



UNIVERSITE de CAEN/BASSE-NORMANDIE

Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie

UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutrition NCS

Thèse présentée par

Jérémy LOTHIER

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Caen

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions
(Arrêté du 7 août 2006)

**Métabolisme des fructanes chez *Lolium perenne* L.:
Identification de deux gènes codant des fructane
exohydrolases (FEHs) et étude de la régulation de
l'activité FEH par les sucres solubles.**

Soutenue à Caen le **17 décembre 2007**, devant la commission d'examen composée de :

A. VAN LAERE, Professeur, Université de Louvain (Belgique)	Rapporteur
D. ROLIN, Professeur, Université de Bordeaux II	Rapporteur
F. ROLLAND, Chercheur, Université de Louvain (Belgique)	Examineur
A. OURRY, Professeur, Université de Caen	Examineur
A. MORVAN-BERTRAND, Maître de Conférences, Université de Caen	Co-directrice de thèse
M.P. PRUD'HOMME, Professeur, Université de Caen	Directrice de thèse

Année :

N°:

REMERCIEMENTS-

Pour commencer, je tiens à remercier chaleureusement le directeur du laboratoire, Alain Ourry (dit le chef) de m'avoir accueilli au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA nutritions NCS pour la réalisation de mon stage de DEA et de m'avoir soutenu pour l'obtention de ma bourse de thèse MENRT et mon monitorat. J'arrête là car je crois me souvenir que je t'ai déjà remercié en « liquide » et que tu as déjà accepté mes remerciements !

Je suis très honoré que Dominique Rolin et André Van Laere aient accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Filip Rolland et Alain Ourry de l'intérêt qu'ils portent à mon travail en acceptant d'en être les examinateurs.

Merci à nos amis belges, Wim Van den Ende et André Van Laere pour leur accueil chaleureux au sein du Laboratory for Molecular Plant Physiology de l'Université Catholique de Leuven (Belgique). Merci à Wim pour m'avoir initié à la technique d'expression hétérologue dans *Pichia Pastoris*, je te dois une bonne partie des résultats que j'ai obtenu. Je tiens aussi à remercier Katrien, Barbara, Lindsey et Rudy, vous avez été adorables.

Je tiens également à remercier Philippe Barre (Lusignan INRA-UGAPF) pour la cartographie du gène *Lp1-FEHa* et surtout pour ses explications sur les différences entre génotype et variété.

Je tiens aussi à remercier tous les enseignants qui m'ont encadré durant mon service de moniteur avec une pensée particulière pour toute la bande du LBBM Benoît, Isabelle, Pascal et Anne Marie.

Annette et Marie-Pascale, je ne sais pas quoi écrire ! Comme le temps passe vite ! Je me souviens lorsque nous avons fait connaissance lors de mon stage de licence, c'est à ce moment là que je me suis dis « si je m'engage dans la recherche, ça sera avec elles ». Cinq ans plus tard, nous sommes encore ensemble mais plus pour très longtemps, hélas ! Nos chemins vont bientôt se séparer mais sachez que partout où j'irai travailler, vous guiderez mes pas, je suis votre disciple. Alors pour tout ce que vous m'avez donné, je vous adresse un grand un très grand **merci** du fond du cœur (tu vois Annette que je mets des trucs en gras dans ma thèse) et je vous souhaite bonne route.

Bertrand, moi aussi je t'écris une mention spéciale. Evidemment ma thèse n'aurait pas été la même si tu n'avais pas été là. Nous avons vraiment passé du bon temps au labo et en dehors. Mais l'Amérique, ce n'est pas si loin, alors à bientôt mon ami.

Laurent, toi aussi tu as le droit à ta mention spéciale, merci pour les pauses café, les sorties dans les bars, le golf, les pauses café, les sorties dans les bars, le golf, les pauses café, les sorties dans les bars, le golf, les pauses café, les sorties dans les bars, le golf, les pauses café, les sorties dans les bars, le golf...

Un très grand merci pour les pôôôôtes du saucisson bière foot que je ne nommerai pas pour préserver votre vie privée contre d'éventuels charognards de la presse people mais vous vous reconnaîtrez. Merci en tout cas, grâce à vous la semaine s'arrêtait le vendredi midi ce qui est plutôt confortable. Merci à Fredo, Alex et Marie D. pour les soirées UNO, la prochaine (si possible un weekend) c'est moi ou Julie qui la gagne.

Merci à tous mes collègues stagiaires pour les bonnes parties de rigolade, je vous souhaite bon courage et bonne chance.

Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu l'honneur d'encadrer : Fabien, Emilie, Estelle et Angélique.

Je tiens également à remercier tout le personnel du laboratoire EVA que je n'ai pas cité personnellement mais qui m'a aidé et m'a permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Et bien sûr, le meilleur pour la fin, un grand merci à Julie pour m'avoir aidé durant la rédaction de ce manuscrit d'une part et m'avoir fait découvrir un volet délicieux des interactions C/N d'autre part.

Bonne continuation à tous, il faut croire au destin...

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BFC	Bases des feuilles en croissance
BSA	Albumine sérique bovine
CLHP, HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytosine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
DP	Degré de polymérisation
DTT	Dithiothréitol
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
FEH	Fructane exohydrolase
FT	Fructosyltransférase
1-FFT	Fructane:fructane 1-fructosyltransférase
6G-FFT	Fructane:fructane 6G-fructosyltransférase
HPAEC-PAD	Système chromatographique d'échange d'anions haute pression couplée à un détecteur à ampérométrie pulsée
kDa	kiloDalton
kV	kilovolt
MF	Matière fraîche
NADP⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH, H⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, formeréduite
nkatal	nanokatal (nanomoles par seconde)
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PVPP	Polyvinylpyrrolidone
QTL	Quantitative Trait Locus
RT	Reverse Transcription (transcription inverse)
6-SFT	Saccharose:fructane 6-fructosyltransférase
1-SST	Saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase
Tm	Température d'hybridation
U	Unité enzymatique
UTR	Untranslated region (région non traduite)

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....4

1. Le métabolisme des fructanes chez les végétaux supérieurs	5
1.1 Structure des fructanes.....	5
1.2 Synthèse des fructanes : les fructosyltransférases (FTs).....	7
1.3 Dégradation des fructanes : les fructane exohydrolases (FEHs)	9
1.4 Localisation tissulaire et subcellulaire des fructanes	11
1.5 Rôles des fructanes	13
1.5.1 Mise en réserve du carbone	13
1.5.2 Régulation de la concentration en saccharose	14
1.5.3 Ajustement du potentiel osmotique	15
1.5.4 Résistance aux stress abiotiques	15
1.6 Régulation de la synthèse et de la dégradation des fructanes	16
1.6.1 Le saccharose, un facteur majeur de régulation du métabolisme des fructanes.....	17
1.6.2 Quels autres facteurs pour la régulation du métabolisme des fructanes ?	19
2. Les voies de perception et de transmission des signaux sucres : « sugar sensing and signaling».....	21
2.1 Définition et implication dans la croissance et le développement.....	21
2.2 La perception du signal « sucre »	22
2.2.1 Perception du glucose et du fructose	22
2.2.2 Perception du saccharose.....	26
2.3 Les acteurs impliqués dans la transmission du signal « sucre »	27
2.3.1 Les protéines kinases, les protéines phosphatases et le Ca ²⁺	27
2.3.2 Les protéines SnRK1s.....	27
2.3.3 Le tréhalose-6-phosphate?	28
2.4 Les mécanismes de régulation déclenchés par les sucres	29
2.4.1 Régulation transcriptionnelle.....	29
2.4.2 Régulation post-transcriptionnelle.....	30
2.4.3 Régulation post-traductionnelle.....	30
3. Rôle et régulation du métabolisme des fructanes après la coupe chez le ray-grass anglais, <i>Lolium perenne</i> L.	31
3.1 Présentation de la plante et rappel sur les structures et le métabolisme des fructanes.....	31
3.2 Effet de la défoliation sur le métabolisme des fructanes	31
3.3 Régulation du métabolisme des fructanes après la coupe, hypothèse du « signal sucre ».....	33

OBJECTIFS DE RECHERCHE35

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES39

RESULTATS.....42

1. Article I: Hexoses and sucrose-sensing mechanisms modulate fructan exohydrolase (FEH) activity but not sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) activity in defoliated perennial ryegrass.	43
1.1 Résumé.....	44
1.2 Abstract	45
1.3 Introduction.....	46
1.4 Materials and methods	48
1.4.1 Plant material	48
1.4.2 Experimental procedure, treatments and harvest	49
1.4.3 Extraction and analysis of WSC	49
1.4.4 Measurement of enzyme activities	51
1.4.5 Statistical analysis.....	52
1.5 Results	52
1.5.1 Effects of hexoses and hexose analogues on 1-SST, FEH and INV activities after defoliation.....	53
1.5.2 Effects of hexoses and hexose analogues on sucrose, glucose and fructose levels after defoliation.	54
1.5.3 Effects of sucrose and disaccharide analogues on 1-SST, 1-FEH and INV activities after defoliation.	55
1.5.4 Effects of sucrose and disaccharide analogues on sucrose, glucose and fructose levels after defoliation.....	55

1.5.5.	Effects of sugar supply on fructan levels after defoliation	57
1.6	Discussion	57
1.7	Conclusion	60
2.	Article II: Cloning, gene mapping and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from <i>Lolium perenne</i> rather implicated in fructan synthesis than in fructan mobilisation.....	61
2.1	Résumé	62
2.2	Abstract	63
2.3	Introduction	64
2.4	Materials and methods	66
2.4.1.	Plant material	66
2.4.2.	Preparation and screening of <i>L. perenne</i> cDNA library	67
2.4.3.	cDNA 5' cloning	68
2.4.4.	Lp1-FEHa mapping	68
2.4.5.	Expression in <i>Pichia pastoris</i>	69
2.4.6.	Determination of enzyme activities of the <i>P. pastoris</i> expressed recombinant Lp1-FEHa	70
2.4.7.	Extraction and analysis of water soluble carbohydrates (WSC).....	70
2.4.8.	Measurement of 1-FEH and sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) activities in leaf protein extracts	71
2.4.9.	RNA isolation and real-time qPCR analysis	72
2.5	Results	73
2.5.1.	Sequence analysis of the perennial ryegrass Lp1-FEHa cDNAs	73
2.5.2.	Gene mapping	74
2.5.3.	Functional characterization of the recombinant 1-FEH protein	74
2.5.4.	Transcript levels of Lp1-FEHa and 1-FEH activity during fructan mobilisation	76
2.5.5.	Transcript levels of Lp1-FEHa and 1-FEH activity during fructan accumulation	77
2.6	Discussion	78
2.6.1.	Nucleotidic sequence of <i>Lp1-FEHa</i> transcripts and deduced amino acid sequence of protein	78
2.6.2.	Gene mapping	79
2.6.3.	Enzymatic properties	79
2.6.4.	Subcellular localization.....	80
2.6.5.	Putative function for Lp1-FEHa in leaves.....	81
2.7	Conclusion	83
3.	Article III: Cloning and functional analysis of a fructan 6-exohydrolase (6-FEH) from <i>Lolium perenne</i>. Post transcriptional mechanisms for regulation of FEH activity involved in fructan mobilization after defoliation in grass species?	84
3.1	Résumé	85
3.2	Abstract	86
3.3	Introduction	87
3.4	Materials and methods	89
3.4.1.	Plant material	89
3.4.2.	Preparation and screening of <i>L. perenne</i> cDNA library	90
3.4.3.	cDNA 5' cloning	91
3.4.4.	Expression in <i>Pichia pastoris</i>	91
3.4.5.	Determination of enzyme activities of the <i>P. pastoris</i> expressed recombinant Lp6-FEHa	92
3.4.6.	Extraction and analysis of water soluble carbohydrates	93
3.4.7.	RNA isolation and real-time qPCR analysis	93
3.5	Results	94
3.5.1.	Molecular characterization of Lp6-FEHa	94
3.5.2.	Homology with other glycosyl hydrolases	95
3.5.3.	Functional characterization of the recombinant Lp6-FEH protein	95
3.5.4.	Soluble sugar contents and fructan metabolism gene transcript levels in defoliated ryegrass	96
3.5.5.	<i>Lp6-FEHa</i> gene expression in response to sugar supply	97
3.6	Discussion	97
3.6.1.	Deduced amino acid sequence of Lp6-FEHa	97
3.6.2.	Enzymatic properties	98
3.6.3.	In planta function of Lp6-FEHa	99
3.6.4.	Regulation of Lp6-FEHa	100
3.7	Conclusion	101

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	103
1. Discussion	105
1.1 Méthodologie employée	105
1.1.1. Le système d'étude du rôle des signaux « sucre » dans la régulation de l'activité FEH	105
1.1.2. Intérêt de l'expression hétérologue dans la levure <i>Pichia pastoris</i> pour la caractérisation fonctionnelle des deux FEHs clonées	107
1.2 La régulation du métabolisme des fructanes après une défoliation.....	108
1.2.1. Les signaux régulant le métabolisme des fructanes après une défoliation	108
1.2.2. Les mécanismes à l'origine de la régulation du métabolisme des fructanes après une défoliation	111
1.3 Conclusion sur la régulation du métabolisme des fructanes dans les tissus foliaires du ray-grass anglais..	114
2. Perspectives de recherche	116
2.1 Régulation du métabolisme des fructanes.....	116
2.1.1. Poursuivre l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité FEH.....	116
2.1.2. Etendre l'étude aux autres isoformes de FEHs	119
2.2 De l'étude du métabolisme des fructanes à la sélection variétale	120
2.2.1. L'origine de la variabilité génétique des richesses en sucres	120
2.2.2. Les gènes codant des enzymes du métabolisme des fructanes, des marqueurs moléculaires pour la sélection variétale ?	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	122

INTRODUCTION



Figure 1: Le ray-grass anglais (*Lolium perenne*), dessin d'une plante (d'après Lindman, 1905).

Le **ray-grass anglais** (*Lolium perenne* L.) est une plante herbacée vivace de la famille des Poacées (Figure 1). Originaire des régions tempérées et chaudes de l'ancien monde, Afrique du nord, Europe, Asie occidentale et du sous-continent indien, il est maintenant naturalisé dans toutes les régions tempérées du globe. Cette plante possède un grand intérêt agronomique. En effet, grâce à sa pérennité, sa tolérance au piétinement et sa bonne valeur alimentaire (Bourgoin, 1995), le ray-grass anglais est largement utilisé comme espèce fourragère et constitue l'une des espèces majeures de la prairie. Les recherches sur la prairie s'inscrivent dans le contexte d'une agriculture qui est passée d'un schéma productiviste à un schéma dans lequel doivent être également prises en compte préservation de l'environnement et valeur alimentaire.

Chez le ray-grass anglais, les réserves glucidiques accumulées principalement dans les feuilles représentent une source d'énergie pour les herbivores et contribuent aussi grandement à sa pérennité. C'est pourquoi l'un des critères de sélection porte chez cette espèce sur la richesse en sucres de ses tissus. Après une défoliation due à la fauche ou au pâturage, l'arrêt de l'acquisition des photoassimilats est compensé en partie par l'utilisation de glucides stockés préalablement sous forme de fructanes dans les tissus foliaires préservés de la coupe (Prud'homme *et al.*, 1992; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a; Amiard *et al.*, 2003b). Les glucides alimentent prioritairement les méristèmes foliaires pour assurer la constitution de nouvelles feuilles capables d'assimiler le dioxyde de carbone atmosphérique. Le niveau des réserves glucidiques au moment de la défoliation est d'ailleurs positivement corrélé avec la production foliaire durant les deux premiers jours suivant la défoliation (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a). Chez cette espèce, les glucides s'accumulent en majorité sous forme de fructanes (Chatterton *et al.*, 1989), qui sont la forme principale de réserve chez 12 à 15% des végétaux supérieurs (Hendry, 1993).

L'utilisation des fructanes suppose leur hydrolyse dans les tissus foliaires laissés en place par la coupe. En dépit de l'intérêt agronomique du ray-grass, de l'importance de la mobilisation des réserves glucidiques pour assurer sa repousse, les mécanismes sous-jacents à cette mobilisation sont encore très méconnus. Ainsi, à l'heure où ce travail a débuté, aucun gène codant les enzymes permettant la dégradation des fructanes n'était cloné, si bien que les connaissances relatives aux facteurs endogènes impliqués n'étaient que fragmentaires. Parmi ces facteurs potentiels, figurent les sucres solubles, saccharose, glucose et fructose dans la

mesure où leurs teneurs diminuent en réponse à la défoliation et où il est admis qu'ils peuvent assurer un rôle signalétique au sein des organismes végétaux (Koch, 1996).

Dans ce contexte, les principaux objectifs de mon travail de thèse étaient de caractériser les enzymes responsables de la dégradation des fructanes et d'étudier la régulation de leurs activités en analysant plus spécifiquement le rôle potentiel joué par les sucres solubles. Après une analyse bibliographique portant sur le métabolisme des fructanes et sur le rôle signalétique des sucres solubles chez les végétaux supérieurs, les résultats sont exposés sous la forme de trois articles scientifiques suivis d'une discussion générale incluant les perspectives de recherche.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I: Distribution des fructanes chez les angiospermes (d'après Hendry, 1993).

	Famille	Estimation du nombre d'espèces
Dicotylédones	Astéracées	25000
	Campanulacées	2250
	Dipsacacées	60
	Polemoniacees	2340
	Ericacées	150
Monocotylédones	Poacées	8000
	Liliacées	7200
Nombre total d'espèces estimées		45000

-Le nom des fructanes est construit autour du préfixe « kesto » et du suffixe « ose ».

-Entre le préfixe et le suffixe se trouve la racine grecque correspondant au DP du fructane :

les fructanes de DP3 sont des kestotrioses, les DP4 des kestotétraoses, les DP5 des kestopentaoses etc.....

-Le nom du fructane est précédé par un ou plusieurs nombres qui indiquent les numéros des carbones engagés dans les différentes liaisons :

«1- »: liaison entre le carbone n°2 d'un fructosyle et le carbone n°1 d'un autre fructosyle: le 1-kestotriose par exemple.

« 6 -» : liaison entre le carbone n°2 d'un fructosyle et le carbone n°6 d'un autre fructosyle: le 6-kestotriose par exemple.

«6G- »: liaison entre le carbone n°2 d'un fructosyle et le carbone n°6 du glucose: le 6G-kestotriose par exemple, appelé également néokestose

Les liaisons engageant le fructose du saccharose sont citées en premier.

Lorsque les liaisons $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$ coexistent, la liaison $\beta(2-1)$ est notée en premier.

-Les différents numéros précédemment cités sont séparés par :

Une virgule lorsqu'ils concernent des liaisons sur différents résidus : le 1,1-kestotétraose et le 6G, 1-kestotétraose par exemple.

Le signe « & » lorsqu'ils concernent des liaisons sur le même résidu : le 1&6-kestotétraose par exemple.

Figure 2: Nomenclature des fructanes (d'après Waterhouse et Chatterton, 1993).

1. Le métabolisme des fructanes chez les végétaux supérieurs

Identifiés par Rose en 1804 dans les rhizomes d'aunée (*Inula helenium*), une dicotylédone de la famille des Astéracées, les fructanes sont des polymères de fructose construits autour d'une molécule de saccharose (Pontis et Del Campillo, 1985). Moins étudiés que l'amidon, ces composés hydrosolubles sont pourtant présents chez cinq familles de dicotylédones (principalement chez les Astéracées) et dans deux familles de monocotylédones, les Liliacées et les Poacées (Hendry, 1993) (Tableau I). Parmi les plantes accumulant des fructanes, se trouvent des espèces d'intérêt agronomique comme le blé (*Triticum sp*), l'orge (*Hordeum vulgare*), l'avoine (*Avena sativa*), le ray-grass (*Lolium sp*), la chicorée (*Cichorium intybus*), l'oignon (*Allium cepa*), le dahlia (*Dahlia variabilis*) et la tulipe (*Tulipa gesneriana*).

1.1 Structure des fructanes

Les fructanes sont des polymères de fructose liés au résidu fructosyle ou glucosyle d'une molécule de saccharose. Les résidus fructosyles sont liés entre eux par des liaisons *O*-glycosidiques en β -(2,1) ou en β -(2,6). Ces liaisons engagent systématiquement le carbone 2 du résidu fructosyle terminal qui porte la fonction cétone réductrice. Les fructanes sont donc des glucides non réducteurs. Leur taille est très variable. Elle est exprimée en degré de polymérisation (DP), qui correspond au nombre de monomères qui les composent. Ainsi, chez les végétaux supérieurs, la longueur des molécules de fructanes varie du DP 3 aux DP 30-50 exceptionnellement jusqu'à des DP $\sim$ 200 (Itaya *et al.*, 1997). Pour les nommer, nous utilisons la nomenclature établie par Waterhouse et Chatterton (Figure 2) (Waterhouse et Chatterton, 1993). Certains auteurs utilisent cependant encore quelques noms particuliers tels que le 1-kestose pour le 1-kestotriose, le 6-kestose pour le 6-kestotriose, le néokestose pour le 6G-kestotriose, le nystose pour le 1,1-kestotétraose et le bifurcose pour le 1&6-kestotétraose.

Il existe quatre grands types de fructanes (Vijn et Smeekens, 1999; Ritsema et Smeekens, 2003a) (Figure 3). Les fructanes de type **inuline** sont des fructanes linéaires dont les résidus fructosyles sont liés entre eux exclusivement par des liaisons β -(2,1). Dans cette classe le résidu glucosyle du saccharose est en position terminale, c'est-à-dire que la chaîne de

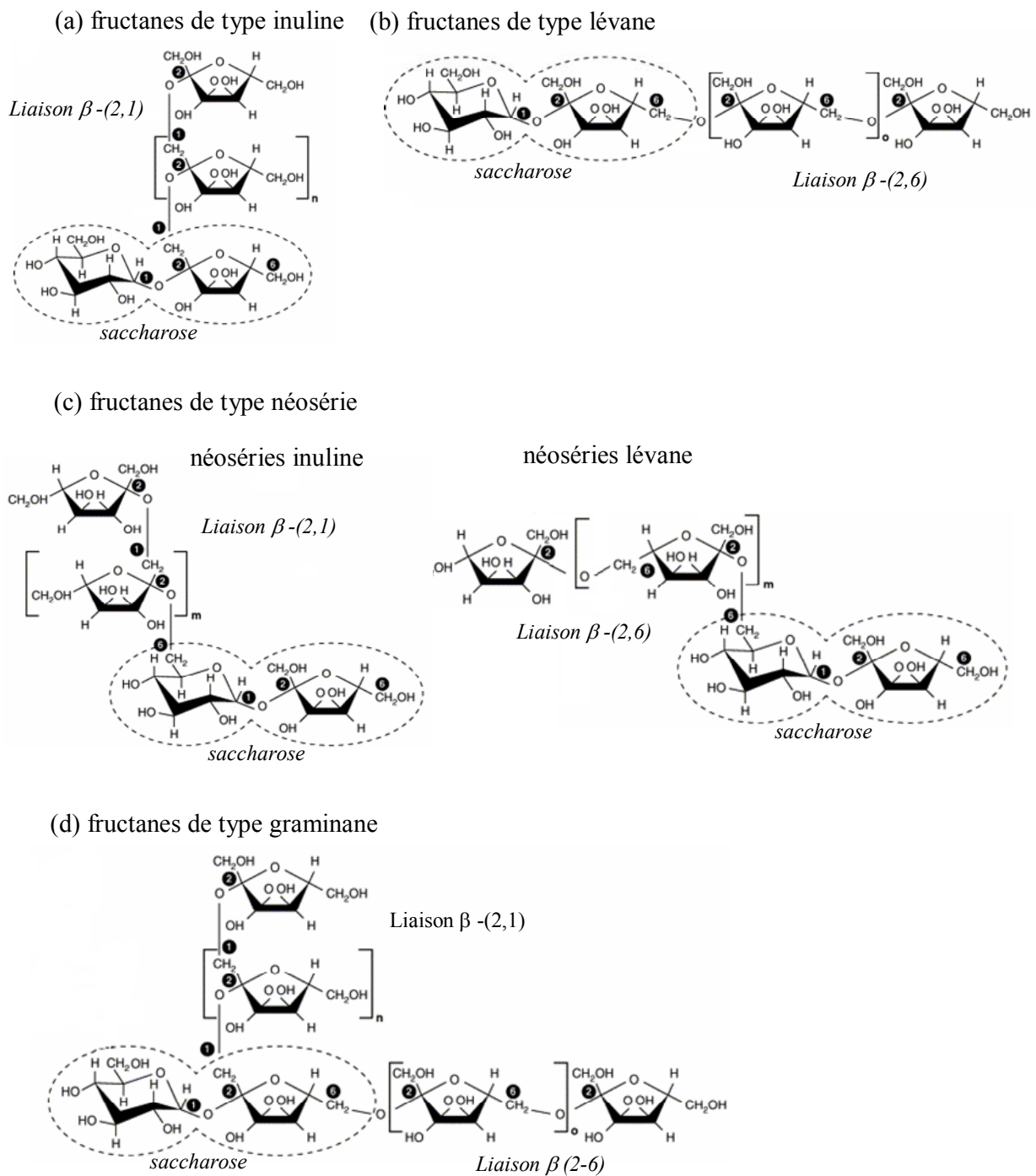


Figure 3: Structure des quatre types de fructanes. (a) type inuline, (b) type lévane, (c) type néosérie, (d) type graminane. La molécule de saccharose est entourée en pointillé et le numéro dans un rond noir correspond au numéro de l'atome de carbone dans la molécule (d'après Ritsema et Smeekens, 2003a).

résidus fructosyles est liée au résidu fructosyle du saccharose (Figure 3a). Les fructanes de type **lévane** sont aussi linéaires et possède également un résidu glucosyle du saccharose en position terminale. La différence avec les inulines se situe au niveau des liaisons *O*-glycosidiques, en effet chez les lévanes ce sont des liaisons β -(2,6) (Figure 3b). Les fructanes de type **néosérie** diffèrent des deux premiers types par le fait que les chaînes de résidus fructosyles sont liées au résidu glucosyle de la molécule de saccharose. Le premier fructane de cette série, le 6G-kestotriose, est également appelé néokestose, ce qui a donné le nom à ce type. Dans cette série, le résidu glucosyle sera donc en position interne (Figure 3c). Il existe deux sortes de fructanes de type néoséries, des fructanes de type **néosérie inuline** possédant des liaisons β -(2,1) ou des fructanes de type **néosérie lévane** possédant des liaisons de type β -(2,6) (Figure 3c). Enfin, les fructanes de type **graminane** possèdent un résidu glucosyle en position terminale. Ce sont des fructanes mixtes ou branchés possédant à la fois des chaînes de résidus fructosyles liés en β -(2,1) et en β -(2,6) (Figure 3d).

Selon les espèces de végétaux supérieurs, les fructanes accumulés peuvent appartenir à un seul ou plusieurs de ces quatre types. Chez les Astéracées, le topinambour (*Helianthus tuberosus*) accumule uniquement des fructanes de type inuline. La chicorée et le dahlia accumulent majoritairement des fructanes de type inuline mais aussi des lévanes (Carpita *et al.*, 1991; Bonnett *et al.*, 1994). Les Astéracées ont aussi la particularité d'accumuler des fructanes exclusivement composés de résidus fructosyles (Ernst *et al.*, 1996). Ces fructanes sont synthétisés à partir d'un fructose à la place du saccharose et sont appelés inulo-*n*-ose (Van den Ende et Van Laere, 1996). Ces fructanes sont donc des glucides réducteurs car la fonction cétone du premier résidu fructosyle de la chaîne est libre. Les Liliacées tels que l'oignon possèdent des fructanes de type inuline et néosérie inuline (Ritsema et Smeekens, 2003a; Ritsema et Smeekens, 2003b). C'est chez les Poacées que la structure des fructanes accumulés est la plus complexe. En effet, les fructanes présents chez cette famille peuvent appartenir aux quatre types décrits précédemment (Bonnett *et al.*, 1997). Généralement les Poacées affichent une prédominance de liaisons β -(2,6) (Chatterton *et al.*, 1990; Bancal *et al.*, 1992; Cairns, 1993; Livingston *et al.*, 1993), sans toutefois exclure une présence de liaisons β -(2,1). En effet, une étude réalisée sur 110 espèces de Poacées a permis de mettre en évidence qu'une seule d'entre elles (*Poa ampla*) présente exclusivement des fructanes de type lévane (Chatterton et Harrison, 1997). Chez *Lolium perenne*, la plante modèle de notre étude, les fructanes sont de type inuline, néosérie inuline et néosérie lévane (Pavis *et al.*, 2001b). La

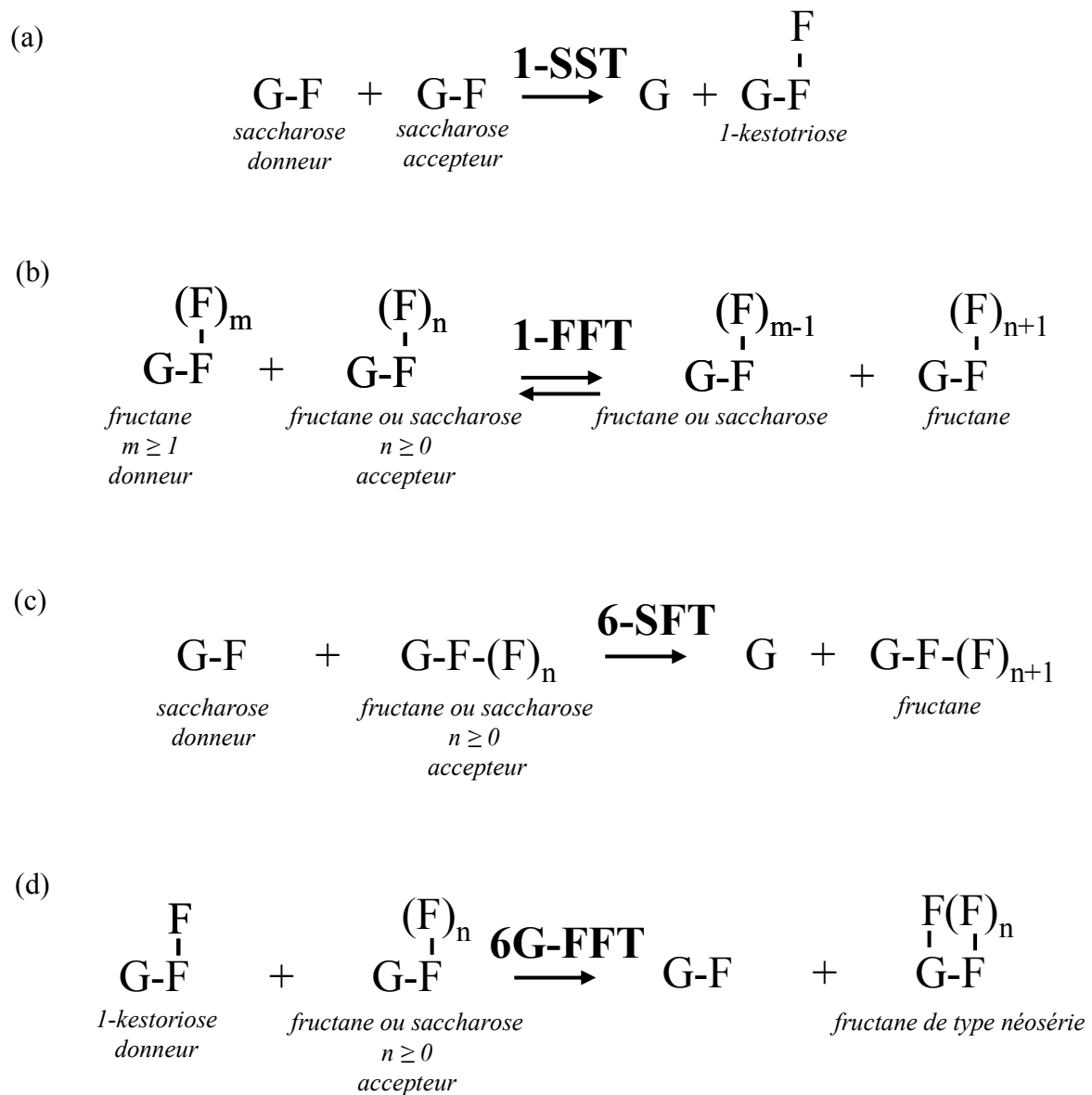


Figure 4: Les enzymes de synthèse des fructanes. (a) la saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST) (EC 2.4.1.99). (b) la fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT) (EC 2.4.1.100). (c) la saccharose:fructane 6-fructosyltransférases (6-SFT) (EC 2.4.1.10). (d) la fructane:fructane 6G-fructosyltransférase (6G-FFT). Les traits verticaux symbolisent des liaisons β -(2,1) et les traits horizontaux des liaisons β -(2,6). F, fructose; G, glucose; G-F, saccharose.

proportion de fructanes de type néosérie varie au sein du genre *Lolium*. Elle est inférieure à 1% chez *Lolium temulentum* (Sims *et al.*, 1992), environ égale à 66% chez *Lolium rigidum* (Bonnett *et al.*, 1994) et de 75% chez *Lolium perenne* (Pavis *et al.*, 2001b).

1.2 Synthèse des fructanes : les fructosyltransférases (FTs)

Exceptés les fructanes contenant exclusivement des résidus fructosyles, tous les autres fructanes sont synthétisés à partir du saccharose. En accord avec le modèle proposé par (Vijn et Smeekens, 1999), quatre activités fructosyltransférase (FTs) sont suffisantes pour catalyser la formation de tous les types de fructanes (Figure 4). Les enzymes correspondantes sont des glycoprotéines solubles appartenant à la famille 32 des glycosides hydrolases (GH32).

La saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST) (EC 2.4.1.99) catalyse de manière irréversible la synthèse du 1-kestotriose à partir de deux molécules de saccharose (Figure 4a). Elle peut également générer du 1,1-kestotétraose (nystose) et du 1,1,1-kestopentaose mais à une vitesse beaucoup plus faible (Koops et Jonker, 1996). Cette enzyme est à la fois une transférase (transfert d'un résidu fructosyle d'une molécule de saccharose sur le carbone n°1 du résidu fructosyle d'une autre molécule de saccharose) et une sucrase (dégradation d'une molécule de saccharose avec libération de glucose). Le carbone n°2 de l'unité fructosyle terminale est greffé sur le carbone n°1 du résidu fructosyle du saccharose formant ainsi une liaison *O*-glycosydique β -(2,1). Le saccharose sert donc à la fois de donneur et d'accepteur de résidus fructosyles.

La fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT) (EC 2.4.1.100) catalyse le transfert réversible d'un résidu fructosyle entre deux molécules de fructanes (Figure 4b). La 1-FFT permet l'allongement progressif des fructanes par addition de résidus fructosyles liés en β -(2,1). Dans cette réaction, le saccharose peut jouer le rôle d'accepteur mais ne peut pas être un donneur de résidu fructosyle. Lorsqu'il est présent en forte concentration, il peut inhiber l'activité 1-FFT (Edelman et Jefford, 1968; Penson et Cairns, 1994). Chez certaines espèces, la 1-FFT peut aussi catalyser la production de fructanes inulo-*n*-ose, constitués seulement de résidus fructosyles à partir du fructose (Van den Ende et Van Laere, 1996).

L'action concertée des activités 1-SST et 1-FFT est suffisante chez les plantes n'accumulant que des fructanes de type inuline (famille des Astéracées). Cependant, la

question de la régulation de la longueur des molécules de fructanes reste en suspens. En effet, le DP des inulines accumulées est très variable d'une espèce à l'autre. Il est environ de 10 chez la chicorée ou le topinambour (Hellwege *et al.*, 1998; Vergauwen *et al.*, 2003), de 30 chez *Echinops ritro* (Vergauwen *et al.*, 2005), de 65 chez *Cynara scolymus* (Hellwege *et al.*, 1998) et de 130-174 chez *Viguiera discolor* (Itaya *et al.*, 1997). Pour expliquer ces différences, l'hypothèse actuelle est que le DP des inulines accumulées dépendrait des propriétés enzymatiques intrinsèques des 1-FFTs de chaque espèce (Hellwege *et al.*, 1998). Pour étayer cette hypothèse, des travaux récents chez *Viguiera discolor* et *Echinops ritro* (espèces accumulant des inulines de DP élevés) rapportent la caractérisation de 1-FFTs catalysant la synthèse de fructanes de haut DP (en utilisant comme accepteur préférentiel des fructanes de DP supérieurs à 6) (Van den Ende *et al.*, 2005; Van den Ende *et al.*, 2006).

Chez les espèces n'accumulant pas que de l'inuline, deux autres activités enzymatiques sont nécessaires pour la synthèse des autres types de fructanes.

La saccharose:fructane 6-fructosyltransférase (6-SFT) (EC 2.4.1.10) catalyse le transfert du résidu fructosyle du saccharose sur le résidu fructosyle d'un autre saccharose (Sprenger *et al.*, 1995) ou d'un fructane par une liaison β -(2,6) (Duchateau *et al.*, 1995) (Figure 4c). La 6-SFT est une enzyme bifonctionnelle, dont l'activité dépend du substrat présent dans le milieu. En présence de saccharose, cette enzyme présente essentiellement une activité invertasique (dégradation d'une molécule de saccharose en glucose et fructose) doublée d'une activité 6-SST qui conduit à la formation de 6-kestotriose et à la libération de glucose. En présence simultanée de saccharose et d'un fructane accepteur, l'activité invertasique disparaît, et l'enzyme agit essentiellement comme une 6-SFT utilisant le saccharose comme donneur de fructose pour greffer ce fructose sur le résidu fructosyle du fructane accepteur par une liaison β -(2,6) (Duchateau *et al.*, 1995).

La fructane:fructane 6G-fructosyltransférase (6G-FFT) catalyse le transfert d'un résidu fructosyle du 1-kestotriose (donneur de résidus fructosyles) sur le résidu glucosyle d'une molécule de saccharose par une liaison β -(2,6). La 6G-FFT peut aussi catalyser le transfert d'un résidu fructosyle du 1-kestotriose sur le résidu glucosyle d'une molécule d'inuline (Figure 4d). Il faut noter que certaines 6G-FFT possèdent aussi une activité 1-FFT comme chez l'oignon (Ritsema *et al.*, 2003) et le ray-grass anglais (Lasseur *et al.*, 2006).

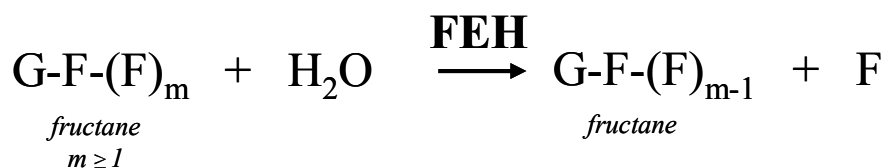


Figure 5: Réaction enzymatique catalysée par l'activité fructane exohydrolase (FEH). F, fructose; G, glucose.

Tableau II: Quelques propriétés des 12 FEHs purifiées à l'homogénéité (une seule bande révélée par coloration à l'argent après séparation par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide) ou partiellement pour la 6-FEH de blé (Van Riet *et al.*, 2006).

Activité principale	Source de l'enzyme	Nom	Masse moléculaire (kDa)	pH optimal	Références
1-FEH	<i>Triticum aestivum</i> (tiges)	1-FEHw1	70	4,5-5,5	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003a
	<i>Triticum aestivum</i> (tiges)	1-FEHw2	70	4,5-5,5	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003a
	<i>Helianthus tuberosus</i> (tubercules)	1-FEH	79	5,2	Marx <i>et al.</i> , 1997a
	<i>Hordeum vulgare</i> (tiges)	1-FEH	33	-	Henson et Livingston, 1998
	<i>Cichorium intybus</i> (racines)	1-FEH I	68	5,5	Claessens <i>et al.</i> , 1990
	<i>Cichorium intybus</i> (racines)	1-FEH II	64	5,0	De Roover <i>et al.</i> , 1999
6-FEH	<i>Avena sativa</i> (feuilles)	6-FEH	43	4,5-5,5	Henson et Livingston, 1996
	<i>Lolium perenne</i> (chaumes)	6-FEH	69	5,1-5,6	Marx <i>et al.</i> , 1997b
	<i>Triticum aestivum</i> (chaumes)	6-KEHw1	72	-	Van den Ende <i>et al.</i> , 2005
	<i>Triticum aestivum</i> (épis)	6-FEH	70	-	Van Riet <i>et al.</i> , 2006
	<i>Beta vulgaris</i> (racines)	6-FEH	-	5,0-6,0	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003b
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (plante entière)	AtcwINV3	72	5,0-6,0	De Coninck <i>et al.</i> , 2005

A côté des quatre enzymes solubles précédemment décrites, il a été suggéré que certaines Poacées pouvaient posséder une enzyme supplémentaire, la phléine sucrase qui catalyserait la synthèse des fructanes de DP élevés. Sa présence a été d'abord décrite chez la fléole (*Phleum pratense*) (Suzuki et Pollock, 1986) et mentionnée également chez le dactyle, une autre Poacée riche en fructanes de DP élevés (Suzuki et Nass, 1988). La réaction catalysée par la phléine sucrase serait similaire à celle catalysée par la lévane sucrase bactérienne (Chambert *et al.*, 1974) et consisterait en un transfert direct et successif de résidus fructosyles du saccharose sur un fructane accepteur par des liaisons β -(2,6).

1.3 Dégradation des fructanes : les fructane exohydrolases (FEHs)

Chez les végétaux supérieurs, la dégradation des fructanes est catalysée par des fructane exohydrolases (FEHs) (Figure 5). Ces enzymes agissent de façon exolytique, c'est-à-dire qu'elles clivent la liaison *O*-glycosidique du dernier résidu fructosyle de la chaîne de fructose, libérant ainsi du fructose. Comme les enzymes de synthèse des fructanes, ce sont des glycoprotéines solubles appartenant à la famille 32 des glycosides hydrolases (GH32). Même si ces enzymes ont été moins étudiées que les enzymes de synthèse, un certain nombre de FEHs ont été purifiées à l'homogénéité et/ou clonées et caractérisées dans le système d'expression hétérologue *Pichia pastoris* (Tableau II et Tableau III). Elles ont une masse moléculaire comprise entre 43 et 79 kDa et un pH optimal compris entre 4,5 et 6,0. Selon leur affinité préférentielle pour les liaisons *O*-glycosidiques β -(2,1) et/ou β -(2,6), elles sont dénommées 1-FEH ou 6-FEH.

Les fructane 1-exohydrolases (1-FEH) (EC 3.2.1.153) hydrolysent préférentiellement les liaisons β -(2,1). Chez la chicorée, deux isoformes distinctes, la FEH I (Claessens *et al.*, 1990) et la FEH II, ont été purifiées à l'homogénéité (De Roover *et al.*, 1999a) ce qui a permis le clonage de trois ADNc distincts dénommés *1-FEH I*, *1-FEH IIa* et *1-FEH IIb* (Van den Ende *et al.*, 2000; Van den Ende *et al.*, 2001). Une 1-FEH a aussi été purifiée à l'homogénéité à partir de tubercules de topinambour (Marx *et al.*, 1997a). Chez le blé, deux 1-FEHs (1-FEH w1 et 1-FEH w2) ont été purifiées à l'homogénéité et les gènes correspondants clonés (Van den Ende *et al.*, 2003a). Une 1-FEH a aussi été purifiée à l'homogénéité à partir de tiges d'orge (Henson et Livingston, 1998).

Tableau III: ADNc correspondant à des FEHs dont la séquence nucléotidique est disponible dans les banques de données.

Activité principale	Source de l'ADNc	Nom	Numéro d'accession	Références
1-FEH	<i>Triticum aestivum</i> (tiges)	<i>Ta1-FEHw1</i>	AJ516025	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003
	<i>Triticum aestivum</i> (tiges)	<i>Ta1-FEHw2</i>	AJ508387	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003
	<i>Lolium perenne</i> (chaumes)	<i>Lp1-FEHa</i>	DQ016297	Lothier <i>et al.</i> , 2007
	<i>Hordeum vulgare</i> (chaumes)	<i>1-feh</i>	AJ605333	Nagaraj <i>et al.</i> , 2005
	<i>Cichorium intybus</i> (racines)	<i>1-FEH I</i>	AJ242538	Van den Ende <i>et al.</i> , 2000
	<i>Cichorium intybus</i> (racines)	<i>1-FEH IIa</i>	AJ295033	Van den Ende <i>et al.</i> , 2001
	<i>Cichorium intybus</i> (racines)	<i>1-FEH IIb</i>	AJ295034	Van den Ende <i>et al.</i> , 2001
6-FEH	<i>Triticum aestivum</i> (chaumes)	<i>Ta6-KEHw1</i>	AB089271	Van den Ende <i>et al.</i> , 2005
	<i>Triticum aestivum</i> (chaumes)	<i>Ta6-KEHw2</i>	AB089270	Van den Ende <i>et al.</i> , 2005
	<i>Triticum aestivum</i> (chaumes)	<i>Ta6&1-FEHw1</i>	AB089269	Kawakami <i>et al.</i> , 2005
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (feuilles)	<i>AtcwINV3</i>	At1g55120	De Coninck <i>et al.</i> , 2005
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (feuilles)	<i>AtcwINV6</i>	At5g11920	De Coninck <i>et al.</i> , 2005
	<i>Triticum aestivum</i> (épis)	<i>6-FEH</i>	AM075205	Van Riet <i>et al.</i> , 2006
	<i>Beta vulgaris</i> (racines)	<i>6-FEH</i>	AJ508534	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003

Tableau IV: ADNc correspondant à des invertases possédant une activité FEH dont la séquence nucléotidique est disponible dans les banques de données.

Activité principale	Source de L'ADNc	Nom	Numéro d'accession	Références
Invertases 1-FEH	<i>Lolium perenne</i>	<i>LpFT2</i>	AY082350	Johnson <i>et al.</i> , 2003
	<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaVIN2</i>	AJ635225	Ji <i>et al.</i> , 2007
	<i>Oryza sativa</i>	<i>OsVIN1</i>	AF276703	Ji <i>et al.</i> , 2007
	<i>Oryza sativa</i>	<i>OsVIN2</i>	AF276704	Ji <i>et al.</i> , 2007

Les fructane 6-exohydrolases (6-FEH) (EC 3.2.1.154) hydrolysent préférentiellement les liaisons β -(2,6). Une 6-FEH a été purifiée à l'homogénéité à partir de tiges d'orge (Henson et Livingston, 1996). Chez le blé, quatre 6-FEHs ont été découvertes récemment. L'une d'elles a été purifiée à partir d'inflorescences et l'ADNc correspondant a été cloné (Van Riet *et al.*, 2006). Les ADNc codant deux autres isoformes de 6-FEH dégradant spécifiquement le 6-kestotriose ont également été clonés et dénommés 6-KEHw1 et 6-KEHw2 (Van den Ende *et al.*, 2005). Enfin, une quatrième 6-FEH clivant les liaisons β -(2,6) (et dans une moindre mesure les liaisons β -(2,1)) des fructanes de faible DP a été caractérisée et nommée 6&1-FEH (Kawakami *et al.*, 2005).

Il faut noter que des études récentes ont rapporté la présence de FEHs chez des plantes non-accumulatrices de fructanes. C'est le cas de la betterave à sucre (Van den Ende *et al.*, 2003b) chez laquelle une 6-FEH a été purifiée à l'homogénéité. C'est aussi le cas de l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) où les enzymes AtcwINV3 et AtcwINV6, initialement décrites comme étant des invertases, sont en fait respectivement une 6-FEH et une 6&1-FEH (De Coninck *et al.*, 2005). Les auteurs suggèrent que ces FEHs pourraient dégrader les lévanes exogènes produits par les bactéries pathogènes et donc assumer une fonction de défense (Van den Ende *et al.*, 2004).

Concernant le ray-grass anglais, peu d'études sont disponibles sur les FEHs. A ce jour, seule une 6-FEH purifiée à l'homogénéité a été décrite (Marx *et al.*, 1997b). Une étude récente rapporte le clonage d'un ADNc codant potentiellement une 1-FEH mais l'activité de la protéine n'a pas été confirmée (Chalmers *et al.*, 2005).

A côté des FEHs *sensus strictu*, n'hydrolysant que les fructanes, des invertases vacuolaires capables d'hydrolyser non seulement le saccharose mais également les fructanes ont été clonées et caractérisées chez les Poacées, dont une chez *Lolium perenne*, *LpFT2* (Tableau IV). Chez ces protéines, le niveau de l'activité FEH se situe entre 5 et 30 % de celui de l'activité invertase, ce qui indique que cette activité FEH est loin d'être négligeable. (Johnson *et al.*, 2003 ; Ji *et al.*, 2007). Il faut cependant bien noter que cela n'est pas le cas de toutes les invertases puisqu'il a été montré qu'une invertase vacuolaire d'orge (HvINV1) n'a aucune activité contre le 1-kestotriose (Nagaraj *et al.*, 2005). Contrairement aux FEHs *sensus strictu*, ces invertases à activité FEH sont phylogénétiquement plus proches des invertases vacuolaires que des invertases pariétales (Johnson *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2007). Le rôle de ces

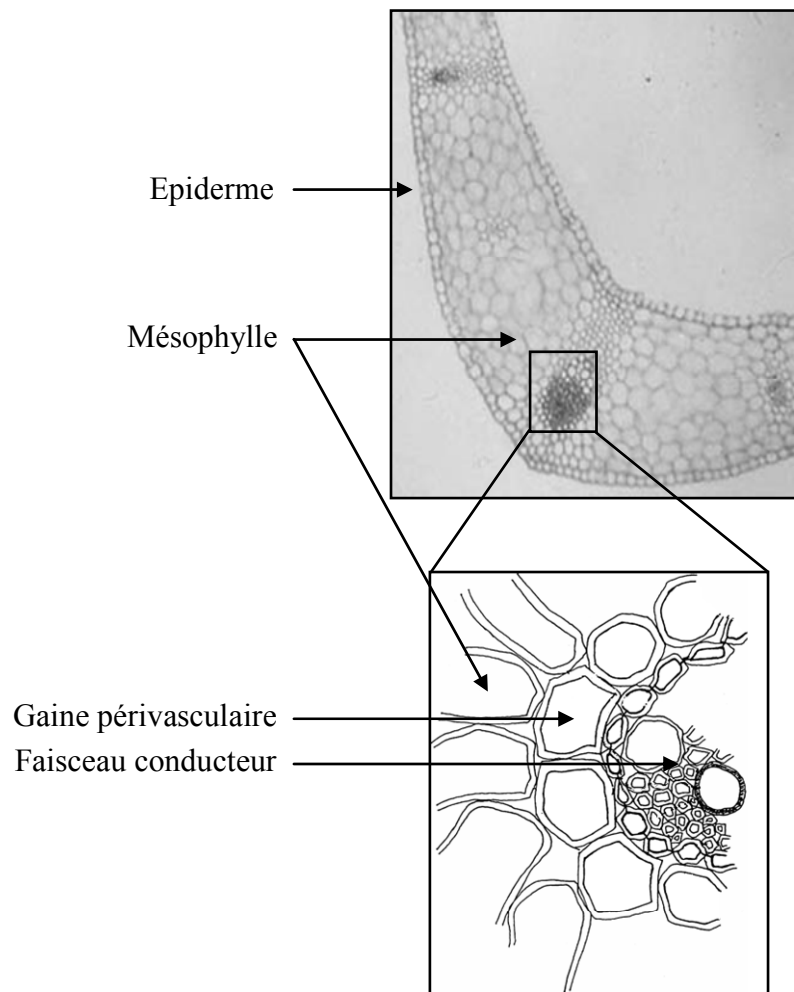


Figure 6: Anatomie d'une feuille d'orge (d'après Fricke, 2002).

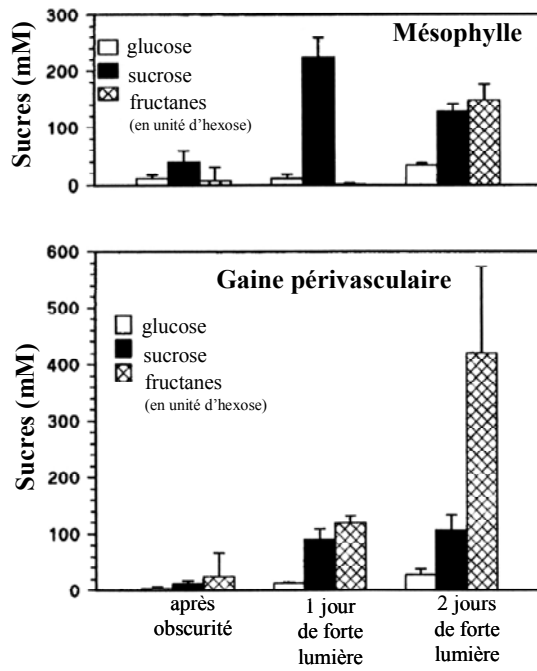
protéines, capables d'hydrolyser à la fois le substrat (saccharose) et les produits (fructanes) des FTs, est probablement différent de celui des autres FEHs. Les transcripts *LpFT2* sont plus abondants dans les tissus où la synthèse des fructanes est forte, tels que les gaines des feuilles matures et la zone de croissance foliaire, suggérant un rôle dans la biosynthèse des fructanes (Johnson *et al.*, 2003).

1.4 Localisation tissulaire et subcellulaire des fructanes

Les fructanes constituent la réserve glucidique majeure chez 12 à 15 % des angiospermes. Ils peuvent s'accumuler dans des organes de stockage, tels que les bulbes (dahlia), les tubercules (topinambour), et les racines (chicorée, pissenlit) (Van Laere et Van Den Ende, 2002). Chez les Poacées, il n'existe pas d'organe de stockage proprement dit et les fructanes sont présents dans les racines (Prud'homme *et al.*, 1992), dans les tiges (Smith, 1967), dans les gaines et les limbes des feuilles adultes (Borland et Farrar, 1989) ainsi que dans les méristèmes et les zones de croissance foliaire (Volenc et Nelson, 1984). Les teneurs les plus élevées se rencontrent dans les entre-nœuds de la base des tiges (Pollock et Jones, 1979), dans les gaines foliaires matures (Volenc, 1986) et dans les zones de croissance foliaire (Volenc et Nelson, 1984; Schnyder et Nelson, 1987). Les fructanes peuvent y représenter jusqu'à 30% de la matière sèche. Les fructanes se retrouvent également, mais en faibles quantités, dans les inflorescences (Smith, 1967) et dans les graines (Schnyder *et al.*, 1988).

Au niveau tissulaire, les fructanes sont présents dans les cellules du parenchyme de réserve de topinambour (Frehner *et al.*, 1985). Des travaux chez l'agave (*Agave deserti*) ont mis en évidence la présence de fructanes et d'activité de synthèse de fructanes dans les tissus vasculaires ainsi que la présence de fructanes circulant dans le suc phloémique (Wang et Nobel, 1998). Par contre, chez le ray-grass anglais, il n'y a pas de fructanes dans les exsudats phloémiques (Amiard *et al.*, 2004). En utilisant des protoplastes de feuilles d'orge, des fructanes ont été observés dans les cellules du mésophylle (Wagner *et al.*, 1983) (Figure 6). Plus récemment, grâce à une technique d'échantillonnage par microcapillaire couplée à un test enzymatique fluorométrique, des travaux rapportent que lorsque les fructanes sont synthétisés dans les limbes d'orge, ils s'accumulent préférentiellement dans les cellules de la gaine périvasculaire, en moindre quantité dans les cellules du mésophylle et pas du tout dans les

(a)



(b)

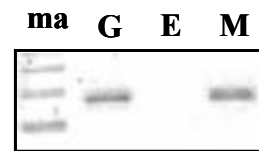


Figure 7: Synthèse de fructanes dans les limbes d'orge. (a) teneurs en glucose, sucrose et fructanes dans les cellules du mésophylle et de la gaine périvasculaire en réponse à un éclairage fort. (b) expression de la 6-SFT au niveau cellulaire dans la feuille d'orge. ma, marqueur de taille ; G, cellules de la gaine périvasculaire ; E, cellules de l'épiderme ; M, cellules du mésophylle. (d'après Koroleva *et al.*, 2001).

cellules épidermiques (Koroleva *et al.*, 1997; Koroleva *et al.*, 1998,) (Figure 7a). Chez la même espèce et dans les mêmes conditions, une étude récente rapporte que la présence d'ARNm codant la 6-SFT est concomitante avec la présence de fructanes dans les cellules de la gaine périvasculaire et dans les cellules du mésophylle (Koroleva *et al.*, 2001) (Figure 7b).

Au niveau subcellulaire, des travaux de 1921 (cités par Pollock et Chatterton, 1988) rapportent la présence de sphérocristaux d'inuline précipités par l'éthanol au niveau de la vacuole. Cette localisation vacuolaire a été confirmée par des travaux postérieurs. En effet, chez l'orge, non seulement les fructanes mais aussi les activités 1-SST et FEH ont été localisées dans la vacuole (Wagner *et al.*, 1983; Wagner et Wiemken, 1986). Chez le topinambour, des travaux montrent la présence des activités SST et 1-FFT dans le suc vacuolaire et de l'activité FEH partagée entre le suc vacuolaire et la membrane tonoplastique (Frehner *et al.*, 1985; Darwen et John, 1989). Des travaux récents montrent également que la protéine AtcwINV3 qui possède une activité 6-FEH, appartient au protéome vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana* (Carter *et al.*, 2004). Le compartiment vacuolaire n'est peut-être pas le seul lieu d'accumulation des fructanes. En effet, des travaux montrent qu'une partie des fructanes et de l'activité FEH est localisée au niveau de l'apoplaste d'avoine dans des conditions particulières d'endurcissement au froid (Livingston et Henson, 1998). Chez le blé, une étude récente, rapporte la présence de fructanes dans l'apoplaste et suggère que les 6-KEHs sont également localisées dans l'apoplaste (Van den Ende *et al.*, 2005). La synthèse *in situ* de fructanes, c'est à dire la présence effective d'enzymes de synthèse, au niveau de l'apoplaste, n'a cependant pas été prouvée. Il est possible, en revanche, que les fructanes soient synthétisés dans la vacuole puis transférés vers l'apoplaste. En effet, des solutés vacuolaires peuvent être sécrétés dans l'apoplaste *via* des vésicules de transport ou directement par des pores formés lorsque la vacuole s'accole à la membrane plasmique (Echeverria, 2000). Concernant les FEHs apoplastiques, il est possible que des enzymes vacuolaires soient sécrétées dans l'apoplaste comme c'est le cas de l' α -mannosidase, la chitinase et la β -glucanase (Kunze *et al.*, 1998).

Il semble peu probable que les fructanes s'accumulent dans le compartiment cytosolique, à cause de leur effet toxique pour la cellule. En effet, l'accumulation artificielle de fructanes de haut DP dans le cytosol des cellules de feuilles de plantes de tabac ou de tubercules de pomme de terre exprimant une lévane sucrase bactérienne codée par le gène *SacB* entraîne la mort cellulaire (Caimi *et al.*, 1997).

1.5 Rôles des fructanes

Les espèces accumulatrices de fructanes représentent environ un tiers de la surface végétale du globe et appartiennent aux familles d'angiospermes les plus évoluées (Hendry, 1993). 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, a lieu en supplément et non en remplacement des autres formes de mise en réserve des glucides : l'amidon et le saccharose (Chatterton *et al.*, 1989). D'un point de vue évolutif, des travaux suggèrent que les fructanes sont apparus par mutation des invertases en fructosyltransférases, suite à une pression de l'environnement (Housley et Pollock, 1993). La synthèse des fructanes aurait donné un avantage sélectif à ces plantes par rapport aux plantes n'accumulant que l'amidon ou le saccharose (Chatterton *et al.*, 1989). Cependant, si les différentes fonctions possibles des fructanes ont été discutées depuis de nombreuses années, le rôle des fructanes chez les végétaux supérieurs est encore mal compris. Les fructanes servent-ils uniquement de forme de réserve supplémentaire ou leurs caractéristiques physico-chimiques propres apportent-elles un avantage aux plantes qui les synthétisent? D'après les connaissances actuelles, il n'est pas possible de répondre clairement à ces questions, mais les fonctions susceptibles d'être attribuées aux fructanes peuvent être discutées.

1.5.1. Mise en réserve du carbone

De nombreux exemples montrent que les fructanes s'accumulent lorsque la vitesse d'assimilation du carbone est supérieure à sa vitesse d'utilisation tandis qu'ils sont mobilisés lorsque la demande de molécules carbonées devient plus importante que la production de photoassimilats (Archbold, 1940; Pollock, 1984; Pollock et Cairns, 1991). L'accumulation des fructanes de type inuline qui a lieu dans les tubercules de topinambour et les racines de chicorée à l'automne est la résultante d'un processus de mise en réserve du carbone pour permettre la reprise de croissance au printemps (Van Laere et Van Den Ende, 2002).

Chez les Poacées, il n'existe pas d'organe de réserve proprement dit. Les fructanes s'accumulent pendant la phase végétative, surtout à la base des parties aériennes constituées des gaines des feuilles matures et de la base de la feuille en croissance (Pollock et Cairns, 1991). Dans la feuille en croissance qui contient les zones de division cellulaire, d'élongation cellulaire et de maturation cellulaire (Skinner et Nelson, 1995), les fructanes ne sont pas

répartis de façon homogène. Ils s'accumulent préférentiellement dans les cellules en élongation (Schnyder et Nelson, 1987). Il a été suggéré que ce pool de fructanes servirait de stockage à court terme pour être utilisé dans l'élaboration de la paroi secondaire (Macadam et Nelson, 1987; Allard et Nelson, 1991; Cairns *et al.*, 1991). Cette accumulation de fructanes est particulièrement importante pendant l'automne, lorsque la croissance est réduite alors que la capacité photosynthétique est encore élevée (Pollock et Jones, 1979). Les fructanes accumulés à la base des parties aériennes sont ensuite mobilisés lors de la reprise de croissance printanière (Pollock et Jones, 1979; Hendry, 1993) ou après une défoliation (Prud'homme *et al.*, 1992; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a) et fournissent ainsi de l'énergie et des squelettes carbonés pour la reprise de croissance (Wagner *et al.*, 1986; Schnyder et Nelson, 1987; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Les fructanes sont également mis en réserve dans les tiges de blé et d'orge au cours du développement des fleurs pendant la phase reproductive (Archbold, 1940; Bonnett et Incoll, 1993). Ils sont hydrolysés lors du remplissage du grain (Schnyder *et al.*, 1988; Schnyder, 1993; Van den Ende *et al.*, 2003a).

1.5.2. Régulation de la concentration en saccharose

Selon certains auteurs, un des rôles majeurs du métabolisme des fructanes est de réguler la concentration cytosolique en saccharose (Housley et Pollock, 1993). 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). Suivant la nature des organes ou des cellules, la régulation de la concentration cellulaire en saccharose répondrait à des objectifs précis et contrastés (Pollock *et al.*, 2003). Dans les cellules du mésophylle des organes photosynthétiquement actifs, la concentration cellulaire en saccharose doit être maintenue en dessous d'un certain seuil afin d'éviter une réduction de la vitesse de photosynthèse (Jang et Sheen, 1994). Dans les cellules associées aux tissus conducteurs de ces organes, la valeur seuil en saccharose est inférieure à celle des cellules du mésophylle pour préserver le gradient décroissant de saccharose et donc permettre son acheminement vers le phloème. Dans les organes importateurs de carbone, la concentration cellulaire en saccharose doit être suffisamment faible pour permettre le déchargement du phloème et l'entrée du saccharose dans la cellule (Koch, 1996). Ainsi, dans les zones de croissance foliaire des Poacées (ou méristèmes foliaires), la synthèse des fructanes aurait pour fonction de maintenir un gradient décroissant de saccharose entre le

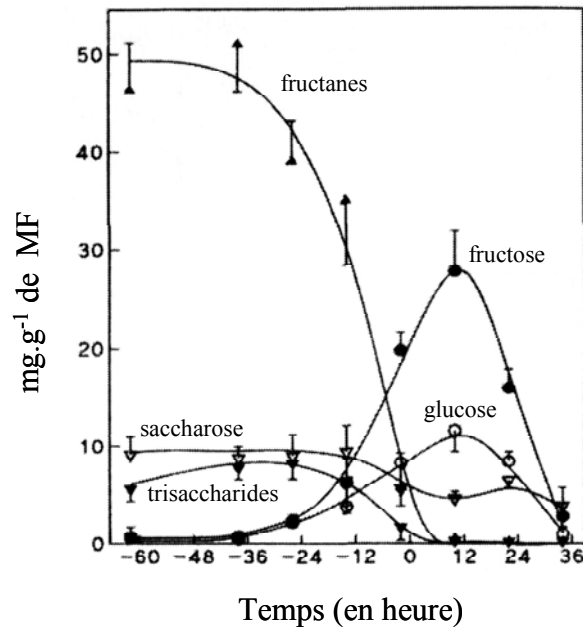


Figure 8: Teneurs en sucres solubles dans des pétales de lis d'un jour (*Heimerocallis*) durant le développement de la fleur. Le temps 0 correspond à l'ouverture de la fleur. Les valeurs correspondent à la moyenne de cinq réplicats. Les barres verticales correspondent à l'erreur standard (d'après Bieleski *et al.*, 1993).

phloème et le cytosol des cellules en division et en élongation, permettant au déchargement du phloème de se poursuivre (Schnyder et Nelson, 1987, 1988; Roth *et al.*, 1997).

De plus, certains auteurs suggèrent que la synthèse des fructanes qui se produit le long des vaisseaux conducteurs dans les gaines foliaires de *Poa* sp. pourrait servir à tamponner la concentration en saccharose dans le phloème pendant les périodes où la vitesse de photoassimilation fluctue (Borland et Farrar, 1985; Borland et Farrar, 1988; Borland et Farrar, 1989). Ce rôle tampon permet ainsi de maintenir la circulation de saccharose entre les limbes foliaires et les méristèmes foliaires et racinaires (Borland et Farrar, 1985; Borland et Farrar, 1988)

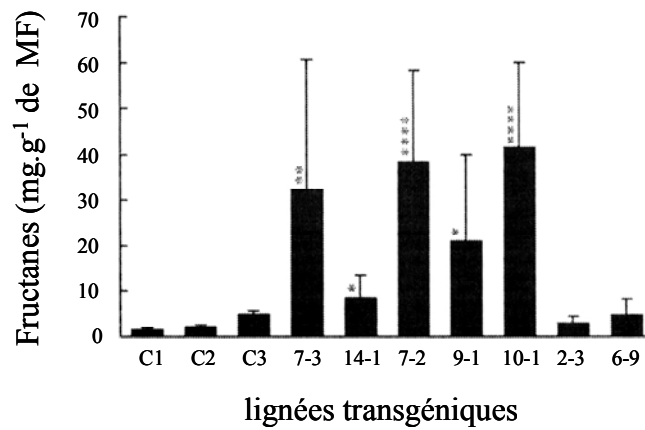
1.5.3. Ajustement du potentiel osmotique

A la différence de l'amidon, les fructanes sont hydrosolubles. A ce titre, ils permettent aux plantes d'ajuster leur potentiel osmotique au cours des différentes phases du développement. Ainsi, les fructanes de faible masse moléculaire 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). Par ailleurs, l'hydrolyse des fructanes qui se produit au moment de l'expansion des pétales chez la campanule (*Campanula rapunculoides*) (Vergauwen *et al.*, 2000) et chez l'hémérocalle ou lis d'un jour (*Heimerocallis*) (Bielecki, 1993), contribue de manière significative au processus d'ouverture de la fleur : les teneurs en fructose et en glucose se trouvent considérablement augmentées suite à l'hydrolyse des fructanes (Figure 8). De ce fait le potentiel osmotique des cellules concernées diminue permettant l'importation de l'eau qui conduit à l'ouverture de la fleur.

1.5.4. Résistance aux stress abiotiques

La plupart des Poacées des zones tempérées et arides synthétisent des fructanes (Chatterton *et al.*, 1989; Smouter et Simpson, 1989; Hendry, 1993). Climatiquement, ces zones sont caractérisées par des périodes saisonnières de froid et de sécheresse, ce qui suggère une implication possible des fructanes dans la tolérance au stress hydrique. Plusieurs études ont montré que les végétaux supérieurs pouvaient accumuler des fructanes en réponse à la

(a)



(b)

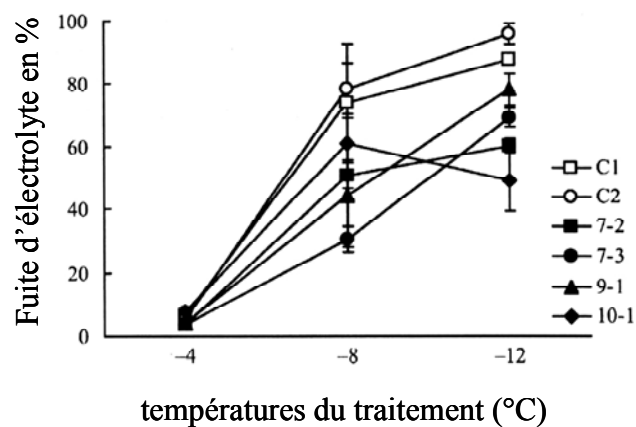


Figure 9: Etude de la tolérance au froid chez des ray-grass transgéniques accumulant des fructanes. (a) teneur en fructanes des limbes des différentes lignées de ray-grass. (b) résistance au stress froid des limbes des différentes lignées de ray-grass exprimée par rapport à la fuite d'électrolyte, c'est-à-dire à la résistance des cellules (plus la fuite d'électrolyte est forte, plus les cellules sont fragiles). Lignées sauvages C1, C2 et C3. Lignées transgéniques 7-3, 14-1, 7-2, 9-1, 10-1, 2-3 et 6-9 (d'après Hisano *et al.*, 2004).

sécheresse (Volaire et Lelievre, 1997 ; De Roover *et al.*, 2000) ou aux basses températures (Livingston et Henson, 1998) sans pour autant démontrer que les fructanes accumulés avaient un rôle actif dans la tolérance au stress puisque leur accumulation pouvait être due à un ralentissement de la croissance. Des travaux menés sur des plantes de tabac ou de betterave transgéniques, modifiées pour synthétiser des fructanes, mettent en évidence le rôle actif des fructanes dans les mécanismes de tolérance au stress hydrique et aux basses températures. En effet, lorsque la disponibilité en eau du milieu diminue, les plantes transgéniques présentent une croissance plus rapide que les plantes témoin qui n'accumulent pas de fructanes (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Pilon-Smits *et al.*, 1999). Les plantes de tabac transformées tolèrent aussi mieux le froid que les plantes non transformées qui ne synthétisent pas de fructanes (Konstantinova *et al.*, 2002). Il en est de même des plantes de ray-grass transgéniques enrichies en fructanes (Hisano *et al.*, 2004) (Figure 9). Le rôle des fructanes dans la tolérance à ces stress abiotiques n'est pas complètement élucidé. Il semblerait cependant que l'action des fructanes ne relève pas d'un changement de potentiel osmotique, que cela soit lors d'un stress hydrique (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Pilon-Smits *et al.*, 1999) ou à basses températures (Livingston et Henson, 1998). En revanche, les fructanes pourraient agir en protégeant les structures membranaires comme le suggère un certain nombre d'expérimentations réalisées *in vitro* (Demel *et al.*, 1998; Vereyken *et al.*, 2001; Hinch *et al.*, 2002; Vereyken *et al.*, 2003; Vereyken *et al.*, 2003a). A côté du stress hydrique et des basses températures, l'hypoxie entraîne également une accumulation de fructanes chez le blé (Albrecht *et al.*, 2004). La tolérance à l'hypoxie chez cette espèce semble corrélée positivement avec la capacité d'accumuler des fructanes plutôt que de l'amidon (Albrecht *et al.*, 1997). Selon les auteurs, l'accumulation des fructanes pendant le stress hypoxique permettrait essentiellement une meilleure reprise de croissance après le retour à des conditions d'aération normales (Albrecht *et al.*, 2004).

1.6 Régulation de la synthèse et de la dégradation des fructanes

Chez les végétaux supérieurs, que ce soit au niveau tissulaire ou de la plante entière, on assiste à des phases d'accumulation nette ou de dégradation nette de fructanes. La présence probable des différentes activités enzymatiques liées à la synthèse et à la dégradation des fructanes dans le même compartiment cellulaire, la vacuole (c.f. 1.4. Localisation tissulaire et subcellulaire des fructanes), suggère qu'il existe *in vivo* une régulation fine de ces activités.

Cette régulation semble liée au statut carboné de la cellule et notamment aux teneurs en saccharose. Des travaux récents ont d'ailleurs prouvé que ce disaccharide est un facteur majeur qui contrôle le métabolisme des fructanes.

1.6.1. Le saccharose, un facteur majeur de régulation du métabolisme des fructanes.

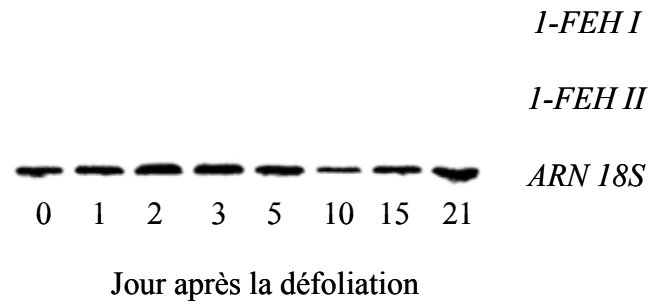
- Synthèse des fructanes

Au début des années 80, des données expérimentales ont mis en relation le saccharose et l'activation de la synthèse des fructanes. En effet, la concentration en saccharose des tissus augmente généralement avant que les fructanes ne soient accumulés (Labhart *et al.*, 1983; Wagner *et al.*, 1986; Cairns et Pollock, 1988; Smouter et Simpson, 1991a, 1991b). Cette observation suggère que la synthèse des fructanes est significativement augmentée au-delà d'une concentration seuil en saccharose. En revanche, le mécanisme d'action du saccharose sur la synthèse des fructanes n'est pas encore clairement établi. Des travaux récents ont cependant apporté quelques éléments de réponse. Ainsi, nous savons maintenant que le niveau des activités fructosyltransférases est généralement corrélé positivement avec l'expression des gènes correspondants et avec les teneurs en saccharose (Sprenger *et al.*, 1995; Nagaraj *et al.*, 2004). De plus, il est maintenant bien connu que le saccharose peut agir en tant que molécule « signal » régulant le niveau d'expression de nombreux gènes parmi lesquels se trouvent ceux codant les FTs. En effet, le saccharose peut être perçu comme une molécule « signal » aboutissant à l'augmentation du niveau des transcrits de la 6-SFT d'orge (Müller *et al.*, 2000) et de la 1-SST de blé (Martinez Noël *et al.*, 2001). L'augmentation de l'expression génique de la 6-SFT est probablement due à une activation de son promoteur (Nagaraj *et al.*, 2001).

- Mobilisation des fructanes

Comme les activités de synthèse des fructanes, l'activité de dégradation des fructanes semble en relation avec les teneurs en saccharose. On constate en effet, que l'activité FEH augmente lorsque les plantes se trouvent carencées en saccharose notamment lors d'un déficit des processus de fixation du CO₂ atmosphérique comme lors d'un ombrage (Willenbrink *et al.*, 1998), d'une mise à l'obscurité (Simpson *et al.*, 1991), d'une défoliation (Yamamoto et Mino, 1987; Prud'homme *et al.*, 1992; De Roover *et al.*, 1999b; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a), ou à la reprise de croissance au printemps (Pollock et Jones, 1979; Hendry, 1993).

(a)



(b)

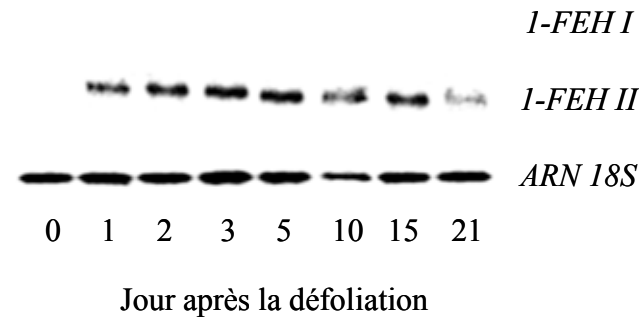


Figure 10: Niveau des transcrits de la *1-FEH I* et *1-FEH II* dans des racines de jeunes plantes de chicorée. (a) plantes contrôle non défoliées, (b) plantes défoliées (d'après Van den Ende *et al.*, 2001).

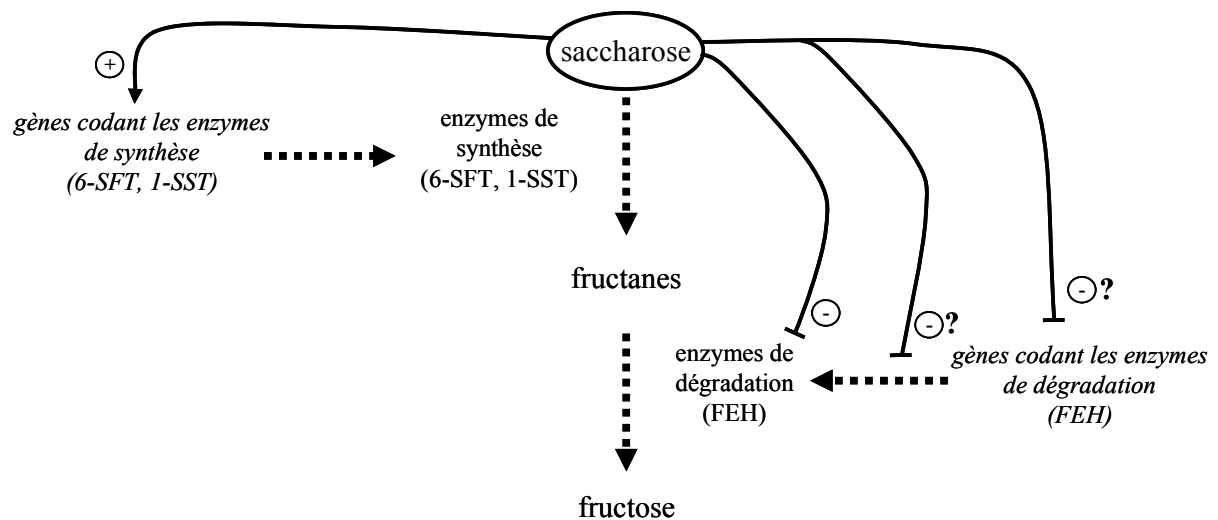


Figure 11: Modèle de la régulation du métabolisme des fructanes par le saccharose. Ce dissaccharide peut être perçu comme une molécule « signal » contrôlant la transcription des gènes codant des enzymes de synthèse des fructanes et donc l'activité de synthèse des fructanes. Le saccharose peut inhiber l'activité FEH. Il peut aussi être impliqué dans une régulation en amont de l'enzyme mature, c'est-à-dire au niveau transcriptionnel ou traductionnel.

Durant ces périodes, les fructanes sont hydrolysés pour fournir à la plante des sucres solubles susceptibles de pallier temporairement la carence en carbone (Yamamoto et Mino, 1987; Prud'homme *et al.*, 1992; De Roover *et al.*, 1999b; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Comme pour les FTs, le mécanisme d'action du saccharose sur la régulation de la dégradation des fructanes n'est pas encore clairement établi. Il est connu que certaines FEHs sont fortement inhibées, *in vitro*, par des concentrations en saccharose comprises entre 10 et 20 mM (Marx *et al.*, 1997b; Henson et Livingston, 1998; Van den Ende *et al.*, 2003a). Chez le ray-grass anglais, des travaux suggèrent que la diminution de la concentration en saccharose des tissus après une défoliation permettrait de lever l'inhibition exercée par ce sucre sur l'activité FEH des protéines présentes (Marx *et al.*, 1997b). Inversement, pendant les périodes d'accumulation des fructanes, la concentration en saccharose des feuilles de *Lolium* augmente et atteint des concentrations susceptibles d'inhiber *in vivo* 50 à 73 % de l'activité FEH (Simpson et Bonnett, 1993). A côté de cette inhibition directe du saccharose par interaction avec les protéines, des travaux ont mis en évidence l'existence d'autres mécanismes de régulation de l'activité FEH. En effet, chez le ray-grass anglais, le fait que l'activité FEH mesurée *in vitro* augmente après défoliation alors même que le saccharose est éliminé du milieu d'incubation indique que l'augmentation de l'activité FEH dans ce cas n'est pas seulement due à une levée de l'inhibition suite à la disparition du saccharose (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Une étude a montré que l'augmentation de l'activité 6-FEH dans les chaumes de dactyle après la coupe est due, au moins en partie, à une synthèse *de novo* d'une isoforme de 6-FEH (Yamamoto et Mino, 1989). Chez la chicorée, le gène codant la 1-FEH IIa est induit dans les racines par la coupe des parties aérienne tandis que l'expression du gène codant la 1-FEH I est insensible à ce processus (Van den Ende *et al.*, 2001) (Figure 10). Ainsi, même si l'activité FEH est inhibée directement par le saccharose, l'hypothèse que le saccharose puisse également agir en tant que molécule « signal » aboutissant à la régulation de la transcription des gènes codant des FEHs peut être émise.

L'ensemble de ces connaissances permet de proposer un modèle hypothétique de régulation du métabolisme des fructanes par le saccharose (Figure 11). A l'heure actuelle, nous savons que ce dissaccharide peut être perçu comme une molécule « signal » contrôlant la transcription des gènes codant des enzymes de synthèse des fructanes et donc l'activité de synthèse des fructanes. Le saccharose peut inhiber l'activité FEH. Il peut aussi être impliqué dans une régulation en amont de l'enzyme mature c'est-à-dire au niveau transcriptionnel ou traductionnel. Ce double rôle du saccharose comme substrat des FTs et comme facteur de

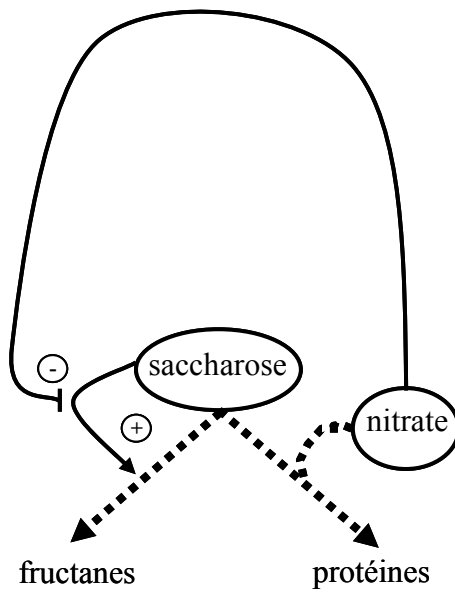


Figure 12: Modèle hypothétique de la régulation du métabolisme des fructanes par deux acteurs aux rôles antagonistes, le saccharose et le nitrate.

régulation du métabolisme des fructanes doit permettre à la plante d'ajuster finement les teneurs en fructanes en fonction du saccharose disponible.

1.6.2. *Quels autres facteurs pour la régulation du métabolisme des fructanes ?*

D'autres facteurs que le saccharose sont probablement impliqués dans la régulation de la synthèse des fructanes. En effet, l'augmentation de la transcription du gène de la 6G-FFT se produit après celle de la transcription du gène de la 1-SST, elle-même corrélée avec l'accumulation de saccharose dans les feuilles d'oignon (Vijn *et al.*, 1998). Pour expliquer ce résultat, les auteurs suggèrent que la régulation de l'activité de la 6G-FFT implique un autre signal que le saccharose. Un tel décalage se produit aussi dans les feuilles excisées d'orge où l'activité 1-SST est stimulée avant celle de la 6-SFT et il en est de même pour les transcrits correspondants (Nagaraj *et al.*, 2004). D'autres faits expérimentaux montrent que synthèse des fructanes et teneurs en saccharose ne sont pas toujours corrélées. C'est le cas dans les limbes de plantes de ray-grass placées en illumination continue chez lesquels on observe une augmentation des teneurs en saccharose ainsi qu'une augmentation du niveau des transcrits codant la 1-SST et la 6G-FFT mais pas des activités FTs correspondantes, suggérant qu'une régulation post-transcriptionnelle contrôlée par un autre facteur que le saccharose ait lieu dans ces tissus photosynthétiquement actifs (Lasseur *et al.*, 2006). Cette absence de corrélation entre synthèse des fructanes et teneurs en saccharose est également observée lors d'un stress hydrique dans les racines de ray-grass anglais (Amiard *et al.*, 2003a) ou lors d'un stress basse température dans les feuilles d'orge (Wei *et al.*, 2001a).

Ces données indiquent que d'autres facteurs agissent en plus du saccharose. **Le nitrate semble être un signal antagoniste du saccharose.** En effet, des apports de nitrate sur des feuilles excisées d'orge entraînent une diminution de la synthèse des fructanes et de l'activité fructosyltransférase sans modifier les teneurs en saccharose. L'effet négatif du nitrate sur la synthèse des fructanes peut même annuler le rôle activateur du tréhalose ou de l'illumination continue (Morcuende *et al.*, 2004). Cette régulation a donc pour effet d'orienter le saccharose vers la synthèse protéique plutôt que vers la synthèse des fructanes, lorsque le milieu nutritif est riche en nitrate. Ce résultat pourrait expliquer pourquoi l'orge ou le ray-grass anglais accumulent moins de fructanes sur un milieu riche en nitrate que sur un milieu pauvre en nitrate (Wang et Tillberg, 1996; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a) (Figure 12).

Quelques données indiquent que le catabolisme des fructanes pourrait être contrôlé par des phytohormones. Il a été suggéré que les gibbérellines étaient impliquées dans l'augmentation de l'activité FEH après la défoliation chez le ray-grass anglais (Morvan *et al.*, 1997; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001b) et que l'acide abscissique (ABA) pouvait jouer un rôle dans l'augmentation de l'activité FEH durant le remplissage des grains chez le blé (Yang *et al.*, 2004).

2. Les voies de perception et de transmission des signaux sucres : « sugar sensing and signaling».

2.1 Définition et implication dans la croissance et le développement

Les sucres solubles constituent la source préférentielle d'énergie et de squelettes carbonés pour toutes les cellules eucaryotes. Pour survivre, la cellule ajuste rapidement son métabolisme à la quantité de sucre disponible. Cet ajustement métabolique implique que les cellules sont capables de percevoir la présence ou l'absence de sucre. Il est maintenant communément admis que les sucres sont perçus en tant que molécule « signal » indépendamment des changements métaboliques qu'ils engendrent. Cette capacité de perception est nommée « sugar sensing » (Koch, 1996; Smeeckens et Rook, 1997; Rolland *et al.*, 2001). Les sucres peuvent ainsi agir comme des « pseudo hormones » capables de réguler un certain nombre de processus cellulaires. Le signal, perçu au niveau de senseur(s), est transmis dans la cellule jusqu'aux cibles cellulaires ; c'est la cascade de transmission du signal « sucre » ou « sugar signaling » qui fait intervenir différents acteurs moléculaires. Les cibles cellulaires correspondent par exemple au promoteur de certains gènes dont la transcription est régulée ou à des enzymes dont l'activité est modifiée.

C'est chez les eucaryotes unicellulaires et notamment chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* que le « sugar sensing » a été le plus étudié (Rolland *et al.*, 2002). Chez cette espèce, lorsque le glucose, source de carbone préférentielle, est présent dans le milieu, la cellule est capable de le percevoir et de réprimer les systèmes permettant l'utilisation de sources de carbone alternatives (Gancedo, 1998). Chez les mammifères, un exemple de « sugar sensing » est celui de la régulation du taux du glucose sanguin. L'insuline, une hormone qui permet la régulation de ce taux, est sécrétée par les cellules β du pancréas qui sont capables de percevoir le taux de glucose sanguin (Efrat *et al.*, 1994; Grupe *et al.*, 1995; Matschinsky *et al.*, 1998; Macfarlane *et al.*, 2000). Les mécanismes à l'origine de cette perception ne sont cependant pas entièrement élucidés.

Chez les végétaux, les sucres sont synthétisés de façon endogène au niveau des cellules photosynthétiquement actives des feuilles *via* la fixation et la réduction du CO₂

atmosphérique. Ces sucres sont soit utilisés sur place, soit exportés vers les cellules des organes non photosynthétiquement actifs (comme les racines), principalement sous forme de saccharose. Les végétaux peuvent donc être comparés à une mosaïque complexe constituée de cellules autotrophes et hétérotrophes pour le carbone. Cette complexité impose une régulation fine et coordonnée des activités de synthèse, de transport, d'utilisation et de stockage des sucres. Il y a une vingtaine d'années, des travaux mettaient en évidence que cette régulation, notamment celle des activités photosynthétiques, pouvait être contrôlée par les sucres eux-mêmes (Sheen, 1990). Les expériences menées sur des protoplastes de cellules du mésophylle de maïs ont en effet démontré que le glucose et le saccharose pouvaient réprimer l'expression de sept gènes codant des protéines impliquées dans le processus photosynthétique. Ces expériences ont marqué le début des travaux sur le « sugar sensing » chez les végétaux. Depuis, l'expression d'un certain nombre de gènes codant des protéines impliquées dans d'autres processus cellulaires tels que le métabolisme du saccharose, de l'amidon et de l'azote a été rapportée comme étant régulée par les sucres.

Il faut cependant noter que les sucres sont métabolisés très rapidement et leur présence pourrait aussi être perçue *via* leurs métabolites. Il a ainsi été suggéré que l'acétate et d'autres intermédiaires du métabolisme respiratoire pouvaient moduler l'expression des gènes (Koch, 1996 ; Koch *et al.*, 2002), mais peut-être indirectement par des modifications de pH et/ou du ratio AMP/ATP. Même si cela concerne la perception du statut carboné, il ne s'agit plus alors de « sugar sensing » au sens strict. Le parti-pris pour cette analyse bibliographique a été de se concentrer sur la perception et la signalisation par les sucres *per se*.

2.2 La perception du signal « sucre »

2.2.1. Perception du glucose et du fructose

Chez les végétaux supérieurs, un seul site de perception du glucose a été clairement identifié : l'**hexokinase**. Cette enzyme phosphoryle les hexoses en hexose 6-phosphates avec cependant une plus grande affinité pour le glucose (Damari-Weissler *et al.*, 2006). Son rôle dans le « sugar sensing » a été suggéré en 1994 grâce à l'utilisation d'analogues du glucose non métabolisables et d'intermédiaires métaboliques (Jang et Sheen, 1994). Des travaux sur des cultures cellulaires de concombre ont montré que le glucose mais aussi le mannose et le 2-

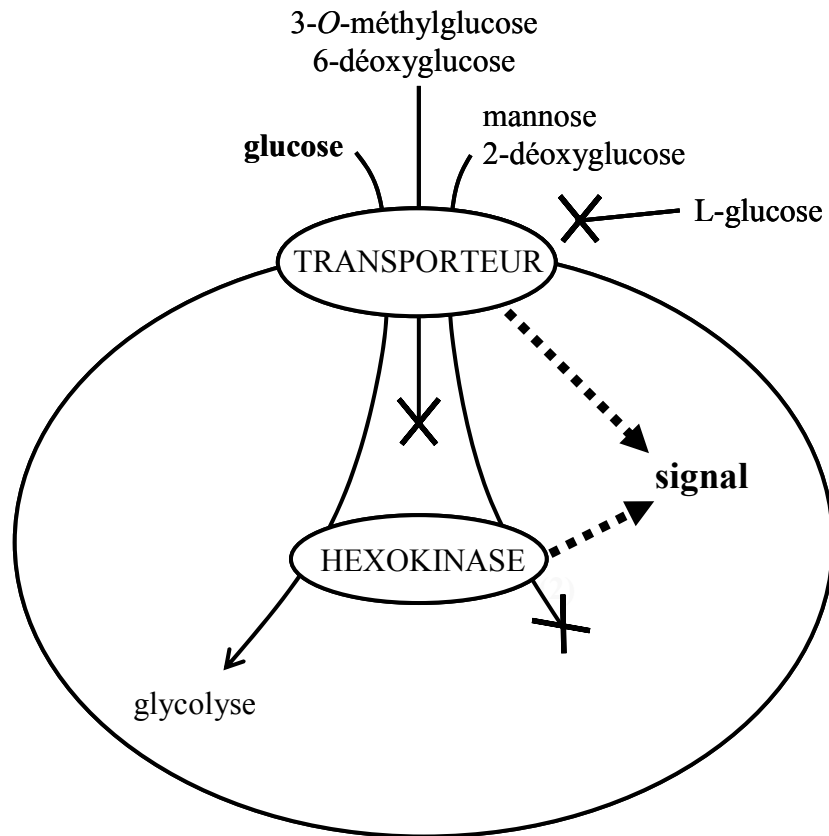


Figure 13: Utilisation des analogues du glucose pour étudier le signal « sucre ». Le 3-*O*-méthylglucose et le 6-déoxyglucose sont transportés dans la cellule mais ils sont peu ou pas phosphorylés par l'hexokinase. Le mannose et le 2-déoxyglucose sont transportés et phosphorylés par l'hexokinase mais pas métabolisés ensuite. Le L-glucose n'est pas transporté dans la cellule.

déoxyglucose, analogues structuraux du glucose phosphorylés par l'hexokinase mais peu ou pas métabolisés par la suite (Figure 13), pouvaient réprimer la transcription des gènes de la malate synthase et de l'isocitrate lyase alors que le 3-*O*-méthylglucose (3-OMG) qui est transporté dans la cellule mais peu phosphorylé par l'hexokinase (Cortès *et al.*, 2003) n'avait pas d'effet sur ces gènes (Graham *et al.*, 1994) (Figure 13). Une autre étude a montré que les gènes codant des protéines impliquées dans les processus photosynthétiques et exprimés dans des protoplastes de maïs sont réprimés par les sucres substrats de l'hexokinase comme le glucose, le mannose et le 2-déoxyglucose (Jang et Sheen, 1994). Le L-glucose (sucre non transporté), le 3-OMG et le 6-déoxyglucose (transportés et peu phosphorylés par l'hexokinase) (Gibson, 2000) n'agissent pas sur l'expression de ces gènes (Figure 13). De plus, après l'ajout de mannoheptulose (inhibiteur compétitif de l'hexokinase), les sucres, substrats de l'hexokinase ne répriment plus ces gènes (Jang et Sheen, 1994). Dix ans plus tard, des travaux ont montré de façon définitive le rôle de l'hexokinase dans la perception du signal sucre chez les végétaux supérieurs (Moore *et al.*, 2003). Les auteurs ont observé qu'une mutation sur le gène codant l'hexokinase 1 (AtH XK1) chez *Arabidopsis* conduisant à l'absence de la protéine AtH XK1, donnait des mutants nommés *gin2-1* insensibles au glucose. Les auteurs ont aussi montré que la perception du signal sucre n'était pas dépendante de l'activité catalytique de AtH XK1 (phosphorylation du glucose), mais de la fixation du glucose dans son site catalytique. Cette liaison substrat/enzyme provoque un changement de conformation de l'hexokinase (Bennett et Steitz, 1978). Ce changement pourrait être à l'origine de la cascade de transmission du signal sucre. L'hexokinase a donc deux rôles distincts chez *Arabidopsis*, un rôle catalytique et un rôle signalétique.

Un autre site de perception du glucose indépendant de l'hexokinase semble exister mais n'est pas clairement défini. Il se situerait au niveau de la membrane plasmique et correspondrait probablement à un **transporteur/senseur**. Ce site de perception a été suggéré grâce à l'utilisation d'analogues structuraux du glucose reconnus par les transporteurs membranaires de monosaccharide mais peu ou pas phosphorylés par l'hexokinase : le 3-*O*-méthylglucose et le 6-déoxyglucose (Figure 13). L'utilisation du 6-déoxyglucose indique que l'expression de plusieurs gènes est modulée par un signal sucre perçu au niveau membranaire. Chez *Chlorella kessleri*, ces gènes codent un transporteur d'hexose, un translocateur mitochondrial d'ATP/ADP et une glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase cytoplasmique (Hilgarth *et al.*, 1991). Chez *Chenopodium rubrum*, ces gènes codent une invertase pariétale (*Cin1*), une sucrose synthase, la phénylalanine ammonia-lyase (*PAL*) et la

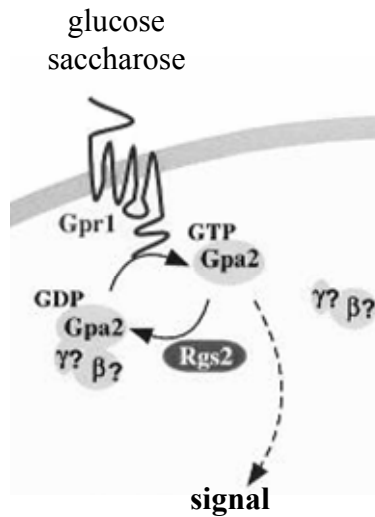


Figure 14: Perception du glucose et du saccharose *via* la protéine Gpr1 (G protein-coupled receptor) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La fixation d'un ligand (sucre) sur le récepteur entraîne le remplacement de la guanosine diphosphate (GDP) par une guanosine triphosphate (GTP) sur la sous-unité α de la protéine G (Gpa2) possédant une activité GTPase. Cet échange permet la dissociation de la protéine G en libérant le complexe Gpa2-GTP et les sous-unités β et γ . Le complexe Gpa2-GTP transmet alors le signal sucre. Le retour à la conformation de départ se fait grâce à l'activité GTPase intrinsèque de Gpa2 et grâce à la protéine Rgs2 qui régule positivement l'activité GTPase de Gpa2 (d'après Versele *et al.*, 2001).

petite sous-unité de la Rubisco (*RbcS*) (Godt *et al.*, 1995; Roitsch *et al.*, 1995; Ehness *et al.*, 1997). A notre connaissance aucun senseur membranaire potentiellement impliqué dans la perception du signal sucre n'a été caractérisé chez les plantes. En revanche, chez la levure, les protéines transmembranaires SNF3 et RGT2 présentant une forte homologie avec des transporteurs d'hexose jouent un rôle de senseur de glucose. Il faut noter que ces deux senseurs ne semblent pas transporter le glucose (Liang et Gaber, 1996; Ozcan *et al.*, 1998). Parmi les 26 gènes d'*Arabidopsis* codant des transporteurs de monosaccharides, deux (*AtSUGTRPR* et *F23E12.140*) codent des protéines qui possèdent comme SNF3 et RGT2 une extension formant une boucle centrale (Lalonde *et al.*, 1999). Ils pourraient donc être de bons candidats pour correspondre à des senseurs membranaires d'hexoses.

A côté des transporteurs/senseurs de glucose, il existe chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* une autre protéine plasmalemmique nommée Gpr1 permettant la perception du glucose et du saccharose (Lemaire *et al.*, 2004). Elle fait partie des GPCR (G-protein coupled receptor) (Figure 14). La fixation d'un ligand (sucre) sur le récepteur entraîne le remplacement de la guanosine diphosphate (GDP) par une guanosine triphosphate (GTP) sur la sous-unité α de la protéine G (Gpa2) possédant une activité GTPase. Cet échange permet la dissociation de la protéine G en libérant le complexe Gpa2-GTP et les sous-unités β et γ . Le complexe Gpa2-GTP transmet alors le signal sucre. Le retour à la conformation de départ se fait grâce à l'activité GTPase intrinsèque de Gpa2 et grâce à la protéine Rgs2 qui régule positivement l'activité GTPase de Gpa2 (Versele *et al.*, 2001) (Figure 14). Chez *Arabidopsis* la protéine AtRGS1, possédant à la fois les domaines transmembranaires de Gpr1 et l'activité régulatrice de Rgs2 a été récemment caractérisée (Chen *et al.*, 2003). Elle interagit avec AtGPA1, la sous-unité α de la protéine G possédant une activité GTPase comme Gpa2 (Chen *et al.*, 2003). Une étude suggère qu'AtRGS1 pourrait être impliquée dans la perception du signal sucre. En effet, des plantes mutantes n'exprimant pas AtRGS1 germent mieux que des plantes sauvages sur un milieu riche en glucose, c'est-à-dire qu'elles sont moins sensibles au glucose que les plantes sauvages (Chen et Jones, 2004).

Même si la plupart des études portent spécifiquement sur le rôle du glucose en tant que molécule « signal », il est important de considérer aussi de façon distincte le rôle signal du fructose, en particulier dans le contexte d'une étude sur une espèce accumulatrice de fructanes telle que le ray-grass anglais. En effet, si la synthèse des fructanes par les FTs, s'accompagne d'une libération de glucose, leur dégradation libère essentiellement du fructose. Il est donc

probable que les effets régulateurs de ces deux hexoses, libérés dans des conditions contrastées, ne soient pas similaires et passent par des voies de signalisation différentes. Parmi les quelques travaux qui ont comparé les effets du glucose et du fructose, certains montrent que ces deux hexoses conduisent aux mêmes réponses (Yamamoto et Mino, 1987; Koch *et al.*, 1992; Jang et Sheen, 1994; Chiou et Bush, 1998; Loreti *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2000; Martinez Noël *et al.*, 2001; Lejay *et al.*, 2003; Tiessen *et al.*, 2003). Au contraire, quelques études indiquent que ces deux hexoses ne conduisent pas à des réponses équivalentes et dans ces cas-là, c'est toujours la réponse du glucose qui a été la plus forte (Kaufman *et al.*, 1973; Umemura *et al.*, 1998; Atanassova *et al.*, 2003; Karthikeyan *et al.*, 2007), suggérant que ces sucres peuvent agir en tant que signaux déclenchant des voies de signalisation différentes.

Le fait que le fructose soit aussi un des substrats des hexokinases (Damari-Weissler *et al.*, 2006) suggère qu'il puisse, comme le glucose, être perçu par ces protéines. Cependant, étant donné que l'affinité pour le fructose est beaucoup plus forte chez les fructokinases que chez les hexokinases, le fructose est probablement davantage perçu par des fructokinases que des hexokinases (Pego et Smeekeens, 2000). Des expériences récentes effectuées chez *Arabidopsis* indiquent en effet que le fructose pourrait être perçu indépendamment du glucose. Chez cette espèce, le mutant *gin2-1* (conduisant à une absence d'hexokinase 1) est insensible au glucose mais reste sensible au fructose (W. Cheng et J. Sheen, résultats non publiés dans Rolland *et al.*, 2006). Par ailleurs, des résultats obtenus grâce à l'utilisation du psicose, un épimère du fructose phosphorylé par la fructokinase mais pas métabolisé ensuite, indiquent que l'inhibition de la croissance racinaire par cet analogue du fructose pourrait faire intervenir une cascade de signalisation déclenchée au niveau d'une fructokinase (Kato-Noguchi *et al.*, 2005).

Comme pour le glucose, le signal fructose pourrait être perçu au niveau de la membrane plasmique. En ce qui concerne l'hypothèse d'un transporteur-senseur, ce n'est que très récemment que trois protéines capables de transporter le fructose ont été identifiées parmi les nombreux transporteurs de monosaccharides (MSTs) connus chez les végétaux supérieurs (Buttner, 2007). Ces trois protéines sont des MSTs qui peuvent transporter efficacement le fructose, à côté de leur activité principale de transport du glucose (AtSTP6 et AtSTP13 ; (Scholz-Starke *et al.*, 2003 ; Nørholm *et al.*, 2006) ou des polyols (Klepek *et al.*, 2005; Reinders *et al.*, 2005). Elles pourraient correspondre à des senseurs membranaires de fructose. La perception membranaire du fructose pourrait aussi se faire par des protéines GPCR. En

effet, le mutant *Atrgs1* qui ne produit pas la protéine AtGPA1 impliquée dans la perception membranaire du glucose est non seulement insensible au glucose, mais aussi au fructose (Chen et Jones, 2004).

2.2.2. Perception du saccharose

Chez les végétaux, le saccharose représente une forme de transport et de stockage du carbone. A côté de ces rôles clairement établis, il semblerait que, au même titre que le glucose et le fructose, et de façon distincte, le saccharose soit également une molécule « signal ». Cette fonction signalétique a été suggérée grâce à l'utilisation d'isomères du saccharose non métabolisables, comme le palatinose, le turanose et le lactulose, pouvant mimer les effets du saccharose (Loreti *et al.*, 2000; Fernie *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2002; Tiessen *et al.*, 2003) et conduire à l'expression de gènes codant par exemple un transporteur du saccharose (Chiou et Bush, 1998) ou à la dérégulation de gènes codant par exemple l' α -amylase dans les embryons d'orge (Loreti *et al.*, 2000). Le site de perception du saccharose reste néanmoins inconnu. Le fait que les isomères du saccharose précédemment cités ne soient pas ou très peu transportés dans la cellule (Schmitt *et al.*, 1984; M'Batchi et Delrot, 1988; Li *et al.*, 1994) a permis de suggérer l'existence d'un senseur plasmalemmique. Ce rôle pourrait être assumé par une protéine appartenant à la famille des transporteurs du saccharose, mise en évidence chez la tomate (Barker *et al.*, 2000). Cette protéine, dénommée LeSUT2, comporte une extension N-terminale, une boucle centrale cytoplasmique et elle ne transporte que peu de saccharose quand elle est exprimée chez la levure. Cette conformation rappelle celle trouvée chez les senseurs membranaires du glucose chez la levure RGT2 et SNF3 (Ozcan *et al.*, 1998). Chez la tomate, LeSUT2 est localisée dans les pétioles au niveau de la membrane plasmique des tubes criblés du phloème, au même niveau que les transporteurs du saccharose LeSUT1 (forte affinité) et LeSUT4 (faible affinité), avec lesquels elle peut interagir (interaction protéine-protéine) pour moduler leurs activités respectives (Reinders *et al.*, 2002). Des orthologues de LeSUT2 ont été caractérisés chez *Arabidopsis* (AtSUT2/SUT3) et chez *Plantago major* (PmSUC3) (Schulze *et al.*, 2000; Barth *et al.*, 2003). Contrairement à LeSUT2, ils ne sont pas colocalisés avec les transporteurs du saccharose et ils présentent eux-mêmes une capacité de transport non négligeable. Leur rôle dans le transport du saccharose est donc envisagé, sans toutefois que soit écartée la possibilité de leur intervention dans la perception du saccharose

(Barth *et al.*, 2003; Sauer, 2007). Il n'est pas exclu que le saccharose puisse aussi être perçu par un senseur cytosolique comme le suggère une étude récente (Loreti *et al.*, 2001).

2.3 Les acteurs impliqués dans la transmission du signal « sucre »

Après avoir été perçu, le signal sucre est transmis des senseurs aux cibles cellulaires par le biais de différents acteurs encore très imparfaitement connus.

2.3.1. Les protéines kinases, les protéines phosphatases et le Ca^{2+}

Les protéines phosphatases 1A et 2A et les protéines kinases semblent impliquées dans la transmission du signal saccharose conduisant à l'induction de la transcription des gènes codant la sporamine et la β -amylase dans les pétioles de patate douce (Takeda *et al.*, 1994). Chez le blé, le Ca^{2+} et des protéines kinases et phosphatases sont impliqués dans la transmission du signal saccharose qui conduit à une augmentation de la transcription des gènes codant des enzymes de synthèse des fructanes (Martinez Noël *et al.*, 2001; Martinez Noël *et al.*, 2006).

2.3.2. Les protéines SnRK1s

Chez la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, une protéine kinase nommée SNF1 (Sucrose Non Fermenting 1) est impliquée dans la transmission du signal « sucre » et plus précisément dans la « voie majeure de répression par le glucose » qui réprime l'expression de nombreux gènes en présence de glucose (Rolland *et al.*, 2006). C'est le cas également de son analogue AMPK chez les mammifères (Hardie *et al.*, 1998). Chez les végétaux supérieurs, une protéine proche de celle de la levure a été caractérisée chez le seigle et a été nommée SnRK1 pour « Snf Related protein Kinase 1 » (Alderson *et al.*, 1991). Plusieurs gènes codant des SnRK1s ont ensuite été clonés chez différentes espèces de végétaux supérieurs (Hardie *et al.*, 1998; Halford *et al.*, 2003). Les premiers travaux ont indiqué que ces protéines végétales seraient bien impliquées dans la transmission du signal sucre, mais contrairement à leurs analogues SNF1 et AMPK qui agissent dans la voie de répression par les sucres, les protéines SnRK1s semblent plutôt impliquées dans l'activation de l'expression par les sucres. En effet, chez des plantes de pomme de terre dont l'activité SnRK1 a été réduite artificiellement, la transcription

du gène *Sus4* codant la sucrose synthase n'est plus inductible par le saccharose (Fu et Park, 1995; Purcell *et al.*, 1998). De plus, toujours chez la pomme de terre, l'activation redox de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (enzyme impliquée dans la synthèse de l'amidon) induite par le saccharose fait intervenir SnRK1 (Tiessen *et al.*, 2003). Des travaux suggèrent aussi que SnRK1 est nécessaire pour la dérépression du gène de l' α -amylase dans les embryons de blé et de riz quand les teneurs en glucose sont faibles (Laurie *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2007). Chez *Arabidopsis*, les SnRK1s jouent aussi un rôle central dans la dérépression de nombreux gènes en réponse à une carence en sucres, ce qui leur attribue clairement une fonction analogue à celle de SNF1 chez la levure et de AMPK chez les mammifères (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007).

2.3.3. Le tréhalose-6-phosphate?

Le tréhalose-6-phosphate (T6P) est un intermédiaire de la synthèse du tréhalose, un disaccharide non réducteur composé de deux résidus glucosyles liés en $\alpha(1-1)$. La synthèse du tréhalose se fait en deux étapes, la première réaction est catalysée par la tréhalose-6-phosphate synthase (TPS), elle produit du T6P à partir d'un glucose-6-phosphate et d'un UDP-glucose. La deuxième étape est catalysée par la tréhalose-6-phosphate phosphatase (TPP), elle produit du tréhalose à partir du T6P. Le tréhalose est dégradé en glucose par des tréhalases. Le T6P, même s'il n'est présent qu'en très faible quantité, se révèle indispensable au développement correct des plantes (Eastmond *et al.*, 2002; Schluepmann *et al.*, 2003; Dijken *et al.*, 2004; Schluepmann *et al.*, 2004). Même si son rôle physiologique n'est pas encore clair, des études suggèrent qu'il pourrait être impliqué dans la transmission du signal sucre. En effet, le T6P semble être un intermédiaire métabolique du signal saccharose, situé en aval de SnRK1, conduisant à l'activation redox de l'ADP-glucose pyrophosphorylase chez *Arabidopsis* (Kolbe *et al.*, 2005). Le T6P ou la TPS semblent également impliqués dans la transmission du signal glucose, conduisant à une augmentation de la transcription du gène *ABI4* codant un facteur de transcription régulant la germination et le développement des parties aériennes chez *Arabidopsis* (Avonce *et al.*, 2004).

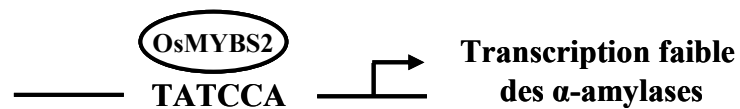
2.4 Les mécanismes de régulation déclenchés par les sucres

2.4.1. Régulation transcriptionnelle

Durant la dernière décennie, les séquences promotrices de certains gènes dont l'expression est régulée par la présence ou l'absence de sucres solubles ont été analysées et des éléments cis permettant le contrôle de la transcription ont été caractérisés. C'est le cas de la boîte-B (B-box) (Grierson *et al.*, 1994), du sucrose-responsive element (SURE) (Grierson *et al.*, 1994), des motifs SP8a et SP8b (Ishiguro et Nakamura, 1992), de la « sugar response sequence » (SRS) contenant une boîte GC, une boîte G et l'élément TATCCA (Lu *et al.*, 1998) ainsi que des « carbohydrate metabolite signal responsive element » (CMSRE-1 et CMSRE-2) (Morikami *et al.*, 2005).

Des éléments trans (facteur de transcription), régulateurs de la transcription, induits ou réprimés en fonction du statut carboné de la cellule, ont été mis en évidence. SUSIBA2 est un activateur de la transcription exprimé dans l'albumen d'orge en présence de saccharose. SUSIBA2 se lie à l'élément SURE présent sur le promoteur de l'isoamylase 1 (iso1) et active sa transcription (Sun *et al.*, 2003). STOREKEEPER (STK) est un activateur de la transcription isolé chez la pomme de terre qui est exprimé en présence de saccharose. Il se lie à la boîte-B présente sur le promoteur des gènes codant la patatine de classe 1. L'interaction entre STK et la boîte-B n'a cependant été démontrée qu'*in vitro* (Zourelidou *et al.*, 2002). Récemment, ASML2 et ASML1, des activateurs de la transcription ont été caractérisés chez *Arabidopsis* (Masaki *et al.*, 2005a; Masaki *et al.*, 2005b). ASML1 et ASML2 sont exprimés dans les tiges, les fleurs et les siliques et leur transcription est induite par le glucose et le saccharose. Ces facteurs de transcription activent les promoteurs des gènes codant la sporamine et la β -amylase chez *Arabidopsis*. Au contraire, SPF1 est connu pour réprimer la transcription des gènes codant la sporamine et la β -amylase chez la patate douce. SPF1, qui reconnaît les motifs SP8a et SP8b, est exprimé en absence de saccharose (Ishiguro et Nakamura, 1994). Chez le riz, l'élément TATCCA présent sur le promoteur des gènes codant les α -amylases peut être reconnu par OsMYB2, un répresseur de la transcription induit en

en présence de glucose



en absence de glucose

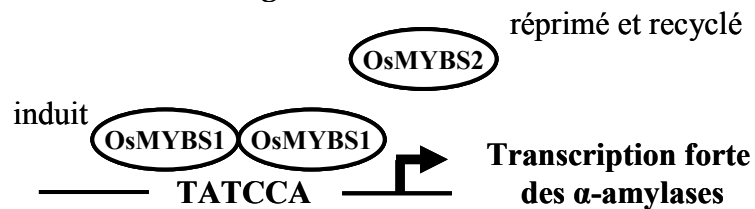


Figure 15: Rôle des facteurs de transcription OsMYB1 et OsMYB2 dans la régulation de la transcription des gènes codant les α -amylases chez le riz. L'élément TATCCA présent sur le promoteur des gènes codant les α -amylases peut être reconnu par OsMYB2, un répresseur de la transcription induit en présence de glucose, ou par OsMYB1, un activateur de la transcription formant un dimère induit lors d'une carence en glucose (d'après Lu *et al.*, 2002).

présence de glucose, ou par OsMYB1, un activateur de la transcription formant un dimère induit lors d'une carence en glucose (Lu *et al.*, 2002) (Figure 15).

2.4.2. Régulation post-transcriptionnelle

Les sucres peuvent aussi induire une régulation post-transcriptionnelle. En effet, des travaux chez le riz ont montré que la présence de glucose déstabilisait les ARNm correspondant au gène α -Amy3 codant l' α -Amylase 3 *via* la région 3' non traduite (3' UTR) (Chan et Yu, 1998). Par ailleurs, il a été montré que la présence de fortes teneurs en saccharose peut réprimer la traduction du facteur de transcription ATB2bZIP chez *Arabidopsis* (Rook *et al.*, 1998). Ce mécanisme de répression nécessite une séquence nommée « Sucrose Control uORF » (SC-uORF) présente dans la partie 5'-UTR de l'ARNm correspondant au gène ATB2 (Wiese *et al.*, 2004).

2.4.3. Régulation post-traductionnelle

Récemment, des travaux menés chez *Arabidopsis* ont montré que le glucose, *via* le senseur AtHXK1 pouvait réguler la durée de vie des protéines. Ainsi, la dégradation du facteur de transcription EIN3 par le protéasome 26S est activée par le signal glucose (Yanagisawa *et al.*, 2003). Les sucres en tant que molécules « signal » peuvent aussi moduler l'activité enzymatique. Une étude récente a mis en évidence chez la pomme de terre, que l'activation redox de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (enzyme impliquée dans la synthèse de l'amidon) est contrôlée par le saccharose *via* SnRK1 (Tiessen *et al.*, 2003). Certaines études suggèrent que les SnRK1s pourraient être impliquées dans la régulation de la nitrate réductase, la saccharose phosphate synthase et la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA reductase. En effet, SnRK1 peut phosphoryler ces trois protéines *in vitro* ce qui entraîne leur inactivation (Dale *et al.*, 1995; Sugden *et al.*, 1999).

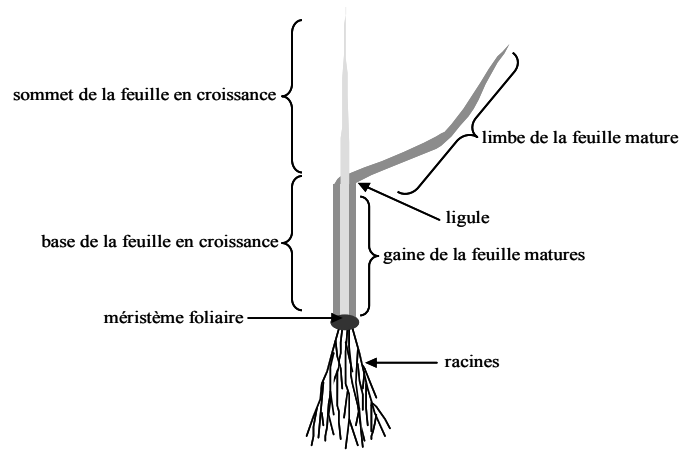


Figure 16: Le ray-grass anglais (*Lolium perenne*), représentation schématique d'une talle.

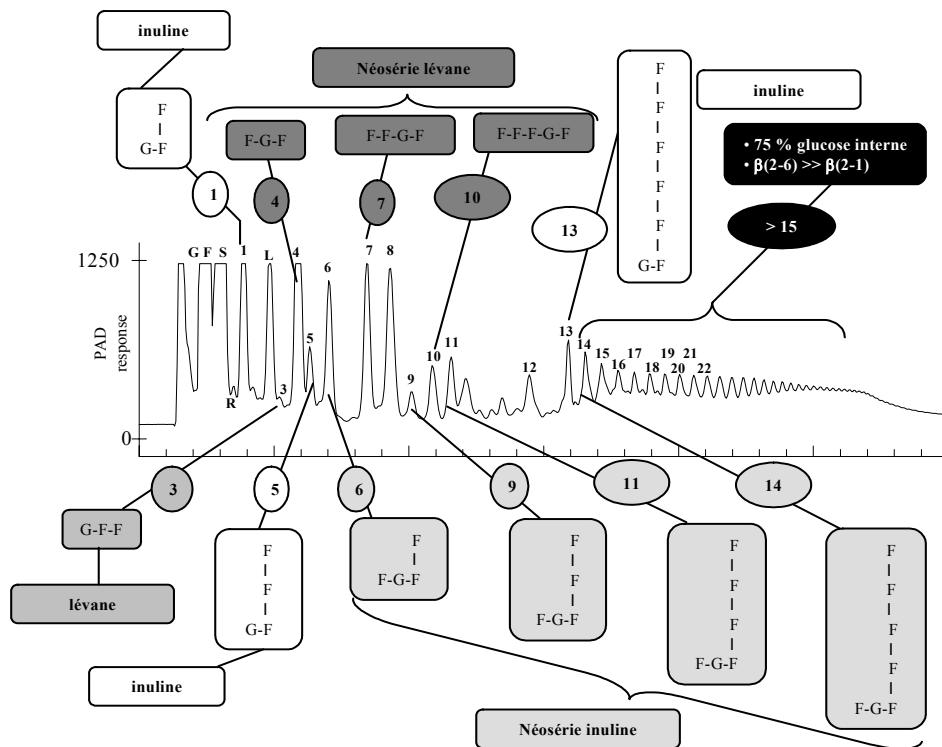


Figure 17: Chromatogramme d'un extrait de chaumes de ray-grass anglais.

Les fructanes du ray-grass anglais sont de type inuline, néosérie inuline et néosérie lévane. Le seul représentant des lévanes est le 6-kestotriose. Parmi les fructanes de faibles DP (DP inférieur ou égal à 8), les fructanes de type inuline et néosérie inuline (liaisons $\beta(2,1)$) sont prédominants alors que les fructanes de la néosérie lévane (liaisons $\beta(2,6)$) sont majoritaires chez les DP supérieurs. Les traits verticaux symbolisent des liaisons $\beta(2,1)$ et les traits horizontaux des liaisons $\beta(2,6)$. F, fructose; G, glucose; S, saccharose (d'après Pavis *et al.*, 2001b).

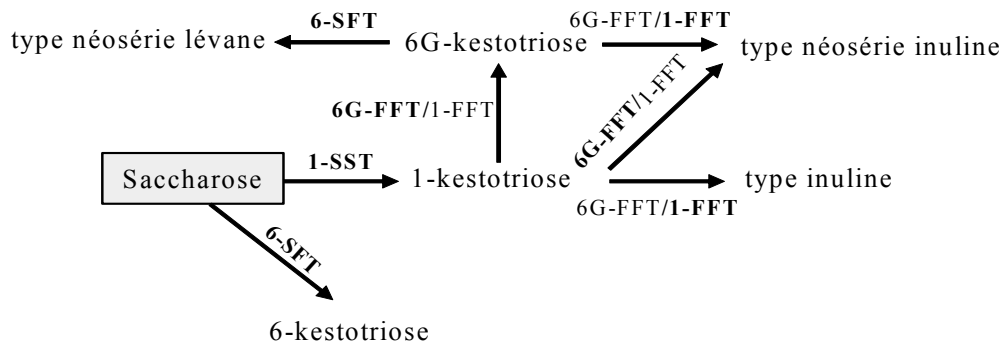


Figure 18: Modèle de synthèse des fructanes chez *Lolium perenne*.

Ce modèle suggère l'action concertée de trois enzymes de synthèse récemment caractérisées, une 1-SST, une 6G-FFT/1-FFT, et une 6-SFT (d'après Lasseur B, Van den Ende W, Prud'homme MP ; résultats non publiés).

3. Rôle et régulation du métabolisme des fructanes après la coupe chez le ray-grass anglais, *Lolium perenne* L.

3.1 Présentation de la plante et rappel sur les structures et le métabolisme des fructanes

Le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) est une plante herbacée vivace de la famille des Poacées. A l'état végétatif, il comprend quelques dizaines de talles constituées chacune d'une tige réduite qui porte les feuilles et les racines. Les feuilles adultes se composent d'une gaine enveloppante et d'un limbe étalé séparés par la ligule. Les feuilles sont emboîtées les unes dans les autres, la plus âgée étant la plus externe. La feuille en croissance forme un tube caché dans la gaine de la feuille précédente et son méristème est basal (Figure 16). La zone de croissance foliaire (division et élongation cellulaire) se situe dans les trois premiers cm de la base et la zone de différenciation cellulaire dans les trois cm suivant.

Chez cette espèce, les glucides s'accumulent en majorité sous forme de fructanes qui sont de type inuline, néosérie inuline et néosérie lévane. Le seul représentant des lévanes est le 6-kestotriose. Parmi les fructanes de faibles DP (DP inférieur ou égal à 8), les fructanes de type inuline et néosérie inuline (liaisons β -(2,1)) sont prédominants alors que les fructanes de la néosérie lévane (liaisons β -(2,6)) sont majoritaires chez les DP supérieurs (Figure 17) (Pavis *et al.*, 2001b). Leur synthèse nécessite l'action concertée de trois fructosyltransférases récemment caractérisées : une 1-SST, une 6G-FFT/1-FFT, et une 6-SFT (Figure 18) (Chalmers *et al.*, 2003; Lasseur *et al.*, 2006 ; Lasseur B, Van den Ende W, Prud'homme MP ; résultats non publiés). Les connaissances acquises sur leur dégradation restent parcellaires. A ce jour, seule une 6-FEH purifiée à l'homogénéité a été décrite (Marx *et al.*, 1997b). Une étude récente rapporte le clonage d'un ADNc codant potentiellement une 1-FEH sans que l'activité de la protéine n'ait été confirmée (Chalmers *et al.*, 2005).

3.2 Effet de la défoliation sur le métabolisme des fructanes

La pérennité des espèces prairiales telles que le ray-grass anglais est fortement dépendante de leur capacité à croître après la fauche ou le pâturage. Lorsqu'une défoliation

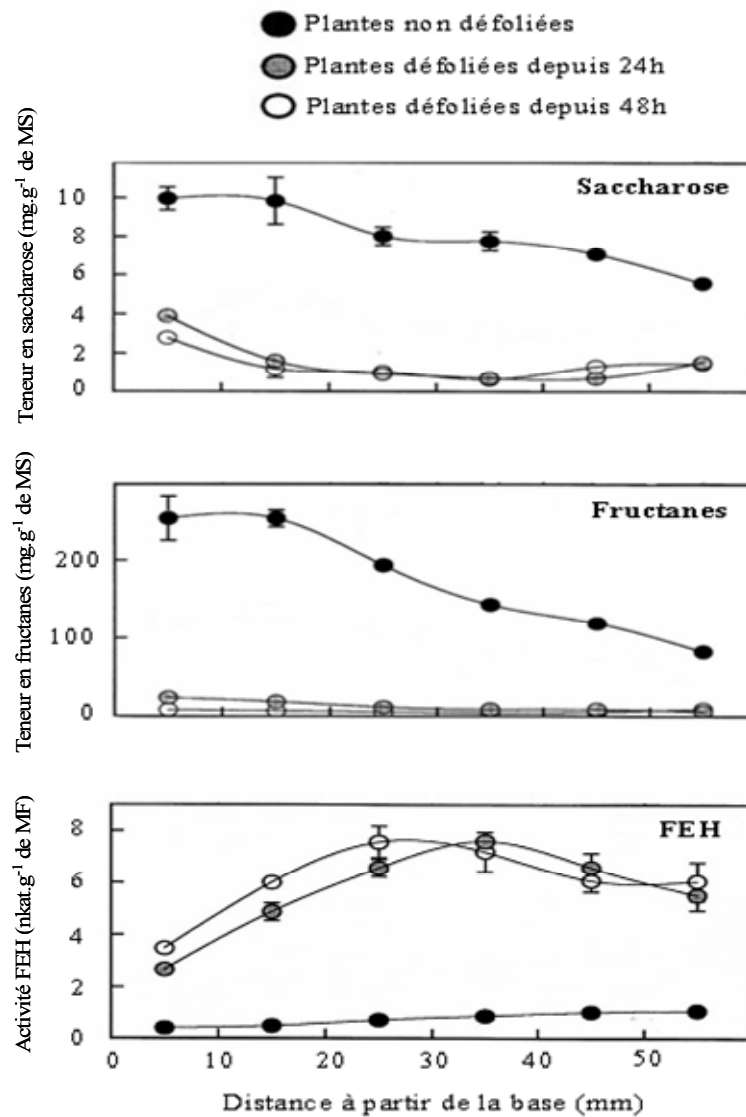


Figure 19: Changement dans la distribution spatiale des teneurs en saccharose et en fructanes et de l'activité FEH dans les bases de feuilles en croissance chez le ray-grass anglais en réponse à la défoliation. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres verticales correspondent à l'erreur standard (d'après Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a).

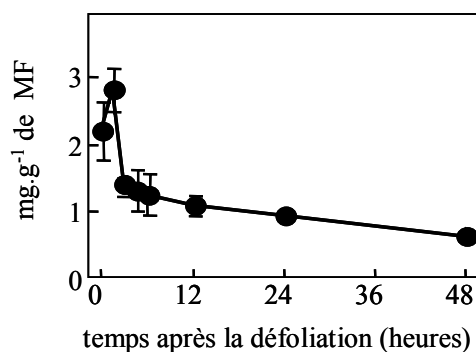


Figure 20: Teneur en fructanes chez le ray-grass suivant une défoliation dans les gaines des feuilles matures. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois réplicats. Les barres verticales correspondent à l'erreur standard (d'après Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a).

supprime la totalité des tissus photosynthétiques, la croissance des plantes dépend alors transitoirement du carbone assimilé avant la coupe.

Des travaux basés sur l'utilisation du marquage au $^{13}\text{CO}_2$ ont montré que pendant les deux premiers jours de repousse, la croissance foliaire et racinaire est majoritairement dépendante des réserves (De Visser *et al.*, 1997; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999b). Par ailleurs, des expériences basées sur la manipulation des teneurs en sucre par des traitements courts à l'obscurité, à l'illumination continue ou à des températures basses ou élevées, ont permis de montrer que la production de nouveaux tissus foliaires au cours des premiers jours de repousse est corrélée aux teneurs initiales en sucres solubles et en fructanes, non seulement dans les **gainés des feuilles** adultes mais également à la **base des feuilles en croissance** (Davies, 1965; Davidson et Milthorpe, 1966; Donaghy et Fulkerson, 1997; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a).

A la base des feuilles en croissance, la mobilisation des fructanes a lieu à la fois dans la zone de différenciation et dans la zone de croissance foliaire où l'activité FEH augmente fortement (Figure 19) (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Cela indique que les fructanes stockés dans la zone de croissance foliaire sont utilisés sur place dans les cellules en division et en élongation, comme source de carbone pour la croissance. Les fructanes sont aussi dégradés dans les gainés des feuilles matures, où leur teneur diminue pendant les premiers jours de repousse (Figure 20) (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Dans le but d'évaluer le devenir du carbone des fructanes des gainés, les gainés coupées ont été alimentées avec du ^{13}C -fructose en faisant l'hypothèse que le devenir de ce ^{13}C -fructose reflète celui du fructose provenant de l'hydrolyse des fructanes des gainés après la défoliation (Amiard *et al.*, 2003b). A la fin des huit heures de marquage, l'enrichissement en ^{13}C est non seulement élevé dans les gainés, comme attendu, mais il est également très élevé dans la zone de croissance foliaire, en particulier dans les 10 premiers mm de la base. Deux jours après la défoliation, les feuilles en croissance ont ainsi incorporé 57% du ^{13}C apporté indiquant que les gainés foliaires représentent une source de carbone pour la production de biomasse foliaire après défoliation. Pendant le même temps, les racines n'ont incorporé que 3% du marquage apporté aux gainés, montrant qu'il existe une allocation préférentielle vers la zone de croissance foliaire (Amiard *et al.*, 2003b).

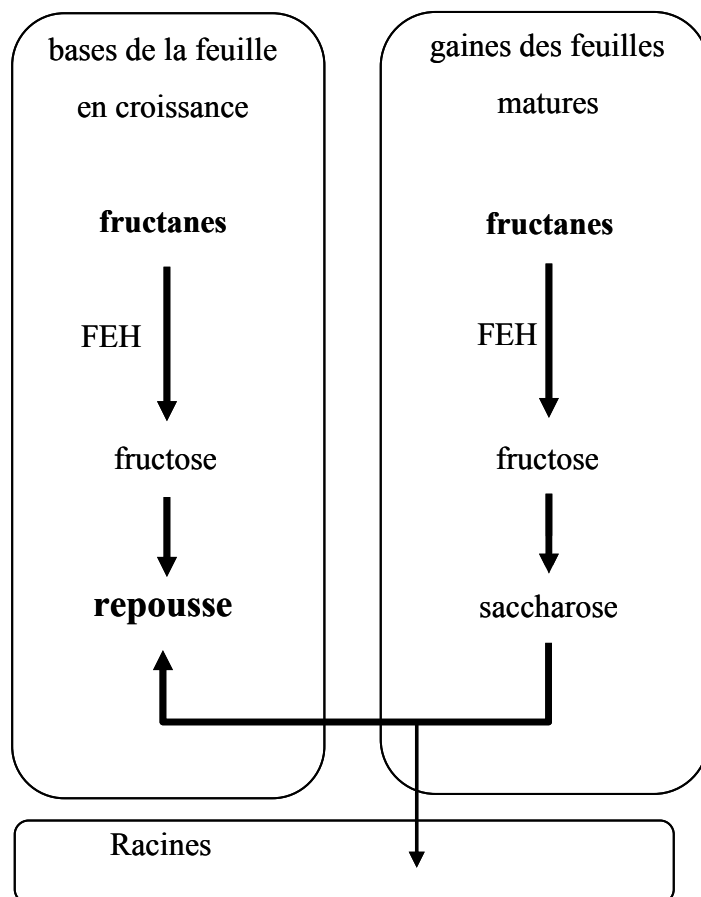


Figure 21: Représentation schématique d'un ray-grass défolié. La mobilisation des fructanes des gainnes et de la zone de croissance foliaire *via* la forte augmentation de l'activité FEH ainsi que l'allocation préférentielle du carbone issu des réserves vers la zone de croissance foliaire sont des mécanismes qui contribuent à une repousse rapide et donc à la tolérance à la défoliation.

Tableau V: Concentration en sucres solubles dans la sève phloémique des gainnes des feuilles matures avant et 6 heures après la défoliation (d'après Amiard *et al.*, 2004).

Sucres (mM)	gainnes des feuilles matures non défoliées	gainnes des feuilles matures défoliées
saccharose	1041	207
glucose	63	36
fructose	17	9

L'ensemble de ces données est particulièrement important pour la compréhension de la pérennité des espèces prairiales. La mobilisation des fructanes des gaines et de la zone de croissance foliaire *via* la forte augmentation de l'activité FEH ainsi que l'allocation préférentielle du carbone issu des réserves vers la zone de croissance foliaire sont des mécanismes cruciaux qui contribuent à une production rapide de tissus photosynthétiques et donc à la tolérance à la défoliation (Figure 21). Les **FEHs**, fortement impliquées dans ces mécanismes, constituent donc des **enzymes clés** qui permettent l'alimentation en carbone de la zone de croissance foliaire.

3.3 Régulation du métabolisme des fructanes après la coupe, hypothèse du « signal sucre »

Les facteurs régulant les activités de synthèse et de dégradation des fructanes sont encore méconnus (c.f. 1.6. Régulation de la synthèse et de la dégradation des fructanes). Des travaux réalisés chez le blé et l'orge ont montré que l'activité des enzymes de synthèse pouvait être contrôlée par le saccharose en tant que molécule « signal » *via* la modulation du niveau de transcrits des gènes correspondants (Sprenger *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2000; Nagaraj *et al.*, 2004). Chez le ray-grass, même si aucune étude ne l'a démontré directement, il est probable que le saccharose régule également la synthèse des fructanes. En effet, dans les conditions où l'offre en carbone est supérieure à la demande, l'accumulation de saccharose jusqu'à une teneur seuil précède l'augmentation du niveau des transcrits de la 1-SST et de la 6G-FFT dans les bases des feuilles en croissance et les gaines des feuilles matures (Lasseur *et al.*, 2006). Il a été montré chez le ray-grass que le saccharose inhibe directement l'activité FEH par interaction avec les protéines (Marx *et al.*, 1997b). Ainsi, la chute des teneurs en saccharose qui se produit dans les tissus (Figure 19) et plus particulièrement dans le phloème (Tableau V) après la défoliation peut expliquer au moins en partie l'augmentation de l'activité FEH par levée de cette inhibition. Cependant, le fait que l'activité FEH, mesurée *in vitro* alors que le saccharose est éliminé du milieu d'incubation, augmente après la défoliation indique que cette augmentation n'est pas seulement due à une levée de cette inhibition directe suite à la disparition du saccharose (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). La défoliation s'accompagne aussi d'une diminution de la teneur en glucose et en fructose dans les tissus laissés en place. Il n'est donc pas exclu que ce soit cette diminution qui soit perçue par la plante défoliée et soit à l'origine de la dégradation des fructanes.

Prises dans leur ensemble, ces informations suggèrent que les sucres solubles peuvent être des signaux régulant le métabolisme des fructanes chez le ray-grass anglais après une défoliation. La diminution des teneurs en sucres solubles suite à la coupe pourrait être le signal qui, d'une part, cesse d'induire les enzymes de synthèse des fructanes et qui, d'autre part, lève l'inhibition de l'expression des gènes codant les enzymes de dégradation des fructanes ou lève l'inhibition des activités FEHs. Cette régulation par les sucres pourrait donc avoir lieu à plusieurs niveaux : transcriptionnel, traductionnel et/ou post traductionnel.

OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'analyse bibliographique a souligné l'importance des fructanes dans la tolérance à la défoliation chez le ray-grass anglais. En effet nous avons vu que ces polymères de fructose, qui constituent la forme principale de réserve carbonée accumulée à la base des feuilles, sont utilisés après une défoliation pour pallier transitoirement la diminution des photoassimilats importés dans les tissus hétérotrophes. Leur mobilisation permet à la plante de survivre jusqu'à la production de nouveaux tissus photosynthétiques. Le catabolisme des fructanes après la coupe est assuré par une augmentation de l'activité fructane exohydrolase (FEH). Cependant, en dépit de son rôle majeur dans la pérennité du ray-grass anglais, les signaux métaboliques et les mécanismes à l'origine de la régulation de l'activité FEH sont encore inconnus.

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail de thèse étaient d'étudier les signaux métaboliques et les mécanismes de régulation à l'origine de l'augmentation de l'activité FEH après une défoliation chez le ray-grass anglais.

Ce travail a été décomposé en deux projets :

Le projet 1 a consisté à étudier, parmi les signaux susceptibles de contrôler le niveau de l'activité FEH chez le ray-grass anglais après une défoliation, le rôle des sucres solubles (glucose, fructose et saccharose). Nous avons vu dans l'analyse bibliographique que les sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) sont perçus comme des molécules « signal » régulant un certain nombre de processus cellulaires. Une étude récente rapporte que le saccharose est perçu comme une molécule « signal » modulant la synthèse des fructanes (Martinez Noël *et al.*, 2001). En ce qui concerne la dégradation des fructanes, des travaux réalisés chez le dactyle montrent qu'un apport exogène en sucres solubles peut également moduler l'activité FEH sans pour autant apporter la preuve expérimentale qu'ils soient perçus *per se* comme des molécules « signal » (Yamamoto et Mino, 1987).

Pour réaliser ce projet, nous avons mesuré l'activité FEH en réponse à des apports exogènes de sucres solubles mais également d'analogues structuraux de sucres solubles non métabolisables mais susceptibles d'être reconnus par les senseurs des signaux « sucre ». Les sucres et les analogues ont été apportés par pulvérisation sur des ray-grass anglais défoliés

afin de mimer au maximum le flux de photoassimilats disparu avec la coupe. Les résultats obtenus sont rédigés sous forme d'une publication scientifique et correspondent à l'article I de la partie RESULTATS.

Le projet 2 a consisté à rechercher les mécanismes à l'origine de la modulation de l'activité FEH et principalement d'étudier les possibilités d'une régulation transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle des FEHs en réponse à la défoliation. Les seules données que nous possédions chez le ray-grass anglais étaient que l'augmentation de l'activité FEH après la coupe n'est pas seulement due à la levée de l'inhibition des FEHs par la disparition du saccharose, mais que d'autres mécanismes de régulation (transcriptionnelle, traductionnelle et/ou post-traductionnelle) étaient mis en jeu. Chez d'autres espèces, des études rapportent que l'augmentation de l'activité FEH après la défoliation est liée à une augmentation de la synthèse *de novo* de protéines (dactyle) (Yamamoto et Mino, 1989) ou à une augmentation du niveau des transcrits (chicorée) (Van den Ende *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que de tels niveaux de régulation existent chez *Lolium perenne*.

Pour réaliser ce projet, nous avons dû développer au préalable les outils moléculaires nécessaires à cette étude. Il s'agit ici de cloner des ADNc codant des FEHs afin de suivre l'évolution du niveau des transcrits en réponse à la défoliation. Les ADNc codant des FEHs ont été obtenus grâce au criblage d'une banque d'ADNc produite à partir d'ARNm extraits de chaumes de ray-grass défoliés depuis 12 heures. Pour deux de ces ADNc, le criblage a été suivi par une caractérisation fonctionnelle des protéines recombinantes correspondantes, produites avec un système d'expression hétérologue, la levure *Pichia pastoris*. Cette étape de caractérisation est absolument nécessaire afin de déterminer si l'ADNc obtenu code une protéine à activité 1-FEH et/ou 6-FEH ou une invertase. En effet, à l'heure actuelle, l'analyse de la séquence nucléotidique ne permet pas de les différencier sans erreur. Les résultats obtenus sont rédigés sous forme de deux publications scientifiques et correspondent aux articles II et III de la partie RESULTATS.

Durant ma thèse, financée par une allocation de recherche MENRT, j'ai réalisé la majeure partie de ces travaux au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale,

Agronomie et nutriments NCS, dans l'équipe « Carbone-Défoliation » sous la direction d'Annette Morvan-Bertrand et de Marie Pascale Prud'homme. Pour développer le système d'expression hétérologue dans la levure *Pichia pastoris*, j'ai effectué plusieurs séjours au Laboratory for Molecular Plant Physiology de l'Université Catholique de Leuven (Belgique) sous la direction d'André Van Laere et Wim Van den Ende dans le cadre d'un programme bilatéral PAI Tournesol (Egide). Enfin, j'ai aussi travaillé en collaboration avec Philippe Barre (UGAPF, INRA de Lusignan) pour la cartographie du gène *Lp1-FEHa*.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Les résultats rapportés dans ce mémoire ont fait à ce jour l'objet de :

Trois articles en premier auteur (correspondant aux trois chapitres de résultats), dont un est publié et deux seront soumis prochainement :

Lothier J., Lasseur B., Miclot AS., Erntsen A., Prudhomme MP., Morvan-Bertrand A. Hexoses and sucrose-sensing mechanisms modulate fructan exohydrolase (FEH) activity but not sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) activity in defoliated perennial ryegrass.

Lothier J., Lasseur B., Le Roy K., Van Laere A., Prudhomme MP., Barre P., Van den Ende W., Morvan-Bertrand A., 2007. Cloning, gene mapping, and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* implicated in fructan synthesis rather than in fructan mobilization. *Journal of Experimental Botany* 58 : 1969-1983.

Lothier J., Lasseur B., Miclot AS., Erntsen A., Prudhomme MP., Morvan-Bertrand A. Cloning and functional analysis of a fructan 6-exohydrolase (6-FEH) from *Lolium perenne*. Post transcriptional mechanisms for regulation of FEH activity involved in fructan mobilization after defoliation in grass species?

Quatre posters présentés lors de congrès nationaux ou internationaux :

Lothier J., Miclot A-S., Ernsten A., Amiard V., Prud'homme MP., Morvan-Bertrand A. Regulation of fructan exohydrolase (FEH) activity by sugars in *Lolium perenne* after defoliation. 5th *International Fructan Symposium*, La Havane, Cuba, 5-9 Décembre 2004.

Lasseur B., Lothier J., Morvan-Bertrand A., Humphreys MO., Prud'homme MP. Is grazing tolerance of *Lolium perenne* related to fructan metabolism? 5th *International Fructan Symposium*, La Havane, Cuba, 5-9 Décembre 2004.

Lasseur B., Lothier J., Morvan-Bertrand A., Humphreys MO., Prud'homme MP. Varietal differences in perennial ryegrass for fructan metabolism and their relationship to grazing tolerance. XXth *International Grassland congress*. Dublin, Irlande, 26 Juin-1^{er} Juillet 2005.

Lothier J., Miclot A-S., Ernsten A., Amiard V., Prud'homme MP., Morvan-Bertrand A. Regulation of fructan exohydrolase (FEH) activity by sugars in *Lolium perenne* after defoliation. 6^{ème} *Colloque National de la Société Française de Biologie Végétale*, Arcachon, France, 27-29 Avril 2005.

Par ailleurs, mon travail de recherche réalisé au sein de l'UMR a permis de contribuer aux quatre articles suivants :

articles acceptés :

Lasseur B., Lothier J., Djoumad A., De Coninck B., Smeekens S., Van Laere A., Morvan-Bertrand A., Van Den Ende W., Prudhomme MP., 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 of Experimental Botany* 57: 2719-2734.

Lasseur B., Lothier J., Morvan-Bertrand A., Humphreys MO., Prudhomme MP., 2007. Impact of defoliation frequency on regrowth and carbohydrate metabolism in contrasting varieties of *Lolium perenne*. *Functional Plant Biology* 34: 418-430.

articles en cours de rédaction:

Lasseur B.*, Lothier J.*, Djoumad A., De Coninck B., Smeekens S., Van Laere A., Morvan-Bertrand A., Van Den Ende W., Prudhomme MP. 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.)

*les deux premiers auteurs ont contribué de façon égale au manuscrit

Meuriot F., Becel C., Decau ML., Lothier J., Avice JC. Morvan-Bertrand A., Escobar A., Simon JC., Gastal F., Prudhomme MP. Effect of remaining leaf area (RLA) after defoliation on fructan mobilisation and nitrogen uptake in *Lolium perenne*.

Et au chapitre d'ouvrage suivant :

Prudhomme MP., Morvan-Bertrand A., Lasseur B., Lothier J., Noiraud-Romy N., Meuriot F., Decau ML., 2007 *Lolium perenne*, backbone of sustainable development, source of fructans for grazing animals and potential source of novel enzymes for biotechnology. In Recent advances in Fructooligosaccharides Research. Editeurs: Shiomi N, Nouredine B, Shuichi O. Published by Reaserch Signpost, Kerala, India. p 231-258

RESULTATS

1. Article I: Hexoses and sucrose-sensing mechanisms modulate fructan exohydrolase (FEH) activity but not sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) activity in defoliated perennial ryegrass.

Authors:

Jérémy Lothier, Anne-Sophie Miclot, Marie-Pascale Prud'homme, Annette Morvan-Bertrand

Address:

UMR INRA-UCBN 950 EVA Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions NCS,
Université, Esplanade de la Paix, 14032 CAEN cedex, France

1.1 Résumé

La compréhension des mécanismes permettant à la plante de repousser après une coupe est essentielle pour améliorer la gestion des prairies. La défoliation réduit de manière drastique la surface foliaire photosynthétique et induit ainsi une carence en sucre qui peut fortement altérer l'expression génique. Afin de mieux comprendre la régulation du métabolisme des fructanes suite à la défoliation chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), les objectifs de ce travail étaient d'évaluer le rôle du saccharose et des hexoses comme molécules « signal » de la régulation des activités 1-SST et FEH dans les tissus laissés en place après la défoliation. Le rôle du signal « sucre » a été étudié à l'aide d'une approche originale *in planta* qui a consisté à pulvériser, sur des plantes défoliées (c'est-à-dire carencées en sucres), pendant 24 heures après la coupe, différentes solutions de sucres métabolisables (glucose, fructose et saccharose) et d'analogues structuraux (3-OMG, mannose, trehalose, lactulose, turanose and palatinose) pas ou peu métabolisables. L'application de saccharose et d'hexoses suite à la défoliation n'a pas abouti à la restauration de l'activité 1-SST. A l'inverse et comme attendu, l'application de saccharose et d'hexoses a conduit à la répression de l'augmentation de l'activité FEH. Le fait que l'activité FEH a été inhibée par le mannose mais pas par le 3-OMG indique que les hexoses sont perçus au niveau de l'hexokinase. Indépendamment des hexoses, le saccharose semble être perçu comme un signal car l'application de saccharose mais également d'analogues du saccharose peu métabolisables a conduit à la répression de l'augmentation de l'activité FEH. D'après nos résultats et la littérature, nous proposons un modèle de régulation du métabolisme des fructanes par les sucres dans les bases de feuille de ray-grass anglais. Le ray-grass anglais défolié pourrait ainsi constituer un modèle et l'activité FEH une cible appropriée pour l'étude de la privation en sucre et la signalétique « sucre » chez les plantes.

1.2 Abstract

To optimize grassland management, understanding of mechanisms that allow plants to grow after cutting or grazing is crucial. Defoliation reduces drastically the photosynthetic leaf area and thereby induces a sugar starvation which may greatly alter expression of genes. To better understand the regulation of fructan metabolism following defoliation in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), the objectives of this work were to evaluate the role of sucrose and hexoses as signaling molecules for the regulation of 1-SST and FEH activities in remaining leaf tissues after defoliation. To study the sugar sensing processes, we used an original approach in *planta* that consisted in spraying defoliated plants (i.e. sugar starved plants) during 24 hours after cutting with different solutions of metabolized sugars (glucose, fructose and sucrose) and sugar analogues (3-OMG, mannose, trehalose, lactulose, turanose and palatinose). Sucrose or hexose supply following defoliation did not lead to a restoration of 1-SST activity. Conversely and as expected, the supply of sucrose and hexoses led to a repression of FEH activity increase. The fact that FEH activity increase was inhibited by mannose but not 3-OMG indicates that hexoses acted via an hexokinase-mediated pathway. Concerning the dissacharide signaling mechanism, sucrose seems to be perceived as a signal since the supply of not only sucrose but also sucrose analogues led to a repression of FEH activity increase. According to our data and litterature, we propose a model for regulation of fructan metabolism by sugars in perennial ryegrass leaf bases. Moreover, the data presented here show that defoliated perennial ryegrass may be a useful plant model and FEH activity an adequate target for the study of sugar starvation sensing and signaling in plants.

Key words: fructan biosynthesis, fructan exohydrolase, sugar sensing and signaling defoliation, *Lolium perenne*.

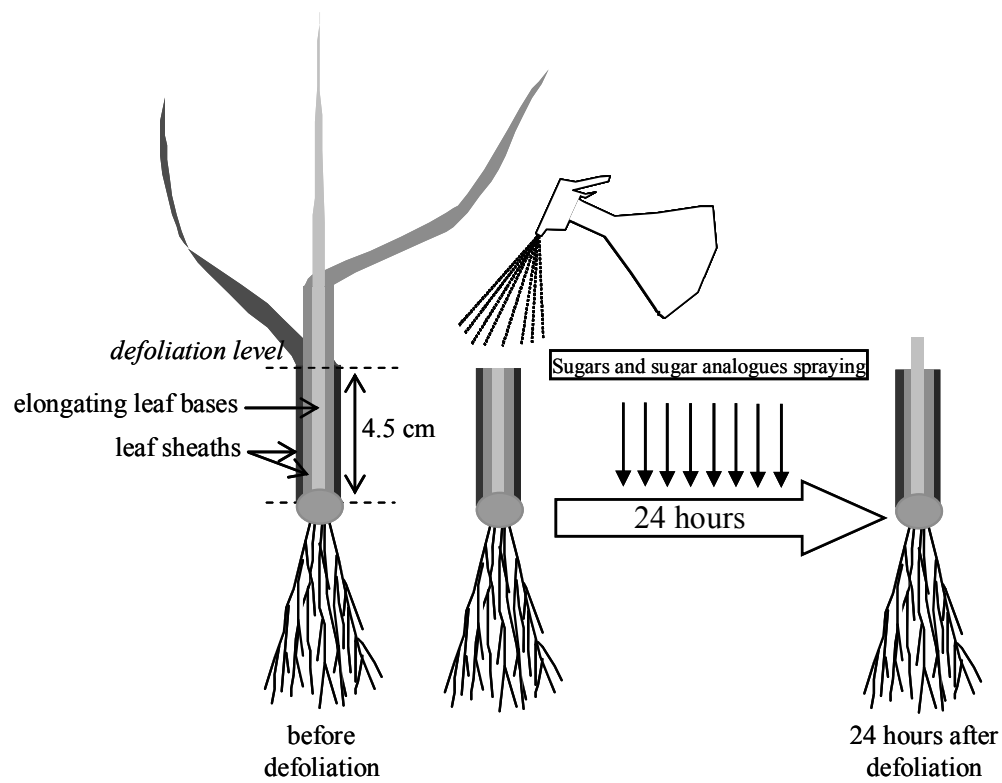


Figure 22: Schematic views of a *Lolium perenne* (perennial ryegrass) tiller before and 24 hours after defoliation.

1.3 Introduction

Like other forage plant species, perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is submitted to frequent defoliations which reduce the leaf area and thereby the supply of photosynthates to the leaf meristem. To optimize grassland management, understanding of mechanisms that allow plants to grow after cutting or grazing is crucial. In *Lolium perenne* several studies have reported that the growth of young leaf tissues after defoliation is highly dependent on carbohydrate reserve mobilization (Alberda, 1957; Davidson and Milthorpe, 1966; De Visser *et al.*, 1997; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999b). Fructans (oligo and polyfructosyl-sucrose) are the main carbohydrate reserve in a number of C3 grass species (Chatterton *et al.*, 1989). In ryegrass, fructans accumulate in the tiller base composed by mature leaf sheaths and elongating leaf bases (Pavis *et al.*, 2001a) (Figure 22).

Defoliation induces a decrease in fructan content in leaf sheaths (Volenc, 1986; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a) and it was recently demonstrated that fructose produced by fructan hydrolysis is used to synthesize sucrose which is exported to the leaf growth zone after defoliation (Amiard *et al.*, 2003b; Amiard *et al.*, 2004). Defoliation also induces an immediate and strong mobilization of fructans located in elongating leaf bases suggesting that fructans stored in the leaf growth zone also serve as a source of carbon to sustain re-foliation (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). In *Lolium perenne*, fructans are composed by β -(2,1) linked fructosyl residues (inulin and inulin neoseries) and β -(2,6) linked fructosyl residues (levan neoseries) (Pavis *et al.*, 2001b). In this species, three fructan biosynthetic enzymes were recently cloned and characterized, a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase named Lp1-SST (EC 2.4.1.99) (Chalmers *et al.*, 2003), a fructan:fructan 6G-fructosyltransferase named Lp6G-FFT having also a fructan:fructan 1-fructosyltransferase activity (Lasseur *et al.*, 2006) and a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (Lp6-SFT; Lasseur B, Lothier J, Morvan-Bertrand A., Prud'homme M-P, unpublished results). Together, they catalyse the production of inulin, inulin neoseries and levan neoseries from sucrose. Since *Lolium perenne* synthesized both β -(2,1) and β -(2,6) linked fructans, fructan breakdown in this species is supposed to occur by both fructan 1-exohydrolase (1-FEH) (EC 3.2.1.153) and fructan 6-exohydrolase (6-FEH) (EC 3.2.1.154) preferentially degrading β -(2,1) and β -(2,6) linked fructans, respectively (Van den Ende *et al.*, 2004). In *L. perenne* a 6-FEH has been purified to homogeneity (Marx *et al.*,

1997b), and a 1-FEH has been recently cloned and characterized (Lothier *et al.*, 2007). Other unidentified FEH isoforms probably exist and participate to the whole FEH activity. Indeed, in wheat, 6 different FEH isoforms have been characterized to date (Van den Ende *et al.*, 2003a; Kawakami *et al.*, 2005; Van den Ende *et al.*, 2005; Van Riet *et al.*, 2006).

Defoliation reduces drastically the photosynthetic leaf area and thereby induces a sugar starvation which may greatly alter expression of genes involved in several metabolic pathways (Koch, 1996). For instance, the expression of genes for rice α -amylase (Yu *et al.*, 1991; Sheu *et al.*, 1996), maize sucrose synthase (Koch *et al.*, 1992), cucumber malate synthase and isocitrate lyase (Graham *et al.*, 1994) and *Arabidopsis* vacuolar invertase (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998) is up-regulated during sugar starvation, while that of genes encoding the protein for storage of sucrose is down regulated (Koch, 1996). In perennial ryegrass, sugar starvation due to defoliation induces a fructan mobilization during the first hours of re-growth which is associated with a significant decrease of 1-SST and 6G-FFT activities and an uprise of total FEH activity (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a; Lasseur *et al.*, 2007). However, the signals that trigger and coordinate the regulation of these activities are still unknown. The decrease in sucrose and hexose levels which occurs during the first hours of re-growth in leaf tissues as well as in phloem sap (Amiard *et al.*, 2004) could be good candidates for such signals. Indeed, metabolites such as soluble sugars are now known to act as signaling molecules that modulate gene expression or enzyme activity (Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2006). The mechanisms used by cells to sense sugars have been extensively studied in yeast, animals and plants, and there is increasing evidence that sugar-sensing mechanisms are partly conserved in eukaryots (Rolland *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2006). Studies using mutants or non-metabolizable sugar analogues, or metabolic intermediates suggest that hexokinase and plasmalemma receptors are potential locations of input into the sugar signaling pathways (Lalonde *et al.*, 1999; Smeekens, 2000; Sheen *et al.*, 1999). Few data already suggest the existence of such sugar sensing mechanisms for fructan metabolism regulation in Poaceae. A recent study on excised barley leaf blades reported that the increase of 6-SFT activity as well as of 6-SFT mRNA level are induced by the supply of sucrose and trehalose, and authors suggest that the dissacharides are perceived as signaling molecules which initiate a chain of events until the nucleus (Müller *et al.*, 2000). In wheat, it has been shown that the induction of fructosyltransferase expression by sucrose implicates protein kinase and phosphatase activities as well as Ca^{2+} (Martinez Noël *et al.*, 2001; Martinez Noël *et al.*, 2006). Conversely, the increase of FEH activity following defoliation is

repressed by exogenous glucose, fructose and sucrose in orchardgrass (Yamamoto and Mino, 1987). These data support the idea that sugars act as signals controlling fructan metabolism in ryegrass leaves. Then, it can be argued that during the period of fructan biosynthesis, the high level of sugars in leaves acts as signal to up-regulate fructosyltransferase activities and repress FEH activities. Following defoliation, the decrease of soluble sugars would lead to a decrease of fructosyltransferase activities and a derepression of FEH activities.

In this context, to better understand the regulation of fructan metabolism following defoliation in grasses, the objectives of this work were to evaluate the role of sucrose and hexoses as signaling molecules for the regulation of 1-SST and FEH activities in the economically important species, *L. perenne*. A difficult point to assess the role of sugars in plant development is due to their dual roles as metabolites and signaling molecules. Non- or poorly metabolizable sugar analogues which can only act as signals are good tools to investigate sugar signaling. When used carefully, they allow the discrimination between the effects of sugar *per se* from the effect of metabolic products (Roitsch *et al.*, 1995; Pego *et al.*, 1999; Loreti *et al.*, 2000; Brouquisse *et al.*, 2001; Cortès *et al.*, 2003). In this study, to assess whether sugars are perceived as signals that up-regulate 1-SST activity and repress FEH activity, metabolizable sugars (glucose, fructose and sucrose) as well as non or poorly metabolizable hexose analogues (3-*O*-methylglucose -3OMG- and mannose) and dissaccharides analogues (lactulose, turanose, palatinose, trehalose) were sprayed on cut leaves during the first 24 hours following defoliation. 1-SST and FEH activities as well as sugar contents were then measured in leaf sheaths and in elongating leaf bases. The activity of another sugar metabolizing enzyme, the soluble acid invertase (INV) was also followed for comparison.

1.4 Materials and methods

1.4.1. Plant material

Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Bravo) were grown for nine weeks in a greenhouse with a photoperiod of 16 h natural light supplemented by a photosynthetic photon flux density of 110 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Phyto tubes, Claude, GTE, Puteaux, France). The thermoperiod was 22 °C (day) and 18 °C (night). Seeds were germinated on water and

transferred on nutrient solution in 9.0 L polyvinyl chloride pots (fifteen plants per pots) after 2 weeks. Nutrient solution, previously described by Gonzalez *et al.* (1989), was aerated continuously and replaced every week.

1.4.2. Experimental procedure, treatments and harvest

Two separate experiments were carried out successively using seven pots (fifteen plants per pot) for each. The treatments began when plants were nine week-old. All plants were defoliated at 9:00 AM (3 h after light on) at 4.5 cm aboveground and one pot was harvested as a “before treatment” control. For experiment I, the six staying pots were treated separately but simultaneously with the following solutions all including 0.1 % (V:V) Tween 20 : water “control pot”, 200 mM mannitol (Sigma, St-Louis, MO, USA), 200 mM glucose (Sigma), 200 mM fructose (Sigma), 200 mM 3-*O*-methylglucose (3-OMG, Acros organics, Geel, Belgium), 200 mM mannose or 13.3 mM mannose (Acros organics). For experiment II, the six staying pots were treated separately but simultaneously with the following solutions all including 0.1 % (V:V) Tween 20 : water “control pot”, 100 mM sucrose (Sigma), 100 mM palatinose (Glc[1,6]Fru) (Sigma), 100 mM trehalose (Glc[1,1]Glc) (Acros organics), 100 mM lactulose (β -Gal[1,4]Fru) (Acros organics) or 100 mM turanose (Glc[1,3]Fru) (Acros organics). These treatments were applied by spraying 24 times 25 mL of each solution (i.e. 600 mL) every 30 min from 9:00 AM to 2:00 PM, every hour from 02:00 PM to 12 PM and at 01:30 AM, 04:00 AM and 06:00 AM. After 24 hours of regrowth (09:00 AM, day 1) every pots were harvested. Stubble of each plant was divided into leaf sheaths and elongating leaf bases (Figure 22). One part of the harvested tissues was used immediately for enzyme extraction, whereas the remainder was freeze-dried for water soluble carbohydrate (WSC) extraction.

1.4.3. Extraction and analysis of WSC

Fifty milligrams (leaf sheaths) or 25 mg (elongating leaf bases) of freeze dried plant tissue, ground to a fine powder, was placed in a 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 or sorbitol (for samples from mannitol treated plants). 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 centrifuge 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 polyvinylpolypyrrolidone (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 sorbitol (for plants treated with mannitol) or mannitol (for the other treatments) as internal standard and a refractometer as a sugar detector. Palatinose and turanose were analyzed HPAEC-PAD (DX-300, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) on an analytical CarboPac PA100 column (4 X 250 mm) eluted at room temperature with sodium acetate (25 mM) in 150 mM NaOH (1 mL min^{-1}). Trehalose, 3-OMG and mannose co-elute on cation exchange HPLC with sucrose, glucose and fructose, respectively. For this reason they were quantified indirectly by subtracting sucrose, glucose or fructose levels obtained by enzymatic assays from levels of mixed sugars obtained by HPLC. In extracts from trehalose treated plants, enzymatic analysis of sucrose was carried out by mixing V μL of desalted extract, (40-V) μL of water and 750 μL of enzymatic reagent (0.004 U μL^{-1} of Phosphoglucomutase from Roche diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany ; 0.0013 U μL^{-1} of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Roche diagnostics in 10 mM KH_2PO_4 , pH 7 buffer) in a polystyrene cuvette. After mixing, absorbance at 340 nm (A1) was determined and 3 μL of 0.026 U μL^{-1} of Sucrose Phosphorylase diluted in 3.2 M ammonium sulphate were added. After 90 min of incubation at room temperature, NADH, H^+ release was followed by measuring absorbance at 340 nm (A2). Sucrose concentration was calculated from A2-A1 subtraction which should be between 0.2 and 0.7. Sucrose concentration (g L^{-1}) is $((\text{A2}-\text{A1})/6.23) * (793/ V \mu\text{L}) * 342/1000$. In tissues from 3-OMG treated plants, enzymatic analysis of glucose was carried out by mixing 1 mL of Trinder reagent (mixture of Glucose oxidase, Peroxidase and 4- aminoantipyrine ; Sigma, Saint-Louis, MO, USA) and 50 μL of desalted extract in a polystyrene cuvette. After 15 min at room temperature, absorbance at 505

nm is measured and glucose level was calculated by comparison with a glucose standard. In tissues from mannose treated plants, enzymatic analysis of fructose was carried out by mixing V μL of desalted extract, $(500-V)$ μL water and 500 μL of imidazole buffer (206 mM imidazole, 10 mM MgCl_2 , 0.4 mg mL^{-1} bovin serum albumin, 1.45 mM ATP, 0.81 mM NADP, pH 7.5) in polystyrene cuvette. Absorbance at 340 nm (A_1) was measured before adding 2 μL of enzyme mixture (51 U mL^{-1} of hexokinase from Roche diagnostics and 25.5 U mL^{-1} of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Roche diagnostics diluted in 3.2 M ammonium sulphate. After 45 min at room temperature, release of NADPH, H^+ was determined by measuring absorbance at 340 nm (A_2). Two μL of 105 U mL^{-1} of phosphoglucose Isomerase diluted in 3.2 M ammonium sulphate were added and absorbance at 340 nm (A_3) was measured after 45 min at room temperature. Fructose level (mmole L^{-1}) is calculated from (A_3-A_2) which should be between 0.1 and 0.4 and is equal to $((A_3-A_2)*100*4)/(6.22*V)$.

1.4.4. Measurement of enzyme activities

Plant tissue (2 g FW leaf sheaths, 1 g FW elongating leaf bases) was ground at a ratio of 1 mL (g FW) $^{-1}$ in 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 5.5) at 4°C containing 5 mM dithiothreitol (DTT). The homogenate was centrifuged at 20,000 g for 10 min. An aliquot of the crude extract was desalted on Sephadex G50, which also removed sucrose from the extract. This is of particular importance for assay of fructan exohydrolase (FEH) activity since inhibition of *in vitro* FEH activity by sucrose has been reported for a range of species including *L. perenne* (Simpson et Bonnett, 1993; Marx *et al.*, 1997b; Lothier *et al.*, 2007). The assay mixture consisted of 100 μL of enzyme extract and 100 μL of substrate. For measurement of FEH activity, high-molecular-weight fructan (8 mg mL^{-1}) extracted from *L. perenne* (Morvan *et al.*, 1997) was used as substrate. For sucrose: sucrose 1-fructosyl-transferase (1-SST) and soluble acid invertase (INV) activity assays, 100 mM sucrose was used as substrate. Triplicate samples were run together with duplicate enzyme blanks (no substrate). After incubation at 30°C for 2 h (1-SST and INV activities) or 4 h (FEH activity), 100 μL mannitol or sorbitol (1g L^{-1}) was added to the assay mixture and the reaction was stopped by boiling for 5 min. The samples were stored at -20 °C until further processing. For 1-SST and INV assay, samples of 100 μL were desalted by using a minicolumns filled with ion exchange resins, as described for WSC analysis. To determine 1-SST and INV activities,

1-kestotriose and fructose in the assay mixture were quantified by HPLC on the Sugar-PAK column under the conditions defined above for WSC analysis. For FEH assay, fructose released was measured enzymatically as above for WSC analysis. SST activity was defined as the amount of 1-kestotriose formed in this assay per unit of time per g fresh tissue. INV and FEH activities were defined as the amount of fructose released from sucrose or from high-molecular-weight fructan solution per unit of time per g fresh tissue.

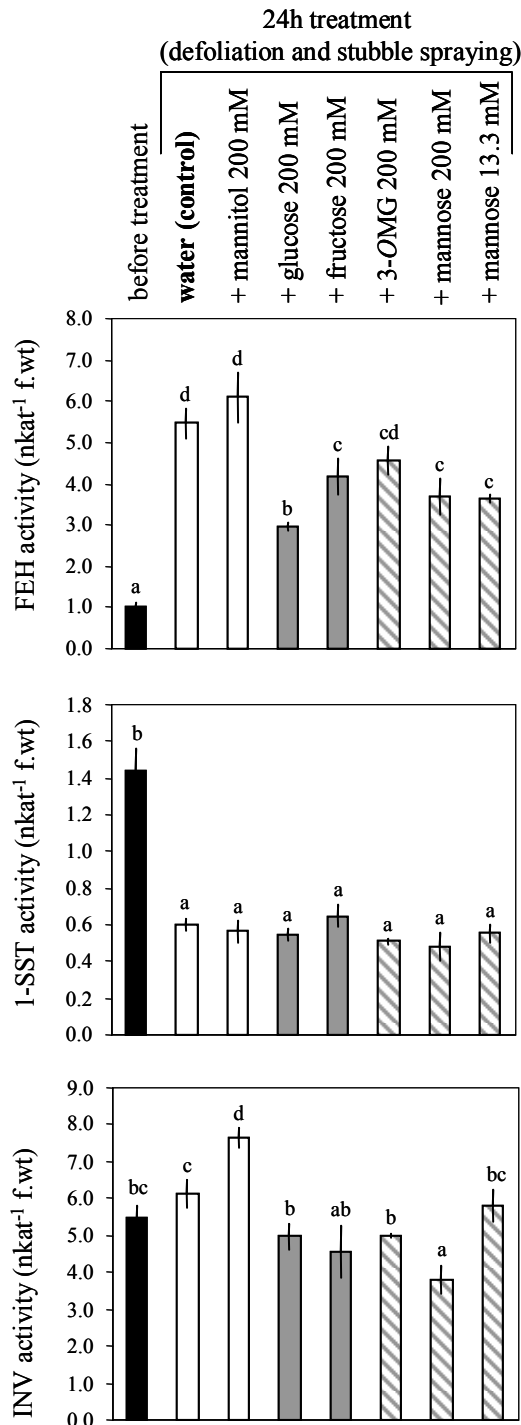
1.4.5. Statistical analysis

The resulting variation in measurements were expressed as the mean $\pm$ SD for $n=3$. Statistical analyses were performed using the Minitab 13.20 Statistical Software. After checking the normality of the data (Anderson-Darling test, 95%) and the equality of variances (Bartlett test, 95%), treatment effect was tested by ANOVA (GLM) and the significance of differences was estimated using the Tukey test (95%).

1.5 Results

To evaluate the role of sucrose and hexoses as signaling molecules for the modulation of 1-SST and FEH activities after defoliation in *L. perenne*, sugars and non or poorly metabolizable analogues have been provided to 8 week-old plants which were defoliated at 4.5 cm above the ground level (Figure 22). If sucrose or hexoses act as signaling molecules, the supply of sugars but also of non metabolizable sugars is supposed to mimic control condition before defoliation and to avoid changes in FEH and 1-SST activities. Thus, the defoliated plants were sprayed during 24 hours after defoliation with different solutions of metabolized sugars (glucose, fructose and sucrose) and sugar analogues (3-OMG, mannose, trehalose, lactulose, turanose and palatinose) at 200 mM for monosaccharides and 100 mM for dissaccharides. Mannose was also supplied at 13.3 mM to distinguish its possible toxic effects by sequestering phosphate (Brouquisse *et al.*, 2001) from signaling effects. Enzyme activities (FEH, 1-SST, INV) were measured in the remaining leaf tissues, i.e. elongating leaf bases and leaf sheaths, at the time of defoliation (before treatment) and after 24 hours of regrowth.

elongating leaf bases



leaf sheaths

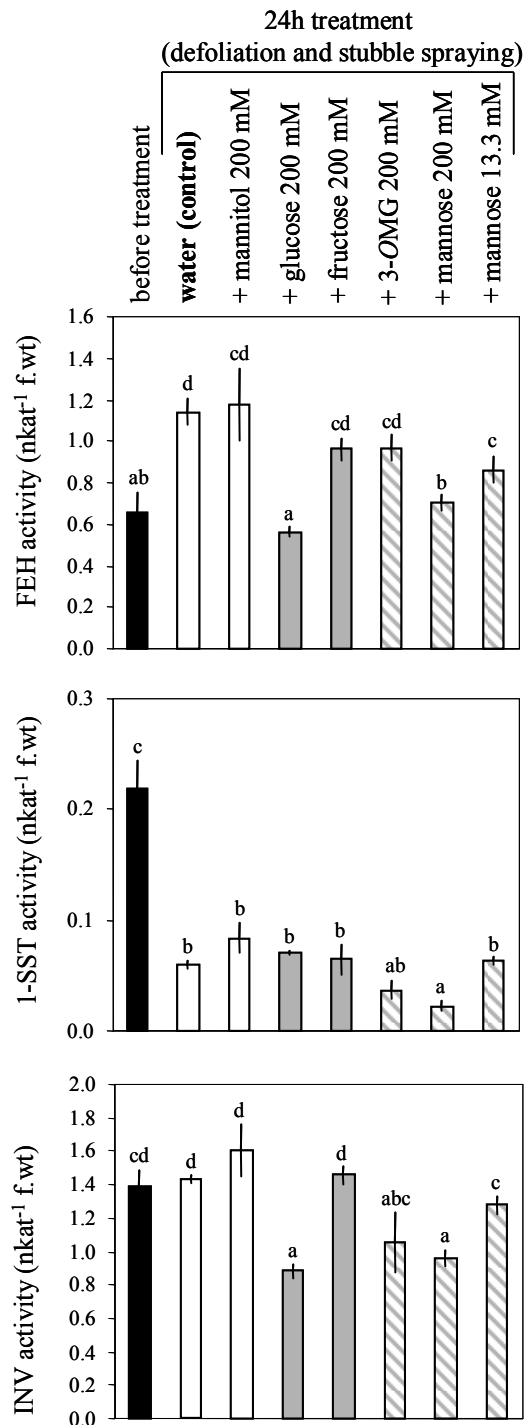


Figure 23: 1-SST and FEH activities (nkat g⁻¹ f.wt) in elongating leaf bases and leaf sheaths of perennial ryegrass plants treated with hexose and hexose analogues. Plants harvested before treatment are symbolized by black bars. Plants defoliated and treated with water or mannitol are symbolized by open bars. Plants defoliated and treated with metabolized hexose (glucose and fructose) are symbolized by gray bars. Plants defoliated and treated with hexose analogues (3-OMG and mannose) are symbolized by hatched gray bars. Values are means of three replicates. Vertical bars indicate $\pm$ SE when larger than the symbol. Different letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$) (Tukey test).

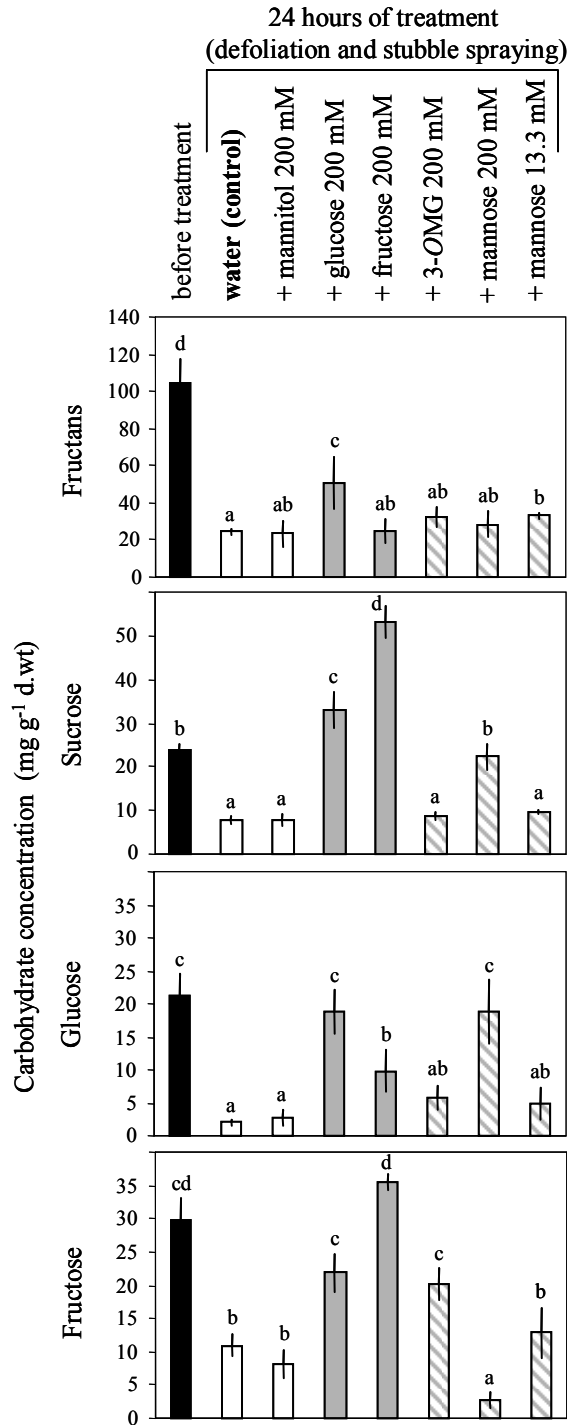
Two distinct experiments were conducted. The first experiment was for hexoses (glucose and fructose) and corresponding analogues (3-OMG and mannose). The effect of mannose, which is phosphorylated by hexokinase but not further metabolized is considered to be indicative of the involvement of hexokinase signaling pathway (Roitsch *et al.*, 1995; Umemura *et al.*, 1998). 3-OMG is a poor substrate for hexokinase, and its effect indicates a hexokinase-independent signaling pathway (Cortès *et al.*, 2003). The second experiment, was for sucrose and sucrose analogues (trehalose, lactulose, turanose and palatinose). The effects of lactulose, turanose and palatinose, which are non- or poorly transported and non- or poorly metabolizable by plants are considered to be indicative of the involvement of a disaccharide signaling pathway, independent of the hexose signaling pathway (Schmitt *et al.*, 1984; M'Batchi and Delrot, 1988; Li *et al.*, 1994; Loreti *et al.*, 2000; Fernie *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2002). For trehalose, the case is different since it is now known to be required and probably universal, playing a central role in regulating carbon use for growth (Eastmond *et al.*, 2002; Schluepmann *et al.*, 2003). Indeed, it is thought that a key role is played by the metabolite trehalose-6-phosphate (T-6-P) (Schluepmann *et al.*, 2003; Schluepmann *et al.*, 2004; Kolbe *et al.*, 2005) which should be implicated in the sugar signaling pathway (Avonce *et al.*, 2004).

Mannitol was used in the first experiment to know whether the osmotic shock causes changes in enzyme activities and sugar levels. Moreover, for both experiments, internal carbohydrate levels (fructans, sucrose, glucose and fructose) were measured in both leaf tissues to determine the impact of treatments on sugar metabolism and to distinguish between direct effects of sugar analogues and possible indirect effects attributable to changes in internal carbohydrate levels.

1.5.1. Effects of hexoses and hexose analogues on 1-SST, FEH and INV activities after defoliation.

As expected, 1-SST activity decreased after defoliation by 60 and 70% in elongating leaf bases and in leaf sheaths, respectively (Figure 23). Sugar supply was supposed to avoid the decrease of 1-SST activity. However, this was not the case. Instead mannose at 200 mM did not inhibit but enhance the decrease of 1-SST activity in leaf sheaths. The fact that 1-SST activity could not be restored by sugar supply suggests that 1-SST activity is not regulated by hexose signals after defoliation. Conversely to 1-SST and as expected, the level of FEH

elongating leaf bases



leaf sheaths

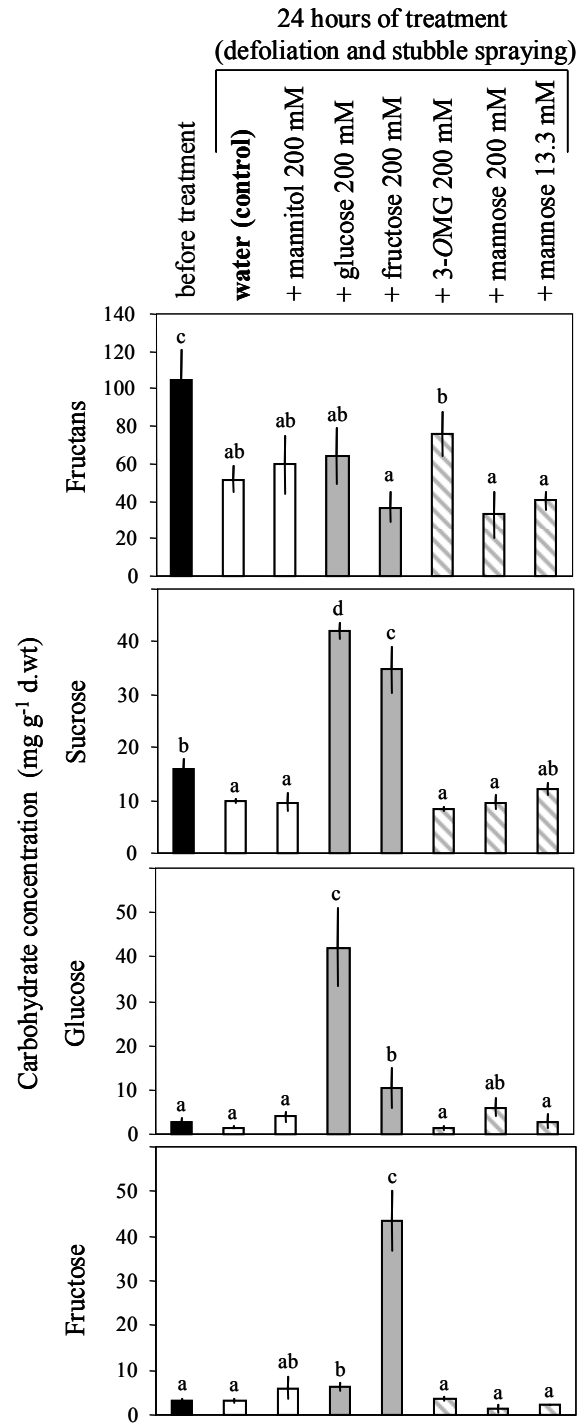


Figure 24: Concentration of fructans, sucrose, glucose and fructose ($\text{mg g}^{-1} \text{ d.wt}$) in elongating leaf bases and leaf sheaths of perennial ryegrass plants treated with hexose and hexose analogues. Plants harvested before treatment are symbolized by black bars. Plants defoliated and treated with water or mannitol are symbolized by open bars. Plants defoliated and treated with metabolized hexose (glucose and fructose) are symbolized by gray bars. Plants defoliated and treated with hexose analogues (3-OMG and mannose) are symbolized by hatched gray bars. Values are means of three replicates. Vertical bars indicate $\pm$ SE when larger than the symbol. Different letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$) (Tukey test).

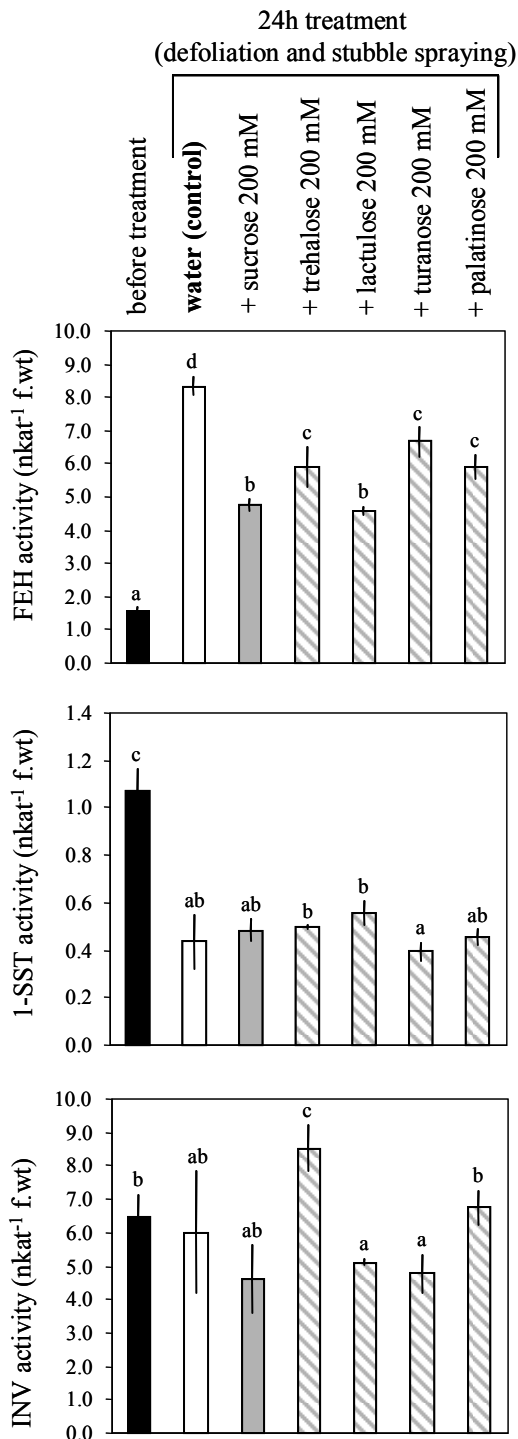
activity increased within 24 hours after defoliation by 1.8 fold in leaf sheaths and 5.5 fold in elongating leaf bases (Figure 23). No inhibition of FEH activity increase was observed in mannitol fed plants, indicating that FEH activity did not respond to changes in osmotic pressure. Glucose supply resulted in a partial inhibition of FEH activity increase in elongating leaf bases and a total inhibition in leaf sheaths. By contrast with glucose, fructose supply had only a weak inhibitory effect on FEH activity increase in elongating leaf bases and no effect in leaf sheaths. 3-OMG, which is taken up by cells but is a poor substrate for hexokinase (Cortès *et al.*, 2003) had no significant effect on FEH activity. Interestingly, external feeding of mannose (taken up and phosphorylated by hexokinase but not or poorly metabolized thereafter; Roitsch *et al.*, 1995; Umemura *et al.*, 1998) induced a significant reduction of the increase of FEH activity both at 200 and 13.3 mM.

Soluble acid invertase (INV) activity was not significantly affected by defoliation in both leaf tissues (Figure 23). The supply of mannitol induced a small but significant increase of INV activity in both tissues compared with control plants sprayed with water. Exogenously provided glucose, fructose, 3-OMG or mannose at 13.3 mM had no effect on INV activity indicating that sugars do not act as signals to modulate INV activity in *Lolium* leaves after defoliation. Mannose sprayed at 200 mM induced a small decrease of INV activity in elongating leaf bases.

1.5.2. Effects of hexoses and hexose analogues on sucrose, glucose and fructose levels after defoliation.

Since glucose and fructose are rapidly interconverted and incorporated in sucrose and fructans in *Lolium perenne* leaves (Amiard *et al.*, 2003b), the repression of FEH activity increase triggered by glucose or fructose feeding could therefore be attributed to hexoses, sucrose or both. Moreover, even if mannose is not metabolized, the response to mannose supply could be attributable to mannose *per se* or to indirect effects due to changes of internal glucose, fructose or sucrose levels. Thus, to evaluate the effect of hexose supply on sugar metabolism, carbohydrate contents of remaining leaf tissues were determined before defoliation and 24 hours after treatments (Figure 24). In elongating leaf bases, glucose and fructose contents decreased in control plants while the supply of glucose and fructose strongly increased glucose and fructose levels and also sucrose levels. In leaf sheaths, defoliation did

elongating leaf bases



leaf sheaths

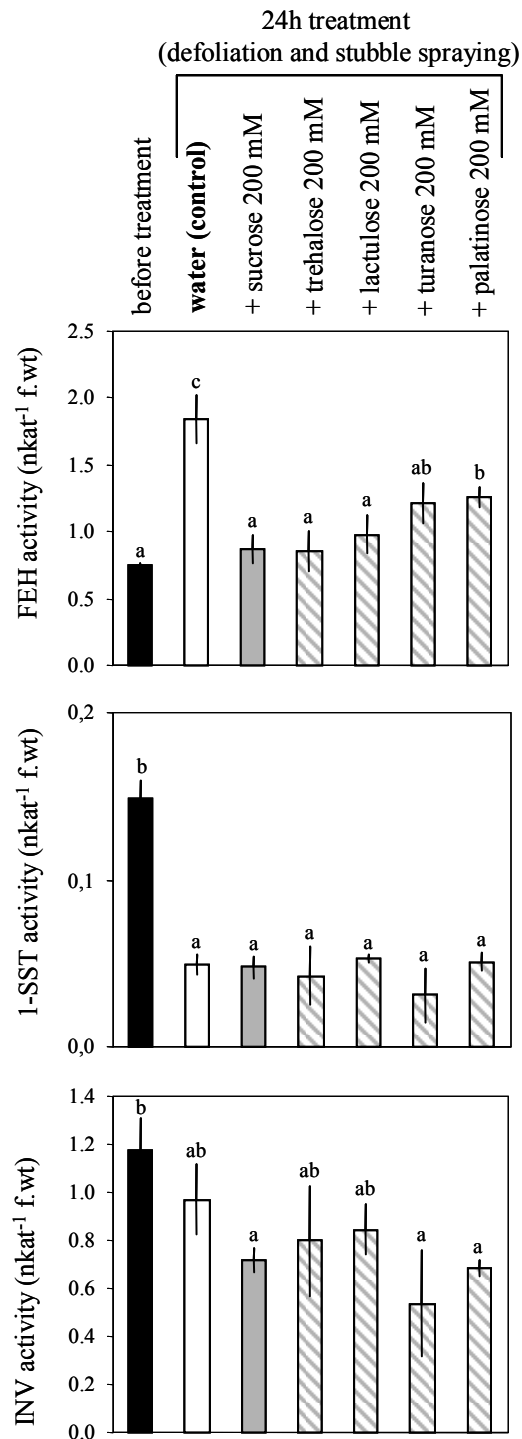


Figure 25: 1-SST and FEH activities (nkat g⁻¹ f.wt) in elongating leaf bases and leaf sheaths of perennial ryegrass plants treated with sucrose and sucrose analogues. Plants harvested before treatment are symbolized by black bars. Plants defoliated and treated with water are symbolized by open bars. Plants defoliated and treated with sucrose are symbolized by gray bars. Plants defoliated and treated with sucrose analogues (trehalose, lactulose, turanose and palatinose) are symbolized by hatched gray bars. Values are means of three replicates. Vertical bars indicate $\pm$ SE when larger than the symbol. Different letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$) (Tukey test).

not alter glucose and fructose levels and, as in elongating leaf bases, supply of glucose and fructose strongly increased glucose, fructose and sucrose levels. The supply of 3-OMG, which had no significant effect on FEH activity did not alter glucose and sucrose levels compared with control plants and partially inhibited the decrease of fructose level in elongating leaf bases. Interestingly, mannose at 13.3 mM, which led to a significant inhibition of FEH activity increase (Figure 24), had no significant effect on glucose, fructose and sucrose levels, compared to control plants treated with water (Figure 24). Thus, glucose, fructose and sucrose levels in mannose treated plants were much lower than in glucose or fructose treated plants indicating that mannose acted *per se* and not *via* a modulation of internal sugar levels.

1.5.3. Effects of sucrose and dissacharide analogues on 1-SST, 1-FEH and INV activities after defoliation.

Beside hexoses, sucrose may also act as a signaling molecule in plants and can regulate specific responses that are not necessarily affected by hexoses (Rolland *et al.*, 2006). Thus, in a second experiment we investigated the role of sucrose *per se* as a signal. We tested several non- or poorly metabolized disaccharides (turanose, palatinose, trehalose, lactulose) for their ability to modulate 1-SST or FEH activity.

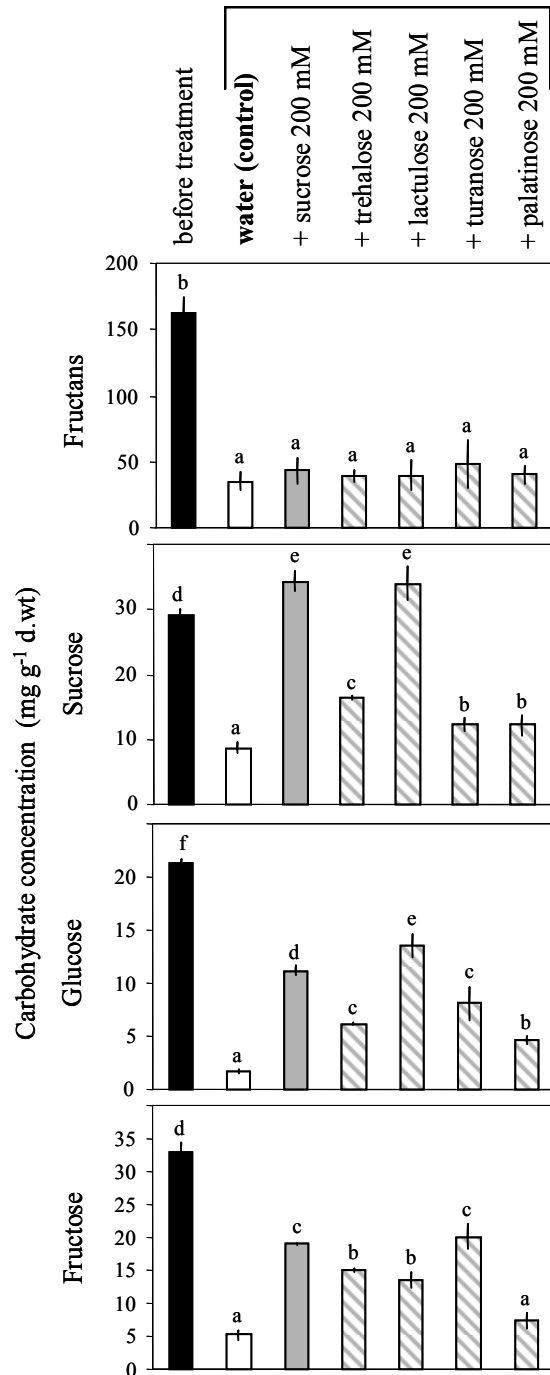
As for hexoses, sucrose and analogues had no effect on 1-SST and INV activities in both leaf tissues. By contrast, sucrose feeding led to a partial inhibition of the increase of FEH activity in elongating leaf bases and a total inhibition of the increase in leaf sheaths. Moreover, the same inhibition of FEH activity increase was obtained with the four sucrose analogues tested (Figure 25), indicating the existence of a dissacharide sensing mechanism.

1.5.4. Effects of sucrose and dissacharide analogues on sucrose, glucose and fructose levels after defoliation.

Since sucrose analogues have been shown to be sometimes metabolized (Loreti *et al.*, 2000), their effects could be indirect and result rather from modifications of internal sugar levels than from direct effects of dissacharides *per se*. To determine whether the sugar levels were affected by sucrose analogues, carbohydrate contents of remaining leaf tissues were determined before defoliation and 24 hours after treatments (Figure 26).

elongating leaf bases

24 hours of treatment
(defoliation and stubble spraying)



leaf sheaths

24 hours of treatment
(defoliation and stubble spraying)

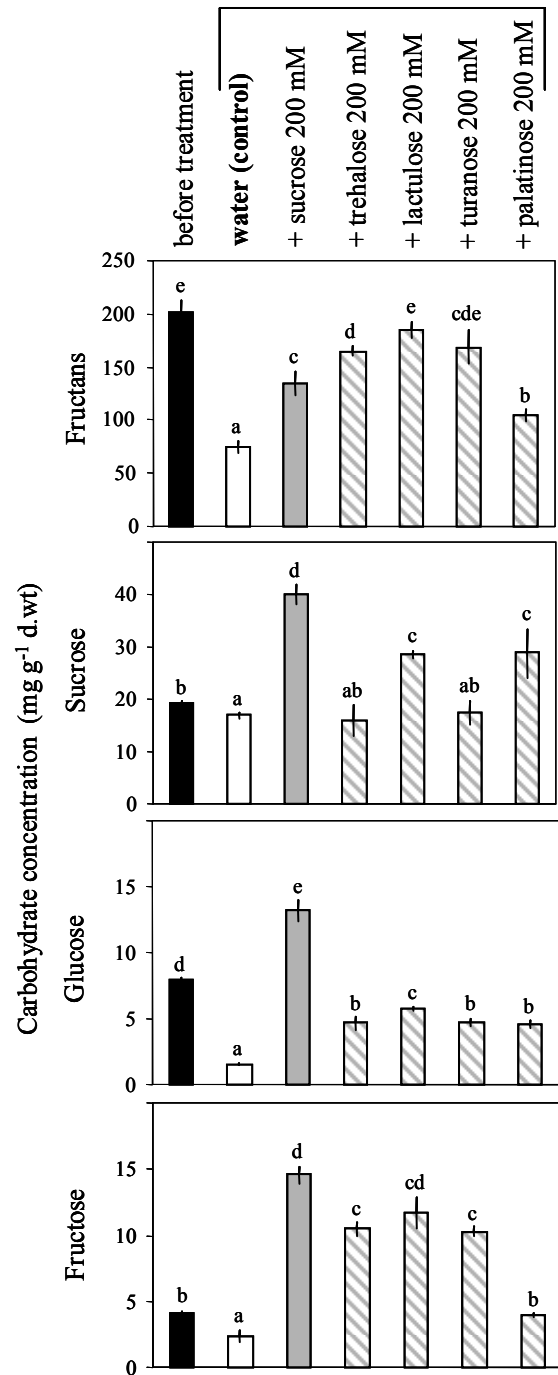


Figure 26: Concentration of fructans, sucrose, glucose and fructose (mg g^{-1} d.wt) in elongating leaf bases and leaf sheaths of perennial ryegrass plants treated with sucrose and sucrose analogues. Plants harvested before treatment are symbolized by black bars. Plants defoliated and treated with water are symbolized by open bars. Plants defoliated and treated with sucrose are symbolized by gray bars. Plants defoliated and treated with sucrose analogues (trehalose, lactulose, turanose and palatinose) are symbolized by hatched gray bars. Values are means of three replicates. Vertical bars indicate $\pm$ SE when larger than the symbol. Different letters above bars indicate significant differences ($P < 0.05$) (Tukey test).

Sucrose level decreased after defoliation in elongating leaf bases of control plants and this decrease was totally avoided by the supply of sucrose and also lactulose (Figure 26). Sucrose depletion was also slightly reduced by the supply of trehalose. By contrast, turanose and palatinose did not alter sucrose level compare to control plants. In leaf sheaths, defoliation did not alter significantly sucrose level in plant treated with water. Sucrose accumulated in leaf sheaths of plants fed with sucrose and to a lesser extent in plants fed with lactulose and palatinose. By contrast, trehalose and turanose did not affect sucrose level in leaf sheaths compare to control plants (Figure 26). This indicates that sucrose analogues led to important modifications of internal sucrose level in elongating leaf bases and/or in leaf sheaths, suggesting that they have been metabolized or that they have modified carbon partitioning by acting as signal for other enzymes of carbohydrate metabolism. Indeed, the supply of sucrose analogues also modified the level of glucose and fructose which were then higher in treated plants than in control plants except for plants treated with palatinose (Figure 26). Thus, the effect of sucrose, trehalose, lactulose and turanose on FEH activity could be due to modification of hexose level and not to dissacharide signaling.

However, in plants treated with palatinose, the levels of glucose and fructose were only slightly modified by sugar supply and were very close to those of control plants treated with water or mannitol (Figure 26). Indeed, in elongating leaf bases, glucose and fructose levels dropped during the first day of regrowth in control plants and this decrease was only slightly inhibited by the supply of palatinose (Figure 26). These contents were not very different than those measured after mannitol feeding, which were 2.32 ± 0.64 and 7.98 ± 2.07 mg g⁻¹d.wt., respectively (Figure 24). Similarly, in leaf sheaths, glucose and fructose contents also decreased after defoliation in water treated plants and palatinose supply led to a partial inhibition of glucose decrease and a total inhibition of fructose decrease. In those plants treated with palatinose, glucose and fructose contents in leaf sheaths after 24 hours of treatments were 4.51 ± 0.31 and 3.95 ± 0.08 mg g⁻¹d.wt., respectively (Figure 26). These contents were not very different to glucose and fructose levels measured after mannitol feeding, which were 3.29 ± 0.28 and 5.66 ± 1.48 mg g⁻¹d.wt., respectively (Figure 24). Thus, in both leaf tissues, since mannitol did not induce any changes in FEH activity (Figure 23), palatinose effect could not be attributed to the small changes in glucose and fructose levels (Figure 23) and was more probably attributable to a dissacharide sensing mechanism.

1.5.5. Effects of sugar supply on fructan levels after defoliation.

As expected, defoliation induced a strong decrease in fructan content, by 80% in elongating leaf bases and 50 % in leaf sheaths, in water treated control plants. In elongating leaf bases, neither of the sugars supplied excepted glucose led to the inhibition of fructan mobilisation (Figure 24 and Figure 26). This result indicates that the partial inhibition of FEH activity increase is not strong enough to avoid fructan mobilisation. Conversely, fructan mobilisation observed in leaf sheaths of control plant treated with water was partially inhibited by the supply of sucrose and also of sucrose analogues (Figure 26). This partial inhibition could be attributable to the partial inhibition of FEH activity increase.

1.6 Discussion

Sucrose is closely linked to the regulation of fructan metabolism. Increase of fructan biosynthesis activity is observed when sucrose level is high (Labhart *et al.*, 1983; Wagner *et al.*, 1986; Cairns and Pollock, 1988; Smouter and Simpson, 1991a, 1991b). In Poaceae, activation of the fructan biosynthesis enzymes (1-SST or 6-SFT) is due to the increase of corresponding gene expression (Nagaraj *et al.*, 2004). Recently, a study reported that sucrose *per se* can regulate 6-SFT gene expression (Müller *et al.*, 2000). Thus, in barley, sucrose would be perceived as a signaling molecule which initiates a chain of events until the nucleus, involving protein kinase, protein phosphatase and Ca^{2+} (Martinez Noël *et al.*, 2001; Martinez Noël *et al.*, 2006). The fact that FEH activity increases when sucrose or hexose levels are low suggest that sugars could inhibit FEH activity, not only by direct inhibition of the protein (Marx *et al.*, 1997), but also maybe *via* a sugar signaling mechanism. In this study, we evaluate the role of sucrose and hexoses as signaling molecules for the up-regulation of 1-SST activity and repression of FEH activity in a grassland Poaceae, *L. perenne*. To study the sugar sensing processes that may modulate 1-SST and FEH activities, we used an original approach *in planta* that consisted in spraying defoliated plants (i.e. sugar starved plants) during 24 hours after cutting with different solutions of metabolized sugars (glucose, fructose and sucrose) and sugar analogues (3-OMG, mannose, trehalose, lactulose, turanose and palatinose) (Figure 22). Mannose was supplied at 200 or 13.3 mM to distinguish the possible toxic effects of mannose by sequestering phosphate (Brouquisse *et al.*, 2001). Sugar spraying

was supposed to mimic sugar supply from leaf blades or from top of elongating leaves before defoliation.

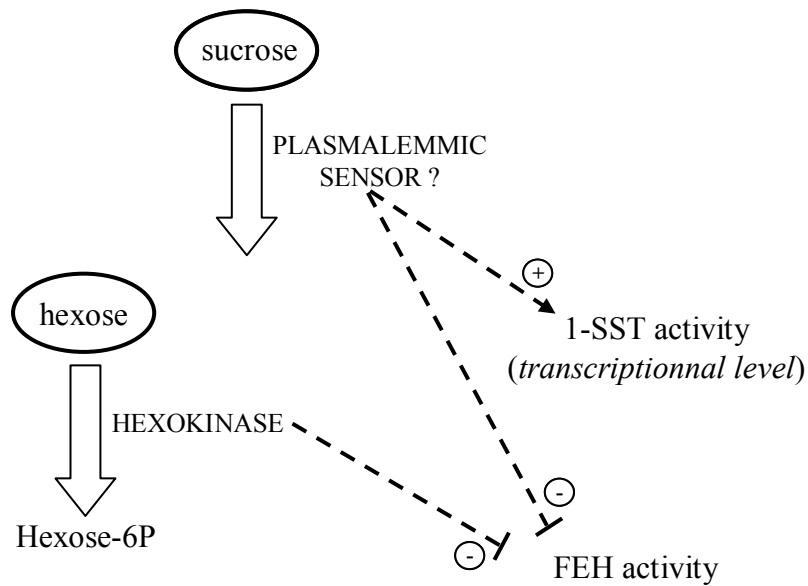
Concerning fructan synthesis, it is known that defoliation induces a decrease of 1-SST activity together with a decrease of 1-SST transcript level (Lasseur *et al.*, 2007; Lothier *et al.*, 2007). The supply of exogenous sugars on leaves after defoliation was supposed to allow maintaining 1-SST activity, presumably by maintaining 1-SST gene transcription. However, although it has been shown that sucrose accumulation can lead to an induction of 1-SST gene expression (Lasseur *et al.*, 2006), our data indicated that sucrose or hexose supply following defoliation does not lead to a restoration of 1-SST activity. This could be explained by the fact that sucrose supply did not allow reaching the threshold of sucrose level above which 1-SST expression is induced. Sucrose level patterns are not in favour to this hypothesis since in plants treated with sucrose, sucrose levels 24h after defoliation were equal or twice that of undefoliated plants in leaf sheaths and elongating leaf bases, respectively. However it is possible that sucrose fluxes or levels in particular cells or tissues were below the threshold inducing 1-SST expression. But most probably an unknown signal induced by defoliation would block the sucrose signaling and repress 1-SST gene expression following defoliation in both leaf tissues despite the high level of sucrose in sugar fed plants. This unknown signal could be nitrate or ABA since they have been shown to be negative signals of fructan synthesis (Morcuende *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Ruuska *et al.*, 2007). All together, this is consistent with the idea that fructan synthesis may be controlled by various signaling pathways not only by the sugar status, but also by other nutrients or by hormones.

Concerning fructan breakdown, our results show that, as expected, FEH activity increase is inhibited by soluble sugars since supply of hexoses and sucrose on defoliated ryegrass led to a repression of FEH activity increase in both leaf tissues, elongating leaf bases and leaf sheaths. A former study has already shown this effect in orchardgrass following defoliation (Yamamoto and Mino, 1987) but the distinction between metabolic and signaling effects of sugars were not investigated. Our data suggest that FEH activity is under control of sugar signaling *per se* since supply of non-metabolizable sugar analogues also represses FEH activity following defoliation. The fact that FEH activity increase is inhibited by the presence of mannose (taken up and phosphorylated by hexokinase but not or poorly metabolized thereafter) (Roitsch *et al.*, 1995; Umemura *et al.*, 1998) but not by 3-OMG which is taken up by cells but is a poor substrate for hexokinase) (Cortès *et al.*, 2003), indicates that hexoses act

via an hexokinase-mediated pathway in which hexokinase probably acts as a sensor (Moore *et al.*, 2003). Indeed, since 3-OMG supply had no effect on FEH activity, hexoses are most probably not perceived by a plasmalemma receptor. Concerning dissacharide signaling mechanism, sucrose seems to be also perceived as a signal since not only sucrose but sucrose analogues fed to defoliated ryegrass led to a repression of FEH activity increase. Nevertheless this result should be carefully interpreted. Indeed, except with palatinose, the supply of other sucrose analogues tested (lactulose, turanose, trehalose) induced strong modifications in sugar contents of treated tissues and then the repression of FEH activity could be due to hexose sensing or to direct sucrose inhibition of FEH enzyme rather than to dissacharide signaling mechanism. The fact that palatinose induced only small changes in sugar contents that are unable to interfere with sucrose or hexoses sensing mechanisms, indicates that palatinose acted *per se*, presumably as a signaling molecule. It should be noted that, since palatinose has been also shown to be able to act as an allosteric activator of invertase in potatoes (Ferne *et al.*, 2001), the palatinose answer could be due to a direct regulation of INV or FEH, which are very closed to INV (Van den Ende *et al.*, 2002). In our case, however no modification of invertase activity was observed following palatinose feeding, indicating that in defoliated ryegrass, palatinose probably not acts as such effector neither for invertase nor for FEH proteins. Taken together, these results are in favour of the existence of a dissacharide sensing mechanism in defoliated *L. perenne* leading to the modulation of FEH activity. Concerning the hypothetic sucrose sensor, data available in the litterature suggest that sucrose is perceived at the plasmalemma level possibly by a sucrose transporter like sensor (Barker *et al.*, 2000). Concerning the effect of trehalose, it is not possible in our experiment to distinguish between an effect of trehalose (or T-6-P) *per se* from an indirect effect due to the modification of sucrose and hexose contents in trehalose treated plants compared to water treated plants.

If it is obvious that FEH activity is controlled by sucrose and hexoses acting as signaling molecules, the underlying mechanism is unclear. A report suggests that regulation of FEH activities occurs at the post-transcriptionnal level in the basal parts of leaves of grass species. Indeed in orchardgrass following defoliation, the supply of transcription inhibitors had only a weak effect on FEH induction while inhibitors of translation decreased drastically the rise up of FEH activity (Yamamoto and Mino, 1989).

Before defoliation in leaf bases: **high 1-SST activity and low FEH activity**



After defoliation in leaf bases: **low 1-SST activity and high FEH activity**

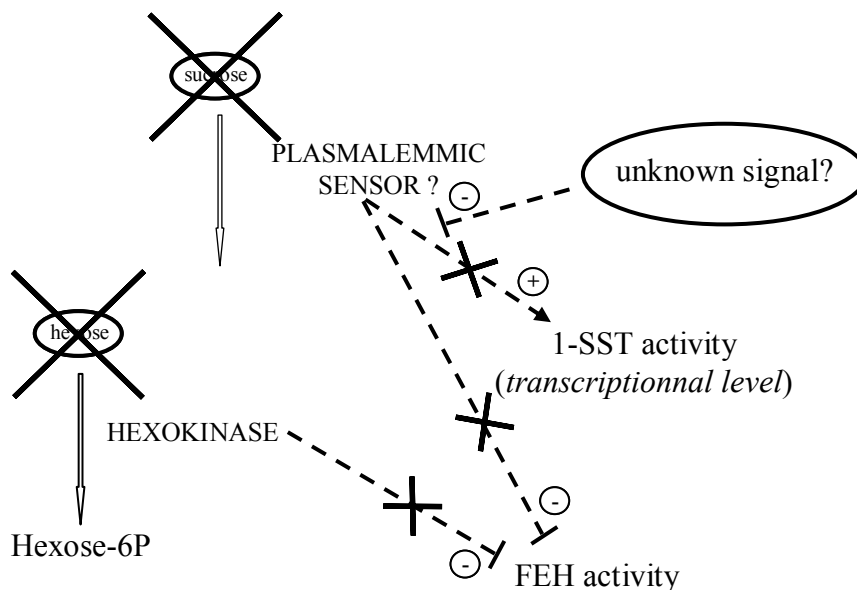


Figure 27: Diagram illustrating regulation of 1-SST and FEH activities in leaf bases of perennial ryegrass. Before defoliation, sucrose induces an increase of 1-SST expression at the transcriptional level while sucrose and also hexoses repress FEH activity. Following defoliation, when sucrose and hexose levels decrease, 1-SST is down regulated while FEH is up regulated. Moreover the fact that exogenous sucrose supply is unable to restore high 1-SST activity after defoliation suggests that an unknown signal repress the 1-SST expression following defoliation.

1.7 Conclusion

According to our data and literature, we propose a model for regulation of fructan metabolism by sugars in perennial ryegrass leaf bases (Figure 27). Taken together, our results support the idea that before defoliation, sucrose, probably *via* a plasmalemmic sensor, but also hexoses, sensed by hexokinase, act as signaling molecules repressing FEH activity. Sucrose is also an inhibitor of FEH activity by direct interaction with the protein. Moreover, according to the results of Nagaraj *et al.*, (2004), sucrose signaling could lead to an induction of 1-SST gene expression. Sugar starvation resulting from defoliation leads to a de-inhibition and then a rise-up of FEH activity. Moreover our results also suggest that 1-SST activity is repressed by an unknown signal since exogenous sugars were unable to restore a high 1-SST activity following defoliation. In conclusion we suggest that FEH activity is a major control point for fructan metabolism in defoliated grasses since it can be modulated by sugars and then allow the plant to adjust fructan pool size in agreement to the carbohydrate need of the cell while fructan biosynthesis is repressed.

Moreover, the data presented here show that defoliated perennial ryegrass may be a useful plant model and FEH activity an adequate target for the study of sugar starvation sensing and signaling in plants.

2. Article II: Cloning, gene mapping and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* rather implicated in fructan synthesis than in fructan mobilisation

Authors:

Jérémy Lothier¹, Bertrand Lasseur¹, Katrien Le Roy², André Van Laere², Marie-Pascale Prud'homme¹, Philippe Barre³, Wim Van den Ende², Annette Morvan-Bertrand¹.

Addresses:

¹UMR INRA-UCBN 950 EVA Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutriments NCS, Université de Caen, Esplanade de la Paix, 14032 Caen cedex, France.

²Department of Biology, Laboratory for Molecular Plant Physiology, Institute of Botany and Microbiology, K.U.Leuven, Kasteelpark Arenberg 31, B-3001 Leuven, Belgium.

³INRA-UGAPF 889, F-86600 Lusignan, France.

Article publié dans Journal of Experimental Botany, 2007 58 :1969-1983

2.1 Résumé

Polymères de fructose liés en β -(2,1) et/ou β -(2,6), les fructanes constituent d'importants glucides de réserve chez de nombreuses plantes et sont mobilisés *via* des fructane exohydrolases (FEHs). Nous décrivons ici le clonage, la cartographie et la caractérisation de la première 1-FEH (EC 3.2.1.153) de *Lolium perenne* L. var. Bravo. En criblant une banque d'ADNc de ray-grass anglais, un ADNc codant une 1-FEH appelé *Lp1-FEHa* a été cloné. La protéine correspondante Lp1-FEHa possède un faible point iso-électrique (5,22). La séquence d'acides aminés déduite présente 75% d'identité avec la *1-FEH w2* du blé. Le gène *Lp1-FEHa* a été cartographié en position distale sur le groupe de liaison 3 (LG3). La caractérisation fonctionnelle de la protéine recombinante dans *Pichia pastoris* a mis en évidence une forte activité FEH contre le 1-kestotriose, le 1,1-kestotetraose et l'inuline mais une faible activité contre le 6-kestotriose et les lévanes. Comme les autres FEHs, aucune activité invertasique n'a été détectée contre le saccharose démontrant clairement que l'enzyme n'est pas une invertase. L'analyse du profil d'expression a révélé une accumulation de transcrits *Lp1-FEHa* dans les tissus foliaires accumulant des fructanes alors que le niveau de transcrits est faible dans les tissus photosynthétiques. Le haut niveau d'expression de cette 1-FEH dans des conditions de synthèse active de fructanes couplé à un faible niveau d'expression lorsque les teneurs en fructanes sont faibles suggère qu'elle pourrait jouer le rôle d'enzyme β -(2,1) « trimmer » (ou « élagueur ») agissant de concert avec les fructosyltransférases au cours de la synthèse des fructanes.

2.2 Abstract

Fructans, which are β -(2,1) and/or β -(2,6) linked polymers of fructose, are important storage carbohydrates in many plants. They are mobilised via fructan exohydrolases (FEHs). Here we describe the cloning, mapping and functional analysis of the first 1-FEH (EC 3.2.1.153) from *Lolium perenne* L. var. Bravo. By screening a perennial ryegrass cDNA library, a 1-FEH cDNA named *Lp1-FEHa* was cloned. The Lp1-FEHa deduced protein has a low iso-electric point (5.22) and it groups together with plant FEHs and cell-wall type invertases. The deduced amino acid sequence shows 75% identity to wheat *1-FEH w2*. The *Lp1-FEHa* gene was mapped at a distal position on the linkage group 3 (LG3). Functional characterization of the recombinant protein in *Pichia pastoris* demonstrated that it had high FEH activity towards 1-kestotriose, 1,1-kestotetraose and inulin but low activity against 6-kestotriose and levan. Like other fructan-plant FEHs, no hydrolase activity could be detected towards sucrose, convincingly demonstrating that the enzyme is not a classic invertase. The expression pattern analysis of *Lp1-FEHa* revealed transcript accumulation in leaf tissues accumulating fructans while transcript level was low in the photosynthetic tissues. The high expression level of this 1-FEH in conditions of active fructan synthesis together with its low expression level when fructan contents are low suggest that it might play a role as a β -(2,1) trimming enzyme acting during fructan synthesis in concert with fructan synthesis enzymes.

Key words: fructan biosynthesis, fructan exohydrolase, gene mapping, *Lolium perenne*, *Pichia pastoris*.

2.3 Introduction

Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. var. Bravo) is a major forage grass in temperate areas. Fructans, oligo- and polyfructosylsucroses, are the main carbon storage compounds in vegetative tissues of this species. These water soluble carbohydrates (WSC) also constitute an important fermentable carbohydrate source that improves protein utilization by ruminants and boosts milk and meat production (Miller *et al.*, 2001).

Fructans are present in approximately 15% of the flowering plant species, notably in species belonging to economically important orders such as Asterales [chicory (*Cichorium intybus*), Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*)], Liliales [onion (*Allium cepa*), asparagus (*Asparagus officinalis*)] and Poales, [barley (*Hordeum vulgare*), wheat (*Triticum aestivum*), perennial ryegrass (*L. perenne*)] (Hendry, 1993). Fructans are believed to be mainly stored in the vacuole (Wagner *et al.*, 1983; Wiemken *et al.*, 1986), but have also been reported in phloem sap (Wang and Nobel, 1998) and apoplast (Livingston and Henson, 1998). In Poales, fructans show linear or branched structure with β -(2,6) and/or β -(2,1) linked fructose residues (Bancal *et al.*, 1992; Bonnett *et al.*, 1997). In *L. perenne*, fructans mainly accumulate in the basal part of the leaves i.e. in elongating leaf bases and leaf sheaths (Pavis *et al.*, 2001a). In this species, low degree of polymerization (DP) fructans are composed in majority by β -(2,1) linked fructosyl residues (inulin and inulin neoseries) while high DP fructans mainly consist of β -(2,6) linked fructosyl residues (levan neoseries) (Pavis *et al.*, 2001b).

Regulation of fructan pool size is under control of both synthesis and breakdown enzymes which belong to the glycoside hydrolase family 32 (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>) (Vijn and Smeekens, 1999) and are assumed to be vacuolar (Wagner *et al.*, 1983; Darwen and John, 1989). In *L. perenne*, two synthesis enzymes were recently cloned and characterized, a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase named Lp1-SST (EC 2.4.1.99) (Chalmers *et al.*, 2003) and a fructan:fructan 6G-fructosyltransferase named Lp6G-FFT (Lasseur *et al.*, 2006). Together, they are supposed to be able to produce inulin and inulin neoseries from sucrose while a third enzyme which is needed to produce levan neoseries in *L. perenne* remains to be characterized (Lasseur *et al.*, 2006). Fructan breakdown is believed to occur by 1-FEHs (EC 3.2.1.153) and 6-FEHs (EC 3.2.1.154) preferentially degrading β -(2,1) and β -(2,6) linked

fructans, respectively (Van den Ende *et al.*, 2004). A third type named 6&1-FEH which hydrolyses both β -(2,1) and β -(2,6) linked fructans has recently been identified in wheat (Kawakami *et al.*, 2005). 1-FEHs have been studied extensively in the dicot species chicory and Jerusalem artichoke, which accumulate almost exclusively inulin-type fructans (Van Laere et Van Den Ende, 2002). From grasses, three 6-FEHs (Henson and Livingston, 1996; Marx *et al.*, 1997b; Van Riet *et al.*, 2006) and three 1-FEHs (Van den Ende *et al.*, 2003a) have been purified to homogeneity, including one 6-FEH from *L. perenne* (Marx *et al.*, 1997b). In this species, a putative FEH cDNA has been reported (Chalmers *et al.*, 2005). However, the activity of the corresponding protein has not been characterized. So to date, no cloning and characterization of any FEH from perennial ryegrass has been reported.

In fructan accumulating plants, FEHs are associated with a diverse set of physiological functions such as hydrolysing fructan reserves when energy and carbon skeleton are needed (Van den Ende *et al.*, 2001; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a), increasing osmotic potential that drives the flower expansion (Bieleski, 1993; Vergauwen *et al.*, 2000) and increasing oligofructan concentrations under stress (Van den Ende and Van Laere, 1996) contributing to frost or drought tolerance through membrane stabilisation (Hinch *et al.*, 2002; Vereyken *et al.*, 2003a). In perennial grasses, FEHs are implicated in the fast mobilisation of fructans immediately after defoliation (Yamamoto and Mino, 1985; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a) in order to deliver carbon to leaf growing cells (Amiard *et al.*, 2003b). In non-fructan accumulating plants, 6-FEHs have been characterized from *Arabidopsis thaliana* (De Coninck *et al.*, 2005) and sugar beet (*Beta vulgaris* L.) (Van den Ende *et al.*, 2003b) for which a role in pathogen defense has been proposed.

Unexpectedly, in *Lolium rigidum* leaves (Smouter and Simpson, 1991b), barley leaves (Wagner and Wiemken, 1989) and perennial ryegrass stubble (Prud'homme *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 1997b), high *in vitro* FEH activities have been measured not only during periods of fructan breakdown but also during periods of fructan biosynthesis. Several hypotheses have been proposed to explain this result. FEH could be either inactive, representing possibly a standby enzyme (Van den Ende *et al.*, 2003a), or active, controlling the length of the α -(2,1) fructosyl chains (Bancal *et al.*, 1992; Van den Ende *et al.*, 2002). In this context, it seems important to characterize the full set of FEHs in the economically important species, *L. perenne* to assess their corresponding and specific functions. Here, a cDNA named *Lp1-FEHa* was cloned by screening a perennial ryegrass cDNA library. The activity of the corresponding

recombinant protein termed Lp1-FEHa was confirmed by heterologous expression in yeast *Pichia pastoris*. Knowing that the chromosomal location of defined gene underlying specific physiological function are supposed to become the next generation of molecular markers for forage species, *Lp1-FEHa* gene was mapped by using the F2 population VrnA (Jensen *et al.*, 2005a; Jensen *et al.*, 2005b). In this study, the *Lp1-FEHa* gene expression was followed during fructan accumulation and mobilisation, and compared with 1-FEH activity pattern. Results suggest that the cloned *Lp1-FEHa* is rather implicated in fructan biosynthesis than in fructan mobilisation.

2.4 Materials and methods

2.4.1. Plant material

Seeds of *Lolium perenne* L. var Bravo were germinated in 9 L pots and grown hydroponically during eight weeks on a nutrient solution as previously described by (Prud'homme *et al.*, 1992). The nutrient solution was aerated continuously and replaced every week. Plants were grown in a greenhouse with day to night temperatures of 22 to 18°C and a photoperiod of 16 h of natural light supplemented by a photosynthetic photon flux density of 110 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Phyto tubes, Claude, GTE, France).

Defoliation and exogenous sugar treatments began when plants were 8 weeks old. On day 0, all plants were defoliated at 9:00 AM (3 h after light on) at 4.5 cm above ground and plants of one pot were harvested (“before treatment”). Plants of the four other pots were treated separately but simultaneously with the following solutions all including 0.1 % (V:V) Tween 20 but containing either water, 200 mM glucose, 200 mM fructose or 100 mM sucrose. Treatments were applied by spraying 24 times 25 mL of each solution every 30 min from 9:00 AM to 2:00 PM, every hour from 02:00 PM to 12 PM and at 01:30 AM, 04:00 AM and 06:00 AM. After 24 h of regrowth (09:00 AM, day 1) every pot were harvested and elongating leaf bases, which correspond to the enclosed basal 5 cm of elongating leaves including the cell division, elongation and maturation zones, were dissected.

Synthesis of fructan was induced in the plants 8 weeks after sowing, according to the method used by Smouter and Simpson (1991a). The plant tissues used in this experiment were

the same as those used by Lasseur *et al.*, (2006). After a dark period, plants (named illuminated plants) were placed in nutrient solution at 5°C with apical meristems covered by the solution and illuminated continuously with a photosynthetic photon flux density of 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for up to 72 h. Control swards were grown under the original plant growth conditions, with a daylength of 16 h. Plants were divided into three parts, sheaths of mature leaves, blades of mature leaves together with emerged parts of elongating leaves, and elongating leaf bases (Lasseur *et al.*, 2006). For control plants at time 0, elongating leaves were dissected longitudinally. The base previously enclosed by the sheaths was dissected in five segments (four 10 mm-long segments (0-40 mm) from leaf base and a fifth variable length segment of about 40 mm-long) while the emerged parts were divided into three equal parts.

Sampling was done in triplicate. One part of the harvested tissues was used immediately for enzyme extraction whereas the remainder was frozen and stored at -80°C for RNA and water soluble carbohydrates (WSC) extraction.

2.4.2. Preparation and screening of *L. perenne* cDNA library

Stubble (composed by leaf sheaths and elongating leaf bases) of 8 week old plants (1.5 g fresh weight) was ground in liquid nitrogen. Powder obtained was used to purify poly (A⁺) RNA with Dynabeads oligo (dT)₂₅ kit (Dyna, France) by following manufacturer's recommendation. Double stranded cDNA was synthesized from poly (A⁺) RNA and a cDNA library was constructed using a Lambda-Zap cDNA library kit and the Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene, France). The cDNA library was screened with a 989 bp *L. perenne* PCR product. This PCR product was previously obtained with sense primer WES (5'-TGGGAGTGCCCGGACTTC-3') based on the conserved amino acid sequences WECPD and antisense primer FEHAS (5'-ATGGTCCATGCGCTGAGCT-3') designed from the conserved nucleotidic sequences between wheat *1-FEH* w2 (accession no. AJ508387) and barley *1-feh* (accession no. AJ605333). The PCR product was named putative *1-FEH* (accession no. AY693396) because of its high homology to wheat *1-FEH* w2 (accession no. AJ508387). The PCR product was labeled with [α -³²P] dCTP by using random priming method with NEBlot kit (Biolabs, France). Membranes were hybridized overnight at 42°C and washed twice in 2 SSC, SDS 0.5% (w/v), for 15 minutes at room temperature, then rinsed

two times in the same buffer at 56°C. After three rounds of purification, positive clones were excised and recircularised in a pBluescript vector (Stratagene, USA). Sequencing of positive clones was performed by Genome Express (France). Nucleotide sequences were compared with sequences available in NCBI Databank. Two partial cDNAs *Lp1-FEHa* and *Lp1-FEHa-S* with the same partial open reading frame (ORF) but with different 3' UTR length and showing a high homology to wheat 1-FEH were cloned (Figure 28).

2.4.3. cDNA 5' cloning

In order to clone the missing 5' part of the cDNA obtained, RNA was isolated from stubble of 8 week old plants using the RNeasy plant mini kit (Qiagen, France) coupled to a DNase treatment (Qiagen, France). RNA was quantified using a 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 (Biorad, France). Four PCR reactions were performed on cDNA using sense primers FEHA (5'-ATGGCCCAAGCTTGGGCCTT-3'), FEHB (5'-ATGGCCCAAGCCTGGGCCTT-3'), FEHC (5'-ATGGCNCAAGCNTGGGCCTT-3'), FEHD (5'-ATGGCNCAAGCNTGGGCNTT-3') based on the conserved amino acid sequences MAQAWAF found in wheat and barley 1-FEH (accession no. AJ508387 and AJ605333) and antisense primer FEH9-1 (5'-GGGAGTTCTCCTGCATGGT-3') based on the 3' UTR *Lp1-FEHa* partial cDNA sequence. One clear band appeared at this stage with FEHD and FEH9-1 primers. PCR products were sequenced and found to match exactly with *Lp1-FEHa* partial cDNA sequence.

2.4.4. Lp1-FEHa mapping

The F2 population VrnA (Jensen *et al.*, 2005a; Jensen *et al.*, 2005b) was used to map the *Lp1-FEHa* gene. Total DNA of 136 plants was extracted by the method previously described (Cheng *et al.*, 1993). The primers Lp1FEHs (5'-GCGGTCTTGGAGCCAGAGC-3') and Lp1FEHas (5'-CAGTCCCAATGGTGCCACCC-3') were used to amplify a part of the gene. The PCR conditions were : taq buffer 1X, 0.5 U of Platinum Taq polymerase (Invitrogen, The Netherlands), 0.3 µM of each primer, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂ and 50 ng of total DNA. The PCR program was : 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 94°C

for 30 s, 61°C for 30 s and 72°C for 1 min 20 s, and then 72°C for 5 min. PCR products of about 1000 bp were separated depending on their length by electrophoresis on polyacrylamide gels 3% (w/v) and revealed by silver-nitrate staining coloration (Tixier *et al.*, 1997). Two bands of about 1000 bp and 1100 bp were present in both parents of the mapping family and were scored a and b, respectively. The *Lp1-FEHa* gene was mapped on the existing map of VrnA population (Jensen *et al.*, 2005a and b) using the raw-data provided by Jensen L.B. (Danish Institute of Agricultural Sciences) and adding our scoring data. The software Joinmap was used with the Haldane distance (Van Ooijen et Voorrips, 2001). The linkage groups were grouped with a minimum of LOD 6.0.

2.4.5. Expression in *Pichia pastoris*

To construct the expression plasmid *PICLp1FEH*, containing the mature protein part, PCR was done with PICFEHs (5'-GATCGGCCCAGCCGGCCGGAGCTCCCCTCCATTGCC-3') and PICFEHas (5'-GATCCCCGCGGTCAACCCTGAATTACATTAC-3') primers with adaptators. *SfiI* and *SacII* restriction sites are indicated in bold in the primers. PCR was performed with proofreading *Pfu* DNA polymerase (Promega, France). The PCR program was as follows: 95 °C for 5 min followed by 30 cycles of 95 °C for 20 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 5 min, and then a single 72 °C for 9 min. PCR products and pPICZalpha A (expression vector, Invitrogen, The Netherlands) were digested with restriction enzymes corresponding to restriction sites introduced by PCR and purified with Nucleospin Extract Kit (Macherey-Nagel, Germany). The digested vector was dephosphorylated with CIAP (Stratagene, USA), and then PCR products were cloned in frame behind the alpha-factor signal of the pPICZalpha A vector. The plasmids were transformed into *Escherichia coli* competent cells as described by Van den Ende *et al.* (2001). Cells were plated on 2 x yeast tryptone (YT) medium supplemented with zeocine as a selection marker. Positive colonies were used for vector amplification. The *P. pastoris* wild-type strain X33 was transformed by electroporation with 20 µg *PmeI*-linearized *PICLp1FEH*. Transformants were selected on YPDS/zeocine plates (Invitrogen, The Netherlands). In order to produce recombinant Lp1-FEHa enzyme for characterization, a 90 mL pre-culture medium (BMGY) was inoculated with single colonies and incubated overnight at 30 °C, 200 rpm. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 20 mL of induction medium (BMMY) and incubated for 4 days at 29 °C.

Methanol was replenished every day to a final concentration of 2% (v/v). Protein purification was done by following the protocol described by (De Coninck *et al.*, 2005).

2.4.6. Determination of enzyme activities of the *P. pastoris* expressed recombinant *Lp1-FEHa*

Sodium azide 0.02% (w/v) was added to all buffers to prevent microbial growth. Proteins were diluted in 50 mM Na-acetate buffer pH 5.0 and incubated with substrates for different time intervals at 30 °C. *L. perenne* high-molecular-weight fructans were prepared as described by Morvan *et al.* (1997). Briefly, fructans were extracted from stubble of 8-week old plants of *L. perenne* grown for 4 days under continuous illumination and nutrient solution at 5 °C. Fructans were extracted first with boiling 80% ethanol (4 mg g⁻¹ f. wt) for 1 h and then with boiling water (5 mg g⁻¹ f. wt) for 1 h. Both extracts were combined and the volume was reduced by rotary evaporation. The resulting concentrated extract was depigmented by an overnight contact with polyvinylpyrrolidone followed by centrifugation. Fructans contained in the supernatant were then separated from sucrose, glucose and fructose by passage through a gel filtration column (Sephadex G25). The remaining charged material was removed by passage through cation-exchange and anion-exchange resins (Amberlite IR120 and IRA 416, in the hydrogen and formate forms, respectively). For origins of other substrates see De Coninck *et al.*, 2005. Enzyme amounts and/or incubation times were adjusted to result in the linear production of fructose during the incubation period. For pH optimal determination, 0.5 M sodium citrate buffer (pH 3.4, 3.9, 4.3, 4.9) and 0.5 M sodium phosphate buffer (pH, 5.4, 5.75, 6.4, 6.75, 7.3, 7.8, 8.25) were used. Carbohydrates of the assay mixture were separated and quantified by high-performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD DX-300, Dionex, CA, USA) on an analytical CarboPac PA100 column (4 x 250 mm) as described by Van den Ende and Van Laere (1996). For determination of 1-FEH activity in the presence of fructose, 1-FEH activity was determined by following the disappearance of 1,1-kestotetraose.

2.4.7. Extraction and analysis of water soluble carbohydrates (WSC)

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 10,000 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 10,000 g for 10 min. The supernatant was preserved and the aqueous extraction was repeated once with the pellet. The three supernatants 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.

2.4.8. Measurement of 1-FEH and sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) activities in leaf protein extracts

Fresh plant tissue (2 g leaf sheaths or leaf blades, 1 g elongating leaf bases) was ground at a ratio of 1 mL g⁻¹ in 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 5.5) at 4°C containing 5 mM dithiothreitol (DTT). The homogenate was centrifuged at 20,000 g for 10 min. An aliquot of the crude extract was desalted on Sephadex G50, which also removed sucrose from the extract. The assay mixture consisted of 100 µL of enzyme extract and 100 µL of substrate. For measurement of 1-FEH activity, commercial inulin from chicory roots was used as substrate. For sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) activity assays, 100 mM sucrose was used as substrate. Triplicate samples were run together with duplicate enzyme blanks (no substrate). After incubation at 30°C for 2 h (1-SST activity) or 4 h (1-FEH activity), 100 µL mannitol (1g L⁻¹) was added to the assay mixture and the reaction was stopped by boiling for 5 min. The samples were stored at -20 °C until dessalting with ion exchange resins as described above for WSC analysis. The products of the 1-FEH (fructose) and 1-SST (1-

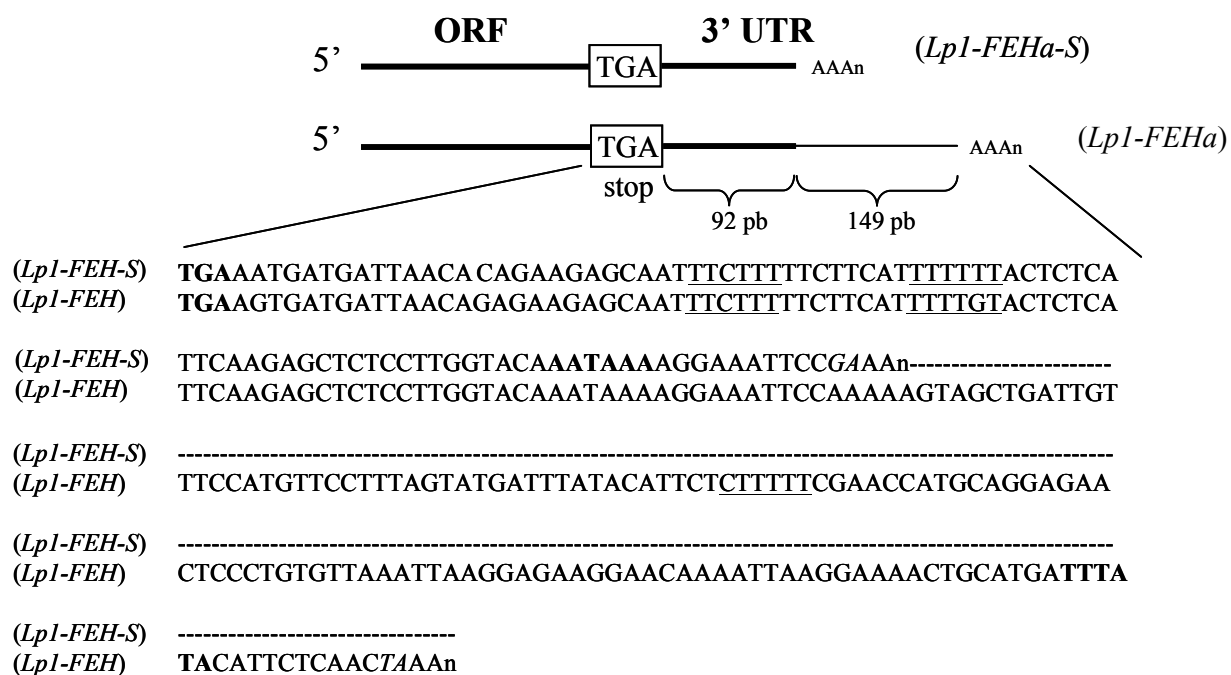


Figure 28: 3' UTR sequences of *Lp1-FEH-S* and *Lp1-FEH* cDNAs. The series of bold letters TGA, AATAAA and TTTATA are the presumed translation termination codon and polyadenylation signal sequence (NUE). Potential FUE are underlined. Polyadenylation/cleavage sites are in italic. cDNA are not drawn to scale. The nucleotidic sequence is represented by a thick line for common sequence between *Lp1-FEH-S* and *Lp1-FEH* and a thin line for the 3' UTR extension of *Lp1-FEH*. ORF: open reading frame.

kestotriose) enzymatic reactions were measured by HPLC under the conditions defined above for WSC analysis.

2.4.9. RNA isolation and real-time qPCR analysis

RNA was isolated from leaf tissues using the RNeasy plant mini kit (Qiagen, France) coupled to a DNase treatment (Qiagen, France). RNA was quantified using a 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 (Biorad, France). 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 the Lp1FEHs and Lp1FEHas previously described for *Lp1-FEHa* and Lp1SSTs (5'-GCCAGGTCATCCTGCTCTAC-3') and Lp1SSTas (5'-CCGGCATGAGCTCGTAGTT-3') for *Lp1-SST*. As a marker for constitutive expression rRNA18S was amplified with rRNA18Ss (5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3') and rRNA18Sas (5'-GTACTCATTTCCAATTACCAGAC-3') primers. PCR reactions were performed in a total volume of 15 µl, 500 nM for each primers 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 s and 60 °C for 40 s. All the qPCR results were confirmed by three independent reactions from RNA of the same bulk of plants. Expression levels produced by qPCR were expressed as a ratio relative to the control point, which was set to 1. 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 confirms that the correct amplicons was produced from each pair of primers.

2.5 Results

2.5.1. Sequence analysis of the perennial ryegrass Lp1-FEHa cDNAs

The *L. perenne* stubble cDNA library was screened with a 989 bp *L. perenne* PCR product, previously obtained with sense primer WES based on the conserved amino acid sequences WECPD and antisense primer FEHAS designed from the conserved nucleotide sequences between wheat *1-FEH w2* (accession no. AJ508387) and barley *1-FEH* (accession no. AJ605333). This PCR product was named putative *1-FEH* (accession no. AY693396) since it has high homology to wheat *1-FEH w2* (accession no. AJ508387). A cDNA termed *Lp1-FEHa* (accession no. DQ016297) was obtained as well as a second partial cDNA having a shorter 3' untranslated region (3'UTR) and termed *Lp1-FEHa-S* (Small) (Figure 28). To get the 5' end of the coding sequence, the screening was followed by PCR with degenerated primers based on the conserved amino acid sequences MAQAWAF found in wheat and barley 1-FEHs (accession nos. AJ508387 and AJ605333) and specific primers from *Lp1-FEHa* 3'UTR. As a result the *Lp1-FEHa* complete cDNA was obtained. *Lp1-FEHa* shows a 241 bp 3' UTR (Figure 28). The second cDNA termed *Lp1-FEHa-S* contains the same end (100 % of homology) of open reading frame (ORF) but has a shorter 3'UTR of 92 bp which is 98 % homologous with the beginning of the *Lp1-FEHa* 3'UTR. The *Lp1-FEHa* ORF of 1755 bp begins with a ATG start codon and finishes with a TGA stop codon and encodes a 584 amino acid protein termed Lp1-FEHa. Lp1-FEHa deduced protein has a predicted pI value of 5.22 and a calculated molecular mass of 65.4 kDa. Lp1-FEHa contains four potential *N*-glycosylation sites identified by the [N-X-(S/T)] motif (Figure 29). Lp1-FEHa contains the typical consensus domains conserved among family 32 of plant glycoside hydrolases, the β -fructosidase motif (NDPNG) and the FRDP and [WEC(V/P)D] regions (Figure 29). A hydrophobic N-terminal signal of 22 amino acids was determined with Signal3P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) and the mature Lp1-FEHa was estimated to begin at the 43rd amino acid residue (Figure 29; in italic) based on the *N*-terminal sequence of chicory and wheat 1-FEH mature proteins (Van den Ende *et al.*, 2001, 2003a). This Lp1-FEHa protein shows 78% identity to *L. perenne* putative LpFEH (Chalmers *et al.*, 2005), 75% identity to wheat 1-FEH w2, 74% identity to barley putative 1-FEH, 73% identity to wheat 6-KEH w1

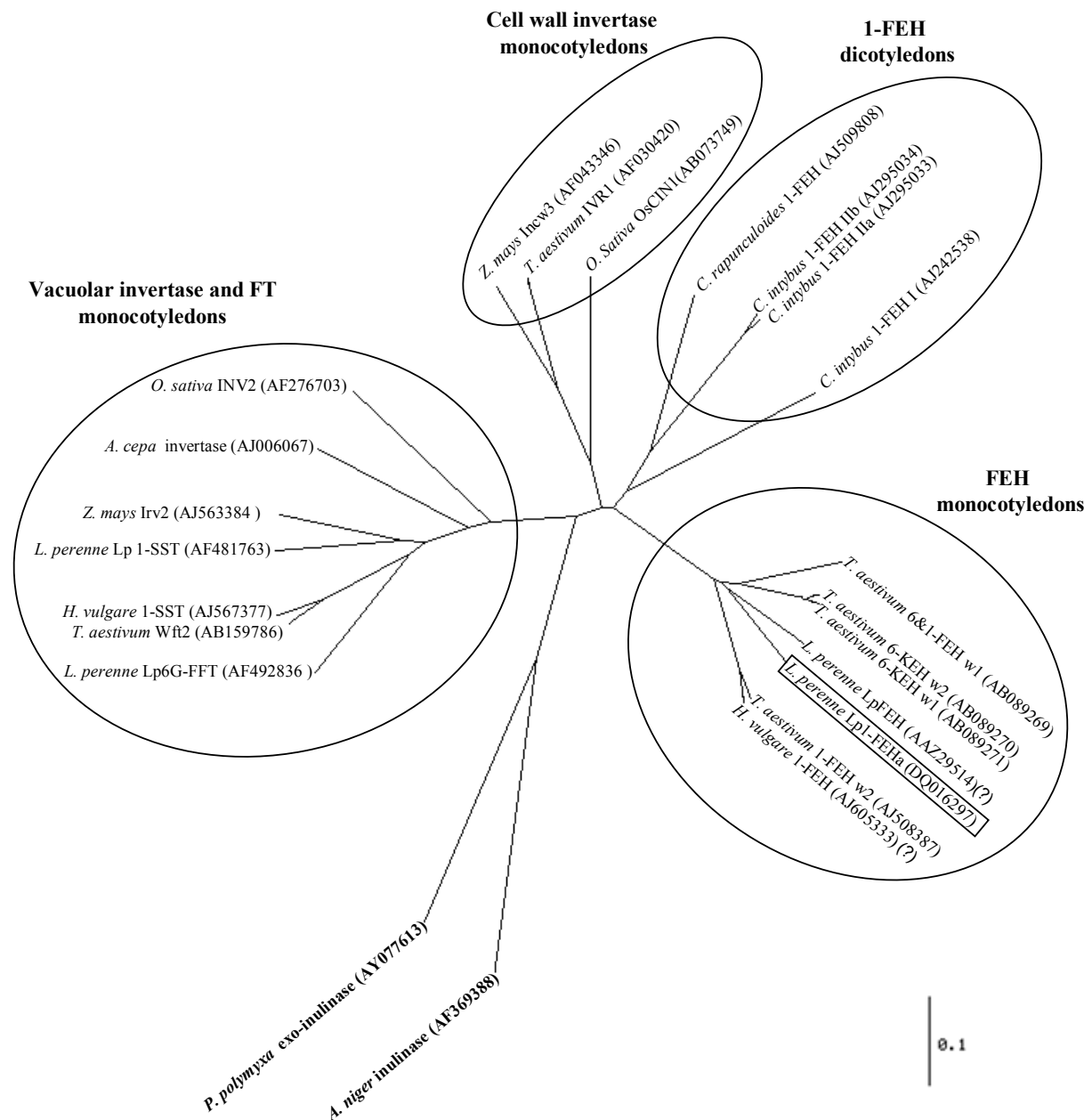


Figure 30: Phylogenetic tree of invertase and fructan metabolism cDNAs-derived amino acid sequences. The *Lolium perenne* Lp1-FEHa is boxed. Inulinase and exo-inulinases from micro-organisms are in bold. Question marks indicate putative FEH which have not been characterized. *Z. mays*, *Zea mays*; *T. aestivum*, *Triticum aestivum*; *O. sativa*, *Oryza sativa*; *C. rapunculoides*, *Campanula rapunculoides*; *C. intybus*, *Cichorium intybus*; *H. vulgare*, *Hordeum vulgare*; *A. cepa*, *Allium cepa*; *L. perenne*, *Lolium perenne*; *P. polymyxa*, *Paenibacillus polymyxa*; *A niger*, *Aspergillus niger*.

and 6&1-FEH w1 (Figure 29), and 49% identity to sugar beet 6-FEH and chicory 1-FEH IIa. It also shows 47% identity to wheat cell wall invertase Incw3 and 38-41% to fructosyl transferases from *Lolium sp.* A phylogenetic analysis of invertases, fructosyltransferases (FT) and fructan exohydrolases (Figure 30) confirmed that Lp1-FEHa comes from ryegrass and not from microbial contamination. Indeed, Lp1-FEHa is closer to plant FEHs rather than to *Aspergillus niger* or *Paenibacillus polymyxa* exo-inulinases.

2.5.2. Gene mapping

The F2 population VrnA (Jensen *et al.*, 2005a; Jensen *et al.*, 2005b) was used to map the *Lp1-FEHa* gene. The observed effectives of the 136 F2 plant genotypes for Lp1-FEHa were: 33 aa, 43 bb and 60 ab, which is not significantly different from the expected effectives with a 1:2:1 segregation ($p=0.19$). The *Lp1-FEHa* gene was mapped on the linkage group 3 (Figure 31), named according to the chromosome assignment found in the ILGI perennial ryegrass population (<http://ukcrop.net/perl/ace/search/FoggDB>).

2.5.3. Functional characterization of the recombinant 1-FEH protein

The recombinant Lp1-FEHa was successfully expressed in *P. pastoris* for functional characterization. This heterologous expression system is now recognized to be a valid technique to judge the functionality of plant FEHs (De Coninck *et al.*, 2005). None or very low hydrolase activities could be detected towards sucrose and high DP levan (Table VI), demonstrating that the enzyme is neither a classic invertase nor a 6-FEH. Moreover, the missing activity against loliose, a sucrosyl-galactoside present in *Lolium* and *Festuca* species, is an additional argument demonstrating that Lp1-FEHa is unable to cleave (α 1- β 2) glucosidic bound fructosyl unit (Table VI). Lp1-FEHa has a clear preference for β -(2,1) linked fructans such as 1,1-kestotetraose, 1-kestotriose or inulin. Among the β -(2,1) fructans tested, 1,1-kestotetraose was the best substrate while 1-kestotriose and inulin were hydrolysed 1.7 and 4 times slower (Table VI). 6-Kestotriose and bacterial levan were hydrolysed at least 16 times

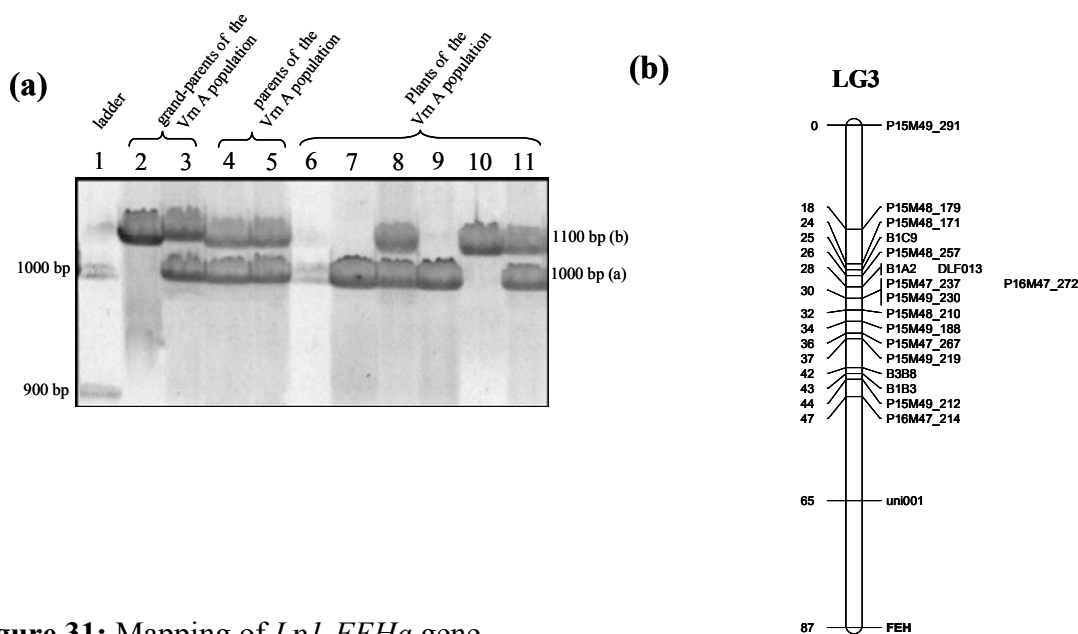


Figure 31: Mapping of *Lp1-FEHa* gene.

(a) *Lp1-FEHa* gene polymorphism in the Vrna population on 3% poly-acrylamide gel with a silver-nitrate staining coloration. Lane 1: ladder lower band at 900 bp and upper band 1000 bp. Lanes 2 and 3: grand parents of the F2 population Vrna, bb and ab, respectively. Lanes 4 and 5: parents of the F2 population Vrna, both scored ab. Lane 6 to 11: plants of the Vrna population. (b) *Lp1-FEHa* gene (FEH) map location on linkage group 3 on the Jensen *et al.* (2005a) map. The distance of Haldane in cM has been used.

Table VI : Substrate specificity of the *Pichia pastoris* expressed recombinant Lp1-FEHa

Substrate	DP	Relative activity (%)
Sucrose	2	0.3
1,1-kestotetraose	4	100
1-kestotriose	3	58
Inulin (<i>C. intybus</i>)	>10	24
6-kestotriose	3	6
Levan	+/- 72	0.5
6G-kestotriose	3	19
Loliose	3	0

Substrate concentration in the enzyme assays was 3 mM. Relative activity is expressed as the percentage of the activity with 1,1-kestotetraose (bold) as substrate. DP, degree of polymerization.

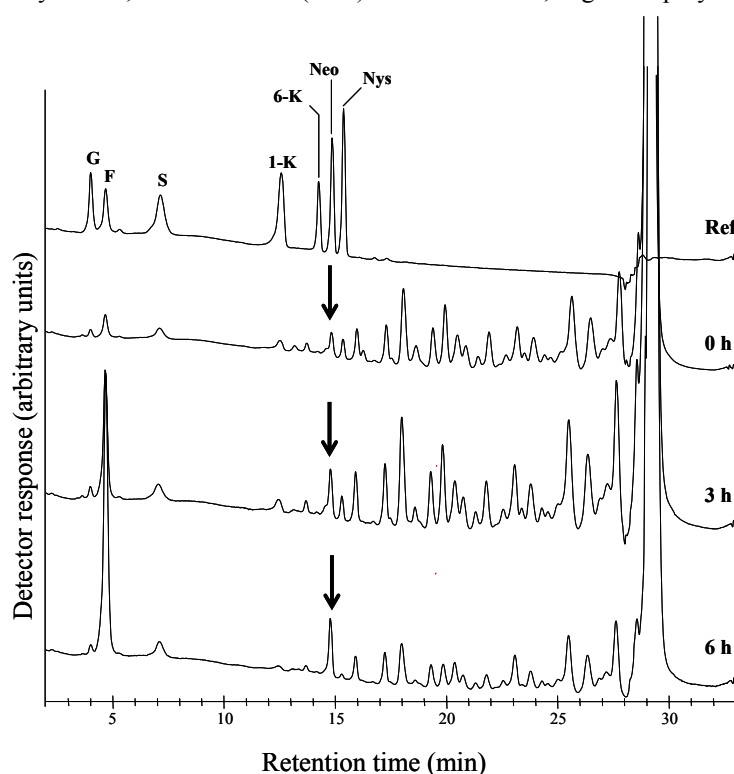


Figure 32: HPAEC chromatograms of reaction mixtures of the *Pichia pastoris* expressed recombinant Lp1-FEHa with native fructans from *Lolium perenne* after 0, 3 and 6 h of incubation at 30 °C. Reference includes glucose (G), fructose (F), sucrose (S), 1-kestotriose (1-K), 6-kestotriose (6-K), 6G-kestotriose (Neo) and 1,1-kestotetraose (Nys). The arrows show accumulation of 6G-kestotriose.

slower than 1,1-kestotetraose. Lp1-FEHa was also able to slowly degrade the β -(2,6) glucosidic bound fructosyl unit from 6G-kestotriose, showing that the presence of a fructosyl-fructosyl linkage is not a prerequisite for enzymatic activity (Table VI). To determine the mode of exolytic attack by the Lp1-FEHa, all products formed during incubation with a mixture of commercially available inulin from *Cichorium intybus* were analysed by HPAEC-PAD (data not shown). Only fructose was formed and there was no indication of other compounds such as sucrose, 1-kestotriose and inulo-*n*-oses. This analysis shows that Lp1-FEHa has no endo-hydrolase activity and hydrolyses fructans by a multichain mechanism in which the substrate is released from the enzyme before complete hydrolysis. To further support substrate specificity, incubations with *L. perenne* fructans, the putative natural substrate, were performed. Figure 32 illustrated that in agreement to table VI data, Lp1-FEHa hydrolysed 1,1-kestotetraose and 1-kestotriose. The experiment further suggests that Lp1-FEHa can degrade neoseries type fructans, as indicated by the accumulation of 6G-kestotriose after 3 and 6 h of incubation (see arrows in Figure 32). Indeed, the low DP neo-type oligosaccharides in *Lolium* mainly belong to the inulin neoseries (Pavis *et al.*, 2001b) which is consistent with the decrease of these fructans in parallel with 6G-kestotriose accumulation after longer time incubations with the Lp1-FEHa (Figure 32). The fact that there is no accumulation of 6-kestotriose, which is itself a very poor substrate (Table VI), is in agreement with the fact that no typical graminan type fructans occur in *Lolium*. The Lp1-FEHa activity with 1,1-kestotetraose as substrate was optimal around pH 5.5 (Figure 33). Maximal hydrolysis was measured at 40 °C but the enzyme was still active in the lower temperature range; 20 % of the maximal activity was still detected at 4°C (Figure 33). Lp1-FEHa activity decreased strongly above 40 °C and falls to 20% of its maximal activity at 50°C.

Table VII : Influence of glucose, fructose and sucrose on the activity of the *Pichia pastoris* expressed recombinant Lp1-FEHa.

Inhibitor	Inhibitor concentration (mM)	Inhibition (%)
None	0	0
Glucose	20	0
Fructose	20	0
Sucrose	1	26
Sucrose	2.5	41
Sucrose	5	62
Sucrose	10	86
Sucrose	20	90

Enzymatic assays were done with 1,1-kestotetraose 3 mM as substrate. The rate of fructose production without sucrose was used as 0 % inhibition of reaction rate.

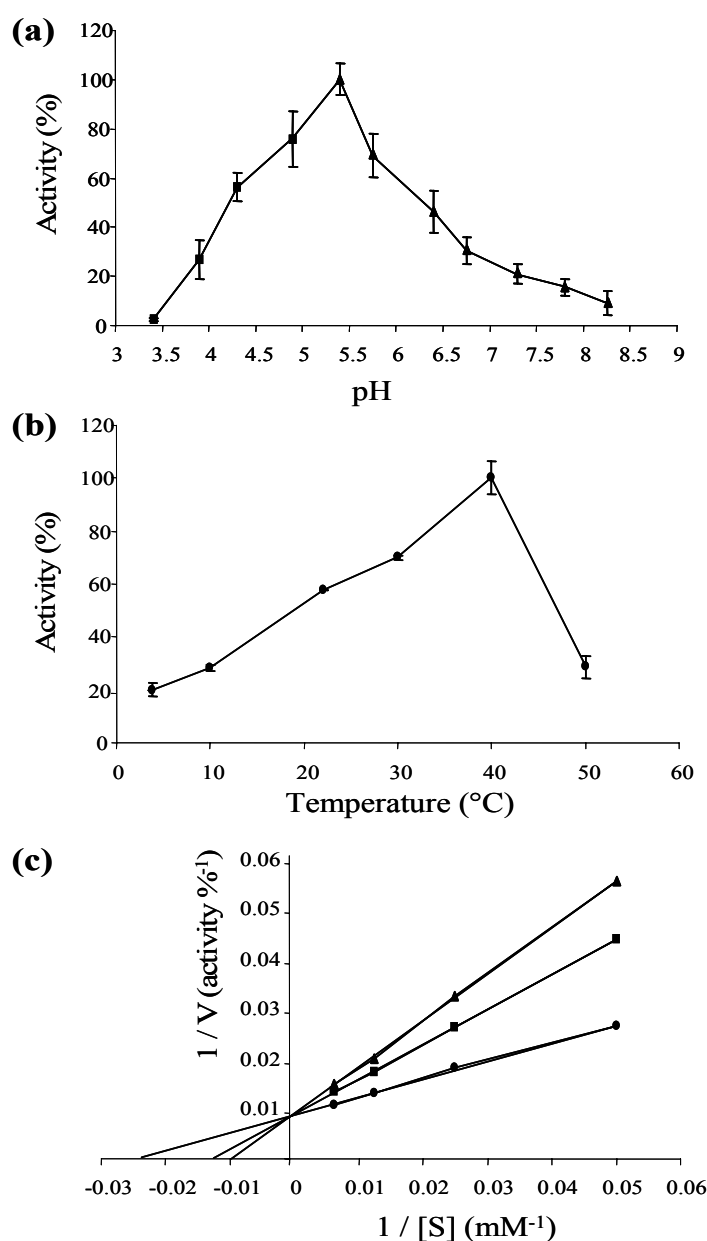


Figure 33: Properties of the *Pichia pastoris* expressed recombinant Lp1-FEHa. (a) Effect of pH on the activity of recombinant Lp1-FEHa. Lp1-FEHa was incubated for 1 h with 3 mM 1,1-kestotetraose at different pH values using 0.5 M sodium citrate buffer (square) and 0.5 M sodium phosphate buffer (triangle). Activity is expressed as a percentage of the maximal activity calculated as the amount of fructose released after incubation with 1,1-kestotetraose. (b) Effect of incubation temperature on the activity of recombinant Lp1-FEHa. Lp1-FEHa was incubated for 1 h with 3 mM 1,1-kestotetraose at different temperatures between 4 and 50 °C. (c) Lineweaver-Burk plots after incubation with 1,1-kestotetraose as the substrate in absence (circle) or with 2 mM

Glucose and the terminal products of fructan hydrolysis sucrose and fructose were tested as regulators of Lp1-FEHa activity. Glucose and fructose (20 mM) did not affect Lp1-FEHa activity while sucrose acted as a strong inhibitor. This inhibition reached 90% in the presence of 20 mM of sucrose in the incubation medium (Table VII). The linear relations obtained with Lineweaver-Burk plots (Figure 33) suggest that the recombinant enzyme shows typical substrate saturation kinetics with 1,1-kestotetraose as substrate and that the corresponding K_m is around 45 mM. In the presence of 2 or 4 mM (Figure 33), Lineweaver-Burk plots suggest that sucrose inhibits 1-FEH by a competitive mechanism with a K_i of 2.8.

2.5.4. Transcript levels of Lp1-FEHa and 1-FEH activity during fructan mobilisation

Plants were defoliated and 1-FEH activity, *Lp1-FEHa* transcript level as well as fructan contents were measured 24 h after defoliation in elongating leaf bases (Figure 34, control plants sprayed with water). In order to compare the expression of Lp1-FEHa with the expression of a fructan synthesising enzyme, sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) activity and *Lp1-SST* (EMBL accession no. AY245431) (Chalmers *et al.*, 2003) transcript level were also followed. As expected, defoliation induced a decrease in 1-SST activity and *Lp1-SST* transcript level, simultaneously with the decrease in fructan level. Surprisingly, both 1-FEH activity and *Lp1-FEHa* transcript level also decreased following defoliation. In order to assess whether the inhibition of both *Lp1-FEHa* and *Lp1-SST* gene expression was linked to the sugar status, glucose, fructose and sucrose were sprayed on cut leaves several times during the first 24 h following defoliation. The supply of glucose and fructose but not of sucrose prevented the decrease of *Lp1-FEHa* transcript level without altering the decrease of 1-FEH activity. Similarly, the supply of sugars led to a reduction of the decrease of *Lp1-SST* transcript level without altering the decrease of 1-SST activity. Thus, after 24 hours of regrowth, *Lp1-FEHa* and *Lp1-SST* transcript levels were higher in defoliated plants treated with monosaccharides than in control plants treated with water.

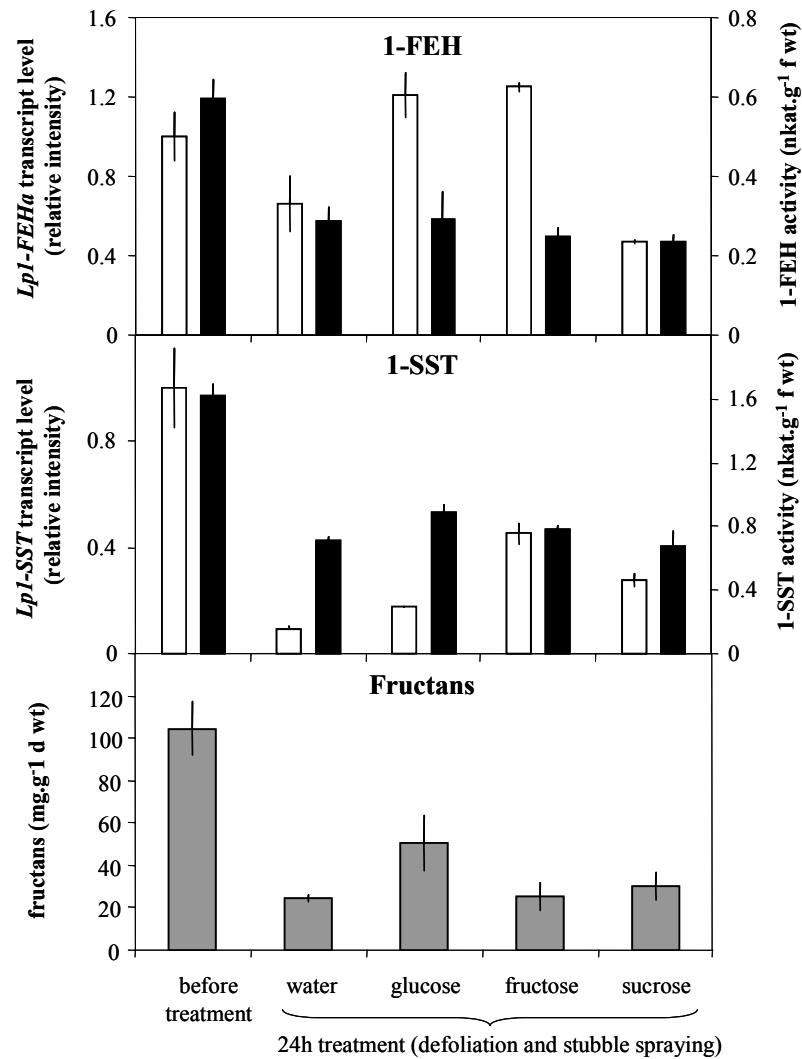


Figure 34: Real time qPCR analysis of *Lp1-FEHa* and *Lp1-SST* expression (white bars), 1-FEH (fructose released after incubation with inulin from chicory roots) and sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) activities (black bars), and fructan levels (grey bars) in elongating leaf bases of *Lolium perenne*. Plants grown for 8 weeks were further subjected to defoliation and exogenous sugars were supplied by spraying the cut leaves with water, glucose (200 mM), fructose (200 mM) or sucrose (100 mM) several times during the first 24 h of regrowth. The data are means of three replicates. Expression levels produced by real-time qPCR are expressed as a ratio relative to the control point (before treatment). Vertical bars indicate SD when larger than the symbol.

2.5.5. Transcript levels of *Lp1-FEHa* and *1-FEH* activity during fructan accumulation

The data presented in Figure 35 were obtained from the same plants as those used by Lasseur *et al.* (2006). After several time intervals, shoots of control and treated plants, which were continuously illuminated in order to induce fructan accumulation, were harvested and dissected into leaf blades, leaf sheaths and elongating leaf bases (Figure 35). Initial *in vitro* 1-FEH activity was low but present in the three harvested tissues (Figure 35). Unexpectedly, the 1-FEH activity increased gradually in elongating leaf bases and in leaf sheaths during the treatment while it was only slightly increased in leaf blades after 48 h of treatment. In leaf sheaths and in elongating leaf bases, level of *Lp1-FEHa* transcripts was also increased after 24 h of illumination and remained higher than in control plants thereafter. In leaf blades, level of *Lp1-FEHa* transcripts strongly increased between 6 and 24 h after the beginning of treatment and decreased between 48 and 72 h. In control plants, *Lp1-FEHa* transcripts are higher in the four basal cms of the elongating leaf than in upper segments (Figure 35).

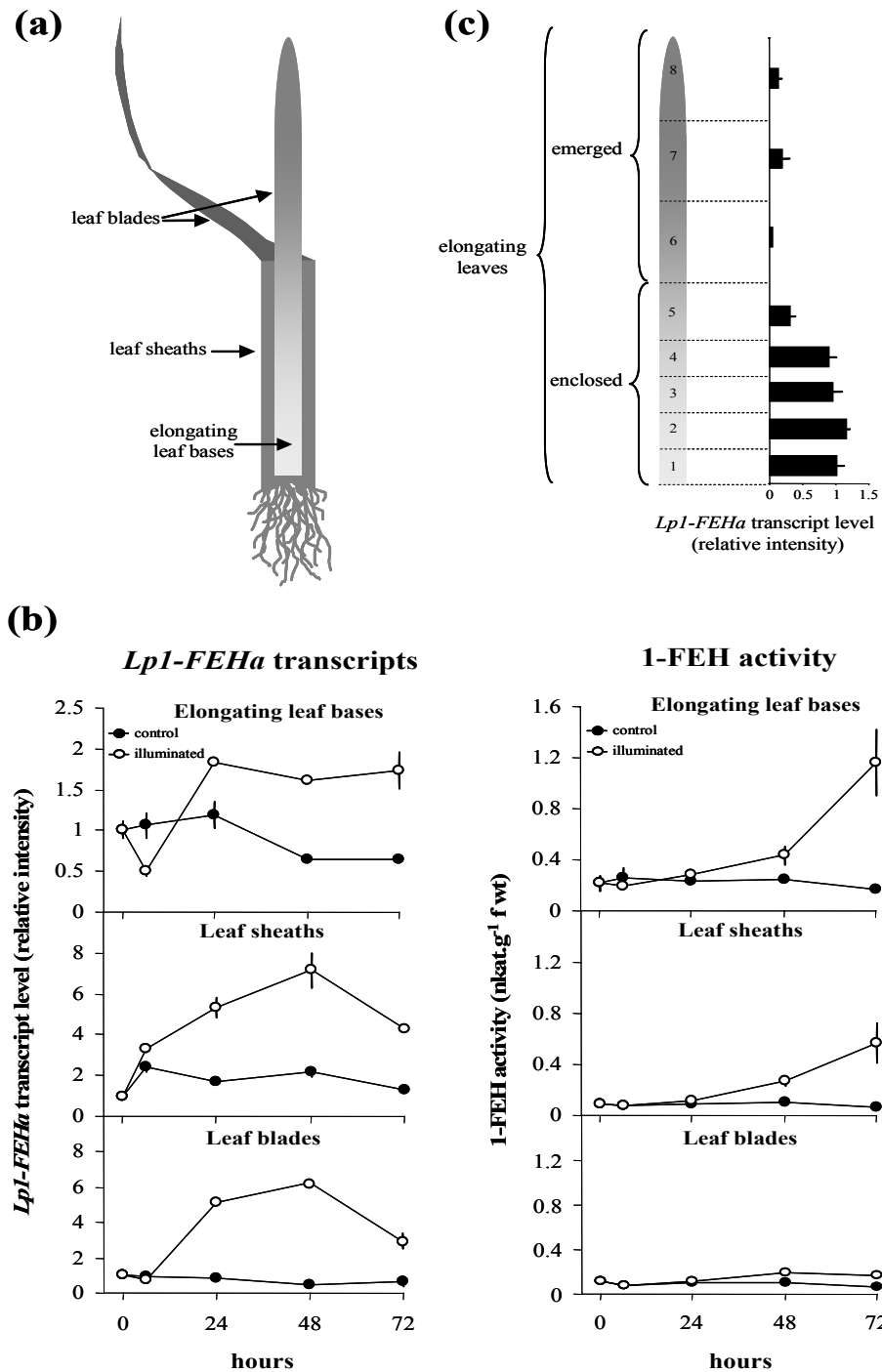


Figure 35: Real time qPCR analysis of *Lp1-FEHa* expression and 1-FEH activity (fructose released after incubation with inulin from chicory roots) in elongating leaf bases, leaf sheath and leaf blades of *Lolium perenne*. (a) Schematic view of the dissected tissues. (b) 1-FEH activities and *Lp1-FEHa* transcript levels. (c) *Lp1-FEHa* transcript levels in segments of elongating leaves at the beginning of treatment (0 h). Plants were grown for 8 weeks with a photoperiod of 16 h at day/night temperatures of 22/18°C were further subjected to the same conditions (control plants) or to continuous light with roots at 4°C (illuminated plants) for 72 h. The data are means of three replicates. Expression levels produced by real-time qPCR are expressed as a ratio relative to the control point, i.e. 0 hour for (b) and segment 1 for (c). Vertical bars indicate SD when larger than the symbol.

2.6 Discussion

2.6.1. Nucleotidic sequence of *Lp1-FEHa* transcripts and deduced amino acid sequence of protein

The *Lp1-FEHa* cDNA encodes an ORF of 1755 nucleotides and a 3' UTR of 241 nucleotides. The second smaller transcript (*Lp1-FEHa-S*) could be an artefact derived from hybridisation of oligo-dT primer to the internal AAAAA sequence during cDNA synthesis or the product of the same gene but obtained by alternative usage of two polyadenylation sites (Figure 28). The second possibility has been shown for another glycosyl hydrolase, the cell-wall invertase gene (*Incwl*) from maize (Cheng *et al.*, 1999). Indeed, transcriptional induction of the *Incwl* gene is associated with two mRNAs which differ by the length of the 3' UTR and which have relative abundance depending on the metabolic status of sugars (Cheng *et al.*, 1999). These data are of particular interest since FEHs are supposed to be derived from cell wall invertases (Van Laere and Van den Ende, 2002). Consequently, the sequence characteristics of the 3' UTR of *Lp1-FEHa* mRNAs could indicate that *L. perenne* possesses a post-transcriptional regulatory mechanism for the *Lp1-FEHa* gene.

The *Lp1-FEHa* deduced protein sequence contains the three conserved motifs ND₂₅PSG, FRD₁₅₀P and WE₂₀₅CPD of Glycoside Hydrolase Family 32. Asp 25 probably acts as nucleophile and Glc 205 as a proton donor. Signal3P software predicts that *Lp1-FEHa* has a hydrophobic N-terminal signal sequence of 22 amino acids required for cotranslational insertion in the endoplasmic reticulum (Bendtsen *et al.*, 2004). This signal peptide is followed by a propeptide estimated at 20 amino acids by subtraction with the estimated length of mature enzyme based on the N-terminal sequence of other 1-FEH mature proteins (Van den Ende *et al.*, 2001; Van den Ende *et al.*, 2003a). Such propeptides are known to be a signal for targeting proteins to the vacuole and to aid folding of proteins into three-dimensional structures (Valls *et al.*, 1990; Winther and Sorensen, 1991). It should be noted, however, that the function of these propeptides have never been investigated in 1-FEHs or cell-wall type invertases.

2.6.2. Gene mapping

The *Lp1-FEHa* cDNA shows 78 % identity to *LpFEH*, a putative FEH cDNA from *L. perenne* (DQ073968; Chalmers *et al.*, 2005) and 75% identity to wheat *1-FEH w2* (Figure 29). We designed the *Lp1FEHs* and the *Lp1FEHas* primers used for mapping so that they amplified the *Lp1-FEHa* gene but not the *LpFEH* gene from Chalmers *et al.* (2005). We mapped *Lp1-FEHa* gene at a distal position on the linkage groupe 3 of *L. perenne* as for the *LpFEH* and the fructosyltransferase gene *LpFT4* (Chalmers *et al.*, 2005). Differences (SNP and In/Del) are present at the *Lp1FEHs* and *Lp1FEHas* primer locations (data not shown). Furthermore, the level of differentiation between *LpFEH* and *Lp1-FEHa* confirms that they should be paralogous genes rather than alleles of the same gene. So, the distal part of LG3 in perennial ryegrass seems to contain several genes involved in the fructan metabolism. The syntenicity in this region between perennial ryegrass and wheat is known to be well conserved (Alm *et al.*, 2003) and effectively, we found that *Lp1-FEHa* cDNA sequence is close (Bit score: 353) to the wheat EST sequence BE443203 (396 bp) which is mapped on the long arm of linkage group 3 corresponding to the LG3 of *Lolium*. Furthermore, it is also close (Bit score: 266) to the wheat EST sequence BE488501 (359 bp) which is mapped on the short arm of linkage group 6 (<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/>) indicating that we could expect another fructan metabolism gene in the corresponding region in ryegrass. Since fructans provide a readily available source of energy for grazing ruminants and since high-fructan content has been associated with improved drought survival in grasses (Volaire and Lelievre, 1997) and regrowth after defoliation in *Lolium* (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a), the chromosomal location of genes implicated in fructan metabolism could be a useful tool in future breeding programmes. None of the water soluble carbohydrate (WSC) quantitative trait loci (QTL) identified by (Turner *et al.*, 2006) co-locates with the *Lp1-FEHa* loci while it is close to the pWSC sp-gh-02 QTL identified by (Cogan *et al.*, 2005). This absence of co-location between *Lp1-FEHa* and a known WSC QTL could be due to the populations used and/or the effect of the gene.

2.6.3. Enzymatic properties

The recombinant enzyme preferentially degrades β -(2,1) linkages in lower DP inulin-type and neoseris inulin-type fructans while its activity is very low against sucrose and

levan-type fructans. Therefore, the enzyme is classified as a 1-FEH or fructan β -(2,1) fructosidase (EC 3.2.1.153). The Lp1-FEHa substrate specificity is in accordance with the nature of low DP fructans found in *L. perenne* mainly composed of inulin or inulin neoseries type oligosaccharides (Pavis *et al.*, 2001b). Interestingly, Lp1-FEHa seems to be able to degrade 1,1-kestotetraose (DP4) at a faster rate than the 1-kestotriose and 6G-kestotriose (DP3). This preference might allow the Lp1-FEHa to first hydrolyse fructans without producing sucrose, which would otherwise inhibit further reaction. The β -(2,6) linkages which are predominant in higher DP levan neoseries type fructans in *L. perenne*, are probably not hydrolyzed by 1-FEHs. Instead, they might be degraded by specific 6-FEHs (Marx *et al.*, 1997b). The pH optimum of Lp1-FEHa is close to 5.5 according to data obtained from wheat 1-FEH w1 and w2 and *L. perenne* 6-FEH (Marx *et al.*, 1997b; Van den Ende *et al.*, 2003a). Optimal temperature is close to 40°C but Lp1-FEHa still shows considerable activity in the lower temperature range allowing it to be active during the cold season. Similar properties were observed for purified wheat 1-FEH (Van den Ende *et al.*, 2003a) and *L. perenne* 6-FEH (Marx *et al.*, 1997b). Contrary to purified *L. perenne* 6-FEH which show still 90% of its maximum activity at 50°C (Marx *et al.*, 1997b), the recombinant Lp1-FEHa only shows 20% of its maximum activity at 50°C. The fact that sucrose is not a substrate for Lp1-FEHa but acts as a strong competitive inhibitor indicates that sucrose is bound in the active site of the enzyme without being hydrolyzed. This inhibition by sucrose was observed for most plant FEHs purified so far (Yamamoto and Mino, 1985; Simpson *et al.*, 1991; Bonnett and Simpson, 1993; Marx *et al.*, 1997b; Van den Ende *et al.*, 2000; Van den Ende *et al.*, 2003a). For the 1-FEH of barley (Henson and Livingston, 1996) and of Jerusalem artichoke (Edelman and Jefford, 1968) sucrose is a non competitive inhibitor while, here, it act as a competitive inhibitor of Lp1-FEHa.

2.6.4. Subcellular localization

It is commonly accepted that fructans and fructan metabolizing enzymes are located in the vacuole (Wagner *et al.*, 1983; Wiemken *et al.*, 1986). Recently, a 6-FEH of *Arabidopsis* firstly identified as an invertase has been found in the vacuole proteom (Carter *et al.*, 2004; De Conink *et al.*, 2005). However, fructans and fructan hydrolyzing activities were also reported outside the vacuole, in the apoplast (Livingston and Henson, 1998) and in phloem sap (Wang and Nobel, 1998) of fructan accumulating plants. The predicted hydrophobic N-

terminal signal sequence (Figure 29) suggests that the proprotein Lp1-FEHa enters the endoplasmic reticulum from where it could be secreted to the apoplast or directed towards the vacuole (Vitale and Hinz, 2005).

Lp1-FEHa, as the other FEHs, shows a higher homology to cell wall than to vacuolar invertase (Figure 30), and it has been proposed that fructan exohydrolysing enzymes derived from the cell wall invertase ancestors (Van den Ende *et al.*, 2002). However, the low pI of Lp1-FEHa (5.22) is more in favour of vacuolar targeting since apoplastic enzymes often have a high pI to bind the cell wall (Ramloch-Lorenz *et al.*, 1993; Van den Ende *et al.*, 2000).

2.6.5. Putative function for *Lp1-FEHa* in leaves

In some C3 grasses, large fructan stores are deposited temporary at the base of elongating leaves and in mature leaf sheaths (Schnyder and Nelson, 1989; Lüscher and Nelson, 1995; Roth *et al.*, 1997; Pavis *et al.*, 2001b). Moreover, accumulation of large quantities of fructans can be induced in those heterotrophic tissues of C3 grasses by cooling the roots and continuously illuminating the shoots (Smouter and Simpson, 1991a; Guerrand *et al.*, 1996; Pavis *et al.*, 2001b; Wei and Chatterton, 2001b; Lasseur *et al.*, 2006). This accumulation is at least partly due to an induction of fructan synthesis enzymes at the transcriptional level (Lasseur *et al.*, 2006). Surprisingly, our results show that *Lp1-FEHa* gene expression and 1-FEH activity also increased in leaf sheaths and in elongating leaf bases during illumination (Figure 35). The fact that *Lp1-FEHa* transcript level followed 1-FEH activity indicates that even if 1-FEH activity is probably the result of different 1-FEH isoforms as it is the case in wheat (Van den Ende *et al.*, 2003a), the Lp1-FEHa isoform represents probably a major part of 1-FEH activity in perennial ryegrass leaves. *Lp1-FEHa* transcript level and 1-FEH activity also evolved similarly with *Lp1-SST* transcript level and 1-SST activity, in conditions where fructans are degraded. Indeed, transcript levels and activities both decreased during the first day after defoliation (Figure 34), while the whole FEH activity against native fructans increased during the same period (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Such cases of co-existence of fructan synthesis and hydrolysing enzyme activities in grass leaves have often been reported (Wagner and Wiemken, 1989; Prud'homme *et al.*, 1992; Wang and Tillberg, 1996; Roth *et al.*, 1997; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Here we show that for 1-SST and 1-FEH, this co-existence is probably due to a co-regulation at the

transcriptionnal level. If those enzymes are vacuolar and located in the same cell types, both fructan biosynthetic and breakdown enzymes are liable to operate simultaneously in grass leaf cells. This apparent contradiction could be considered in two ways: (i) hydrolysing activities observed *in vitro* are inhibited *in vivo* and do not act during fructan synthesis or (ii) hydrolysing activities are active *in vivo*.

Concerning the first hypothesis, inactivation of fructan hydrolysing enzymes during period of active fructan biosynthesis could be obtained by interaction with a protein inhibitor as it is the case for invertases (Rausch and Greiner, 2004). FEH activity could also be inhibited by sucrose which accumulates in leaves during illumination treatment (Lasseur *et al.*, 2006) and is a strong inhibitor of most plant FEHs purified so far (Yamamoto and Mino, 1985; Simpson *et al.*, 1991; Bonnett and Simpson, 1993; Bonnett and Simpson, 1995; Marx *et al.*, 1997b; Van den Ende *et al.*, 2000; Van den Ende *et al.*, 2003a). In this context, specific FEH isoforms could act as “standby” enzymes, i.e. ready to operate but largely inhibited when sucrose concentration is high, as previously suggested (Van den Ende *et al.*, 2003a). This type of regulation would allow a quick adjustment of the fructan pool size in accordance to the source/sink status modification. Lp1-FEHa could have been a good candidate for such a “standby” enzyme since its transcript level increased simultaneously with the transcript levels of fructan biosynthetic enzymes and since the Lp1-FEHa protein is strongly inhibited by sucrose (Figure 33). According to this hypothesis, the decrease of sucrose level induced by defoliation in elongating leaf bases (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a) should almost immediately activate this 1-FEH. However, our results are not in favour of this hypothesis, since 1-FEH activity did not increase but decrease after defoliation (Figure 34).

According to the second hypothesis, both synthesis and hydrolysis of fructans operate during fructan accumulation *in vivo*. Indeed, besides their main role during fructan mobilisation, FEHs might be involved in β -(2,1) trimming, a mechanism which has been reported during active fructan biosynthesis in monocots (Rocher, 1967; Bancal *et al.*, 1992; Van den Ende *et al.*, 2003a). This trimming mechanism could partly explain the species-specific fructan patterns in grasses. In *L. perenne*, there is a majority of β -(2,1) linkages in low DP fructans while β -(2,6) linkages are predominant in high DP fructans (Pavis *et al.*, 2001b). The limitation of high DP β -(2,1) linked fructan accumulation in *L. perenne* could be explained by a β -(2,1) trimmer. The Lp1-FEHa described here is a good candidate for β -(2,1) trimming since (i) it is co-expressed with 1-SST and (ii) the corresponding cDNA sequence

presents 89% homology with the wheat *1-FEH w2* cDNA (AJ508387) which seems to have a β -(2,1) trimmer activity during active fructan biosynthesis (Van den Ende *et al.*, 2003a). The role of fructan trimming might be of physiological importance in elongating leaf bases. The active fructan synthesis occurring in the leaf growth zone, composed of cells in division and in elongation has been proposed to allow phloem unloading by retrieving sucrose from cytosol (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Moreover, fructan synthesis and preferentially low DP fructans, in elongating cells could also help to maintain a low osmotic potential needed for water import, which drives cell expansion. This might imply a trimming process involving specific FEHs, such as *Lp1-FEHa*. Indeed, *Lp1-FEHa* transcripts are the highest in the first four cms of the elongating leaf bases corresponding to the leaf growth zone (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Besides, the increase of both *Lp1-FEHa* and *Lp1-SST* transcript levels induced by monosaccharide supply after defoliation suggests that those sugars are implicated in the regulation of *Lp1-FEHa* and *Lp1-SST* gene expression. Further research is needed to determine whether sugar sensing mechanisms are involved, as it has been shown for a number of genes (Rolland *et al.*, 2006) including a fructan biosynthetic gene from barley (Müller *et al.*, 2000).

2.7 Conclusion

In this study, a cDNA termed *Lp1-FEHa*, encoding a genuine 1-FEH from perennial ryegrass, has been cloned, characterized and mapped. Since both *Lp1-FEHa* gene transcription and 1-FEH activity are up-regulated in heterotrophic leaf tissues during period of active fructan biosynthesis and down-regulated during period of active fructan breakdown, we suggest that *Lp1-FEHa* functions as a β -(2,1) trimming enzyme acting in concert with fructan synthesis enzymes. Thus our results suggest that in breeding for high fructan ryegrass, research should not only focus on genes coding for fructan synthesis enzymes but also on genes coding for breakdown enzymes like *Lp1-FEHa*. Cloning and characterization of other 1-FEH isozymes as well as 6-FEH genes in *L. perenne* will help to enhance our understanding on fructan metabolism and carbon fluxes in perennial ryegrass.

Acknowledgements

We thank Philippe Cormenier from the INRA-UGAPF of Lusignan (France) for his technical assistance in gene mapping.

3. Article III: Cloning and functional analysis of a fructan 6-exohydrolase (6-FEH) from *Lolium perenne*. Post transcriptional mechanisms for regulation of FEH activity involved in fructan mobilization after defoliation in grass species?

Authors:

Jérémy Lothier¹, Bertrand Lasseur¹, André Van Laere², Marie-Pascale Prud'homme¹, Wim Van den Ende², Annette Morvan-Bertrand¹.

Addresses:

¹UMR INRA-UCBN 950 EVA Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritons NCS, Université de Caen, Esplanade de la Paix, 14032 Caen cedex, France.

²Department of Biology, Laboratory for Molecular Plant Physiology, Institute of Botany and Microbiology, K.U.Leuven, Kasteelpark Arenberg 31, B-3001 Leuven, Belgium.

3.1 Résumé

Les fructanes, polymères de fructose liés en β -(2,1) et/ou β -(2,6), représentent la forme majeure de stockage de glucides chez 15% des espèces de végétaux supérieurs. Chez *Lolium perenne* L., espèce fourragère dominante des prairies, les fructanes sont mobilisés *via* des fructane exohydrolases (FEHs) pour permettre la repousse après la défoliation. Dans cette étude, nous décrivons le clonage et l'analyse fonctionnelle de la première 6-FEH (EC 3.2.1.154) de *Lolium perenne* L. var. Bravo. Le criblage d'une banque d'ADNc de ray-grass anglais a permis de cloner l'ADNc codant une 6-FEH appelée *Lp6-FEHa*. La protéine Lp6-FEHa déduite a un faible point isoélectrique (5,52). La caractérisation fonctionnelle de la protéine recombinante dans *Pichia pastoris* a mis en évidence une activité FEH plus élevée envers les fructanes liés en β -(2,6) que ceux liés en β -(2,1). Comme pour les autres FEHs, aucune activité hydrolase n'a été détectée envers le saccharose démontrant clairement que l'enzyme n'est pas une invertase. Suite à la défoliation, au cours de la dégradation des fructanes, l'analyse du profil d'expression a montré que le niveau de transcrits *Lp6-FEHa* diminue alors que l'activité FEH augmente. Par comparaison, les niveaux de transcrits de gènes codant des fructosyltransferases (FTs) impliquées dans la biosynthèse des fructanes diminuent également après la défoliation mais plus rapidement que le niveau de transcrits *Lp6-FEHa*. Nos résultats suggèrent que chez les Poacées prairiales défoliées, les gènes des *FEHs* et des *FTs* sont co-régulés au niveau transcriptionnel alors que d'autres mécanismes modulent l'activité FEH, probablement en agissant sur la stabilité des ARNm.

3.2 Abstract

Fructans, which are β -(2,1) and/or β -(2,6) linked polymers of fructose, are the main carbohydrate storage in 15% of flowering plant species. In *Lolium perenne* L. a major forage grass species, they are mobilized *via* fructan exohydrolases (FEHs) to sustain regrowth following defoliation. In this report, we describe the cloning and functional analysis of the first 6-FEH (EC 3.2.1.154) from *Lolium perenne* L. var. Bravo. By screening a perennial ryegrass cDNA library, a 6-FEH cDNA named *Lp6-FEHa* was cloned. The Lp6-FEHa deduced protein has a low iso-electric point (5.52) and it groups together with plant FEHs and cell-wall type invertases. Functional characterization of the recombinant protein in *Pichia pastoris* demonstrated that it had higher FEH activity towards β -(2,6) than towards β -(2,1) linked fructans. Like other fructan-plant FEHs, no hydrolase activity could be detected towards sucrose, convincingly demonstrating that the enzyme is not a classic invertase. Following defoliation, during fructan breakdown, the expression pattern analysis showed that *Lp6-FEHa* transcript level decreased when FEH activity increased. In comparison, transcript levels of genes coding for fructosyltransferases (FTs) involved in fructan biosynthesis also decreased after defoliation but much faster than *Lp6-FEHa* transcript level. Our results suggest that in defoliated grasses *FEH* and *FT* genes are co-regulated at the transcriptional level while other mechanisms modulate FEH activity, presumably acting on mRNA stability.

Key words: fructan biosynthesis, fructan exohydrolase, defoliation, *Lolium perenne*, *Pichia pastoris*.

3.3 Introduction

Fructans, water soluble fructose based oligo and polysaccharides, are the major reserve carbohydrates in 15% of flowering plant species (Hendry, 1993). The size and the glycosidic linkages of fructans vary markedly between and within fructan accumulating plant species. Dicotyledonous plants are considered to contain mainly β -(2,1) glycosidic linkages whilst monocotyledonous species accumulate both β -(2,1) and β -(2,6) linked fructans with a higher proportion of β -(2,6) linkages (Chatterton *et al.*, 1990; Cairns and Ashton, 1993; Livingston *et al.*, 1993). Beside an obvious function as reserve in plants, fructans can increase the tolerance to cold and drought stress (Pilon-Smits *et al.*, 1999; Konstantinova *et al.*, 2002), most probably by stabilizing plant membranes (Hinch *et al.*, 2002; Vereyken *et al.*, 2003).

In grasses and cereals, during vegetative stage, fructans are mainly stored in the tiller bases composed by leaf sheaths and elongating leaf bases (Volenc, 1986; Schnyder and Nelson, 1987). Fructans biosynthesis is derived from sucrose and involves four fructosyltransferase (FT) activities. Sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99) and fructan : fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) produce β -(2,1) linked fructans (Van Laere and Van Den Ende, 2002). Fructan : sucrose 6-fructosyltransferase (6-SFT) produces β -(2,6) linked fructans (Sprenger *et al.*, 1995) and fructan : fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT) synthesizes fructan neoseries which are based on the linkage of fructosyl residues on both C1 and C6 of the glucosyl residues from sucrose (Shiomi, 1981).

Fructan mobilization occurs when energy and carbon skeletons are needed such as following defoliation until the restoration of adequate photosynthetic capacity (Prud'homme *et al.*, 1992; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Fructans can also be mobilized during leaf senescence in summer dormant pasture grasses (Ballard *et al.*, 1990). During reproductive stage, fructans are also found in stems, where their mobilization contributes to grain filling (Pollock and Cairns, 1991; Schnyder, 1993).

Fructan breakdown is catalyzed by different kinds of fructan exohydrolases (FEHs). Fructan 1-exohydrolases (1-FEH) (EC 3.2.1.153) and fructan 6-exohydrolases (6-FEH) (EC 3.2.1.154) preferentially degrade β -(2,1) and β -(2,6) linked fructans, respectively.

In Poaceae, 1-FEHs have been purified to homogeneity from barley (Henson et al., 1998) and wheat (Van den Ende *et al.*, 2003a) and cDNAs of 1-FEH isoforms have been recently cloned from wheat (Van den Ende *et al.*, 2003a), barley (Nagaraj *et al.*, 2005) and perennial ryegrass (Lothier *et al.*, 2007). 6-FEHs have been purified to homogeneity from oat (Henson and Livingston, 1996), perennial ryegrass (Marx *et al.*, 1997b) and wheat (Van den Ende *et al.*, 2005; Van Riet *et al.*, 2006) and three cDNAs of 6-FEHs have been cloned from wheat (Van den Ende *et al.*, 2005; Van Riet *et al.*, 2006). Another FEH type, named 6&1-FEH since it degrades both β -(2,1) and β -(2,6) linkages, has been recently identified in wheat (Kawakami *et al.*, 2005). Surprisingly, 6-FEHs from non-fructan plants have been recently purified and cloned in *Arabidopsis* (De Coninck *et al.*, 2005) and *Beta vulgaris* (Van den Ende *et al.*, 2003b). Authors suggest that those 6-FEHs are part of the plant defense system against bacterial or fungal pathogens.

Regulation of fructan pool size is the result of the balance between biosynthesis and degradation (Wagner and Wiemken, 1986, 1989; Roth *et al.*, 1997). Following defoliation, in *Lolium perenne*, a decrease of fructosyltransferase activities and a rise up of total FEH activity measured against native fructans are observed concomitantly with fructan mobilization in tiller bases (Yamamoto and Mino, 1987; Marx *et al.*, 1997b; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Since perennial ryegrass contains a high proportion of β -(2,6) linked fructans but also β -(2,1) linked fructans (Pavis *et al.*, 2001b), both 6-FEH and 1-FEH activities are supposed to increase in the tissues left behind defoliation. Indeed, Marx *et al.*, (1997b) observed an increase of 1-FEH activity (measured against 1,1-kestotetraose) and also of 6-FEH activity (measured against 6,6-kestotetraose) in stubble and roots of *Lolium perenne* after 26 hours of regrowth. By contrast, we noticed a decreased of 1-FEH activity measured against inulin after defoliation (Lothier *et al.*, 2007). Together, these results indicate that 1-FEH activities related to low or high DP fructans are probably due to different 1-FEH isoforms, and that it is the low DP fructans 1-FEH activity which seems to be of more importance in *L. perenne* after defoliation. Knowing that β -(2,6) linkages are predominant in *L. perenne* fructans, 6-FEHs are probably the main enzymes involved in fructan mobilization after defoliation in this species.

Although that fructan breakdown is crucial for grass perennity, the mechanisms of FEH induction are still largely unknown. Since sucrose is a strong inhibitor of FEHs *in vitro*, Marx *et al.* (1997b) suggested that the decrease of sucrose level after defoliation could lead to the

increase of FEH activity in ryegrass. However, other studies showed that this mechanism does not fully explain the increase of FEH activity following defoliation since this increase is also observed *in vitro* when sucrose is removed from protein extract (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Moreover, in orchardgrass 6-FEH activity increased after defoliation as a result of *de novo* protein synthesis (Yamamoto and Mino, 1989). In chicory roots, the transcript level of one of the two known 1-FEH isoforms increased after defoliation while the transcript level of the other one remains at a constant low level (Van den Ende *et al.*, 2001). We have shown that in perennial ryegrass, transcript level of a 1-FEH isoform (*Lp1-FEHa*) decreased after defoliation together with the decrease of 1-FEH activity measured against inulin (Lothier *et al.*, 2007). All together, these data suggest that, following defoliation, FEH expression may be controlled at the transcriptional and post-transcriptional level and that the different FEH isoforms could be differentially regulated.

Even if 6-FEHs are obviously key enzymes that allow perennity of forage species, cDNAs coding for 6-FEHs from grass species subjected to defoliation have never been cloned. This lack of tools makes investigation on 6-FEH regulation at the transcriptional level impossible. Thus, as a contribution to understand the complex regulation of fructan breakdown in defoliated grass species, a cDNA coding for a 6-FEH and named *Lp6-FEHa* was cloned from perennial ryegrass (*Lolium perenne*), a major forage grass of temperate areas. The activity of recombinant protein was confirmed by heterologous expression in *Pichia pastoris* and a transcriptional analysis was performed following defoliation. For comparison the effects of defoliation on transcript levels of *Lp1-FEHa* and of the three available *Lolium perenne* FT genes (*Lp1-SST*, *Lp6G-FFT*, *Lp6SFT*) were also investigated.

3.4 Materials and methods

3.4.1. Plant material

Seeds of *Lolium perenne* L. var Bravo were germinated in 9 L pots and grown hydroponically during eight weeks on a nutrient solution as previously described by Prud'homme *et al.* (1992). The nutrient solution was aerated continuously and replaced every week. Plants were grown in a greenhouse with day to night temperatures of 22 to 18°C and a

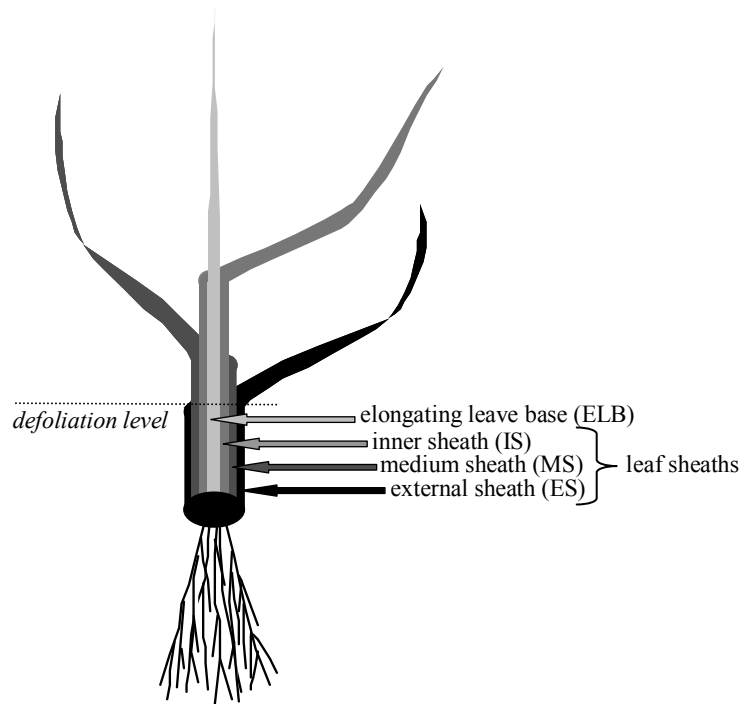


Figure 36: Schematic view of a *Lolium perenne* (perennial ryegrass) tiller. For results shown in (Figures 40 et 41) elongating leaf bases (ELB), and mature leaf sheaths decomposed in inner sheaths (IS), medium sheaths (MS) and external sheaths (ES) were dissected. For results shown in (Figure) elongating leaf bases and mature leaf sheaths were dissected.

photoperiod of 16 h of natural light supplemented by a photosynthetic photon flux density of $110 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Phyto tubes, Claude, GTE, France).

Experiment began when plants were 8 weeks old. On time 0, all plants were defoliated at 9:00 AM (3 h after light on) at 4.5 cm above ground and plants of one pot were harvested (“T0”). Plants of the two other pots were harvested at T0 + 12 hours and T0 + 24 hours and elongating leaf bases, and mature leaf sheaths decomposed in inner sheaths, medium sheaths and external sheaths were dissected (Figure 36).

For exogenous sugar supply experiment, all plants were defoliated at 9:00 AM (3 h after light on) at 4.5 cm above ground and plants of one pot were harvested (“before treatment”). Plants of the four other pots were treated separately but simultaneously with the following solutions all including 0.1 % (V:V) Tween 20 but containing either water, 200 mM glucose, 200 mM fructose or 100 mM sucrose. Treatments were applied by spraying 24 times 25 mL of each solution every 30 min from 9:00 AM to 2:00 PM, every hour from 02:00 PM to 12 PM and at 01:30 AM, 04:00 AM and 06:00 AM. After 24 h of regrowth (09:00 AM, day 1) every pot were harvested and elongating leaf bases, and mature leaf sheaths were dissected.

Sampling was done in triplicate. One part of the harvested tissues was used immediately for enzyme activity determinations whereas the remainder was frozen and stored at -80°C for RNA and water soluble carbohydrates (WSC) analysis.

3.4.2. Preparation and screening of *L. perenne* cDNA library

Stubble (composed by leaf sheaths and elongating leaf bases) of 8 week old plants defoliated since 12h (1.5 g fresh weight) was ground in liquid nitrogen. Powder obtained was used to purify poly (A⁺) RNA with Dynabeads oligo (dT)₂₅ kit (Dyna, France) by following manufacturer’s recommendation. Double stranded cDNA was synthesized from poly (A⁺) RNA and a cDNA library was constructed using a Lambda-Zap cDNA library kit and the Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene, France). The cDNA library was screened with a probe generously gifted by Dr M. Yoshida and Dr T. Yamada (National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Japan). The probe was labeled with [α -³²P] dCTP by using random priming method with NEBlot kit (Biolabs, France). Membranes were hybridized overnight at 42°C and washed twice in 2 SSC, SDS 0.5% (w/v), for 15 minutes at room

temperature, then rinsed two times in the same buffer at 56°C. After three rounds of purification, positive clones were excised and recircularised in a pBluescript vector (Stratagene, USA). Sequencing of positive clones was performed by Genome Express (France). A partial cDNA *Lp6-FEHa* was cloned.

3.4.3. cDNA 5' cloning

In order to clone the missing 5' part of the cDNA obtained, RNA was isolated from stubble of 8 week old plants using the RNeasy plant mini kit (Qiagen, France) coupled to a DNase treatment (Qiagen, France). RNA was quantified using a 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 (Biorad, France). Four PCR reactions were performed on cDNA using sense primers FEHA (5'-ATGGCCCAAGCTTGGGCCTT-3'), FEHB (5'-ATGGCCCAAGCCTGGGCCTT-3'), FEHC (5'-ATGGCNCAAGCNTGGGCCTT-3'), FEHD (5'-ATGGCNCAAGCNTGGGCNTT-3') based on the conserved amino acid sequences MAQAWAF found in wheat and barley 1-FEH (accession no. AJ508387 and AJ605333) and antisense primer FEH6-1 (5'-GCACGAAGGCTGCGCTGTTC-3') based on the 3' UTR *Lp1-FEHa* partial cDNA sequence. One clear band appeared at this stage with FEHD and FEH6-1 primers. PCR products were sequenced and found to match exactly with *Lp6-FEHa* partial cDNA sequence.

3.4.4. Expression in *Pichia pastoris*

To construct the expression plasmid *PICLp6FEH*, containing the mature protein part, PCR was done with PICFEHs (5'-GATCCGGCCCAGCCGGCCGGAAGTCCCCTCCATTGCC-3') and PICFEHas (5'-GATCCCCGCGGTCAACCCTTATTCACATTCAC-3') primers with adaptators. *Sfi*I and *Sac*II restriction sites are indicated in bold in the primers. PCR was performed with proofreading *Pfu* DNA polymerase (Promega, France). The PCR program was as follows: 95 °C for 5 min followed by 30 cycles of 95 °C for 20 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 5 min, and then a single 72 °C for 9 min. PCR products and pPICZalpha A (expression vector, Invitrogen, The Netherlands) were digested with restriction enzymes corresponding to

restriction sites introduced by PCR and purified with Nucleospin Extract Kit (Macherey-Nagel, Germany). The digested vector was dephosphorylated with CIAP (Stratagene, USA), and then PCR products were cloned in frame behind the alpha-factor signal of the pPICZalpha A vector. The plasmids were transformed into *Escherichia coli* competent cells as described by Van den Ende *et al.* (2001). Cells were plated on 2 x yeast tryptone (YT) medium supplemented with zeocine as a selection marker. Positive colonies were used for vector amplification. The *P. pastoris* wild-type strain X33 was transformed by electroporation with 20 µg *Pme*I-linearized *PICLp6FEH*. Transformants were selected on YPDS/zeocine plates (Invitrogen, The Netherlands). In order to produce recombinant Lp6-FEHa enzyme for characterization, a 90 mL pre-culture medium (BMGY) was inoculated with single colonies and incubated overnight at 30 °C, 200 rpm. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 20 mL of induction medium (BMMY) and incubated for 4 days at 29 °C. Methanol was replenished every day to a final concentration of 2% (v/v). Protein purification was done by following the protocol described by De Coninck *et al.* (2005).

3.4.5. Determination of enzyme activities of the *P. pastoris* expressed recombinant Lp6-FEHa

Sodium azide 0.02% (w/v) was added to all buffers to prevent microbial growth. Proteins were diluted in 50 mM Na-acetate buffer pH 5.0 and incubated with substrates for different time intervals at 30 °C. *L. perenne* high-molecular-weight fructans were prepared as described by Morvan *et al.* (1997). Briefly, fructans were extracted from stubble of 8-week old plants of *L. perenne* grown for 4 days under continuous illumination and nutrient solution at 5 °C. Fructans were extracted first with boiling 80% ethanol (4 mg g⁻¹ f. wt) for 1 h and then with boiling water (5 mg g⁻¹ f. wt) for 1 h. Both extracts were combined and the volume was reduced by rotary evaporation. The resulting concentrated extract was depigmented by an overnight contact with polyvinylpolypyrrolidone followed by centrifugation. Fructans contained in the supernatant were then separated from sucrose, glucose and fructose by passage through a gel filtration column (Sephadex G25). The remaining charged material was removed by passage through cation-exchange and anion-exchange resins (Amberlite IR120 and IRA 416, in the hydrogen and formate forms, respectively). For origins of other substrates see De Coninck *et al.*, 2005. Enzyme amounts and/or incubation times were adjusted to result in the linear production of fructose during the incubation period. Carbohydrates of the assay

Lp 6-FEHA MAQAWAFLLL-----ALFSFSQSVKSLFCGRNGEG-----SFLCTRSGE--VPSIASKR 48
Lp 1-FEHA MAQAWAFLLL-----ALFSFSQSVKSLFCGRNGEG-----SFLCTRSGE--VPSIASKR 48
Ta 661-FEHH w1 MAAMAEVLAR-----LACVFETLIGLAWCSNGER-----GFSVQSPK--APSVIRER 50
Ta 6-KEH w1 MAMAMAVQASWLQGLACIFSTLSLLQFLVRCPSNGG-----FGLFQCPSP--APSLISK 54
Ta 6-FEH MAARILPLANC-----VAFHLLCLLSVSVSPSTALR-----RLSEASSLHVHQLNG 49
At 6-FEH MAKLRANSIG-----LILLSMLLANFIT-----DEASSSHRDIN--QP 37
Bv 6-FEH MAPNNGSWILV-----LSTSMMLLSHGMIITAKDQATHHHDDHDDMLNDHQMINDDDP 54
** * * * * *
Lp 6-FEHA YRTAYHSQSPKNWIDPCBMYMYNGIYHEFYQYNPGGTIADN-----IVWGHVSVDTLIN 103
Lp 1-FEHA YRTAYHFQPLKNMNDPSCGPMYNGIYHEFYQYNPGGTIGTD-----IVWGHVSVDTLIN 106
Ta 661-FEHH w1 YRTAYHFQPPKNMNDPCGPMYNGVHEFYQYNPDGAFDNDSLMMWGHVSVDTLIN 110
Ta 6-KEH w1 YRTAYHFQPLKNMNDPCGPMYNGIYHEFYQYNPDGFSFNPN--TSYINIVWGHVSVDTLIN 113
Ta 6-FEH IRPAPHFLPAKNWINDPCGMHYNGVHYMFQYNPLGAMQV-----GNLWSGVSVDLON 106
At 6-FEH YRTGTFHQPLKNMNDPCGMHYKGIYHLFLQYNPYGAWVDV-----RIWGHSTVDLON 93
Bv 6-FEH YRTYHFQSPKNMNDPCGMHYKGIYHLFLQYQYYPVWHT-----LIVWGHSTVDLIN 110
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Lp 6-FEHA WGLEPAIVRDTPTDINGCWGSSITILPLGDQPVILYTG-RDSKDR--QSONQVILPKNRSDP 161
Lp 1-FEHA WLRELPAMVQVLTDRINGCWGTSTIINDGQPVILYTG-GDSQRV--QVONIALPKNRSDP 164
Ta 661-FEHH w1 WGLEPAIVRDTPTDINGCWGSSATILPLGVQPVILYITGLDIRKN--QVONIALPKNRSDP 169
Ta 6-KEH w1 WLTEPAIEPTDPTDINGCWGSSATIVSGDQPVILYITGVITDEKH--QVONIALPKNRSDP 172
Ta 6-FEH WDALDTALDPTAFDINGCWGSSATILPGGTIPALLYTGIDDKAEQVQVONVAFPNKPADP 166
At 6-FEH WISQPAFNPNSDPTDINGCWGSSVITLWNGKPVILYTG-IDQNGK--QVONVAFPNVNSIDP 151
Bv 6-FEH WTQCPIALSPSEYDINGCWGSSITILPQNKQPVILYTG-INNNRV--QVONIALPKNRSDP 168
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Lp 6-FEHA YLREWTKGNNDNPI-----LVPVQGLNSTFEDTGTGWIQDGLNRIATGELNG--YGAA 215
Lp 1-FEHA YLREWIKGNGNPWL-----LVPVQGLNQIRFQDGTGPDGLNRIAGVAELYG--CGAA 218
Ta 661-FEHH w1 YLREWAKVGNGNPWI-----QSVFLGLNSHPDRFTGTGWIQDGLNRIATGAEVAG--IGTA 223
Ta 6-KEH w1 YLREWTKGANNPWI-----QSVFGLNCSQFRDPTGTGWIQDGLNRIATGAQLNG--YGAA 226
Ta 6-FEH YLREWIKVPAKNPWI--PLP--ADVQPNFRDPTTAWVRGDLGNRIATAAKVQGPNGIAST 222
At 6-FEH YLREWIKSPQPNLMTTNAVNG--INPRDFRPTTAWLGRDGLNRIATGSSDTR--RGLA 207
Bv 6-FEH YLKEWIKLPQNLPMAGTPTNNNNINASSFRDPTTAWQSDGKWVRVVG--TQQCK--RGLA 225
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Lp 6-FEHA LLYKSEDFLNWTRVDHPLYSNAPSNWECBPFBAVLPG--NNGGLDLSAIPKGAH--HVL 272
Lp 1-FEHA LLYKSEDFLWTRVDHPLYSNANAMECCDPFFFAVLPG--NNGGLDLSAIPKGAH--HVL 275
Ta 661-FEHH w1 LLYKSEDFLWTRVIERPLYSNALLMAMECLDFFFAVLPG--NNGGLDMSSEPSGAH--HVL 280
Ta 6-KEH w1 LLYKSEDFLNWTRVDHPLYSNATIMPECLDFFFAVLPG--NNGGLDMSSEPAH--HVL 283
Ta 6-FEH LLYKSKDFRHWKRNAPLSYTSRAAGVMECPDLFPVGEVGEGRGLVSGPASGAVRHVL 282
At 6-FEH LLYKSRDFNTQSMKPLHYEDLTGMCECPDFFPVYSIT--GSGVETSSVGENGIC--HVL 264
Bv 6-FEH VLFTSDDFVKNMNTGNPLHSTENGTICWECVDFPVVYG--KSLGADTSIG--DDVK--HVL 281
: : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *
Lp 6-FEHA KMS-VDY--SDKMYIGVYDLKRDAFVPDVI-----LDDRRLRLMDYGTGFYASKSFDFDSKKG 326
Lp 1-FEHA KMS-LDS--SDKMYIGVYDLKRDAFVPDVI-----LDDRRLRLMDYGTGFYASKSFDFDSKKG 329
Ta 661-FEHH w1 KVS-INS--CMYLVIGVYDLKRDEFPDVI-----QDNNLRWTRIDYGTGFYASKSFDFDSKKG 336
Ta 6-KEH w1 KMG-MNFGFVPIYIGVYDLKRDAFVPTD-----QDNNLRWTRIDYGTGFYASKSFDFDSKKG 334
Ta 6-FEH KLSVMTNLTQYVAVGRVDVADVTFFVDEVERNACDRWRPDIYGHVYASKSFDFDSKKG 340
At 6-FEH KVSLEMTLHDYTYTGSYREKRDVYVPDLG-----VQNESAPRDLVYGHVYASKSFDFDVKK 322
Bv 6-FEH KLSLFDTPQYETTYGRDEIKDYVPDVG-----SIESDGLRVDYGHVYASKSFDFDET 337
: : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *
Lp 6-FEHA RLIIWGNVNESDVSDDGVKGWAGIHAIPRTIWLSDGKQLQWIDIEESLR-KDEINH 385
Lp 1-FEHA RLIIWGNVNESDADDDGVKGWAGIHAIPRTIWLSDGKQLQWIDIEESLR-RNEINH 388
Ta 661-FEHH w1 RLIIWGNVNESDYSDDIAKGWAGIHSIPRTIWLSDGKQLQWIDIEESLR-INEINH 393
Ta 6-KEH w1 RLIIWAMTTFDSSDDIAKGWAGIYSFPRITWLNDGKRLQWIDIEESLR-INEINH 395
Ta 6-FEH RLIVWAMANESDQDDIARGWSGVQTPRVRKWLWEDGQVQWIDIEETLRASKRVVLG 402
At 6-FEH RLIIWGNVNESDPAKDDIEKGWSGLQSFPRITWLNDGKRLQWIDIEETLR-QQVNV 379
Bv 6-FEH RLIIWGNVNESDQADDIEKGWSGVQATPRITVLDKSGKQLQWIDIEETLR-ENDEL 396
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Lp 6-FEHA QLELKNGLDFEIKGIDTLDQADVDFELAS IDSADFPDPSWILDFVERHCREGASAKGG 445
Lp 1-FEHA QLELKNGLDFEIKGIDTLDQADVDFELTS IDSADFPDPSWILDFVERHCREGASVQGG 448
Ta 661-FEHH w1 QLELKNGLDFEIKGIDTLDQADIEIDFELTS IDSADFPDPSWILDFPRKCREADASVHG 453
Ta 6-KEH w1 QLELKNGLDFEIKGIDTLDQADVDFELTS IDSADFPNSWILDFTEKHCREADASVHG 455
Ta 6-FEH LEQAGVAGGVNMTGVG--AQADVEAIFELSEEAETQPNWLLDQKCEENAGSVG 461
At 6-FEH QKIVKLAGSTLVQGVHTAQADQVSEFVKELEADIEPSWT--DPQIKCSQGDLSVMG 438
Bv 6-FEH PSQVIGKSSVLSIQTASQADVSEIFSKPESVNYEELSDCT--NPQILCSQKSGAKR 455
: : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *
Lp 6-FEHA IGFFGLVLASDMEEHIAVHFVRKYSQK-----SHMILMCDLRSSLSAGLTPAYG 499
Lp 1-FEHA IGFFGLVLASDMEEHIVHFVRKYSQK-----SVYMLMCDLRSSLSAGLTPAYG 502
Ta 661-FEHH w1 IGFFGLVLASDMEEHIAVHFVRKYSQK-----KYILMCDLRSSLSAGLTPAYG 507
Ta 6-KEH w1 IGFFGLVLASDMEEHITVHFVRKYSQK-----NYMLMCDLRSSLSAGLTPAYG 509
Ta 6-FEH VGGFGLVLASSNMQETATFFVRFRNG-----KYVLMCDLTRSGTRDMVTPKYSV 515
At 6-FEH LGPFGGLVLASDMEEVSTVYFRIFKGNDDTNKKYVLMCDLRSSLSNDENKSTFG 498
Bv 6-FEH GPFGLGLTASMGLEETVAFFRIFKGN-----KYVLMCDTRSSLSNDTPTDKISFG 509
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Lp 6-FEHA GFFEFDLENE--KRISLRTLIDRSVSEFGGGGRVICITRVYFVALVDG--RVHMVAFNNG 556
Lp 1-FEHA GFFEFDLENE--SKISLRTLIDRSVSEFGGGGRVICITRVYFVALAND--THIMVAFNNG 560
Ta 661-FEHH w1 GFFEFDLENE--KRISLRTLIDRSVSEFGGGGRICITRVYFVALVDG--ATHMVAFNNG 568
Ta 6-KEH w1 GFFEFDLENE--KRISLRTLIDRSVSEFGGGGRICITRVYFVALVDG--ATHMVAFNNG 565
Ta 6-FEH GFVDIDIEQQRGITLRTLIDHSVSEFGGGGRVICITRVYFPAENKN--SHVFNNG 573
At 6-FEH AFVADIDPSHQ--TISLRTLIDHSVSEFGGGGRVICITRVYFPAIEN--ANLNVNKG 554
Bv 6-FEH IFVVDVDFINE--DLSLRTLIDHSVSEFGGKSGVICITRVYFPAINDK--AKLVFNNG 565
: : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *
Lp 6-FEHA STTVRVQPLRAWSMMTAQVNVNKG----- 580
Lp 1-FEHA STTVRVQPLRAWSMMTAQVNVNKG----- 584
Ta 661-FEHH w1 STTVRVQPLRAWSMMTAQVNVNKG----- 589
Ta 6-KEH w1 SATVRPHLMAMBRARQVSY----- 598
Ta 6-FEH TGLVRYSKLEAWRLSKAQN--VHGR----- 598
At 6-FEH TQSDVITLSEAWLSKAQN--WOLMSFFIEREESRSNHPQ 594
Bv 6-FEH TEDVKITKLSAWSMKKAQNLSTDMTNSMYSNNKVEKEP 606
: : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *

mixture were separated and quantified by high-performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD DX-300, Dionex, CA, USA) on an analytical CarboPac PA100 column (4 x 250 mm) as described by Van den Ende and Van Laere (1996).

3.4.6. 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 10,000 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 10,000 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 polyvinylpolypyrrolidone (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.

3.4.7. RNA isolation and real-time qPCR analysis

RNA was isolated from leaf tissues using the RNeasy plant mini kit (Qiagen, France) coupled to a DNase treatment (Qiagen, France). RNA was quantified using a 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 (Biorad, France). The cDNA was diluted 1:100 with water and 4 µl was used as a template for

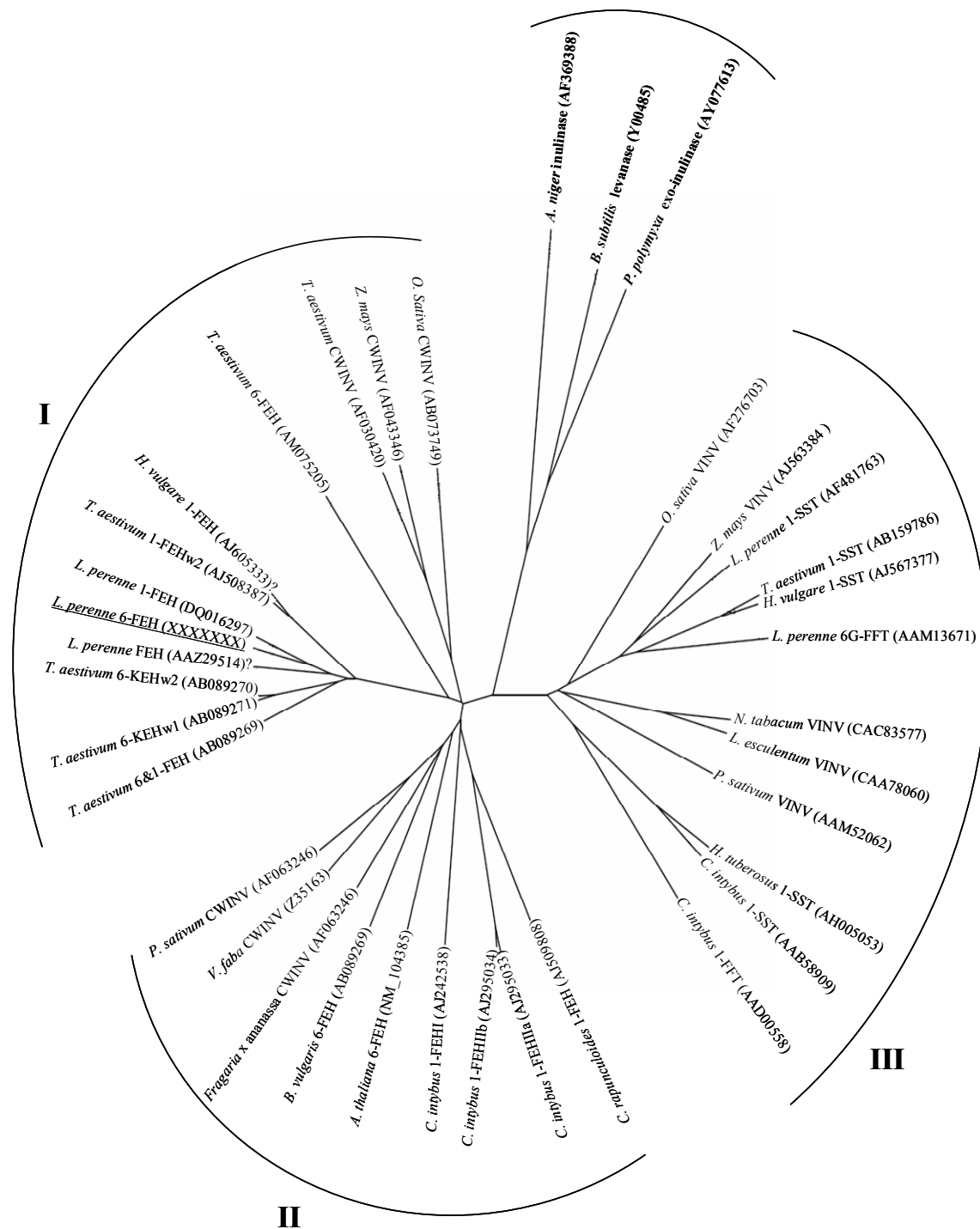


Figure 38: Phylogenetic tree of invertase and fructan metabolism cDNAs-derived amino acid sequences. The *Lolium perenne* Lp6-FEHa is underlined. Inulinase, exo-inulinase and levanase from micro-organisms are in bold. Question marks indicate putative FEH which have not been characterized. *Z. mays*, *Zea mays*; *T. aestivum*, *Triticum aestivum*; *O. sativa*, *Oryza sativa*; *C. rapunculoides*, *Campanula rapunculoides*; *C. intybus*, *Cichorium intybus*; *H. vulgare*, *Hordeum vulgare*; *A. cepa*, *Allium cepa*; *L. perenne*, *Lolium perenne*; *P. polymyxa*, *Paenibacillus polymyxa*; *A. niger*, *Aspergillus niger*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *P. sativum*, *Pisum sativum*; *V. faba*, *Vicia faba*; *B. vulgaris*, *Beta vulgaris*; *A. thaliana*, *Arabidopsis thaliana*; *H. tuberosus*, *Helianthus tuberosus*; *L. esculentum*, *Lycopersicon esculentum*; *N. tabacum*, *Nicotiana tabacum*. Group I contains FEHs and cell-wall invertases from monocotyledons, group II contains FEHs and cell-wall invertases from dicotyledons and group III contains FT and vacuolar invertase from dicotyledons and monocotyledons.

real time qPCR analysis. The gene-specific primers were Lp6FEHs (TGCCTACCACTCCCAGTCT) and Lp6FEHas (ATGACAGGCTGATCACCAGG) for *Lp6-FEHa*; Lp1FEHs (GCGGTCTTGGAGCCAGAGC) and Lp1FEHas (CAGTCCCAATGGTGCCACCC) for *Lp1-FEHa*; Lp1SSTs (5'-GCCAGGTCATCCTGCTCTAC-3') and Lp1SSTas (5'-CCGGCATGAGCTCGTAGTT-3') for *Lp1-SST*; Lp6G-FFTs (TCTCAACTCTTCGGACATCGA) and Lp6G-FFTas (TACATGTCGTCAGCCAAGAAG) for *Lp6G-FFT*; Lp6SFTs (CAGCTTCTGCAACGACGA) and Lp6SFTas (CCTTAACCATGACGGTCTCG) for *Lp6-SFT*. As a marker for constitutive expression rRNA18S was amplified with rRNA18Ss (5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-3') and rRNA18Sas (5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-3') primers. PCR reactions were performed in a total volume of 15 µl, 500 nM for each primers 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 s and 60 °C for 40 s. All the qPCR results were confirmed by three independent reactions from RNA of the same bulk of plants. Expression levels produced by qPCR were expressed as a ratio relative to the control point, which was set to 1. 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 confirms that the correct amplicons was produced from each pair of primers.

3.5 Results

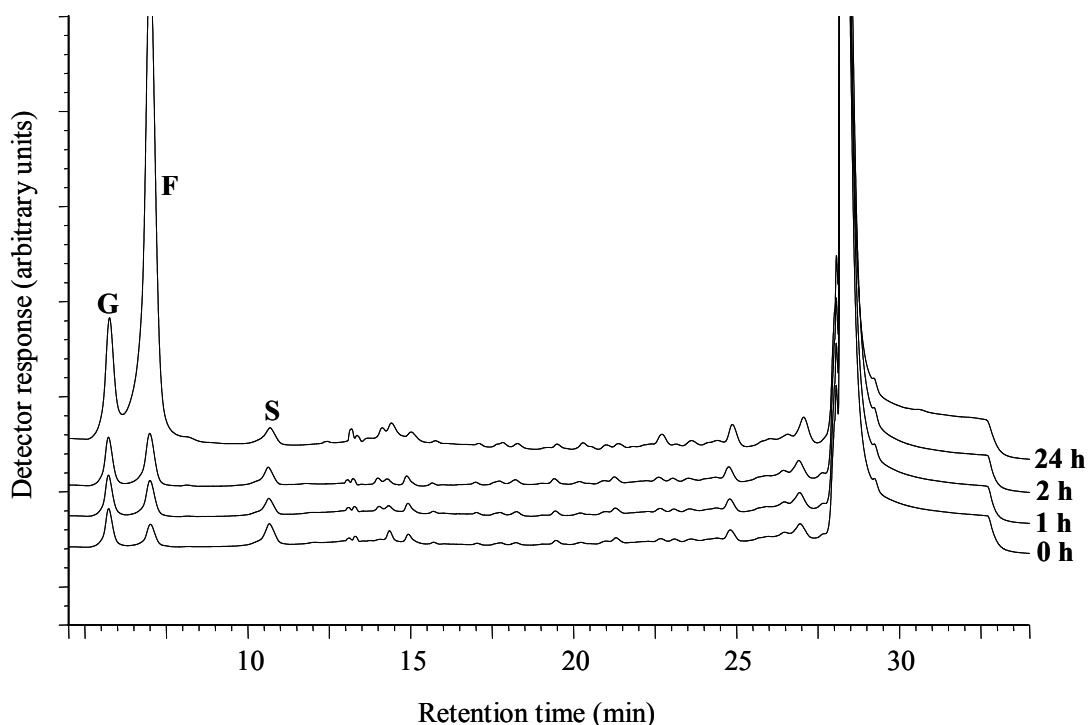
3.5.1. Molecular characterization of *Lp6-FEHa*

A *L. perenne* stubble cDNA library was screened with a 989 bp *L. perenne* nucleotidic probe, generously provided by Dr M. Yoshida and Dr T. Yamada (National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Japan) and a partial cDNA termed *FEHb* was obtained. To get the 5'end of the coding sequence, the screening was followed by PCR with degenerated primers based on the conserved amino acid sequences MAQAWAF found in wheat and barley 1-FEHs (accession nos. AJ508387 and AJ605333) and specific primers from *Lp6-FEHa* 3'UTR. As a result, a 1743 bp full length clone was obtained and designated *Lp6-FEHa* (accession no. EU219846) containing a long open reading frame (ORF) encoding

Table VIII: Substrate specificity of the *Pichia pastoris* expressed recombinant Lp6-FEHa

Substrate	Linkage type	DP	Relative activity (%)
Sucrose		2	0.2
6-kestotriose	β-(2,6)	3	100
6G-kestotriose	β -(2,6)	3	17
Bacterial levan	β -(2,6)	+/- 72	25
1-kestotriose	β -(2,1)	3	11
1,1-kestotetraose	β -(2,1)	4	11
Inulin (<i>C. intybus</i>)	β -(2,1)	>10	1
High DP fructans (<i>L. perenne</i>)	β -(2,6) and β -(2,1)	>10	15

Substrate concentration in the enzyme assays was 3 mM for sucrose, 6-kestotriose, 6G-kestotriose, 1-kestotriose and 1,1-kestotetraose and 5% for bacterial levan, inulin (*C. intybus*) and high DP fructans (*L. perenne*). Relative activity is expressed as the percentage of the activity with 6-kestotriose (bold) as substrate. DP, degree of polymerization.

**Figure 39:** HPAEC chromatograms of reaction mixtures of the *Pichia pastoris* expressed recombinant Lp6-FEHa with native fructans from *Lolium perenne* after 0, 1, 2 and 24 h of incubation at 30 °C. G, glucose; F fructose; S sucrose.**Table IX:** Influence of sucrose on the activity of the *Pichia pastoris* expressed recombinant Lp6-FEHa.

Inhibitor	Inhibitor concentration (mM)	Inhibition (%)
None	0	0
Sucrose	10	70
Sucrose	20	80
Sucrose	40	90

Enzymatic assays were done with 6-kestotriose 3 mM as substrate. The rate of fructose production without sucrose was used as 0 % inhibition of reaction rate.

580 amino acids (Figure 37). Lp6FEHa has a predicted pI of 5.52 and the cDNA derived molecular mass for the expected mature enzyme is 60.9 kDa. Lp6-FEHa contains 5 potential *N*-glycosylation sites and presents the catalytic triad conserved among family 32 of plant glycoside hydrolases: the β -fructosidase motif (NDPNG), the FRDP region and the WEC(V/P)D region (Figure 37). An hydrophobic N-terminal signal of 20 amino acids was determined with Signal3P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) and the mature Lp6-FEHa was estimated to begin at the 40rd amino acid residue (Figure 37; black arrow) based on the *N*-terminal sequence of chicory and wheat 1-FEH mature proteins (Van den Ende *et al.*, 2001, 2003a).

3.5.2. Homology with other glycosyl hydrolases

The deduced amino acid sequence from the Lp6-FEHa is aligned in Figure 37 with related translated cDNAs of Lp1-FEHa from perennial ryegrass; 6-KEH w1, 6&1-FEH w1 and 6-FEH from wheat; 6-FEH from *Arabidopsis* and 6-FEH from sugar beet. Lp6-FEHa is closer to Lp1-FEHa (84% identity) than to the other monocot 6-FEHs as 6-KEHw1, 6&1-FEHw1 and 6-FEH from wheat (75, 73 and 48% identity, respectively). Identity with 6-FEHs from dicot species are lower: 44% with sugar beet 6-FEH and 45% with *Arabidopsis* 6-FEH. A phylogenetic tree of some plant fructosyltransferases and hydrolases is presented in Figure 38. Like other FEHs, Lp6-FEHa groups together with cell-wall type invertases and not with vacuolar type invertases which group with fructan biosynthetic enzymes (group III). Within the cell-wall type plant hydrolases, two distinct groups can be distinguished. Groups I and II contain monocotyledonous and dicotyledonous cell-wall type plant hydrolases, respectively. As expected, Lp6-FEHa group with monocotyledonous cell-wall type plant hydrolases. The high distance between Lp6-FEHa and 1-FEH from *Aspergillus niger* or 6-FEH from *Bacillus subtilis* confirmed that Lp6-FEHa comes from ryegrass and not from microbial contamination (Figure 38).

3.5.3. Functional characterization of the recombinant Lp6-FEH protein

The recombinant Lp6FEHa was successfully expressed in *Pichia pastoris* for functional characterization. No product other than fructose could be detected after incubation of the recombinant Lp6-FEHa with bacterial levan (data not shown). None or very low hydrolase

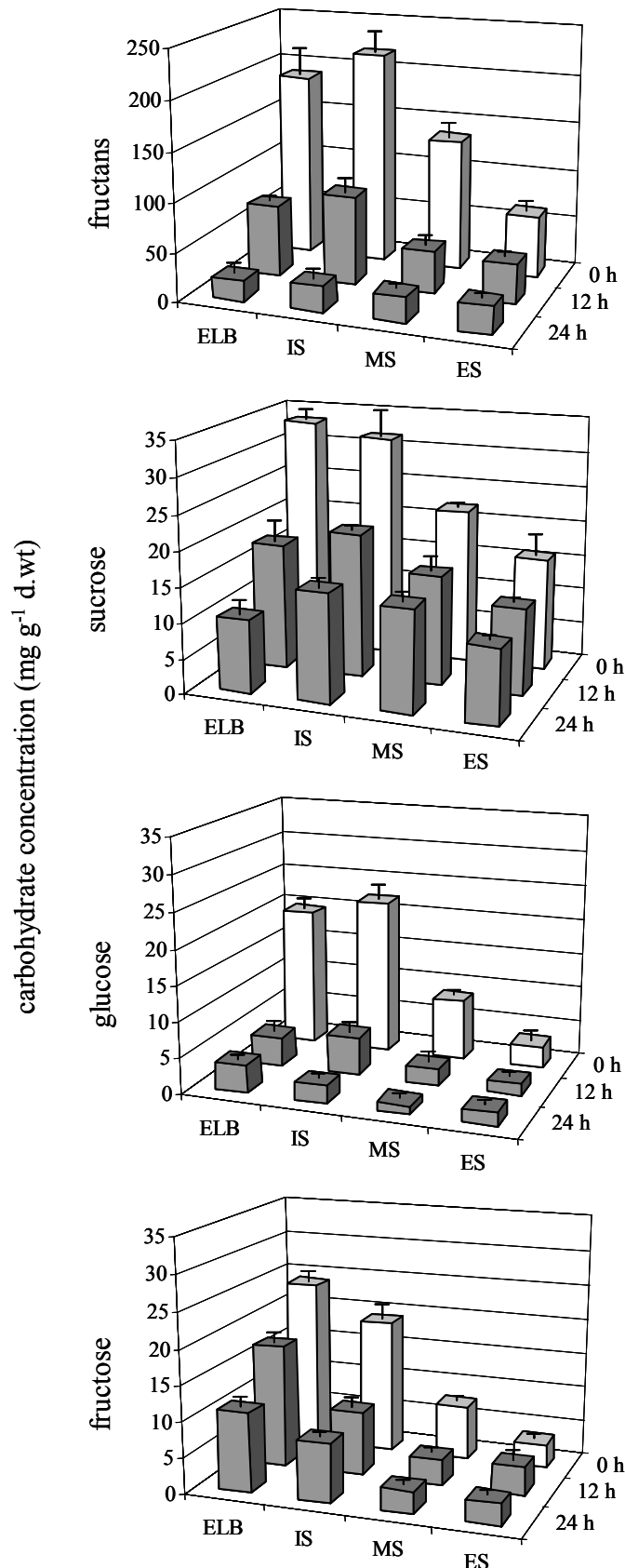


Figure 40: Changes in the contents of soluble sugars (fructans, sucrose, glucose and fructose) in elongating leaf bases (ELB), and mature leaf sheaths decomposed in inner sheaths (IS), medium sheaths (MS) and external sheaths (ES) of *Lolium perenne* during the first 24 h of regrowth. Values are means of three replicates. Vertical bars indicate $\pm \text{SE}$ when larger than the symbol.

normalized gene expression

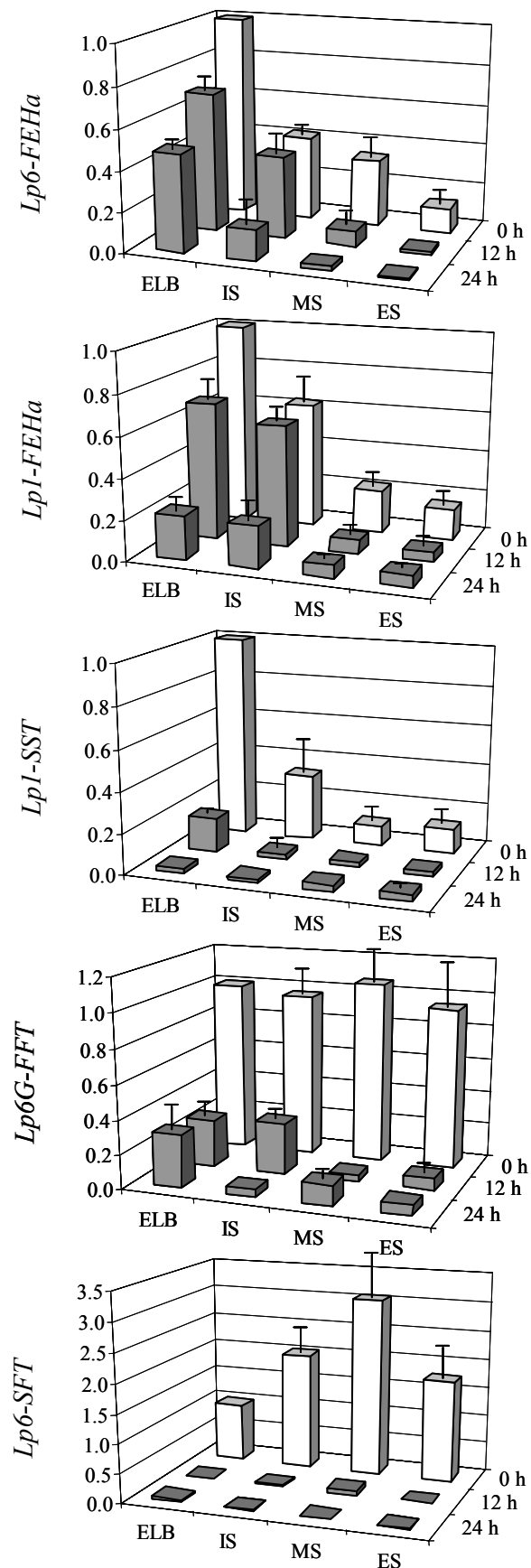


Figure 41: Real time qPCR analysis of *Lp6-FEHa*, *Lp1-FEHa*, *Lp1-SST*, *Lp6-GFFT* and *Lp6-SFT* expression in elongating leaf bases (ELB), and mature leaf sheaths decomposed in inner sheaths (IS), medium sheaths (MS) and external sheaths (ES) of *Lolium perenne* during the first 24 h of regrowth. Expression levels produced by real-time qPCR are expressed as a ratio relative to the control point (expression in elongating leaf bases at 0 h). Values are means of three replicates. Vertical bars indicate $\pm \text{SE}$ when larger than the symbol.

activities could be detected towards sucrose (Table VIII). Of all fructans tested, the recombinant enzyme hydrolyzed most efficiently β -(2,6) linkages. Amongst β -(2,6) fructans tested, 6-kestotriose is the best substrate while bacterial levan and neokestose are slowly hydrolyzed. Amongst β -(2,1) fructans, inulin hydrolysis was neglectible while 1-kestotriose and 1,1-kestotetraose were also hydrolyzed but at a much lower rate than 6-kestotriose (Table VIII). High DP fructans from *Lolium perenne*, composed by both β -(2,1) and β -(2,6) linked fructans with a predominance of β -(2,6) linkages were also degraded by the recombinant protein (Figure 39) at a rate closed to that of 6G-kestotriose and bacterial levan (Table VIII). The recombinant Lp6-FEHa was inhibited at 90% in the presence of 40 mM of sucrose in the incubation medium (Table IX).

3.5.4. Soluble sugar contents and fructan metabolism gene transcript levels in defoliated ryegrass

Fructan, sucrose, glucose and fructose levels as well as the levels of transcripts coding for *Lp6-FEHa*, *Lp1-FEHa*, *Lp1-SST*, *Lp6G-FFT* and *Lp6-SFT* genes were followed in elongating leaf bases (ELB) and matures leaf sheaths. The leaf sheaths were separated in inner sheaths (IS), medium sheaths (MS) and external sheaths (ES) in agreement with their development stage, inner sheaths being the youngest and external sheaths being the oldest (Figure 36). Analyses were done just before defoliation and 12 and 24 h after. Before defoliation, fructans are the major soluble sugar present in all plant tissues tested (Figure 40). Younger tissues (ELB and IS) accumulated more soluble sugars than older ones (MS and ES) (Figure 40). Following defoliation, levels of the sugar tested decreased in the four plant tissues. Nevertheless, in external sheaths, the decrease of soluble sugar contents is of less importance than in other tissues (Figure 40). The decrease of fructan and also of sucrose and glucose levels was much more important in young tissues (ELB and IS) than in old ones (MS and ES). For all tissues, the decrease of fructose content was slower than that of glucose, indicating that the fructose release from fructan breakdown partially balanced the fructose use.

Before defoliation, the transcript levels of *Lp6-FEHa*, *Lp1-FEHa* and *Lp1-SST* were much higher in elongating leaf bases than in leaf sheaths with a decreasing gradient from the youngest to the oldest tissue (Figure 41). By contrast, the transcript level of *Lp6G-FFT* was

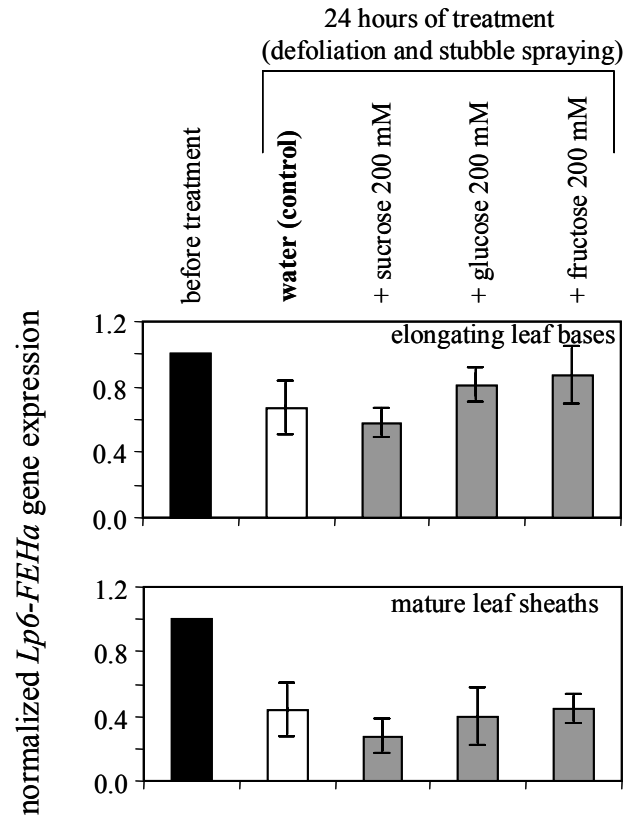


Figure 42: Real time qPCR analysis of *Lp6-FEHa* expression in elongating leaf bases and mature leaf sheaths of *Lolium perenne*. Plants grown for 8 weeks were further subjected to defoliation and exogenous sugars were supplied by spraying the cut leaves with water, glucose (200 mM), fructose (200 mM) or sucrose (100 mM) several times during the first 24 h of regrowth. Expression levels produced by real-time qPCR are expressed as a ratio relative to the control point (before treatment). Values are means of three replicates. Vertical bars indicate $\pm$ SE when larger than the symbol.

homogeneous for all leaf tissues and that of *Lp6-SFT* was the lowest in elongating leaf bases and the highest in medium sheaths. In all plant tissues tested, transcript levels of fructan biosynthesis genes (*Lp6G-FFT*, *Lp1-SST* and *Lp6-SFT*) dropped dramatically after defoliation. They were very low already 12 h after defoliation and remained stable afterwards (Figure 41). Conversely both *Lp6-FEHa* and *Lp1-FEHa* transcript levels decreased only slowly in elongating leaf bases and in inner sheaths and their levels were still relatively high in those young tissues after 12h of regrowth (Figure 41).

3.5.5. *Lp6-FEHa* gene expression in response to sugar supply

In order to assess the effect of soluble sugars on *Lp6-FEHa* gene expression, water (control), sucrose, glucose and fructose were sprayed on cut leaves several times during the first 24h following defoliation. Amongst the sugars tested, no one managed to prevent the decrease of *Lp6-FEHa* gene expression following defoliation in elongating leaf bases or leaf sheaths (Figure 42).

3.6 Discussion

Generally, Poaceae species synthesize a complex mixture of β -(2,1) and β -(2,6) linked fructans with a high proportion of β -(2,6) linked fructans (Chatterton *et al.*, 1990; Cairns and Ashton, 1993; Livingston *et al.*, 1993). Recent studies showed that it is also the case for perennial ryegrass (Pavis *et al.*, 2001b). As a consequence, in this species as in other Poaceae, different FEH types are needed to efficiently degrade such complex mixture. Indeed, in perennial ryegrass a 6-FEH enzyme has been purified to homogeneity (Marx *et al.*, 1997) and a 1-FEH cDNA named *Lp1-FEHa* has been recently cloned (Lothier *et al.*, 2007). In this study, we present for the first time the cloning of a 6-FEH cDNA from *L. perenne*.

3.6.1. Deduced amino acid sequence of *Lp6-FEHa*

The *Lp6-FEHa* deduced protein sequence contains the three conserved motifs ND₂₅PCG, FRD₁₅₀P and WE₂₀₅CPD of Glycoside Hydrolase Family 32. Asp 25 probably acts as nucleophile and Glc 205 as a proton donor (Figure 37). Signal3P software predicts that *Lp6-FEHa* has a hydrophobic N-terminal signal sequence of 20 amino acids required for

cotranslational insertion in the endoplasmic reticulum (Bendtsen *et al.*, 2004). This signal peptide is followed by a propeptide estimated at 19 amino acids by subtraction with the estimated length of mature enzyme based on the *N*-terminal sequence of other 1-FEH mature proteins (Van den Ende *et al.*, 2001; Van den Ende *et al.*, 2003a). Such propeptides are known to be signals for targeting proteins to the vacuole and to aid folding of proteins into three-dimensional structures (Valls *et al.*, 1990; Winther and Sorensen, 1991). It should be noted, however, that the function of these propeptides have never been investigated in 6-FEHs or in any related cell-wall type invertases.

The predicted hydrophobic N-terminal signal sequence (Figure 37) suggests that the proprotein Lp6-FEHa enters the endoplasmic reticulum from where it could be secreted to the apoplast or directed towards the vacuole (Vitale and Hinz, 2005). The calculated low pI (5.68) of Lp6-FEHa is in favour of vacuolar targeting since apoplastic enzymes often have a high pI to bound the cell wall (Ramloch-Lorenz *et al.*, 1993; Van den Ende *et al.*, 2000).

Accordingly to the theory that FEHs and FTs are derived from cell-wall and vacuolar invertases, respectively, Lp6-FEHa groups with monocotyledonous cell-wall invertases and not with monocotyledonous FTs (Van den Ende *et al.*, 2002) (Figure 38). Analysis of the phylogenetic tree points out that apart the wheat 6-FEH, all the other FEHs from monocotyledons are very close (i.e. 1-FEHs from wheat, barley, perennial ryegrass; 6-FEHs from wheat; 6&1-FEH from wheat and our Lp6-FEHa from perennial ryegrass) (Figure 38). This analysis supports the idea that, to date, the amino acid sequence analysis is clearly not enough to determine the substrate specificity of such kind of enzymes and it is impossible to distinguish FEHs from cell-wall invertases and 6-FEHs from 1-FEHs.

3.6.2. Enzymatic properties

The recombinant Lp6-FEHa was expressed in *P. pastoris* for functional characterization. The validity of this heterologous expression system is now recognized since many previous studies showed that recombinant FEHs have similar characteristics to native counterparts (De Coninck *et al.*, 2005; Van Riet *et al.*, 2006).

Like all the other plant FEHs already characterized, the recombinant Lp6-FEHa showed no activity against sucrose. This result clearly demonstrates that this enzyme is not an

invertase but a true FEH. Moreover, like the 6-FEH purified from *L. perenne* (Marx *et al.*, 1997b) and other 1-FEHs from different plant species (Van den Ende *et al.*, 2000; Van den Ende *et al.*, 2003a; Lothier *et al.*, 2007) but contrary to 6-FEHs from wheat (Van Riet *et al.*, 2006), *Arabidopsis* (De Coninck *et al.*, 2005) and *B. vulgaris* (Van den Ende *et al.*, 2003b), Lp6-FEHa is strongly inhibited by sucrose. The recombinant Lp6-FEHa showed the highest activity against β -(2,6) linked fructans notably against 6-kestotriose and also to a lesser extent against bacterial levan and 6G-kestotriose while it had very low activity against β -(2,1) linked fructans. Thus, these results clearly show that Lp6-FEHa prefers β -(2,6) linked fructans and notably β -(2,6) linked oligosaccharides. Regarding its substrate specificity, Lp6-FEHa is close to the proteins termed 6-FEHs such as those purified from oat, *L. perenne*, *B. vulgaris*, and *Arabidopsis* since all of them attack preferentially β -(2,6) linked fructans but are also able to attack at a slower rate β -(2,1) linked oligofructans (Henson and Livingston, 1996; Marx *et al.*, 1997b; Van den Ende *et al.*, 2003b; De Coninck *et al.*, 2005).

Lp6-FEHa and the 6-FEH purified by Marx *et al.* (1997) from *L. perenne* are probably two distinct isoforms. Indeed their pI and molecular weight are different: 4.7 and approximately 65kDa for the purified 6-FEH (Marx *et al.*, 1997) and 5.52 and approximately 60kDa for the recombinant Lp6FEHa. Moreover, the purified 6-FEH from Marx *et al.*, (1997) has a relatively high activity against 6G-kestotriose (63 % compared to that against 6-kestotriose) while the present Lp6-FEHa has a very low activity against 6G-kestotriose (17 % compared to that against 6-kestotriose). It should be pointed out that, for grasses which accumulate a wide range of fructans, it is difficult to determine the exact specificity of FEHs since pure substrates are not commercially available and hard to purify in large amounts for enzymatic assays.

3.6.3. *In planta function of Lp6-FEHa*

Grass and cereal accumulate β -(2,1) and β -(2,6) linked fructans and the predominant linkage is β -(2,6) (Chatterton *et al.*, 1990; Cairns and Ashton, 1993; Livingston *et al.*, 1993). Fructans are depolymerized by 6-FEH and 1-FEH enzymes following source-sink modifications such as cutting or grain-filling (Pollock and Cairns, 1991; Prud'homme *et al.*, 1992; Schnyder, 1993; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Beside an obvious function in fructan degradation when energy and carbon skeletons are

needed, FEHs are also related to stress tolerance since the increase of oligofructan concentrations contributes to membrane stabilization during frost or drought (Van den Ende and Van Laere, 1996; Hinch *et al.*, 2002; Vereyken *et al.*, 2003a). Moreover, a specific function for 1-FEH in the prevention of high DP β -(2,1) linked fructan formation (β -(2,1) trimming) has been suggested during period of active fructan biosynthesis in stem of wheat (Bancal *et al.*, 1992; Van den Ende *et al.*, 2003a). Recently, since 6-FEHs have been discovered in the non-fructan plants *Arabidopsis* and *B. vulgaris*, a new function of defense against plant pathogens has been postulated (Van den Ende *et al.*, 2003b; De Coninck *et al.*, 2005). Indeed 6-FEH activity could prevent the formation of exogenous levans formed by bacterial or fungi plant pathogens (Van den Ende *et al.*, 2004).

Since *Lp6-FEHa* transcripts were found at a high level where fructan accumulates, i.e. in elongating leaf bases and in inner leaf sheaths, the corresponding enzyme may participate to fructan metabolism in leaves rather than to defense mechanism against plant pathogens. *Lp6-FEHa* is probably involved in fructan degradation during the first hours following defoliation.

3.6.4. Regulation of *Lp6-FEHa*

The mechanisms by which FEH activity increases following defoliation are mainly unknown. Since FEHs are strongly inhibited *in vitro* by sucrose (Marx *et al.*, 1997b; De Roover *et al.*, 1999a; Van den Ende *et al.*, 2003a; Lothier *et al.*, 2007), the decrease of sucrose level after defoliation (Figure 40) could lead to the increase of FEH activity, assuming that FEH and sucrose colocalized in the same vacuolar compartment. Nevertheless, in addition to this post-translational regulation, the FEH activity increase may also result from other mechanisms, involving *de novo* protein synthesis (Yamamoto and Mino, 1989). Surprisingly, and as already reported for *Lp1-FEHa* (Lothier *et al.*, 2007), *Lp6-FEHa* mRNA level did not increase but decreased following defoliation (Figure 41). Therefore, in response to defoliation, both *Lp6-FEHa* and *Lp1-FEHa* gene expression is down-regulated at a post-transcriptional level. If these two FEH isoforms are of importance for fructan degradation, this down-regulation at transcriptional level should be overcome by an up-regulation at post-transcriptional levels in order to account for the total FEH activity increase.

Interestingly, in tissues where fructans accumulate the most (ELB and IS), *Lp6-FEHa* and *Lp1-FEHa* transcripts did not decline as drastically as in other tissues or as FT transcripts in all tissues. It is clear then, that ryegrass plants keep a pool of transcripts potentially available for translation during the first hours of regrowth. Since FT regulation mainly occurs at the transcriptional level (Sprenger *et al.*, 1995; Nagaraj *et al.*, 2004), this probably explains the decrease of FT activities following defoliation.

Transcript levels are the results of transcription rate, translation rate and mRNA stability. Higher level of FEH transcripts than FT transcripts could be due to higher translation rate and/or mRNA stability, in a background of transcription decrease. This suggestion is consistent with a previous study in orchardgrass which reports that the 6-FEH activity increase after defoliation was only slightly inhibited by transcription inhibitors (Yamamoto and Mino, 1989). By contrast, the supply of protein synthesis inhibitors suppressed drastically the uprise of 6-FEH activity (Yamamoto and Mino, 1989). These data indicate that FEH gene transcription is not needed for the increase of FEH activity after defoliation but protein synthesis is required. Post-transcriptional regulation by differential mRNA stability is now well documented (Green, 1993; Bailey-Serres, 1999). The fact that it probably occurs during fructan biosynthesis in barley supports our hypothesis (Nagaraj *et al.*, 2004). Soluble sugars are amongst the factors potentially involved in mRNA stability regulation. They have been shown to be implicated *via* the 3'UTR for α -amylase gene in rice (Chang and Yu, 1998) and cell-wall invertase gene in maize (Cheng *et al.*, 1999). *Lp6-FEHa* transcript level does not respond to soluble sugars following defoliation (Figure 42) indicating that soluble sugars are not involved in the regulation of *Lp6-FEHa* mRNA stability.

In grasses adapted to defoliation, specific regulation of mRNA stability rather than increase of transcription could represent an adequate mechanism to save energy and quickly adjust fructan metabolism to the cell need after drastic and sudden defoliation when saving energy is crucial for plant survival.

3.7 Conclusion

In this study, a cDNA termed *Lp6-FEHa*, encoding a genuine 6-FEH from perennial ryegrass, has been cloned. We suggest that this 6-FEH isoform is implicated in fructan breakdown following defoliation. Our results suggest that *FEH* and *FT* genes are co-regulated

at the transcriptional level while other mechanisms probably modulate stability and/or translation of *FEH* mRNAs. As a future goal, to go further in the regulation of fructan metabolism and investigate the putative regulation at the translational level, production of specific antibodies against FEHs and FTs are in progress.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

La majeure partie de mon travail a été réalisée au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S à l'Université de Caen Basse-Normandie (UCBN) dans l'équipe « Carbone Défoliation » animée par Marie-Pascale Prud'homme. Au cours de ma thèse, j'ai aussi effectué une partie des expérimentations au Laboratory for Molecular Plant Physiology de l'Université catholique de Leuven sous la direction d'André Van Laere et de Wim Van den Ende, dans le cadre d'un programme bilatéral PAI Tournesol (Egide). L'un des thèmes de recherche de ce laboratoire concerne l'étude des relations entre structure et fonction chez les enzymes du métabolisme des fructanes. C'est au sein de ce laboratoire que j'ai appris la technique d'expression hétérologue des FEHs dans la levure *Pichia pastoris*. Enfin, j'ai également travaillé en collaboration avec Philippe Barre (UGAPF, INRA de Lusignan) pour la cartographie du gène *Lp1-FEHa*.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le schéma stratégique du département Environnement-Agronomie de l'INRA et en particulier dans le champ thématique traitant de la caractérisation des « réponses aux contraintes et signaux de l'environnement, modélisation de la variabilité génétique ». Pour l'équipe « Carbone Défoliation », le contexte général des travaux concerne la compréhension de la pérennité des prairies, base de leur exploitation durable. Les objectifs sont de produire et organiser les connaissances relatives aux flux de carbone et d'azote lors de la repousse des plantes fourragères. Pour le ray-grass anglais, il s'agit plus particulièrement d'identifier les facteurs endogènes (signaux métaboliques, hormones) ou exogènes (modalité de défoliation) qui déclenchent l'utilisation des réserves ou leur reconstitution, ce qui conduit à développer les outils méthodologiques appropriés, en particulier les sondes moléculaires relatives au métabolisme des fructanes. Dans ce cadre, les principaux objectifs de ce travail visaient à :

- Etudier le rôle des sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) en tant que molécule « signal » dans la régulation de l'activité FEH.
- Rechercher les mécanismes à l'origine de la régulation de l'activité FEH et en particulier les possibilités d'une régulation transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle des FEHs en réponse à une défoliation.

Dans une première partie, la discussion porte sur les méthodologies employées, d'une part pour la mise en évidence d'un rôle signalétique des sucres et d'autre part pour la caractérisation fonctionnelle des FEHs clonées. L'ensemble des résultats est ensuite discuté dans le contexte de la régulation du métabolisme des fructanes chez le ray-grass anglais, ce qui nous conduit à proposer un modèle intégrant les différents niveaux de régulation mis en évidence à ce jour. Dans une seconde partie, les perspectives de recherche sont exposées en distinguant les travaux qui devraient permettre d'affiner et de compléter ce modèle de régulation du métabolisme des fructanes chez *Lolium perenne*, et les objectifs à enjeu agronomique dans le contexte de la sélection de variétés riches en sucre.

1. Discussion

1.1 Méthodologie employée

1.1.1. Le système d'étude du rôle des signaux « sucre » dans la régulation de l'activité FEH

Pour étudier la régulation de l'activité FEH et de l'activité 1-SST après une défoliation et notamment pour tester l'hypothèse d'une régulation négative de l'activité FEH par les sucres avant la défoliation et donc d'une dérepression de cette activité liée à la chute des teneurs en sucres solubles après la coupe, nous avons souhaité travailler dans les conditions les plus proches possibles des conditions naturelles, c'est-à-dire sur plante entière et non sur limbes excisés, comme cela se fait généralement dans les études traitant du signal « sucre » et de la régulation du métabolisme des fructanes (Müller *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001a; Nagaraj *et al.*, 2004). L'excision de feuilles est en effet source de déséquilibres physiologiques conduisant à des résultats dont l'interprétation est difficile. Une illustration frappante de ce problème est rapportée dans les travaux de Wei *et al.* (2001) réalisés chez l'orge. Cette étude montre qu'en réponse au même traitement (illumination) et aux mêmes teneurs en saccharose, des feuilles excisées vont exprimer la 6-SFT alors que des feuilles attachées ne l'exprimeront pas. Ce choix de travailler sur plante entière nous a obligé à développer une technique permettant l'apport de sucres solubles et d'analogues de sucres solubles au niveau des feuilles et non dans la solution nutritive pour deux raisons principales. D'abord, comme les sucres ne

sont pas transportés par la sève xylémique et que les effets attendus sont au niveau des feuilles, des apports dans la solution nutritive n'étaient pas appropriés. Ensuite et surtout, l'idée était ici de mimer l'arrivée de sucres par les limbes ou le sommet des feuilles en croissance, tel que cela a lieu avant la défoliation. Nous avons donc opté pour un apport exogène par pulvérisation sur les feuilles coupées, la pénétration des sucres dans les tissus foliaires se faisant principalement au niveau de la section des tissus foliaires. La difficulté de cette méthode était de parvenir à apporter une quantité suffisante de sucres ou d'analogues, ce qui a été réalisé par des apports successifs au cours des 24 premières heures de repousse.

Pour étudier la signalétique sucre, la contrainte méthodologique forte est de pouvoir dissocier le véritable effet des sucres en tant que molécule « signal » aux effets dus à leur métabolisation. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé des analogues structuraux de sucres solubles. Ces analogues doivent être perçus en tant que « signal » sans pour autant être métabolisés.

Les analogues structuraux du glucose utilisés dans le cadre de cette étude étaient le 3-*O*-méthylglucose (3-OMG) et le mannose. Le 3-OMG est transporté dans la cellule mais n'est que très peu phosphorylé par l'hexokinase et peut donc être utilisé pour mettre en évidence une perception du signal glucose indépendant de l'hexokinase (Cortès *et al.*, 2003). Le mannose est connu pour être transporté dans la cellule puis phosphorylé par l'hexokinase en mannose-6-phosphate qui s'accumule dans la cellule car il ne peut pas être métabolisé (Brouquisse *et al.*, 2001). Lorsque le mannose a un effet régulateur sur la cible cellulaire étudiée mais pas le 3-OMG, cela indique que la perception du signal hexose se fait au niveau d'une hexokinase.

Les analogues du saccharose que nous avons utilisés sont le palatinose, le turanose, le lactulose et le tréhalose. Parmi ces analogues, le palatinose, le turanose et le lactulose ne sont pas ou peu transportés et métabolisés dans les cellules végétales. Ainsi lorsque ceux-ci ont un effet régulateur sur la cible cellulaire étudiée cela indique que la perception du signal saccharose se fait probablement au niveau d'un senseur plasmalemmique (Schmitt *et al.*, 1984; Bouteau *et al.*, 1999; Loreti *et al.*, 2000; Fernie *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2002; Atanassova *et al.*, 2003). Le cas du tréhalose est différent car il est maintenant bien connu que l'apport exogène de ce sucre entraîne une synthèse de tréhalose-6-phosphate (Schluepmann *et*

al., 2004) et que ce dernier joue un rôle central dans la régulation de l'utilisation du carbone pour la croissance (Eastmond *et al.*, 2002; Schluepmann *et al.*, 2003).

Quel que soit l'analogue utilisé, nous avons estimé qu'il était important de suivre les teneurs endogènes en sucres solubles de façon à distinguer les effets directs de ces analogues des effets indirects *via* la modification des teneurs endogènes en sucres solubles qu'ils peuvent induire.

1.1.2. Intérêt de l'expression hétérologue dans la levure Pichia pastoris pour la caractérisation fonctionnelle des deux FEHs clonées

Suite au criblage d'une banque d'ADNc, nous avons cloné des ADNc codant potentiellement des FEHs. Néanmoins, les 6-FEHs, 1-FEHs et les invertases qui sont toutes des glycoside-hydrolases ont des séquences peptidiques tellement proches que seule une caractérisation fonctionnelle de la protéine recombinante permet avec certitude de conclure sur l'activité des protéines. Le choix du système d'expression hétérologue reste délicat, car il doit répondre à certain nombre de contraintes. D'une part, ce système ne doit pas posséder d'activité invertasique endogène susceptible d'interférer avec la mesure de l'activité de la protéine recombinante. D'autre part, ce système doit être un système eucaryote car les FEHs sont des protéines *N*-glycosylées. Etant donné que la *N*-glycosylation est une modification post-traductionnelle qui exerce un effet potentiel sur l'activité et la spécificité de l'enzyme, il est important de choisir un système d'expression hétérologue qui permet l'addition de motifs glycosylés. Plusieurs systèmes ont ainsi été utilisés pour caractériser les fructosyltransférases (FTs) végétales elles aussi *N*-glycosylées : protoplastes de tabac (6-SFT d'orge, Sprenger *et al.*, 1995 ; 6G-FFT d'oignon, Vijn *et al.*, 1997 ; 1-SST de fêtuque, Lüscher *et al.*, 2000) ou suspensions cellulaires de tabac (cellules BY2, 6G-FFT d'oignon, Ritsema *et al.*, 2003) qui présentent l'avantage de glycosyler correctement les protéines mais le désavantage de posséder une activité invertase endogène ce qui rend difficile la détermination de l'activité invertasique intrinsèque du transgène introduit. Plus récemment, c'est la levure méthylotrophe *Pichia pastoris*, qui a été utilisée. Ce système a l'avantage de ne pas posséder d'invertase, de ne pas contenir de fructanes à l'état sauvage et de sécréter des quantités importantes de protéines dans le milieu de culture. Il a été utilisé avec succès pour l'expression fonctionnelle de la 6-SFT d'orge (Hochstrasser *et al.*, 1998), la 1-SST de fêtuque, la 1-SST et la 6-SFT de

blé (Kawakami et Yoshida, 2002), la 6G-FFT/1-FFT de ray-grass (Lasseur *et al.*, 2006) et pour les études de mutagenèse dirigée (Altenbach *et al.*, 2005; Ritsema *et al.*, 2006). Les motifs de *N*-glycosylation fixés à la séquence protéique par *Pichia pastoris* présentent de 8 à 15 résidus mannose alors que ceux qui sont liés par *Saccharomyces cerevisiae* en présentent de 50 à 150. En terme de taille de motif, la glycosylation opérée par *Pichia pastoris* apparaît donc relativement proche de celle qui se produit chez les végétaux. Cependant, il peut arriver que la protéine produite par *Pichia pastoris* ne présente pas exactement les mêmes propriétés enzymatiques que la protéine native (Hochstrasser *et al.*, 1998). Nous avons cependant choisi ce système d'expression hétérologue car il est reconnu pour produire des FEHs recombinantes dont l'activité est très proche de celle des FEHs natives (De Coninck *et al.*, 2005).

1.2 La régulation du métabolisme des fructanes après une défoliation.

La taille du pool de fructanes résulte d'un équilibre entre les activités de synthèse et d'hydrolyse. Lorsque le ray-grass a besoin d'énergie, comme c'est le cas après une défoliation, l'activité FEH augmente pendant que l'activité FT diminue fortement (Prud'homme *et al.*, 1992; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Au début de mon travail de thèse, les signaux et les mécanismes qui sont à l'origine de l'augmentation de l'activité FEH après une défoliation étaient encore inconnus.

1.2.1. Les signaux régulant le métabolisme des fructanes après une défoliation

Il est maintenant admis que les sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) sont perçus comme des molécules « signal » par les cellules végétales (Koch, 1996 ; Rolland *et al.*, 2006). Les sucres *per se* peuvent ainsi réguler la transcription de nombreux gènes et être à l'origine de la modulation de l'activité de certaines enzymes (Sheen, 1990; Tiessen *et al.*, 2003). Des travaux récents ont mis en évidence que le saccharose est perçu comme une molécule « signal » régulant positivement l'expression des FTs (Müller *et al.*, 2000; Nagaraj *et al.*, 2001). Concernant la régulation de l'activité FEH, une étude a suggéré que le saccharose mais aussi le glucose et le fructose pourraient être perçus comme des molécules « signal » réprimant l'activité FEH, mais sans le prouver de manière expérimentale (Yamamoto et Mino, 1987). Chez le ray-grass anglais, cette possibilité est également envisageable puisque l'augmentation de l'activité FEH après la coupe est concomitante avec

une forte chute des teneurs en glucose, fructose et saccharose (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a).

- Le signal « sucre » et la régulation de l'activité 1-SST après la défoliation

Nos résultats montrent clairement que l'apport exogène de sucres solubles (hexoses et saccharose) même si il a compensé la chute des sucres solubles, n'a pas permis d'empêcher la diminution de l'activité 1-SST après une défoliation dans les bases des feuilles en croissance et les gaines des feuilles matures. Cela semble en contradiction avec les données bibliographiques car la plupart des études rapportent que l'augmentation de l'activité 1-SST est le plus souvent précédée par une augmentation des teneurs en saccharose et qu'inversement, une activité SST faible est souvent corrélée avec des teneurs en saccharose faibles, notamment dans les bases des feuilles en croissance et les gaines des feuilles mature (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a; Lasseur *et al.*, 2006). De plus, des études récentes ont montré que le saccharose est perçu comme un signal aboutissant à la régulation positive de la transcription et de l'activité de la 1-SST et de la 6-SFT chez l'orge (Müller *et al.*, 2000; Nagaraj *et al.*, 2004).

D'après ces données, nos résultats pourraient s'expliquer par le fait que l'apport de saccharose n'a pas permis d'atteindre la valeur seuil nécessaire à l'induction de la transcription du gène de la 1-SST. L'évolution des teneurs en saccharose n'est cependant pas en faveur de cette hypothèse puisque chez les plantes traitées au saccharose, les teneurs en saccharose 24 heures après la défoliation sont égales à celles des plantes non défoliées dans les gaines et le double de celles des plantes non défoliées à la base des feuilles en croissance. Il reste néanmoins possible que le flux de saccharose ou sa teneur dans un compartiment tissulaire ou cellulaire particulier soient inférieurs à ceux des plantes non coupées et donc au-dessous du seuil de déclenchement de l'induction des FTs. Plus probablement, nos résultats pourraient s'expliquer par la présence d'un autre signal induit par la défoliation et réprimant l'augmentation de l'activité 1-SST par le saccharose. Dans la littérature, un signal réprimant l'activité 1-SST a été mis en évidence, il s'agit du nitrate (Morcuende *et al.*, 2004). Il est possible que ce signal intervienne également pour réprimer l'activité 1-SST après une défoliation. En effet, des études rapportent que le nitrate peut s'accumuler à la base des feuilles chez des ray-grass défoliés (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001a). Cependant, lors de notre expérience de défoliation présentée dans l'article I de la partie RESULTATS (données non

présentées), nous n'avons pas observé de teneur élevée en nitrate à la base des feuilles après 24 heures de repousse, même si sa teneur a pu transitoirement augmenter au cours du premier jour de repousse. Quoi qu'il en soit, nos données suggèrent qu'il doit exister un autre signal, que le signal sucre et le signal nitrate, induit par la défoliation et capable de réprimer l'activité 1-SST après une défoliation empêchant la néosynthèse de fructanes durant les premières heures de la repousse, même lorsque du saccharose exogène, apportés aux feuilles par pulvérisation, permet de maintenir les teneurs en saccharose à un niveau élevé. Il pourrait par exemple s'agir de l'ABA puisqu'il a été montré que l'apport exogène de cette hormone conduit à la diminution de l'activité 1-SST (Yang *et al.*, 2004) et du niveau des transcrits correspondant (Ruuska *et al.*, 2007).

- Le signal « sucre » et la régulation de l'activité FEH après la défoliation

Nos résultats montrent que l'apport exogène de sucres solubles (hexoses et saccharose) mais aussi d'analogues structuraux de sucres solubles (mannose, palatinose, lactulose, turanose et tréhalose) inhibe en partie l'augmentation de l'activité FEH après une défoliation, dans les tissus foliaires laissés en place qu'ils soient en croissance (bases des feuilles en croissance) ou adultes (gainés). **Ces résultats suggèrent que les hexoses et le saccharose sont perçus distinctement comme des signaux pouvant réprimer l'activité FEH à la base des feuilles du ray-grass anglais avant la défoliation et que la chute de leurs teneurs après la défoliation conduit à la levée de cette inhibition sur l'activité FEH.** Le fait que l'apport de mannose mais pas de 3-OMG puisse inhiber l'augmentation de l'activité FEH après la coupe suggère que le site de perception du signal « hexose » est l'hexokinase. Par ailleurs, le fait que le palatinose puisse inhiber l'augmentation de l'activité FEH après la coupe sans modifier fortement les teneurs en hexoses indique qu'un signal dissaccharide existe indépendamment du signal « hexose » et suggère que le site de perception du signal dissaccharide se situe au niveau plasmalemmique. Ce type de double perception à la fois du saccharose et des hexoses a déjà été mis en évidence chez la pomme de terre (Tiessen *et al.*, 2003) et permet une perception du niveau de sucre extracellulaire (perception du saccharose) et intracellulaire (perception des hexoses).

Cependant, l'apport exogène de sucres ne parvient pas toujours à inhiber totalement l'augmentation de l'activité FEH même si les plantes défoliées et traitées avec les différents sucres partagent avec les plantes témoins non défoliées des teneurs en sucres solubles

(glucose, fructose et saccharose) similaires, voire supérieures. Ces résultats suggèrent que le signal sucre n'est pas le seul signal régulant l'activité FEH. Dans ce cas, la présence de signaux régulant positivement l'activité FEH après la défoliation peut être envisagée comme le suggère des travaux menés au laboratoire sur les gibbérellines. Ces phytohormones pourraient être impliquées dans l'augmentation de l'activité FEH après la coupe. En effet, l'utilisation d'uniconazole (un inhibiteur de la biosynthèse des gibbérellines) diminue l'augmentation de l'activité FEH après la coupe (Morvan *et al.*, 1997). Cependant, le fait que cet inhibiteur ne soit pas spécifique de la voie de biosynthèse des gibbérellines et que les teneurs en gibbérellines n'augmentent pas après la coupe ne permet pas de tirer de conclusion claire sur le rôle des gibbérellines dans la régulation de l'activité FEH (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001b). A côté des gibbérellines, une autre phytohormone semble être impliquée dans la régulation de l'activité FEH mais dans des conditions physiologiques différentes de celles engendrées par la défoliation. En effet, chez le blé l'apport exogène d'ABA conduit à une augmentation de l'activité FEH (Yang *et al.*, 2004).

1.2.2. Les mécanismes à l'origine de la régulation du métabolisme des fructanes après une défoliation

- Régulation transcriptionnelle des activités FTs dans les tissus foliaires

Dans des conditions favorisant l'accumulation des fructanes, des travaux réalisés chez l'orge sur des limbes excisés indiquent que les activités 1-SST et 6-SFT sont régulées *via* une régulation transcriptionnelle. La modulation du niveau de transcrits est suffisante pour expliquer la régulation de ces deux activités car il est maintenant clair que la 1-SST et la 6-SFT ainsi que les ARNm correspondants sont soumis à un turn-over rapide (Obenland *et al.*, 1991; Nagaraj *et al.*, 2004). Le turn-over protéique de ces deux enzymes semble être lié à l'activité importante des protéases mais nos expressions dans le système d'expression hétérologue suggèrent également que la stabilité de ces protéines recombinantes est très faible. Des études récentes réalisées au laboratoire sur plante entière chez le ray-grass anglais corroborent en partie ces résultats. En effet, dans les bases des feuilles en croissance et les gaines des feuilles matures, il existe une régulation des FTs au niveau transcriptionnel (Lasseur *et al.*, 2006). En revanche, dans les limbes, la régulation des fructosyltransférases est probablement liée à une régulation post-transcriptionnelle (Lasseur *et al.*, 2006), puisque dans

ces tissus, l'augmentation du niveau des transcripts suite à l'accumulation du saccharose ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'activité.

Suite à une défoliation, durant la mobilisation des fructanes, nous avons mesuré une chute drastique du niveau des transcripts 1-SST, 6G-FFT et 6-SFT dans les bases des feuilles en croissance et les gaines des feuilles matures. Nos résultats suggèrent donc que cette diminution est majoritairement due à une diminution (ou un arrêt) de la transcription. Si la demi-vie de ces ARNm et des protéines correspondantes est courte, cela peut entraîner une disparition rapide des activités et ce d'autant plus rapidement qu'après la coupe, les protéines peuvent être aussi la cible d'activités protéolytiques qui augmentent après la défoliation (Ourry *et al.*, 1989).

- Régulation post-transcriptionnelle de l'activité FEH ?

Pendant ma thèse, j'ai obtenu des outils moléculaires nécessaires à l'étude du niveau de régulation de l'activité FEH puisque j'ai cloné 4 ADNc. **Parmi ces ADNc, un correspond à une 1-FEH (Lp1-FEHa) et un autre à une 6-FEH (Lp6-FEHa) nous permettant une investigation de la régulation au niveau transcriptionnel.** Les deux autres ADNc viennent d'être caractérisés et correspondent à une 1-FEH (Lp1-FEHb) et à une 1-FEH/INV.

Durant les phases actives de synthèse des fructanes, il est connu que l'activité FEH est faible mais jamais nulle *in vitro*, lorsqu'elle est mesurée en l'absence de saccharose, ce qui indique que les protéines sont présentes, même pendant les phases d'accumulation des fructanes (Wagner et Wiemken, 1989; Smouter et Simpson, 1991b; Prud'homme *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 1997b). Notre analyse transcriptionnelle est en accord avec la mesure de cette activité car les ARNm codant la Lp1-FEHa et la Lp6-FEHa sont présents avant la défoliation dans les bases des feuilles en croissance et les gaines des feuilles matures. Ces résultats suggèrent que la Lp1-FEHa et la Lp6-FEHa pourraient, durant la phase d'accumulation des fructanes, être actives et participer au turn-over des fructanes ayant lieu dans les feuilles de Poacées (Rocher, 1967; Pollock, 1982; Atkinson et Farrar, 1983; Farrar et Farrar, 1985). Néanmoins cette activité est probablement résiduelle *in vivo* car ces deux enzymes sont fortement inhibées par le saccharose.

Après la défoliation, l'activité FEH augmente et des résultats obtenus chez le dactyle suggèrent que cette augmentation est due à une synthèse *de novo* de protéines (Yamamoto et

Mino, 1989). Cette synthèse pourrait être la conséquence d'une augmentation du nombre de transcrits codant pour les FEHs qui conduirait à une augmentation du nombre d'enzymes. De façon surprenante, nos résultats montrent que le niveau des transcrits codant la Lp6-FEHa et la Lp1-FEHa non seulement n'augmente pas mais diminue après la défoliation. Il en est de même pour la Lp1-FEHb que nous avons caractérisé chez le ray-grass anglais (données non présentées). Cette diminution du niveau des transcrits est cependant beaucoup moins importante que celle observée pour les gènes codant les fructosyltransférases. Cette différence peut s'expliquer soit par une diminution moins forte de la transcription pour les gènes codant les FEHs que pour les gènes codant les FTs soit par une diminution aussi forte de la transcription mais par une stabilité des ARNm codant les FEHs plus grande que celle des ARNm codant les FTs. La deuxième explication est séduisante car une étude récente rapporte que les FTs sont régulés, en partie, *via* la stabilité de leur ARNm (Nagaraj *et al.*, 2004). De plus, il est connu que les ARNm codant les FTs sont soumis à un turn-over rapide (Obenland *et al.*, 1991; Nagaraj *et al.*, 2004). Quoi qu'il en soit, nos résultats indiquent que la cellule garde un pool d'ARNm codant les FEHs disponible pour la traduction. **Ces résultats suggèrent qu'après une défoliation, même si la transcription des gènes codant les FEHs diminue, un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle permettrait l'augmentation de l'activité FEH.** Ce type de régulation post-transcriptionnelle qui peut avoir lieu au niveau traductionnel et/ou post-traductionnel (modulation de la stabilité des ARNm, régulation de la traduction, activation redox ou par phosphorylation des enzymes) a longtemps été sous-estimé par rapport à la régulation transcriptionnelle mais commence à être bien documenté (Green, 1993; Bailey-Serres, 1999; Kawaguchi et Bailey-Serres, 2002). Chez *Arabidopsis*, une étude récente rapporte que le facteur de transcription ATB2/bZIP11 est régulé positivement au niveau transcriptionnel et négativement au niveau post-transcriptionnel par le saccharose (Rook *et al.*, 1998). Un autre argument de poids en faveur de notre hypothèse de régulation post-transcriptionnelle de l'activité FEH est fourni par une étude sur le dactyle qui rapporte que l'augmentation de l'activité FEH après une défoliation est fortement réprimée par des inhibiteurs de la synthèse protéique alors que des inhibiteurs de la transcription n'ont que peu d'effet (Yamamoto et Mino, 1989).

Cette hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle n'a cependant pas encore été vérifiée expérimentalement chez le ray-grass anglais. De plus il faut garder à l'esprit que l'activité FEH mesuré *in vitro* n'est pas uniquement la résultante de nos quatre enzymes. En effet il existe chez *Lolium perenne* au moins une autre isoforme de 6-FEH dont la séquence

nucléotidique n'est pas disponible (Marx *et al.*, 1997b). Par ailleurs chez le blé, 6 types de FEHs possédant différentes spécificités de substrats ont été récemment clonées (Van den Ende *et al.*, 2003a; Kawakami *et al.*, 2005; Van den Ende *et al.*, 2005). Dans la racine de chicorée, le niveau des transcrits codant une isoforme de 1-FEH est augmenté après la défoliation alors que le niveau des transcrits d'une autre isoforme de 1-FEH ne l'est pas (Van den Ende *et al.*, 2001). D'après ces données nous ne pouvons donc pas exclure l'hypothèse d'une régulation au niveau transcriptionnelle de certaines isoformes de FEH après la défoliation chez le ray-grass anglais. Cette possibilité n'est cependant pas incompatible avec une régulation post-transcriptionnelle de la Lp1-FEHa et de la Lp6-FEHa.

1.3 Conclusion sur la régulation du métabolisme des fructanes dans les tissus foliaires du ray-grass anglais

Pour conclure, nous nous autorisons à spéculer et proposons un modèle de régulation du métabolisme des fructanes dans les tissus foliaires du ray-grass anglais (Figure 43). Ce modèle est basé sur les résultats que nous avons obtenus grâce aux outils moléculaires dont nous disposons et des données présentes dans la littérature.

- Avant la défoliation :

L'activité fructosyltransférase (FT) est forte. Nous savons d'après la littérature que les différentes activités FTs sont régulées positivement au niveau transcriptionnel en réponse au signal « saccharose » impliquant le Ca^{2+} , les protéines kinases et phosphatases (Figure 43 (1)).

Concernant les activités de dégradation (FEH), puisque nos résultats indiquent que les gènes codant les FTs et les gènes codant les FEHs sont co-régulés, nous spéculons que la transcription des gènes codant les FEHs sont régulés positivement par le saccharose (2). D'après nos résultats nous savons que le signal « saccharose » perçu au niveau plasmalemmique (3), et que le signal « hexose » perçus au niveau de l'hexokinase (4), répriment l'activité FEH. Nous avons aussi montré que la repression de l'activité FEH n'a pas lieu au niveau transcriptionnel puisque la levée de la repression par les sucres suite à la défoliation n'entraîne pas une augmentation mais une diminution du nombre transcrit codant la Lp1-FEHa et la Lp6-FEHa. Nous suggérons donc que le signal « saccharose » et le signal « hexose » répriment l'activité FEH par une régulation post-transcriptionnelle comme cela

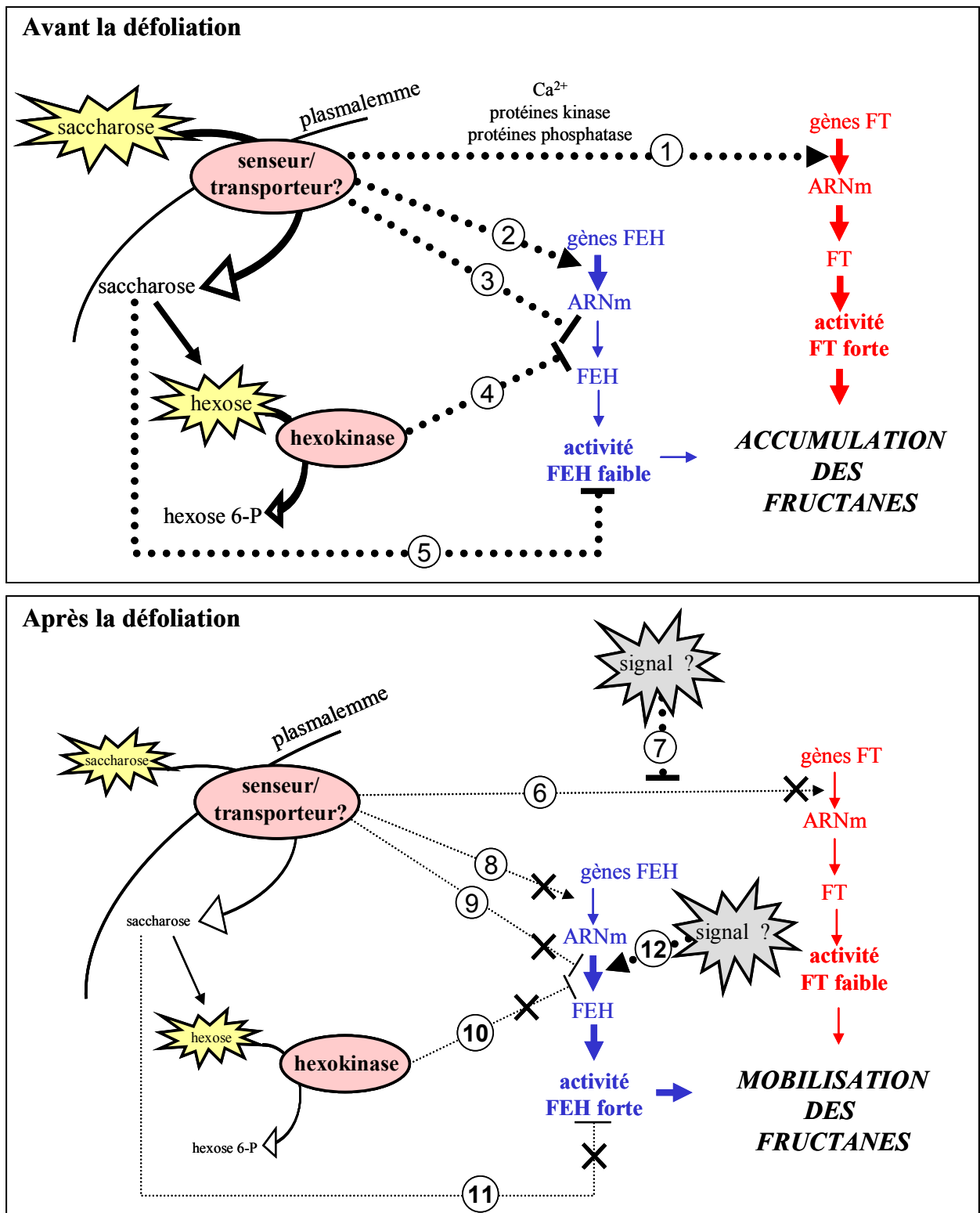


Figure 43: Modèle de co-régulation de l'expression des gènes codant les fructosyltransférases (FTs) et les fructane exohydrolases (FEHs) chez les Poacées prairiales soumises à la défoliation. Implication du saccharose et des hexoses en tant que molécules « signal ».

semble être le cas chez le dactyle. Par ailleurs nos résultats montrent que la Lp1-FEHa et la Lp6-FEHa sont inhibées directement par le saccharose par une interaction au niveau protéique comme c'est le cas pour une grande partie des FEHs (5).

Ces mécanismes de régulation se traduisent d'un point de vue physiologique par une accumulation de fructanes due à des activités de synthèse fortes et des activités de dégradation faibles.

- Après la défoliation :

La chute des teneurs en saccharose entraîne un arrêt ou une très forte diminution de la transcription des FTs conduisant à une diminution rapide des activités de synthèse des fructanes due à un turn-over rapide de ces protéines et des ARNm (6). De plus nous avons montré qu'après la coupe, un signal inhibe l'activité FT puisqu'un apport exogène de saccharose ne permet pas de rétablir l'activité FT (7). Ce signal pourrait être le nitrate car il peut augmenter de façon transitoire dans les bases des feuilles après la coupe.

La chute des teneurs en saccharose doit entraîner une diminution de la transcription des FEHs (8) mais va aussi lever l'inhibition au niveau post-transcriptionnel de l'activité FEH (9) *via* une diminution de la perception du saccharose au niveau plasmalemmique. La chute des teneurs en hexoses, perçue par l'hexokinase, doit aussi lever l'inhibition de l'activité FEH au niveau post-transcriptionnel (10). La chute des teneurs en saccharose empêche aussi l'inhibition directe de l'activité FEH par ce sucre (11). Par ailleurs nos travaux suggèrent qu'un autre signal pourrait réguler positivement l'activité FEH puisque l'apport exogène de saccharose et d'hexoses n'inhibe pas totalement l'augmentation de l'activité FEH après la défoliation. Comme le niveau des transcrits FEH diminue après la défoliation, nous spéculons que ce signal puisse agir au niveau post-transcriptionnel (12).

Ces mécanismes de régulation se traduisent d'un point de vue physiologique par une phase de mobilisation des fructanes.

Ainsi, même si le signal « sucre » est fortement impliqué dans la régulation du métabolisme des fructanes, il est probable que d'autres signaux soient également impliqués dans cette régulation. Par ailleurs, il est intéressant de constater que même après la défoliation

l'activité FEH peut répondre au signal « sucre » perçu au niveau intra ou extracellulaire alors que les activités de synthèse sont complètement inhibées par un autre signal. **En guise de conclusion, nous suggérons que l'activité FEH via une régulation post-transcriptionnelle contrôlée par le signal « sucre » serait le métronome du métabolisme des fructanes permettant à la cellule de moduler sa réponse à la carence carbonée après la coupe.**

2. Perspectives de recherche

2.1 Régulation du métabolisme des fructanes

Un certain nombre de points sont à éclaircir pour affiner le modèle de régulation du métabolisme des fructanes chez le ray-grass anglais, en particulier en ce qui concerne l'étude des FEHs

2.1.1. Poursuivre l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité FEH

- Mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle des FEHs

Même si nos résultats indiquent que l'activité FEH est régulée au niveau post-transcriptionnel, ils ne permettent pas de préciser les mécanismes mis en jeu. Il peut aussi bien s'agir d'une régulation de la stabilité des ARNm, d'une modulation de la traduction ou d'une régulation post-traductionnelle (phosphorylation, contrôle redox).

A court terme pour évaluer la contribution de ces différents mécanismes dans la régulation de l'activité FEH après une défoliation, nous pourrions apporter par pulvérisation sur des ray-grass défoliés des **inhibiteurs de la transcription** (comme l' α -amanitine, inhibiteur de la transcription bloquant l'ARN polymérase II) ou des **inhibiteurs de la traduction** (comme la cycloheximide, inhibiteur de l'activité peptidyl-transférase et donc de l'étape d'élongation lors de la synthèse peptidique) et suivre l'évolution de l'activité FEH et du niveau des transcrits. Cette technique nous permettrait d'évaluer la part due à la transcription et la part due à la traduction dans l'augmentation de l'activité FEH après la

coupe. Cela nous permettrait aussi de déterminer si les ARNm codant des FEHs sont plus stables que les ARNm codant les FTs. Néanmoins l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction est délicate car ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques et perturbent l'ensemble du métabolisme cellulaire.

A moyen terme, pour déterminer si l'augmentation de l'activité FEH s'accompagne d'une augmentation des protéines correspondantes, l'obtention **d'anticorps reconnaissant les FEHs** constitue une étape obligatoire. Cependant à cause de la proximité des séquences peptidiques des FEHs entre elles, il est a priori difficile d'obtenir des anticorps spécifiques pour chaque enzyme. Néanmoins, l'obtention d'anticorps pouvant reconnaître indistinctement les FEHs couplés avec une technique séparative comme l'électrophorèse bidimensionnelle nous permettrait d'estimer la quantité des différentes isoformes de FEH avant et après la défoliation.

Par ailleurs, il est maintenant admis que les invertases sont en partie régulées par des **interactions avec des inhibiteurs protéiques** de faible masse moléculaire (Rausch et Greiner, 2004). Le processus d'inhibition est modulé par les cations divalents qui activent l'inhibition et par le saccharose qui lève l'inhibition. Les inhibiteurs d'invertase seraient impliqués dans le contrôle de l'activité invertase, lors des transitions source/puits et dans les réponses aux stress (Rausch et Greiner, 2004). De tels inhibiteurs n'ont jamais été mis en évidence dans la régulation de l'activité FEH mais au vue de la proximité entre les FEHs et les invertases, la recherche d'interaction éventuelle entre FEHs et des hypothétiques inhibiteurs protéiques pourrait se révéler intéressante.

- La perception du fructose

Le rôle du saccharose en tant que molécule « signal » contrôlant la synthèse des fructanes avait été déjà clairement identifié (Müller *et al.*, 2000; Nagaraj *et al.*, 2001; Nagaraj *et al.*, 2004). Notre étude montre que son rôle signalétique est également impliqué dans la régulation de l'activité FEH. Nos résultats montrent également que, indépendamment du saccharose, le glucose agit en tant que molécule « signal » régulant négativement l'activité FEH. Lors de notre étude, nous n'avons pas testé le rôle du fructose en tant que molécule « signal » indépendamment du signal « glucose ». Les différences entre les effets du glucose et du fructose en tant que molécules signal sont cependant intéressantes chez les espèces

accumulatrices des fructanes. En effet, la synthèse des fructanes entraîne la libération importante de glucose, qui pourrait ensuite quitter la vacuole pour être phosphorylés par l'hexokinase tandis que la dégradation des fructanes produit elle de grandes quantités de fructose, qui peut être le substrat des hexokinases mais aussi surtout des fructokinases (Pego et Smeekens, 2000).

A l'avenir pour tester l'hypothèse d'un signal « fructose » perçu au niveau des fructokinases dans la régulation de l'activité FEH, nous pourrions utiliser un épimère du fructose le **psicose** qui est phosphorylé par la fructokinase mais pas métabolisé ensuite (Kato-Noguchi *et al.*, 2005).

- La perception du saccharose

Au sein de l'équipe « Carbone Défoliation » et dans le cadre de l'étude des flux de carbone chez le ray-grass anglais en réponse à une défoliation, la préparation de vésicules plasmalemmiques a permis de mettre en évidence l'existence d'une activité de transport de saccharose probablement impliquée dans le chargement apoplastique du phloème dans les gaines des feuilles matures après la défoliation (Desclos M., Amiard V., Noiraud-Romy N., Prud'homme MP. ; résultats non publiés). Plus récemment et dans la continuité de ces travaux un **transporteur de saccharose** a été cloné et caractérisé par expression hétérologue dans *Saccharomyces cerevisiae* (Berthier A., Noireau-Romy N., Prud'homme MP. ; résultats non publiés).

Dans ce contexte et en lien avec l'étude de la régulation des enzymes du métabolisme des fructanes, le clonage d'autres transporteurs de saccharose est envisagé, d'une part pour poursuivre l'étude du chargement du phloème et d'autre part pour rechercher un **éventuel senseur de saccharose**, qui se distinguerait des transporteurs par la présence d'une boucle cytoplasmique plus longue d'une dizaine d'acides aminés et part une capacité réduite à transporter le saccharose (Barker *et al.*, 2000).

- Identification d'autres signaux régulant le métabolisme des fructanes

Le **nitrate** a été récemment identifié comme signal régulant le métabolisme des fructanes et, notamment, comme un signal pouvant bloquer le signal sucre chez l'orge (Morcuende *et al.*, 2004). Il est probable que ce signal contrôle également le ratio protéine/fructanes lors du développement végétatif du ray-grass. Nos résultats suggèrent aussi que des signaux non identifiés régulent le métabolisme des fructanes après la coupe, en parallèle ou en interaction avec les signaux « sucre ». Des résultats récents obtenus chez le blé indique que l'**ABA** pourrait avoir un rôle majeur dans la régulation du métabolisme des fructanes par son action à la fois sur l'expression des FTs et des FEHs (Yang *et al.*, 2004; Ruuska *et al.*, 2007). Comme la défoliation constitue aussi une blessure pour la plante, l'estimation du rôle joué par certaines phytohormones induites par des situations de blessure comme l'**acide jasmonique** et l'**éthylène** pourraient se révéler une piste intéressante, d'autant plus que la voie de signalisation de l'éthylène en particulier est connue pour interagir avec celle des signaux sucres (Yanagisawa *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006).

2.1.2. Etendre l'étude aux autres isoformes de FEHs

Il est fort probable qu'un certain nombre d'autres isoformes de FEHs existe chez *L. perenne*. Ainsi chez le blé, six FEHs différentes ont été clonées et caractérisés à ce jour (Van den Ende *et al.*, 2003a; Kawakami *et al.*, 2005; Van den Ende *et al.*, 2005). Pour comprendre la régulation de l'activité FEH totale il est nécessaire de prendre en considération l'ensemble des isoformes qui participent à cette activité et d'appréhender l'importance de chacune pour la physiologie de la plante.

- Cloner et caractériser d'autres FEHs chez *L. perenne*

Une 6-FEH de ray-grass anglais a été purifiée à l'homogénéité (Marx *et al.*, 1997b) mais il ne s'agit probablement pas de la Lp6-FEHa que nous avons cloné car elles ont un pI différents et des spécificités vis-à-vis des substrats différents. Une FEH potentielle, différente des nôtres a également été clonée par Chalmers *et al.*, (2005) mais la protéine correspondante n'a pas été caractérisée.

Le **clonage des autres FEHs de ray-grass anglais** devra donc être poursuivi en criblant de nouveau la banque d'ADNc avec les sondes homologues dont nous disposons maintenant. Comme pour la Lp1-FEHa et la Lp6-FEHa, les clones obtenus devront être caractérisés par expression hétérologue dans *Pichia pastoris*.

- Etude du rôle de chacune des isoformes

Il s'agira ensuite de déterminer pour chacune des isoformes leur importance respective dans les différents processus physiologiques et dans les différents tissus. Si les deux isoformes que nous avons étudiés répondent de façon similaire à la défoliation, cela n'est pas obligatoirement le cas pour les autres isoformes. Par ailleurs, l'obtention de plantes transgéniques sous ou sur-exprimant chacune des isoformes devrait permettre d'affiner l'étude (collaboration envisagée avec le Dr Spangerberg, Plant Biotechnology Center, Victoria, Australie)

2.2 De l'étude du métabolisme des fructanes à la sélection variétale

Chez le ray-grass anglais, les sucres solubles (fructanes, glucose, fructose 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; Morvan-Bertrand *et al.*, 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 capable d'accumuler de forte quantité de sucres solubles et notamment de fructanes. Dans ce cadre, nous nous proposons d'intervenir *via* deux approches en utilisant nos connaissances sur le métabolisme glucidique du ray-grass.

2.2.1. L'origine de la variabilité génétique des richesses en sucres

Au sein de l'espèce *L. perenne*, différentes variétés accumulant plus ou moins de sucres solubles et notamment de fructanes ont été caractérisées. Au laboratoire, des travaux réalisés sur deux variétés contrastées du point de vue de leurs teneurs en fructanes (Aurora et Perma)

et qui font suite aux travaux de Turner *et al.*, (2001, 2002) n'ont pas encore permis de tirer de conclusions claires sur l'origine de la variabilité des richesses en sucres. Il semblerait néanmoins qu'elles résultent de l'interaction complexe entre la capacité photosynthétique, la capacité de croissance et la capacité de synthèse des fructanes.

Dans ce contexte, il est envisagé en collaboration avec le Pr. M.O. Humphreys (IGER, Aberyswyth, UK) et le T. Didion (RISØE, Danemark) qui disposent de variétés plus ou moins riches en sucres, de poursuivre la recherche de l'origine des différences variétales concernant l'accumulation des sucres solubles, et ce grâce aux nouveaux outils moléculaires dont nous disposons. Il est également envisagé d'étudier l'influence de cette différence de richesse en sucres sur la repousse des plantes et le métabolisme des fructanes après une défoliation.

2.2.2. Les gènes codant des enzymes du métabolisme des fructanes, des marqueurs moléculaires pour la sélection variétale ?

Les gènes codant les enzymes du métabolisme des fructanes pourraient dans 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 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 de certaines fructosyltransférases ou de certaines FEHs plus ou moins fortement exprimées selon la variété.

Dans ce contexte, il est envisagé en collaboration avec Philippe Barre (UGAPF, INRA de Lusignan) de poursuivre la cartographie des gènes codant les enzymes de dégradation mais aussi de synthèse des fructanes. Ces informations pourraient être mise en relation avec les QTL liés aux teneurs en sucres (Cogan *et al.*, 2005 ; Turner *et al.*, 2006). La cartographie du gène Lp1-FEHa a déjà permis de montrer qu'il se positionne dans la même région chromosomique que les gènes LpFEH et LpFT4 codant respectivement une FEH potentielle et une FT (Chalmers *et al.*, 2005) mais aucun des QTL liés aux teneurs en sucres solubles actuellement identifiés n'est co-localisé avec ces gènes (Turner *et al.*, 2006).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A**lberda TH (1957) The effect of cutting, light intensity and temperature on growth and carbohydrate content of perennial ryegrass. *Plant and Soil* **8**: 190-230
- Albrecht G, Biemelt S, Baumgartner S** (1997) Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. *New Phytologist* **136**: 137-144
- Albrecht G, Mustroph A, Fox TC** (2004) Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots. *Physiologia Plantarum* **120**: 93-105
- Alderson A, Sabelli PA, Dickinson JR, Cole D, Richardson M, Kreis M, Shewry PR, Halford NG** (1991) Complementation of SNF1, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 8602-8605
- Allard G, Nelson CJ** (1991) Photosynthate partitioning in basal zones of tall fescue leaf blades. *Plant Physiology* **95**: 663-668
- Alm V, Fang C, Busso CS, Devos KM, Vollan K, Grieg Z, Rognli OA** (2003) A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other Poaceae species. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 25-40
- Altenbach D, Nuesch E, Ritsema T, Boller T, Wiemken A** (2005) Mutational analysis of the active center of plant fructosyltransferases: Festuca 1-SST and barley 6-SFT. *Febs Letters* **579**: 4647-4653
- Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard J-P, Huault C, Keller F, Prud'homme M-P** (2003a) Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. *Plant Physiology* **132**: 2218-2229
- Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard JP, Huault C, Prud'homme MP** (2003b) 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, Billard J, Huault C, Sandström J, Prud'homme M** (2004) Carbohydrate and amino acid composition in phloem sap of *Lolium perenne* L. before and after defoliation. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1594-1601
- Archbold HK** (1940) Fructosans in the monocotyledons. A review. *New Phytologist* **39**: 185-219
- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thevenot P, Delrot S** (2003) Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiology* **131**: 326-334
- Atkinson CJ, Farrar JF** (1983) Allocation of photosynthetically fixed carbon in *Festuca ovina* L. and *Nardus stricta* L. *New Phytologist* **95**: 519-531
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein JM, Iturriaga G** (2004) The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscissic acid, and stress signaling. *Plant Physiology* **136**: 3649-3659

- B**achmann M, Matile P, Keller F (1994) Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. *Plant Physiology* **105**: 1335-1345
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J** (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**: 938-942

- Bailey-Serres J** (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends in Plant Science* **4**: 142-148
- Ballard RA, Simpson RJ, Pearce GR** (1990) Losses of the digestible components of annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) during senescence. *Australian Journal of Agricultural Research* **41**: 719-731
- Bancal P, Cartipa NC, Gaudillere JP** (1992) Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytologist* **120**: 313-321
- Barker L, Kuhn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB** (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *The Plant Cell* **12**: 1153-1164
- Barth I, Meyer S, Sauer N** (2003) PmsUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *The Plant Cell* **15**: 1375-1385
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**: 783-795
- Bennett WS, Jr., Steitz TA** (1978) Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 4848-4852
- Bieleski RL** (1993) Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. *Plant Physiology* **103**: 213-219
- Bonnett G, Simpson R** (1993) Fructan-hydrolyzing activities from *Lolium rigidum* Gaudin. *New Phytologist* **123**: 443-451
- Bonnett G, Simpson R** (1995) Fructan exohydrolase activities from *Lolium rigidum* that hydrolyze beta-2,1 and beta-2,6 glycosidic linkages at different rates. *New Phytologist* **131**: 199-209
- Bonnett GD, Incoll LD** (1993) Effects on the stem of winter barley of manipulating the source and sink during grain-filling. 2. Changes in the composition of water-soluble carbohydrates of internodes. *Journal of Experimental Botany* **44**: 83-91
- Bonnett GD, Sims IM, Simpson RJ, Cairns AJ** (1997) Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytologist* **136**: 11-17
- Bonnett GD, Sims IM, St. John JA, Simpson RJ** (1994) Purification and characterization of fructans with beta-2, 1- and beta-2, 6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytologist* **127**: 261-269
- Borland AM, Farrar JF** (1985) Diel patterns of carbohydrate metabolism in leaf blades and leaf sheaths of *Poa annua* L. and *Poa x jemtlandica* (Almq.) Richt. *New Phytologist* **100**: 519-531
- Borland AM, Farrar JF** (1988) Compartmentation and fluxes of carbon in leaf blades and leaf sheaths of *Poa annua* L. and *Poa x jemtlandica* (Almq.) Richt. *Plant, Cell and Environment* **11**: 535-543
- Borland AM, Farrar JF** (1989) The partitioning of photosynthetically fixed carbon in the leaf sheath of *Poa pratensis* L. *Journal of Experimental Botany* **40**: 1247-1254
- Bourgoin B** (1995) Les espèces de graminées à gazon. INRA et BRG, France
- Bouteau F, Dellis O, Bousquet U, Rona JP** (1999) Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from *Hevea*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **48**: 135-139
- Brouquisse R, Evrard A, Rolin D, Raymond P, Roby C** (2001) Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maize root tips. Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties. *Plant Physiology* **125**: 1485-1498

Buttner M (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581**: 2318-2324

- Caimi PG, McCole LM, Klein TM, Hershey HP** (1997) Cytosolic expression of the *Bacillus amyloliquefaciens* SacB protein inhibits tissue development in transgenic tobacco and potato. *New Phytologist* **136**: 19-28
- Cairns AJ** (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
- Cairns AJ, Ashton JE** (1993) Species-dependent patterns of fructan synthesis by enzymes from excised leaves of oat, wheat, barley and timothy. *New Phytologist* **124**: 381-388
- Cairns AJ, Pollock CJ** (1988) Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. II. Changes in fructosyl transferase activity following excision and application of inhibitors of gene expression. *New Phytologist* **109**: 407-413
- Cairns AJ, Winters A, Pollock CJ, Nelson CJ, Schnyder H, Allard G** (1991) Fructan metabolism in leaves of temperate grasses. In: Bonnemain JL, Delrot S, Lucas WJ, Dainty J (eds.), *Phloem Transport and Assimilate Compartmentation*, pp.33-40. Ouest Editions, Presses Académiques, Nantes, France.
- Carpita NC, Housley TL, Hendrix JE** (1991) New features of plant fructan structure revealed by methylation analysis and carbon-13 NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **217**: 127-136
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV** (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell* **16**: 3285-3303
- Chalmers J, Johnson X, Lidgett A, Spangenberg G** (2003) Isolation and characterisation of a sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Plant Physiology* **160**: 1385-1391
- Chalmers J, Lidgett A, Cummings N, Cao Y, Forster J, Spangerberg G** (2005) Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 459-474
- Chambert R, Tréboul G, Dedonder R** (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* **41**: 285-300
- Chan MT, Yu SM** (1998) The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6543-6547
- Chatterton NJ, Harrison PA** (1997) Fructan oligomers in *Poa ampla*. *New Phytologist* **136**: 3-10
- Chatterton NJ, Harrison PA, Bennett JH, Asay KH** (1989) Carbohydrate partitioning in 185 accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures. *Journal of Plant Physiology* **134**: 169-179
- Chatterton NJ, Harrison PA, Thornley WR, Draper EA** (1990) Oligosaccharides in foliage of *Agropyron*, *Bromus*, *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium* and *Phleum*. *New Phytologist* **114**: 167-171
- Chen JG, Jones AM** (2004) AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Enzymology* **389**: 338-350
- Chen JG, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP** (2003) A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* **301**: 1728-1731

- Cheng WH, Taliercio EW, Chourey PS** (1999) Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10512-10517
- Cheng WY, Hubert N, Landry BS** (1993) A simple and rapid microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *PCR Methods and Applications*: 69-70
- Chiou TJ, Bush DR** (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 4784-4788
- Claessens G, Van Laere A, De Proft M** (1990) Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* **136**: 35-39
- Cogan NOI, Smith KF, Yamada T, Francki MG, Vecchies AC, Jones ES, Spangenberg GC, Forster JW** (2005) QTL analysis and comparative genomics of herbage quality traits in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 364-380
- Cortès S, Gromova M, Evrard A, Roby C, Heyraud A, Rolin DB, Raymond P, Brouquisse RM** (2003) In plants, 3-O-Methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiology* **131**: 824-837

- Dale S, Arro M, Becerra B, Morrice NG, Boronat A, Hardie DG, Ferrer A** (1995) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *European Journal of Biochemistry* **233**: 506-513
- Damari-Weissler H, Kandel-Kfir M, Gidoni D, Mett A, Belausov E, Granot D** (2006) Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants. *Planta* **224**: 1495-1502
- Darwen CWE, John P** (1989) Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiology* **89**: 658-663
- Davidson JL, Milthorpe FL** (1966) The effect of defoliation on the carbon balance in *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany* **30**: 185-198
- Davies A** (1965) Carbohydrate levels and regrowth in perennial ryegrass. *Journal of Agricultural Science* **65**: 213-221
- De Coninck B, Le Roy K, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, Van Laere A, Van den Ende W** (2005) *Arabidopsis* AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell and Environment* **28**: 432-443
- De Roover J, De Winter M, Van Laere A, Timmermans J, Van den Ende W** (1999a) Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus* L. *Physiologia Plantarum* **106**: 28-34
- De Roover J, Van Laere A, Van den Ende W** (1999b) Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* **106**: 158-163
- 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* after defoliation: assessment by ^{13}C and ^{15}N steady-state labelling. *Plant, Cell and Environment* **20**: 37-46
- Demel RA, Dorrepaal E, Ebskamp MJM, Smeekens JCM, De Kruijff B** (1998) Fructans interact strongly with model membranes. *Biochimica and Biophysica Acta* **1375**: 36-42
- Dijken AJHv, Schluepmann H, Smeekens SCM** (2004) *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiology* **135**: 969-977
- Donaghy DJ, Fulkerson WJ** (1997) The importance of water-soluble carbohydrate reserves on regrowth and root growth of *Lolium perenne* (L.). *Grass and Forage Science* **52**: 401-407
- Duchateau N, Bortlik K, Simmen U, Wiemken A, Bancal P** (1995) Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. *Plant Physiology* **107**: 1249-1255

- E**astmond PJ, van Dijken AJ, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JD, Smeekens SC, Graham IA (2002) Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal* **29**: 225-235
- Echeverria E** (2000) Vesicle-mediated solute transport between the vacuole and the plasma membrane. *Plant Physiology* **123**: 1217-1226
- Edelman J, Jefford TG** (1968) The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* **67**: 517-531
- Efrat S, Tal M, Lodish HF** (1994) The pancreatic beta-cell glucose sensor. *Trends in Biochemical Sciences* **19**: 535-538
- Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch T** (1997) Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *The Plant Cell* **9**: 1825-1841
- Ernst M, Chatterton J, Harrison PA** (1996) Purification and characterization of a new fructan series from species of Asteraceae. *New Phytologist* **132**: 63-66

- F**arrar SC, Farrar JF (1985) Carbon fluxes in leaf blades of barley. *New Phytologist* **100**: 271-283
- Fernie AR, Roessner U, Geigenberger P** (2001) The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiology* **125**: 1967-1977
- Frehner M, Keller F, Wiemken A** (1985) Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Plant Physiology* **116**: 197-208
- Fricke, W** (2002) Biophysical limitation of cell elongation in cereal leaves. *Annals of botany* **90**: 157-167
- Fu H, Park WD** (1995) Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *The Plant Cell* **7**: 1369-1385

- Gancedo JM** (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 334-361
- Gibson SI** (2000) Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* **124**: 1532-1539
- Godt DE, Riegel A, Roitsch T** (1995) Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: Characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension cultures and sink tissue specific expression in plants. *Journal of Plant Physiology* **146**: 231-238
- 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*: 411-415
- Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ** (1994) Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *The Plant Cell* **6**: 761-772
- Green PJ** (1993) Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiology* **102**: 1065-1070
- Grierson C, Du JS, de Torres Zabala M, Beggs K, Smith C, Holdsworth M, Bevan M** (1994) Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *The Plant Journal* **5**: 815-826
- Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA** (1995) Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* **83**: 69-78
- 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

- Halford NG, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y** (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany* **54**: 467-475
- Hardie DG, Carling D, Carlson M** (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annual Review of Biochemistry* **67**: 821-855
- Hellwege EM, Raap M, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer AG** (1998) Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. *FEBS Letters* **427**: 25-28
- Hendry G** (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* **123**: 3-14
- Henson CA, Livingston DP III** (1996) Purification and characterization of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes beta-2,6-fructans. *Plant Physiology* **110**: 639-644
- Henson CA, Livingston DP III** (1998) Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 715-720
- Hilgarth C, Sauer N, Tanner W** (1991) Glucose increases the expression of the ATP/ADP translocator and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Chlorella*. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 24044-24047

- Hincha DK, Zuther E, Hellwege EM, Heyer AG** (2002) Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* **12**: 103-110
- Hisano H, Kanazawa A, Kawakami A, Yoshida M, Shimamoto Y, Yamada T** (2004) Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science* **167**: 861-868
- Hochstrasser U, Luscher M, De Virgilio C, Boller T, Wiemken A** (1998) Expression of a functional barley sucrose-fructan 6-fructosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Letters* **440**: 356-360
- Housley TL, Pollock CJ** (1993) The metabolism of fructan in higher plants. In: Science and technology of fructans. CRC Press, USA
- Humphreys MO** (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

- Ishiguro S, Nakamura K** (1992) The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots. *Plant Molecular Biology* **18**: 97-108
- Ishiguro S, Nakamura K** (1994) Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Molecular and General Genetics* **244**: 563-571
- Itaya NM, Buckeridge MS, Figueiredo-Ribeiro RCL** (1997) Biosynthesis *in vitro* of high-molecular-mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *New Phytologist* **136**: 53-60

- Jang JC, Sheen J** (1994) Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* **6**: 1655-1679
- Jensen LB, Andersen JR, Frei U, Xing Y, Taylor C, Holm PB, Lubberstedt 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 LB, Muylle H, Arens P, Andersen CH, Holm PB, Ghesquiere M, Julier B, Lubberstedt T, Nielsen KK, Riek JD, 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, Van den Ende W, Schroeven L, Clerens S, Geuten K, Cheng S, Bennett J** (2007) The rice genome encodes two vacuolar invertases with fructan exohydrolase activity but lacks the related fructan biosynthesis genes of the Pooideae. *New Phytologist* **173**: 50-62
- Johnson X, Lidgett A, Chalmers J, Guthridge K, Jones E, Cummings N, Spangenberg G** (2003) Isolation and characterisation of an invertase cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Plant Physiology* **160**: 903-911

- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Jain A, Held MA, Carpita NC, Raghothama KG** (2007) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in *Arabidopsis*. *Planta* **225**: 907-918
- Kato-Noguchi H, Takaoka T, Izumori K** (2005) Psicose inhibits lettuce root growth *via* a hexokinase-independent pathway. *Physiologia Plantarum* **125**: 293-298
- Kaufman PB, Ghosheh NS, Lacroix JD, Soni SL, Ikuma H** (1973) Regulation of invertase levels in avena stem segments by gibberellic acid, sucrose, glucose, and fructose. *Plant Physiology* **52**: 221-228
- Kawaguchi R, Bailey-Serres J** (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 460-465
- 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, Van den Ende W** (2005) Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* **358**: 93-101
- Klepek Y-S, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N** (2005) *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-symport of numerous substrates, including myo-Inositol, glycerol, and ribose. *The Plant Cell* **17**: 204-218
- Koch K** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 509-540
- Koch KE, Nolte KD, Duke ER, McCarty DR, Avigne WT** (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *The Plant Cell* **4**: 59-69
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P** (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 11118-11123
- Konstantinova T, Parvanova D, Atanassov A, Djilianov D** (2002) Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* **163**: 157-164
- Koops AJ, Jonker HH** (1996) Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiology* **110**: 1167-1175
- Koroleva OA, Farrar JF, Deri Tomos A, Pollock CJ** (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 OA, Farrar JF, Tomos AD, Pollock CJ** (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 OA, Tomos AD, Farrar JF, Gallagher J, Pollock CJ** (2001) Carbon allocation and sugar status in individual cells of barley leaves affects expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase gene. *Annals of Applied Biology* **138**: 27-32
- Kunze I, Kunze G, Bröker M, Manteuffel R, Meins Jr F, Müntz K** (1998) Evidence for secretion of vacuolar alpha-mannosidase, class I chitinase, and class I beta-1,3-glucanase in suspension cultures of tobacco cells. *Planta* **205**: 92-99

- Labhart CH, Nösberger J, Nelson CJ** (1983) Photosynthesis and degree of polymerization of fructan during reproductive growth of meadow fescue at two temperatures and two photon flux densities. *Journal of Experimental Botany* **34**: 1037-1046
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM** (1999) The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing. *The Plant Cell* **11**: 707-726
- Lasseur B, Lothier J, Djoumad A, De Coninck B, Smeekens S, Van Laere A, Morvan-Bertrand A, Van den Ende W, Prud'homme M-P** (2006) Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)/fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Experimental Botany* **57**: 2719-2734
- Lasseur B, Lothier J, Morvan-Bertrand A, Escobar-Gutiérrez A, Humphreys MO, Prud'homme M-P** (2007) Impact of defoliation frequency on regrowth and carbohydrate metabolism in contrasting varieties of *Lolium perenne*. *Functional Plant Biology* **34**: 418-430
- Laurie S, McKibbin RS, Halford NG** (2003) Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *Journal of Experimental Botany* **54**: 739-747
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Muller C, Krapp A, von Wiren N, Daniel-Vedele F, Gojon A** (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell* **15**: 2218-2232
- Lemaire K, Van de Velde S, Van Dijck P, Thevelein JM** (2004) Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* **16**: 293-299
- Li ZS, Noubhani AM, Bourbonloux A, Delrot S** (1994) Affinity purification of sucrose binding proteins from the plant plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1219**: 389-397
- Liang H, Gaber RF** (1996) A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Molecular Biology of the Cell* **7**: 1953-1966
- Lindmann CAM** (1905) Bilder ur Nordens Flora, Sweden, Project Runeberg, <http://runeberg.org/nordflor>
- Livingston DP III, Chatterton NJ, Harrison PA** (1993) Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytologist* **123**: 725-734
- Livingston DP III, Henson CA** (1998) Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* **116**: 403-408
- Loreti E, Alpi A, Perata P** (2000) Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. *Plant Physiology* **123**: 939-948
- Loreti E, Bellis LD, Alpi A, Perata P** (2001) Why and how do plant cells sense sugars? *Annals of Botany* **88**: 803-812
- Loreti E, Matsukura C-a, Gubler F, Alpi A, Yamaguchi J, Perata P** (2000) Glucose repression of alpha-amylase in barley embryos is independent of GAMYB transcription. *Plant Molecular Biology* **44**: 85-90
- Lothier J, Lasseur B, Djoumad A, Le Roy K, Van Laere A, Prud'homme M-P, Barre P, Van den Ende W, Morvan-Bertrand A** (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 of Experimental Botany* **58**: 1969-1983
- Lu C-A, Ho T-hD, Ho S-L, Yu S-M** (2002) Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression. *The Plant Cell* **14**: 1963-1980
- Lu CA, Lim EK, Yu SM** (1998) Sugar response sequence in the promoter of a rice alpha-amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 10120-10131
- Lu CA, Lin CC, Lee KW, Chen JL, Huang LF, Ho SL, Liu HJ, Hsing YI, Yu SM** (2007) The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *The Plant Cell* **19**: 2484-2499
- Lüscher M, Hochstrasser U, Vogel G, Aeschbacher R, Galati V, Nelson CJ, Boller T, Wiemken A** (2000) Cloning and functional analysis of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from tall fescue. *Plant Physiology* **124**: 1217-1227
- Lüscher M, Nelson CJ** (1995) Fructosyltransferase activities in the leaf growth zone of tall fescue. *Plant Physiology* **107**: 1419-1425
- M'Batchi B, Delrot S** (1988) Stimulation of sugar exit from leaf tissues of *Vicia faba* L. *Planta* **174**: 340-348
- Macadam JW, Nelson CJ** (1987) Specific leaf weight in zones of cell division, elongation and maturation in tall fescue leaf blades. *Annals of Botany* **59**: 369-376
- Macfarlane WM, Shepherd RM, Cosgrove KE, James RF, Dunne MJ, Docherty K** (2000) Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca^{2+} . *Diabetes* **49**: 418-423
- Martinez Noël G, Tognetti J, Nagaraj V, Wiemken A, Pontis H** (2006) Calcium is essential for fructan synthesis induction mediated by sucrose in wheat. *Planta* **225**: 183-191
- Martinez Noël G, Tognetti JA, Pontis HG** (2001) Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. *Planta* **213**: 640-646
- Marx SP, Nösberger J, Frehner M** (1997a) Seasonal variation of fructan-beta-fructosidase (FEH) activity and characterization of a beta-(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytologist* **135**: 267-277
- Marx SP, Nösberger J, Frehner M** (1997b) Hydrolysis of fructan in grasses: a beta-(2-6)-linkage specific fructan-beta-fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. *New Phytologist* **135**: 279-290
- Masaki T, Mitsui N, Tsukagoshi H, Nishii T, Morikami A, Nakamura K** (2005a) ACTIVATOR of Spomin::LUC1/WRINKLED1 of *Arabidopsis thaliana* transactivates sugar-inducible promoters. *Plant and Cell Physiology* **46**: 547-556
- Masaki T, Tsukagoshi H, Mitsui N, Nishii T, Hattori T, Morikami A, Nakamura K** (2005b) Activation tagging of a gene for a protein with novel class of CCT-domain activates expression of a subset of sugar-inducible genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **43**: 142-152
- Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA** (1998) Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes* **47**: 307-315
- Miller LA, Moorby JM, Davies DR, Humphreys MO, Scollan ND, MacRae JC, Theodorou MK** (2001) Increased 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
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng Wh, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336
- Morcuende R, Kostadinova S, Perez P, del Molino IMM, Martinez-Carrasco R** (2004) Nitrate is a negative signal for fructan synthesis, and the fructosyltransferase-inducing trehalose inhibits nitrogen and carbon assimilation in excised barley leaves. *New Phytologist* **161**: 749-759
- Morikami A, Matsunaga R, Tanaka Y, Suzuki S, Mano S, Nakamura K** (2005) Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco. *Molecular Genetics and Genomics* **272**: 690-699
- Morvan-Bertrand A, Boucaud J, Le Saos J, Prud'homme MP** (2001a) 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
- Morvan-Bertrand A, Boucaud J, Prud'homme MP** (1999a) Influence of initial levels of carbohydrates, fructans, nitrogen, and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L. cv. Bravo following defoliation. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1817-1826
- Morvan-Bertrand A, Ernstsén A, Lindgård B, Koshioka M, Le Saos J, Boucaud J, Prud'homme M-P, Junttila O** (2001b) Endogenous gibberellins in *Lolium perenne* and influence of defoliation on their contents in elongating leaf bases and in leaf sheaths. *Physiologia Plantarum* **111**: 225-231
- Morvan-Bertrand A, Pavis N, Boucaud J, Prud'homme MP** (1999b) Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after defoliation: assessment by ¹³C steady-state labelling and carbohydrate analysis. *Plant, Cell and Environment* **22**: 1097-1108
- Morvan A, Challe G, Prud'homme MP, 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
- Müller J, Aeschbacher RA, Sprenger N, Boller T, Wiemken A** (2000) Disaccharide-mediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiology* **123**: 265-274

- N**agaraj VJ, Altenbach D, Galati V, Lüscher M, Meyer AD, Boller T, Wiemken A (2004) Distinct regulation of sucrose:sucrose-1-fructosyltransferase (1-SST) and sucrose:fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT), the key enzymes of fructan synthesis in barley leaves: 1-SST as the pacemaker. *New Phytologist* **161**: 735-748
- Nagaraj VJ, Galati V, Luscher M, Boller T, Wiemken A** (2005) Cloning and functional characterization of a cDNA encoding barley soluble acid invertase (HvINV1). *Plant Science* **168**: 249-258
- Nagaraj VJ, Riedl R, Boller T, Wiemken A, Meyer AD** (2001) Light and sugar regulation of the barley sucrose : fructan 6-fructosyltransferase promoter. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1601-1607
- Nørholm MHH, Nour-Eldin HH, Brodersen P, Mundy J, Halkier BA** (2006) Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS letters* **580**: 2381-2387

- O**benland DM, Simmen U, Boller T, Wiemken A (1991) Regulation of sucrose-sucrose-fructosyltransferase in barley leaves. *Plant Physiology* **97**: 811-813
- Ourry A, Bigot J, Boucaud J** (1989) Protein mobilization from stubble and roots, and proteolytic activities during post-clipping regrowth of perennial ryegrass. *Journal of Plant Physiology* **134**: 298-303
- Ozcan S, Dover J, Johnston M** (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* **17**: 2566-2573

- P**avis N, Boucaud J, Prud'homme MP (2001a) Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytologist* **150**: 97-109
- Pavis N, Chatterton NJ, Harrison PA, Baumgartner S, Praznik W, Boucaud J, Prud'homme MP** (2001b) Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. *New Phytologist* **150**: 83-95
- Pego JV, Smeekens SCM** (2000) Plant fructokinases: a weet family get-together. *Trends in Plant Science* **8**: 531-536
- Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SC** (1999) Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology* **119**: 1017-1023
- Penson SP, Cairns AJ** (1994) Fructan biosynthesis in excised leaves of wheat (*Triticum Aestivum* L): a comparison of *de novo* synthesis *in vivo* and *in vitro*. *New Phytologist* **128**: 395-402
- Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, Smeekens SCM** (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* **107**: 125-130
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, van Dun K** (1999) Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 313-317
- Pollock C, Farrar J, Tomos D, Gallagher J, Lu C, Koroleva O** (2003) Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. *Journal of Experimental Botany* **54**: 489-494
- Pollock CJ** (1982) Patterns of turnover of fructans in leaves of *Dactylis glomerata* L. *New Phytologist* **90**: 645-650
- Pollock CJ** (1984) Sucrose accumulation and the initiation of fructan biosynthesis in *Lolium temulentum* L. *New Phytologist* **96**: 527-534
- Pollock CJ, Cairns AJ** (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 77-101
- Pollock CJ, Chatterton NJ** (1988) Fructans. *The Biochemistry of Plants* **14**: 109-141
- Pollock CJ, Farrar JF** (1996) Source-sink relations: the role of sucrose. In *Photosynthesis and the Environment*. Baker. NR (ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 226-279.
- Pollock CJ, Jones T** (1979) Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. *New Phytologist* **83**: 9-15
- Pontis HG, Del Campillo E** (1985) Fructans. In: *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*. Dey PM, Dixon RA (eds). London: Academic Press. pp 205-227.
- Prud'homme MP, Gonzalez B, Billard J, 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**: 282-291
- Purcell PC, Smith AM, Halford NG** (1998) Antisense expression of a sucrose non fermenting 1 related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *The Plant Journal* **14**: 195-202
- Ramloch-Lorenz K, Knudsen S, Sturm A** (1993) Molecular characterization of the gene for carrot cell wall beta-fructosidase. *The Plant Journal* **4**: 545-554
- Rausch T, Greiner S** (2004) Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica and Biophysica Acta* **1696**: 253-261
- Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM** (2005) Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 1594-1602
- Reinders A, Schulze W, Kuhn C, Barker L, Schulz A, Ward JM, Frommer WB** (2002) Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *The Plant Cell* **14**: 1567-1577
- Ritsema T, Hernandez L, Verhaar A, Altenbach D, Boller T, Wiemken A, Smeekens S** (2006) Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *The Plant Journal* **48**: 228-237
- Ritsema T, Joling J, Smeekens S** (2003) Patterns of fructan synthesized by onion fructan:fructan 6G-fructosyltransferase expressed in tobacco BY2 cells-is fructan:fructan 1-fructosyltransferase needed in onion? . *New Phytologist* **160**: 61-67
- Ritsema T, Smeekens S** (2003a) Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 223-230
- Ritsema T, Smeekens S** (2003b) Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology* **160**: 811-820
- Rocher JP** (1967) Les lévanes de *Lolium italicum*. Synthèse dans les organes végétatifs. *Physiologie Végétale* **5**: 71-80
- Roitsch T, Bittner M, Godt DE** (1995) Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology* **108**: 285-294
- 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
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* **14 Suppl**: 185-205
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM** (2001) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences* **26**: 310-317
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A, vanKampen M, Borrias M, Weisbeek P, Smeekens S** (1998) Sucrose specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal* **15**: 253-263
- Roth A, Luscher 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
- Ruuska SA, Lewis DC, Kennedy G, Furbank RT, Jenkins CLD, Tabe LM** (2007) Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* sous presse

- Sauer N** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**: 2309-2317
- Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Paul M** (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 6849-6854
- Schluepmann H, van Dijken A, Aghdasi M, Wobbles B, Paul M, Smeekens S** (2004) Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology* **135**: 879-890
- Schmitt MR, Hitz WD, Lin W, Giaquinta RT** (1984) Sugar transport into protoplasts isolated from developing soybean cotyledons : II. sucrose transport kinetics, selectivity, and modeling studies. *Plant Physiology* **75**: 941-946
- Schnyder H** (1993) The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling: a review. *New Phytologist* **123**: 233-245
- Schnyder H, Nelson CJ** (1987) Growth rates and carbohydrate fluxes within the elongation zone of tall fescue leaf blades. *Plant Physiology* **85**: 548-553
- Schnyder H, Nelson CJ** (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, Nelson CJ** (1989) Growth rates and assimilate partitioning in the elongation zone of tall fescue leaf blades at high and low irradiance. *Plant Physiology* **90**: 1201-1206
- Schnyder H, Nelson CJ, Spollen WG** (1988) Diurnal growth of tall fescue leaf blades. II. Dry matter partitioning and carbohydrate metabolism in the elongation zone and adjacent expanded tissue. *Plant Physiology* **86**: 1077-1083
- Scholz-Starke J, Buttner M, Sauer N** (2003) AtSTP6, a new pollen-specific H⁺-monosaccharide symporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**: 70-77
- Schulze W, Weise A, Frommer WB, Ward JM** (2000) Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Letters* **485**: 189-194
- Sheen J** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell* **2**: 1027-1038
- Sheen J, Zhou L, Jang JC** (1999) Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 410-418
- Sheu JJ, Yu TS, Tong WF, Yu SM** (1996) Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice alpha-amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 26998-27004
- Shiomi N** (1981) Purification and characterisation of 6G -fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Carbohydrate Research* **96**: 281-292
- Simpson RJ, Bonnett GD** (1993) Fructan exohydrolase from grasses. *New Phytologist* **123**: 453-469
- Simpson RJ, Walker RP, Pollock CJ** (1991) Fructan exohydrolase activity in leaves of *Lolium temulentum* L. *New Phytologist* **119**: 499-507
- Sims IM, Pollock CJ, Horgan R** (1992) Structural analysis of oligomeric fructans from excised leaves of *Lolium temulentum*. *Phytochemistry* **31**: 2989-2992

- Sinha AK, Hofmann MG, Romer U, Kockenberger W, Elling L, Roitsch T** (2002) Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiology* **128**: 1480-1489
- Skinner RH, Nelson CJ** (1995) Elongation of the grass leaf and its relationship to the phyllochron. *Crop Science* **35**: 4-10
- Smeeckens S** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 49-81
- Smeeckens S, Rook F** (1997) Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiology* **115**: 7-13
- 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
- Smouter H, Simpson RJ** (1989) Occurrence of fructans in the Graminae (Poaceae). *New Phytologist* **111**: 359-368
- Smouter H, Simpson RJ** (1991a) Fructan metabolism in leaves of *Lolium rigidum* Gaudin. I. Synthesis of fructan. *New Phytologist* **119**: 509-516
- Smouter H, Simpson RJ** (1991b) Fructan metabolism in leaves of *Lolium rigidum* Gaudin. II. Fructosyltransferase, invertase and fructan hydrolase activity. *New Phytologist* **119**: 517-526
- Sprenger N, Bortlik K, Brandt A, Boller T, Wiemken A** (1995) Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 11652-11656
- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG** (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiology* **120**: 257-274
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C** (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *The Plant Cell* **15**: 2076-2092
- Suzuki M, Nass HG** (1988) Fructan in winter wheat, triticale and fall rye cultivars of various cold hardiness. *Canadian Journal of Botany* **66**: 1723-1728
- Suzuki M, Pollock CJ** (1986) Extraction and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in timothy grass (*Phleum pratense* L.). *Canadian Journal of Botany* **64**: 1884-1887

- Takeda S, Mano S, Ohto M, Nakamura K** (1994) Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiology* **106**: 567-574
- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P** (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal* **35**: 490-500
- Tixier MH, Sourdille P, Leroy P, Bernard M** (1997) Detection of wheat microsatellites using a non-radioactive silver-nitrate staining method. *Journal of Genetic Breeding* **51**: 175-177

- Turner LB, Cairns AJ, Armstead IP, Ashton J, Skot K, Whittaker D, Humphreys MO** (2006) Dissecting the regulation of fructan metabolism in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) with quantitative trait locus mapping. *New Phytologist* **169**: 45-57
- Turner LB, Humphreys MO, Cairns AJ, Pollock CJ** (2001) Comparison of growth and carbohydrate accumulation in seedlings of two varieties of *Lolium perenne*. *Journal of plant Physiology* **158**: 891-897
- Turner LB, Humphreys MO, Cairns AJ, Pollock CJ** (2002) Carbon assimilation and partitioning into non-structural carbohydrate in contrasting varieties of *Lolium perenne*. *Journal of Plant Physiology* **159**: 257-263
- Tymowska-Lalanne Z, Kreis M** (1998) Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* **207**: 259-265

Umemura T, Perata P, Futsuhara Y, Yamaguchi J (1998) Sugar sensing and alpha-amylase gene repression in rice embryos. *Planta* **204**: 420-428

- Valls L, Winther J, Stevens T** (1990) Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four propeptide amino acids. *The Journal of Cell Biology* **111**: 361-368
- Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Boogaerts D, Le Roy K, Arckens L, Van Laere A** (2006) Cloning and functional analysis of a high DP fructan:fructan 1-fructosyl transferase from *Echinops ritro* (Asteraceae): comparison of the native and recombinant enzymes. *Journal of Experimental Botany* **57**: 775-789
- Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Van Riet L, Van Laere A, Yoshida M, Kawakami A** (2003a) Fructan 1-exohydrolases. beta-(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* **131**: 621-631
- Van den Ende W, De Coninck B, Clerens S, Vergauwen R, Van Laere A** (2003b) Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel "cell-wall invertase-like" specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *The Plant Journal* **36**: 697-710
- Van den Ende W, De Coninck B, Van Laere A** (2004) Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends in Plant Science* **9**: 523-528
- Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Van Laere A** (2002) Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases: expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientifical World Journal* **2**: 1273-1287
- Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Verhaert P, Van Laere A** (2000) Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *The Plant Journal* **24**: 447-456
- Van den Ende W, Michiels A, Van Wouterghem D, Clerens SP, De Roover J, Van Laere AJ** (2001) Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa and fructan 1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology* **126**: 1186-1195

- Van den Ende W, Van Laere A** (1996) Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during growth, storage forcing. *Journal of Plant Physiology* **149**: 43-50
- Van den Ende W, Yoshida M, Clerens S, Vergauwen R, Kawakami A** (2005) Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* **166**: 917-932
- Van Laere A, Van Den Ende W** (2002) Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* **25**: 803-813
- Van Ooijen JW, Voorrips RE** (2001) JOINMAP 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International, Wageningen, the Netherlands*.
- Van Riet L, Nagaraj V, Van den Ende W, Clerens S, Wiemken A, Van Laere A** (2006) Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* **57**: 213-223
- Vereyken IJ, Chupin V, Demel RA, Smeekens SCM, De Kruijff B** (2001) Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica and Biophysica Acta* **1510**: 307-320
- Vereyken IJ, Chupin V, Hoekstra FA, Smeekens SCM, de Kruijff B** (2003) The effect of fructan on membrane lipid organization and dynamics in the dry state. *Biophysical Journal* **84**: 3759-3766
- Vereyken IJ, Chupin V, Islamov A, Kuklin A, Hinch DK, Kruijff Bd** (2003a) The effect of fructan on the phospholipid organization in the dry state. *Biophysical Journal* **85**: 3058-3065
- Vergauwen R, Van den Ende W, Van Laere A** (2000) The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1261-1266
- Vergauwen R, Van Laere A, Van den Ende W** (2003) Properties of fructan : fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiology* **133**: 391-401
- Versele M, Lemaire K, Thevelein JM** (2001) Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Reports* **2**: 574-579
- Vijn I, Smeekens S** (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* **120**: 351-360
- Vijn I, van Dijken A, Luscher M, Bos A, Smeets E, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S** (1998) Cloning of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. *Plant Physiology* **117**: 1507-1513
- Vijn I, Van Dijken A, Sprenger N, Van Dun K, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S** (1997) Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyl-transferase. *The Plant Journal* **11**: 387-398
- Vitale A, Hinz G** (2005) Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? *Trends in Plant Science* **10**: 316-323
- Voltaire F, Lelievre F** (1997) Production, persistence, and water-soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought in the south of France. *Australian Journal of Agricultural Research* **48**: 933-944
- Volenec JJ** (1986) Nonstructural carbohydrates in stem base components of tall fescue during regrowth. *Crop Science* **26**: 122-127
- Volenec JJ, Nelson CJ** (1984) Carbohydrate metabolism in leaf meristems of tall fescue. I. Relationship to leaf elongation rates modified by nitrogen fertilization. *Plant Physiology* **74**: 595-600

- 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
- Wagner W, Wiemken A** (1986) Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Journal of Plant Physiology* **123**: 429-439
- Wagner W, Wiemken A** (1989) Fructan metabolism in expanded primary leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel): change upon ageing and spatial organization along the leaf blade. *Journal of Plant Physiology* **134**: 237-242
- Wagner W, Wiemken A, Matile P** (1986) Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Plant Physiology* **81**: 444-447
- Wang C, Tillberg J-E** (1996) Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* **97**: 339-345
- Wang N, Nobel PS** (1998) Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology* **116**: 709-714
- Waterhouse AL, Chatterton NJ** (1993) Glossary in fructan terms. In: *Science and technology of fructans*, Suzuki M, Chatterton NJ (eds) Boca Raton, FL: CRC Press, pp 1-6.
- Wei J-Z, Chatterton NJ** (2001b) Fructan biosynthesis and fructosyltransferase evolution: expression of the 6-SFT (sucrose : fructan 6-fructosyltransferase) gene in crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*). *Journal of Plant Physiology* **158**: 1203-1213
- Wei JZ, Chatterton NJ, Larson SR** (2001a) Expression of sucrose :fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) and myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) genes in barley (*Hordeum vulgare*) leaves. *Journal of plant Physiology* **158**: 635-643
- Wiemken A, FREHNER M, Keller F, Wagner W** (1986) Fructan metabolism, enzymology and compartmentation. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* **5**: 17-37
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B, Smeekens S** (2004) A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *The Plant Cell* **16**: 1717-1729
- Willenbrink J, Bonnett GD, Willenbrink S, Wardlaw IF** (1998) Changes of enzyme activities associated with mobilization of carbohydrate reserves (fructans) from the stem of wheat during kernel filling. *New Phytologist* **139**: 471-478
- Winther J, Sorensen P** (1991) Propeptide of carboxypeptidase Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 9330-9334
- Yamamoto S, Mino Y** (1985) Partial purification and properties of phleinandase induced in stem base of orchardgrass after defoliation. *Plant Physiology* **78**: 591-595
- Yamamoto S, Mino Y** (1987) Effect of sugar level on phleinandase induction in stem base of orchardgrass after defoliation. *Physiologia Plantarum* **69**: 456-460
- Yamamoto S, Mino Y** (1989) Mechanism of phleinandase induction in stem base of orchardgrass after defoliation. *Journal of Plant Physiology* **69**: 258-260
- Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J** (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* **425**: 521-525

- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L** (2004) Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* **220**: 331-343
- Yu SM, Kuo YH, Sheu G, Sheu YJ, Liu LF** (1991) Metabolic derepression of alpha-amylase gene expression in suspension-cultured cells of rice. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 21131-21137

Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C, Bevan MW (2002) Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *The Plant Journal* **30**: 489-497

Métabolisme des fructanes chez *Lolium perenne* L.: Identification de deux gènes codant des fructane exohydrolases (FEHs) et étude de la régulation de l'activité FEH par les sucres solubles. 2007. Lothier Jérémie, Thèse de l'Université de Caen/Basse-Normandie. 141 pages.

Résumé : Le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) est une espèce fourragère majeure des prairies. Après une défoliation, l'arrêt de l'acquisition des photoassimilats est compensé par une mobilisation des fructanes, polymères de fructose, *via* une augmentation de l'activité fructane exohydrolase (FEH). Pour étudier le rôle des sucres solubles en tant que signaux conduisant à la répression de l'activité FEH, des sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) mais aussi des analogues structuraux non ou peu métabolisables (3-OMG, mannose, turanose, lactulose, palatinose, tréhalose) ont été pulvérisés sur des plantes coupées. Les résultats indiquent que les hexoses et le saccharose sont des signaux qui régulent négativement l'activité FEH et qu'ils seraient perçus respectivement par l'hexokinase et par un senseur plasmalemmique. Pour rechercher le niveau de régulation de l'activité FEH, deux ADNc ont été obtenus grâce au criblage d'une banque d'ADNc. La caractérisation fonctionnelle des protéines recombinantes obtenues par expression hétérologue dans la levure *Pichia pastoris*, a permis de montrer qu'il s'agissait d'une 1-FEH (Lp1-FEHa) et d'une 6-FEH (Lp6-FEHa), hydrolysant respectivement les liaisons β -(2,1) et β -(2,6). L'analyse transcriptionnelle de ces deux gènes indique que la régulation de l'activité FEH après la défoliation se fait en partie au niveau post-transcriptionnel. Un modèle de régulation du métabolisme des fructanes chez les Poacées prairiales est proposé. Nous suggérons que l'activité FEH serait le métronome permettant à la cellule de moduler le métabolisme des fructanes en réponse à la carence carbonée induite par la défoliation.

Title : Fructan metabolism in *Lolium perenne* L. : Identification of two genes coding fructan exohydrolases (FEHs) and study of FEH activity regulation by soluble sugars.

Abstract : Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is a major grassland forage species. After defoliation, the suppression of photoassimilate acquisition is compensated by the mobilisation of fructans (fructose polymers), *via* an increase of fructan exohydrolase activity (FEH). To study the role of soluble sugars as signals leading to the repression of FEH activity, soluble sugars (glucose, fructose, and sucrose) and also non- or poorly- metabolizable analogues (3-OMG, mannose, turanose, lactulose, palatinose, trehalose) were sprayed on defoliated plants. The results demonstrate that hexoses and sucrose are signals which negatively regulate FEH activity and which seem to be perceived by hexokinase and a plasmalemmic sensor, respectively. To investigate the level of FEH activity regulation, two cDNA were obtained by screening a cDNAs library. Functional characterization of the recombinant proteins by heterologous expression in the yeast *Pichia pastoris* showed that the cDNAs code for a 1-FEH (Lp1-FEHa) and a 6-FEH (Lp6-FEHa), hydrolyzing β -(2,1) and β -(2,6) linkages, respectively. Transcriptional analysis of these both genes indicates that FEH activity after defoliation is regulated at least partly by a post-transcriptional mechanism. A model of fructan metabolism regulation in grasses is proposed. We suggest that FEH activity is the metronome which allows the cell to modulate fructan metabolism in response to the carbon starvation induced by defoliation.

Mots-clés :

Indexation Rameau : *Lolium*, fructosanes, enzymes - régulation, teneur en glucides

Indexation libre : ray-grass anglais, défoliation, fructanes, fructane exohydrolases, fructosyltransférases, sugars sensing, *Pichia pastoris*.

Discipline : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

Laboratoire :

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