of the SWEET transporter family (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) transport sugars between and within cells. Previously, it has been shown that *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16* and *SWEET17* promoters are expressed in particular in xylem cells. Moreover, the proteins SWEET11 and SWEET12 have been suggested to participate in the vascular system stem development. The main purpose of this work was to better understand the role of SWEET16 and SWEET17 transporters in the vascular system development, especially during the xylem secondary cell wall formation. *Arabidopsis thaliana* simple, double and triple mutant lines defective in *SWEET11*, *SWEET12*, *SWEET16*, and/or *SWEET17* expression were analysed at different scales (ex : stem morphology and xylem anatomy, xylem cell wall composition by infrared spectroscopy, and/or quantification of soluble sugars). Our results suggest that the fructose exported by SWEET17 will be used directly or not for the secondary cell wall biosynthesis in the vessels. On the other hand, SWEET16 could preferentially contribute to the vascular system development by modulating the sugar homeostasis in developing vascular cells.

Keywords: SWEET, transport, sugar allocation, development, vascular system, phloem, xylem, cambium, secondary cell wall.