UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE VENAM

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

Caractérisation moléculaire et régulation de la force de puits de la plante parasite Phelipanche ramosa (L.) Pomel vis-àvis du saccharose prélevé chez son hôte

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences agronomiques et écologiques Spécialité : Biologie des organismes

> Présentée et soutenue publiquement par

Thomas PÉRON

Le 19 Novembre 2010, devant le jury ci-dessous

Président M. BOUCHEREAU Alain, Professeur, Université de Rennes 1 Rapporteurs M. HODGES Michael, Directeur de Recherche, CNRS - Université Paris-Sud 11

M. ROLIN Dominique, Professeur, Université Victor Segalen Bordeaux 2

Examinateurs

M. SIMIER Philippe, Professeur, Université de Nantes M. DELAVAULT Philippe, Professeur, Université de Nantes

Directeur de thèse : M. SIMIER Philippe

Co-directeur de thèse : M. DELAVAULT Philippe

Avant de rentrer dans le víf du sujet, je me dois d'effectuer quelques remerciements...

Je remercie bien évidemment les trois membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de mettre à contribution leur expertise afin d'évaluer le travail présenté dans ce manuscrit.

Je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse, Philippe Simier et Philippe Delavault, sans qui cette aventure n'aurait jamais vu le jour. Vous avez su capter mon intérêt déjà lorsque j'étais étudiant, par la suite vous m'avez fait confiance et m'avez permis de réaliser cette thèse avec une certaine liberté d'action... Merci pour tous vos conseils et le temps que vous m'avez consacré.

Mercí également à tous les membres du LBPV avec quí j'ai partagé des moments importants aussi bien sur le plan amical que professionnel :

- pour leur collaboration, un grand mercí à JB, Rída, Christophe,
 Catheríne, Greg et Mathieu (alías Francis).
- o pour leur aide technique (et beaucoup d'autres choses), merci à Johannes (grâce à qui les cultures se portent bien), Sabine (grâce à qui les enseignements de TP se déroulent sans accrocs) et Dominique (le MacGyver du LBPV, philosophe, photographe et surtout : finistérien).
- o pour la cueillette des champignons, merci à Christian.
- pour être toujours de bon conseil et pertinents quand il s'agit de parler de sciences, merci à JB, Séverine, Greg, Philippe et Philippe.
- Un spécial thank you à la "team" du bureau 120 composée de Mamat, Marie, Zac + en guest stars : Greg et PhD qui passent beaucoup de temps dans notre bureau dans l'espoir d'intégrer un jour la "team". Le noyau dur de cette "team" contribue chaque jour à mettre une ambiance particulièrement agréable au LBPV. Malgré le fait que je sois un expert en sarcasme (si bien que parfois on me

surnomme JeanJean House), les membres de la "team" ne s'y trompent pas et savent pertinemment que j'ai pour chacun d'eux beaucoup d'affection.

• Pour avoir joué un rôle particulièrement important, notamment dans ma formation de chercheur, un grand merci à Philippe, Philippe, Greg et Axel (alias Dejoucourt, ancien membre de la "team" du bureau 120, il occupera toujours pour moi une place privilégiée).

Durant ma thèse j'ai été amené à rencontrer et à travailler avec des gens que je souhaite remercier :

- Odíle Aumaille, Yvonnick Cheraud, Josiane Fontaine-Perus et Gwennina.Cueff de l'Université de Nantes.
- o Rémi Lemoine de l'Université de Poitiers.
- o Brigitte Bouchet de l'INRA de Nantes.
- Stéphanie Boutet-Mercey (INRA centre Versailles-Grignon)
- Nathalie Leduc, Éric Mortreau, Clémence Henry, José Gentilhomme, Sandrine Pelleschi-Travier, Amélie Rabot et Soulaiman Sakr de l'Université d'Angers.

Enfín, je remercie très chaleureusement les membres de mon proche entourage pour leur soutien et pour tout le reste : mes parents, mon frère Nico, la famille de Cécile (sa maman, Chacha, Greg, Rafaël & Élouan, Constant, Clem & Mélanie, Camille et Cyrille.

Pour finir, je remercie Cécile à qui je dédie ce manuscrit...

Tu partages ma vie, tu me soutiens depuis le début, tu crois en moi et tu m'as accompagné durant ce projet passionnant que fût ma thèse...

Sans toi, je ne sais pas si j'y serais parvenu, nous avons résisté ensemble à ces quelques années parfois synonymes de sacrifices, pour tout ça et bien plus encore, Merci

Intr	oduction.		1
Étu	de Bibliog	raphique	7
1.	LES PLA	ANTES PARASITES	9
1.1	Généralités concernant les plantes parasites9		
1.2	Les o	robanches	11
1.3	Le cy	cle de vie	15
2.	COMMENT LUTTER CONTRE L'OROBANCHE AUJOURD'HUI ?		
2.1	"Élin	nination du potentiel infectieux de l'orobanche"	25
2.2	"Min	imisation des conséquences d'infestations par l'orobanche"	
2.3	Les différentes formes de résistance à l'orobanche		
3.	NOTION	N DE FORCE DE PUITS	
4.	LES CO	MPOSANTES MAJEURES DE LA FORCE DE PUITS	
4.1	Les ti	ransporteurs actifs secondaires de type SUT (sucrose transporter)	
4.2	Les e	nzymes catalysant l'hydrolyse du saccharose	67
	4.2.1	Les Invertases	67
	4.2.2	Les Saccharose synthétases (SuSy = sucrose synthase)	
5.	L'OROE	BANCHE, UN PUITS SURNUMÉRAIRE POUR SON HÔTE	
5.1	Prélè	vement et transport du saccharose chez l'orobanche	95
5.2	Métabolisme du mannitol chez l'orobanche97		
5.3	Métabolisme du saccharose chez l'orobanche		
Pro	blématiqu	e	105
Mat	ériel et M	éthodes	111
1.	MATÉR	IEL	113
1.1	Maté	riel végétal	113
1.2	Souch	he bactérienne et de levure	115
1.3	Vecte	eurs	115
2.	MÉTHO	DDES	119
2.1	Mani	pulations du matériel végétal	119
2.2	Analy	yses histo-cytologiques	
2.3	Analy	yses biochimiques	
2.4	Analy	yses moléculaires	
2.5	Anal	yses bioinformatiques	147

Résultats Discussion			
1.	LE PUITS OROBANCHE, PRÉLÈVEMENT DU SACCHAROSE-HÔTE ET ACTEURS IMPLIQUÉS DANS SON TRANSPORT ET SA MÉTABOLISATION DURANT LA PHASE PARASITAIRE		
1.1	Nature de la décharge phloémienne à l'interface hôte-parasite et dans différents organes puits de l'orobanche		
1.2	Les transporteurs de saccharose (SUT) chez P. ramosa		
1.3	Les invertases chez P. ramosa		
1.4	Les saccharose synthétases (SuSy) chez P. ramosa		
1.5	Conclusions sur le puits orobanche		
2.	RÉGULATION DE LA FORCE DE PUITS DE <i>P. RAMOSA</i> : IMPLICATION DES PHYTOHORMONES223		
2.1	La graine comme modèle d'étude227		
2.2	Inhibition du transport polaire de l'auxine chez l'hôte par le TIBA		
2.3	Le pathosystème P. ramosa/B. napus comme modèle d'étude		
2.4	Conclusions sur l'implication des phytohormones dans la régulation de la force de puits de <i>P. ramosa</i>		
Con	clusion Générale et Perspectives Majeures267		
Réf	érences Bibliographiques277		
Anr	nexes		
1.	LISTE DES ABRÉVIATIONS		
2.	LISTE DES TABLEAUX		
3.	LISTE DES FIGURES		
4.	EXEMPLE DE CLONAGE MOLÉCULAIRE		

Introduction



Figure 1 : Le colza, hôte privilégié de Phelipanche ramosa en France.

Photo de gauche : nombreuses fixations d'orobanche rameuse au niveau du système racinaire d'un pied de colza. Photo de droite : infestation d'une parcelle de colza par l'orobanche rameuse.

Dans le monde du vivant, une distinction évidente peut s'observer entre animaux et végétaux, les premiers sont mobiles et hétérotrophes, ils se déplacent pour accéder à leur alimentation, en revanche, les plantes supérieures vivent fixées et sont pour la plupart autotrophes. En effet, grâce au processus de photosynthèse, les plantes subviennent ellesmêmes à une grande partie de leurs besoins nutritionnels, c'est en quelque sorte une manière pour elles de compenser leur sédentarité. Cependant, ce mode de vie présente de nombreux désavantages, les plantes subissent sans cesse des agressions extérieures comme des stress abiotiques (stress hydrique ou salin...) ou biotiques (virus, bactéries et autres phytopathogènes...). Sous de telles contraintes, les plantes mettent en place des moyens pour lutter et résister à ces différents stress. L'autotrophie pourrait sembler être une condition sine qua non pour que les plantes aient une vie fixée. En réalité le règne végétal comporte une catégorie un peu à part et relativement méconnue : les plantes parasites. Ces curiosités botaniques ont certes un mode de vie fixé, mais comme leur nom l'indique, elles vivent aux dépens d'un hôte. Certaines de ces plantes sont dépourvues de chlorophylle et donc totalement hétérotrophes. Les plantes parasites contournent cette contrainte supplémentaire en puisant directement leurs ressources nutritives chez une plante hôte autotrophe. Cette relation trophique qui se crée entre le parasite et son hôte aura des conséquences dommageables pour ce dernier. Si la plante hôte considérée est une plante cultivée d'intérêt agronomique, une infestation par une plante parasite aura des impacts sur le rendement de cette culture, par conséquent des enjeux agro-économiques évidents apparaissent.

Certaines plantes parasites peuvent être considérées comme des phytopathogènes à part entière. Les étudier dans le but de lutter contre elles, mais aussi de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliquées dans l'interaction plante parasite-plante hôte, sont les principales thématiques de recherche que développe le LBPV (Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales, IFR 149 Qualité et Santé du Végétal (QUASAV)). Le LBPV focalise ses études sur les plantes parasites de la famille des *Orobanchaceae* et plus particulièrement sur l'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa*) qui est devenue en quelques années une réelle menace pour les cultures de colza d'hiver sur le sol français (**Fig. 1**). L'orobanche rameuse est un parasite obligatoire. En effet, elle est achlorophyllienne et donc totalement hétérotrophe. Ce mode de vie si singulier nécessite de la part de l'orobanche une mise en place de stratégies évolutives au cours de son cycle de vie. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'orobanche est dépendante de son hôte, pour la nutrition carbonée notamment, elle doit donc se connecter au système vasculaire des racines de la plante hôte pour y puiser entre autres les

photoassimilats indispensables à son développement. Avant même de se fixer sur l'hôte, l'orobanche débute son cycle par une phase de germination. Il est intéressant de constater qu'elle ne le fait pas de manière aléatoire ou incontrôlée. En effet, l'orobanche ne germe qu'après avoir perçu un signal chimique contenu dans les exsudats racinaires de son hôte. D'une façon générale, tout élément qui joue un rôle clé pour l'orobanche à un moment de son cycle de développement pourra être considéré comme une source de vulnérabilité potentiellement exploitable. L'exemple de la germination cité précédemment illustre parfaitement ces propos car bon nombre de recherches sur ce modèle consistent à sélectionner, ou créer, des variétés d'hôtes ne stimulant que peu ou pas la germination de l'orobanche.

Une fois fixée et connectée au système vasculaire de son hôte, l'orobanche commence la phase parasitaire de son cycle. Elle puise les produits de la photosynthèse (essentiellement du saccharose) contenus dans la sève phloémienne de l'hôte. Durant cette phase, l'orobanche peut être assimilée à un organe puits surnuméraire de l'hôte qui, pour pouvoir se développer, est nécessairement plus attractif vis-à-vis des photoassimilats que les propres organes puits de l'hôte. L'essentiel du travail de thèse présenté dans ce manuscrit a consisté à mettre en lumière les composantes majeures impliquées dans la force de puits de l'orobanche ainsi qu'à comprendre leurs mécanismes de régulation. Pour cela, mes investigations se sont focalisées sur le devenir du saccharose provenant de l'hôte. Ainsi, son mode de prélèvement, la nature de son transport chez le parasite, mais également sa métabolisation dans les tissus puits de l'orobanche rameuse, *via* des enzymes de dégradation de type invertase ou saccharose-synthétase, ont été analysés. Pour traiter certains aspects de ce travail, le modèle « graine d'orobanche isolée de son hôte » s'est avéré utile.

Il nous apparaît essentiel de comprendre et de caractériser la façon dont l'orobanche gère le saccharose prélevé, sans lequel son développement serait très vraisemblablement compromis. Ce travail cherche à identifier certaines phases clés de la physiologie du parasite pour parvenir, à termes, à les exploiter comme "failles" dans des stratégies de lutte contre l'orobanche.

Partie. I

Étude Bibliographique



Figure 2 : Illustrations de quelques types, classes et groupes de plantes parasites.

A illustration du gui (*Viscum album*). **B** illustration de la cuscute de l'ortie (*Cuscuta europaea*). **C** illustration d'hampes florales de striga (*Striga hermonthica*). **D** illustration d'une hampe florale d'orobanche rameuse (*Phelipanche ramosa*).

1. LES PLANTES PARASITES

1.1 Généralités concernant les plantes parasites

Le parasitisme se définit comme l'état d'un organisme vivant aux dépens d'un organisme d'une autre espèce, que l'on appelle l'hôte. Chez les végétaux, il existe une catégorie de plantes, souvent méconnues, ayant un mode de vie parasitaire. Elles ont donc dans la plupart des cas besoin d'une plante hôte pour vivre. Parmi les phanérogames, les plantes parasites ne représentent qu'une petite proportion d'entre elles, soit environ 2% composés par plus de 4000 espèces réparties en une vingtaine de familles (Raynal-Roques et Paré, 1998). Certaines plantes parasites peuvent vivre en l'absence d'hôte, elles sont dites facultatives, c'est notamment le cas des genres Triphysaria et Rhinantus (Seel et Jeschke, 1999). Celles dont la présence d'un hôte est nécessaire sont des parasites obligatoires. Au sein de cette catégorie, une nouvelle distinction peut être faite entre les hémiparasites (exemple du genre Striga) et les holoparasites (exemple du genre Orobanche). Cette distinction permet de regrouper les plantes parasites selon leur dépendance trophique vis-à-vis de l'hôte : les hémiparasites sont encore capables de réaliser la photosynthèse et s'alimentent essentiellement avec la sève xylémienne de l'hôte, tandis que les holoparasites ont perdu leur capacité photosynthétique et s'alimentent essentiellement avec la sève phloémienne de l'hôte. Les plantes parasites obligatoires sont donc de type "xylem feeders" ou "phloem feeders" en fonction de la sévérité de leur hétérotrophie (Hibberd et Jeschke, 2001).

Pour s'alimenter les plantes parasites doivent établir un contact avec leur hôte en se fixant au niveau de leur partie aérienne (parasite épiphyte : le gui, la cuscute), ou au niveau de leurs racines (parasite épirhizes : le striga, l'orobanche) (**Fig. 2**). Une fois le contact établi avec l'hôte, toutes les plantes parasites mettent en place une structure endophytique particulière appelée *haustorium* (sorte de suçoir spécialisé). Cette structure permet la jonction entre le système vasculaire de l'hôte et celui du parasite, rendant alors possible le prélèvement des ressources nutritives nécessaires à leur développement. Un tel détournement des assimilats au profit du parasite aura nécessairement des répercussions sur le rendement et la productivité de la plante hôte.



Figure 3 : Morphologie externe des graines (ornementation tégumentaire) de différentes espèces d'orobanches.

De **A** à **E** : observations en microscopie électronique à balayage (d'après Plaza et al., 2004), **F** : observation en microscopie photonique suite à une coloration au carmino-vert (T. Péron). **A** *O. rapum genistea*. **B** *O. laserpitii-sileris*. **C** *O. alba*. **D** *O. densiflora*. **E** *O. calendulae*. **F** *P. ramosa* (L.) pomel, (pathovar C). Barre d'échelle = 100 µm. Le parasitisme végétal peut avoir des conséquences économiques désastreuses lorsque ce sont des plantes cultivées d'intérêt agronomique qui en sont la cible (Parker, 2009). En Afrique sub-saharienne, plus de 40% des cultures céréalières sont infestées par le striga, ce qui affecte plus de 100 millions de personnes (Scholes et Press, 2008). Face à de tels enjeux, la tendance consiste à trouver le moyen d'éradiquer les plantes parasites. Il faut noter cependant que l'hémiparasite *Santalum album* échappe à cette tendance, en effet le santal blanc est cultivé et commercialisé, notamment pour la production d'huiles essentielles (Radomiljac et al., 1999).

1.2 Les orobanches

Les orobanches sont des herbacées annuelles dicotylédones, mais avant tout des plantes parasites épirhizes obligatoires (holoparasites) incapables de réaliser la photosynthèse et donc totalement dépendantes de leur hôte. Elles appartiennent à la famille des Orobanchaceae. Cette famille, anciennement apparentée aux Scrophulariaceae, est exclusivement constituée, à l'exception du genre Lindenbergia, de plantes parasites (Olmstead et al., 2001). Le genre Orobanche est le plus important, tant par le nombre que par l'impact économique qu'ont les espèces qui le composent (Pieterse, 1979). Le genre Orobanche, constitué de plus d'une centaine d'espèces (Kreutz, 1995), se divise en quatre sous-sections : Trionychon, Myzorrhiza, Gymnocaulis et Osproleon (= Orobanche). Des études phylogénétiques récentes montrent qu'en réalité ces quatre sections peuvent être séparées en deux groupes phylogénétiquement distincts, la section Osproleon appartiendrait au groupe Orobanche, tandis que les trois autres sections formeraient le groupe Phelipanche (Schneeweiss et al., 2004). Dans le groupe Orobanche se trouve l'orobanche du tournesol, Orobanche cumana Wallr., tandis que l'orobanche rameuse (anciennement : Orobanche ramosa L.) appartient désormais au groupe Phelipanche et porte le nom Phelipanche ramosa (L.) Pomel (Joel, 2009). L'une des raisons à cette distinction en deux groupes vient du nombre de chromosomes : X = 19 pour les orobanches du groupe Orobanche contre X = 12 pour celles du groupe *Phelipanche*. La phylogénie des orobanches n'est pas figée, elle peut encore évoluer car à différentes reprises de nouvelles espèces d'orobanche ont pu être identifiées. Une méthode pour discriminer les espèces d'orobanche entre elles consiste à examiner la morphologie des graines (Fig. 3) (Plaza et al., 2004). Concernant la découverte de nouvelles



Figure 4 : Répartition à l'échelle mondiale de l'orobanche rameuse (Phelipanche ramosa (L.) pomel).



Figure 5 : Recensement par le CETIOM des parcelles de colza et de chanvre infestées par l'orobanche rameuse en France (2008).

Le degré d'infestation des parcelles est indiqué aux moyens d'un code de couleurs.

espèces, l'emploi de techniques faisant appel à des marqueurs moléculaires peut néanmoins s'avérer très efficace. Ainsi certains travaux ont permis de distinguer *O. cumana* et *O. cernua*, longtemps considérées comme une seule et même espèce (Benharrat et al., 2002; Delavault et Thalouarn, 2002).

Les orobanches sont très largement répandues dans le monde puisqu'elles sont présentes sur tous les continents. Il faut toutefois noter qu'elles sont préférentiellement regroupées en Europe et au niveau du pourtour méditerranéen, comme en témoigne l'aire de répartition mondiale de l'orobanche rameuse (Fig. 4). Cette localisation géographique spécifique s'explique probablement par des exigences pédoclimatiques associées à la physiologie des orobanches. Il y a donc toute une région du monde qui se trouve confrontée au problème de l'orobanche. Les pertes de rendement qui en découlent peuvent être très importantes : de l'ordre de 30 à 80% et parfois même totales (Fer et Thalouarn, 1997). Néanmoins, les infestations par l'orobanche n'ont pas toutes des retombées économiques, en effet, c'est en fonction de l'importance agronomique de la plante hôte parasitée qu'il est possible de mesurer l'impact de l'orobanche. Par exemple, Orobanche hederae ne parasite que le lierre et n'est donc bien évidemment pas considérée comme une menace. En revanche, l'orobanche rameuse a un spectre d'hôtes très étendu avec une quinzaine d'espèces cultivées concernées (ex : tomate, tabac, aubergine, céleri, chanvre, colza...) appartenant à au moins neuf familles botaniques différentes (ex : Solanacées, Apiacées, Cannabinacées, Brassicacées...). L'impact sur l'éco-agronomie des pays touchés par les infestations de Phelipanche ramosa devient extrêmement inquiétant car ce parasite est une menace agricole en constante progression.

L'expansion de l'orobanche rameuse en France est un phénomène observable depuis une quinzaine d'années. Les cultures de colza sont directement concernées. Le CETIOM (Centre Technique Interprofessionnel de Oléagineux Métropolitains) estimait qu'en 2008, près de 10% de la sole de colza d'hiver étaient infestés par *P. ramosa*. Les régions les plus affectées par le parasite sont : le Poitou-Charentes et la Vendée (**Fig. 5**). Entre 2005 et 2008, de nombreuses nouvelles parcelles de colza infestées ont été recensées. L'expansion de *Phelipanche ramosa* en France est préoccupante et semble malheureusement vouée à se poursuivre. En effet, les graines du parasite sont très facilement disséminables et surtout à ce jour il n'existe aucune variété de colza résistante à l'orobanche. Toutefois, nous serons amenés à rediscuter par la suite d'une variété de colza présentant une forme de résistance partielle à l'orobanche, basée sur le blocage de la croissance souterraine de *P. ramosa*. Des pistes seront



Figure 6 : Cycle de développement de P. ramosa.

1 graine d'orobanche. 2 germination de la graine après stimulation par les exsudats racinaires de l'hôte. 3 fixation du procaulôme de la graine d'orobanche sur une racine hôte. 4 accumulation de réserves, développement d'un tubercule 5 formation de racines adventives non fonctionnelles. 6 formation d'une tige écailleuse. 7 émergence de l'orobanche. 8 floraison. 9 fructification, maturation et dissémination des graines d'orobanche. RH: racine de la plante hôte; T: tégument; R: radicule ou procaulôme; Tb: tubercule (D. Bozec).

proposées pour tenter d'expliquer en quoi cette variété a la capacité d'altérer le développement du parasite.

1.3 <u>Le cycle de vie</u>

L'orobanche a un cycle de développement assez atypique du fait de son mode de vie parasitaire. En effet, beaucoup d'étapes clés de son développement se font en interaction avec l'hôte (Fig. 6). Ce dernier peut être aussi bien un facteur limitant que stimulant et prend donc une part très importante dans le bon déroulement du cycle. Pour illustrer cela, il suffit d'évoquer le mode de germination de l'orobanche. Celle-ci a accumulé dans ces graines des réserves qui sont mobilisées durant la germination. L'orobanche a donc une certaine autonomie lui permettant d'atteindre le système racinaire de son hôte et d'entamer la phase parasitaire de son cycle. Les réserves contenues dans les graines d'orobanche ne sont pas infinies et une orobanche germée qui ne parvient pas à se fixer sur une racine hôte est condamnée. Plusieurs points permettent à l'orobanche de minimiser les risques associés à la phase de germination. D'une part, chaque pied d'orobanche émet plusieurs dizaines de milliers de graines de petite taille (200 à 300 µm, Fig. 2 page 8). L'abondance des graines dans le sol d'une parcelle infestée est ainsi telle que la part de germinations non fructueuses (pas d'accrochage à un hôte) n'impacte pas sur la pérennisation de l'orobanche. D'autre part, le point le plus important est que l'orobanche ne germe qu'après avoir perçu un signal chimique exsudé par un appareil racinaire voisin. La stimulation de la germination des graines d'orobanche est donc conditionnée par la présence d'un hôte potentiel.

• Le préconditionnement

Une fois enfouies dans le sol, les graines d'orobanche entrent en phase de dormance. En l'absence d'hôte, cette phase peut s'avérer être de très longue durée (une dizaine d'années), sans que les graines ne perdent pour autant leur faculté germinative. Avant d'être en mesure de percevoir et de répondre aux stimulants de germination, l'orobanche doit subir une période de préconditionnement. Durant cette phase les graines doivent être dans des conditions de température et d'humidité optimales. Ces conditions ont pu être établies *in vitro*, pour des espèces d'orobanche comme *P. ramosa* et *O. minor*. Ainsi, le préconditionnement se fait en



Figure 7 : Structure chimique de trois strigolactones naturelles et d'un analogue de synthèse : le GR24.

A strigol. B sorgolactone. C orobanchol. D GR24.

atmosphère humide pendant 1 à 2 semaines à une température comprise entre 18 et 23°C (Gibot-Leclerc et al., 2004; Song et al., 2005). Une étude a récemment remis en question cette notion de préconditionnement (Plakhine et al., 2009). La phase de préconditionnement s'avèrerait effectivement être indispensable pour O. crenata mais par pour O. cumana ou P. aegyptiaca. Notons néanmoins que ces travaux indiquent la nécessité d'une période d'imbibition (pré-germination) des graines d'orobanche (Plakhine et al., 2009). L'imbibition des graines dormantes s'accompagne d'un pic de respiration et d'une très forte reprise de la synthèse protéique témoignant d'une activité métabolique intense (Bar-Nun et Mayer, 1993). Certaines phases clés ont lieu au cours de cette étape. En effet certains travaux évoquent la nécessité d'une synthèse d'éthylène et de gibbérellines pour que la germination de l'orobanche puisse avoir lieu en réponse aux stimulants (Zehhar et al., 2002). Dans ces travaux, l'application durant le préconditionnement d'inhibiteurs de la synthèse de gibbérellines rend les graines d'orobanche rameuse moins sensibles aux stimulants de germination. Une autre étude a montré que la synthèse de gibbérellines dans les graines préconditionnées d'Orobanche minor provoque une accumulation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ce métabolite secondaire serait indispensable à la germination de l'orobanche (Uematsu et al., 2007).

Une graine d'orobanche préconditionnée est en mesure de percevoir les stimulants de germination d'un hôte éventuel et d'y répondre en germant. Si la graine ne perçoit pas de tels signaux, elle entre dans une phase de dormance secondaire (Kebreab et Murdoch, 1999). Cette graine ne retrouve sa capacité germinative qu'après une phase de déshydratation prolongée suivie d'une nouvelle phase de préconditionnement (Fer et Thalouarn, 1997).

• La germination

La germination des graines d'orobanche s'effectue après perception des stimulants de germination exsudés par l'appareil racinaire d'une plante (hôte ou non-hôte) se trouvant à proximité du parasite. En effet, une très grande proximité est requise (quelques millimètres) pour déclencher la germination. Les messagers chimiques stimulant la germination des graines d'orobanche appartiennent majoritairement à la famille des sesquiterpènes lactones, dont font partie les strigolactones (**Fig. 7**). Ces dernières dérivent de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Matusova et al., 2005). Les strigolactones ont récemment été caractérisées comme une nouvelle classe d'hormone végétale (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008). Messagers secondaires de l'auxine pour assurer le maintien de la dominance apicale,

les strigolactones sont des inhibiteurs de la ramification et sont également impliquées dans la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Le strigol, isolé à partir d'exsudats racinaires de coton et capable d'induire la germination de l'hémiparasite Striga hermontica, a été le premier strigolactone identifié (Cook et al., 1966). Deux autres strigolactones : l'alectrol et l'orobanchol, stimulants de germination pour Orobanche minor, ont été isolés à partir du trèfle des prés Trifolium pratense (Yokota et al., 1998). Des strigolactones de synthèse ont également été créées tels que le Nijmegen1 ou le GR24. Ces molécules sont utilisées dans les laboratoires de recherche travaillant sur les plantes parasites (Wigchert et al., 1999). Il existe une certaine spécificité des stimulants de germination vis-à-vis des espèces d'orobanche, par exemple, l'arabette stimule la germination de P. ramosa mais pas celle de O. cumana (Goldwasser et al., 2000). Ainsi, cela suggérerait que le spectre d'hôte d'une orobanche est conditionné en partie par sa capacité à répondre aux différents types de stimulants de germination. Pour certaines plantes hôtes de l'orobanche, la nature chimique des stimulants de germination contenus dans leurs exsudats racinaires est encore inconnue. C'est notamment le cas du colza, plante hôte de l'orobanche rameuse. Même si la présence de strigolactones dans ses exsudats racinaires est suspectée, à ce jour rien ne le prouve. Une difficulté pour identifier les strigolactones vient de leur teneur extrêmement faible dans les exsudats : quelques picogrammes seulement sont produits par plante (Sato et al., 2005). En ce qui concerne le colza, la piste des isothiocyanates n'est pas exclue puisqu'il a été montré que la germination de l'orobanche rameuse pouvait être stimulée par ce type de molécules (Zhelev, 1987).

Une fois stimulée, la graine d'orobanche émet un tube germinatif (appelé procaulôme) au niveau du pôle micropylaire. Il croît et s'allonge en direction des racines de la plante hôte, guidé probablement par un chimiotropisme positif vis-à-vis des stimulants de germination (Dube et Olivier, 2001; Bouwmeester et al., 2003). Chez *Phelipanche ramosa*, la germination s'accompagne d'une production et d'un relargage d'auxine (acide indole-3acétique : AIA) (Slavov et al., 2004). Si l'orobanche est en mesure de synthétiser elle-même son auxine au cours de la germination, une fois fixée, c'est l'hôte qui semble en grande partie être responsable de son approvisionnement en AIA (Harb et al., 2004).

• La fixation sur l'hôte

La phase de fixation intervient lorsque le procaulôme entre en contact avec la racine hôte. L'apex du procaulôme se différencie alors en papilles sécrétrices d'une substance



Figure 8 : Types de connexions haustoriales entre une plante parasite et son hôte.

A Observation en microscopie électronique à balayage de connexions xylémiennes luménales (*oscula*) entre *Striga hermonthica* et *Zea mays* (Dörr, 1997). B *Striga hermonthica*. C *Orobanche crenata*. D Observation en microscopie électronique à transmission de plasmodesmes interspécifiques entre *Orobanche crenata* et *Vicia narbonensis*. P: parasite; H: hôte (Dörr and Kollmann, 1995).

mucilagineuse qui favorise l'adhésion du parasite à la racine hôte (Joel et Losner-Goshen, 1994). Une fois fixé, il y a formation d'un *appressorium* composé de cellules intrusives envahissant le cortex racinaire de l'hôte. La progression des cellules de l'*appressorium* se fait par l'intermédiaire de pressions mécaniques couplées à une dégradation enzymatique des parois des cellules corticales hôtes *via* des activités de type pectine méthylestérases et polygalacturonases (Ben-Hod et al., 1997; Losner-Goshen et al., 1998; Veronesi et al., 2007). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) aurait également pour rôle de faciliter la pénétration de l'orobanche entre les cellules de l'hôte (Mor et al., 2008).

Une fois l'endoderme franchi, les cellules de l'orobanche vont mettre en place l'organe le plus important de l'interaction parasite/hôte : l'*haustorium*. C'est cet organe endophytique, souvent comparé à une sorte de suçoir spécialisé, qui permet la connexion entre le système vasculaire du parasite et celui de l'hôte, c'est donc grâce à lui que l'orobanche pourra détourner l'eau, les sels minéraux et les photoassimilats de l'hôte.

En fonction des besoins trophiques du parasite, la nature des connexions réalisées au sein de l'*haustorium* va différer. En effet les "phloem feeders" comme l'orobanche privilégient des communications phloémiennes avec leur hôte, tandis que les "xylem feeders" comme le striga mettent en place des connexions directes avec le xylème de l'hôte *via* des *osculla* (Dörr et Kollmann, 1995; Dörr, 1997) (**Fig. 8**). Des études sur l'hémiparasite *Triphysaria versicolor* ont montré que la mise en place de l'*haustorium* s'accompagnait d'une accumulation d'éthylène et d'auxine au sein de celui-ci (Tomilov et al., 2005). L'auxine pourrait jouer un rôle clé au niveau de l'*haustorium* dans l'établissement des connexions avec l'hôte. En effet l'un des rôle de l'auxine est la différentiation cellulaire en élément xylémien (Aloni et al., 2003). La nature des connexions vasculaires entre le parasite et l'hôte n'est pas quelque chose d'aisé à mettre en évidence étant donné la proximité entre les cellules des deux protagonistes. Un point détaillé sur les différents types de connexions vasculaires pouvant exister au niveau de l'*haustorium* sera présenté dans un paragraphe ultérieur.

Une fois les connexions vasculaires établies entre l'hôte et l'orobanche *via* l'*haustorium*, celle-ci peut prélever chez son hôte tous les éléments nécessaires à son développement et ainsi commencer la phase parasitaire de son cycle.

• Croissance souterraine et émergence (phase parasitaire)

Une fois la jonction vasculaire entre le parasite et l'hôte fonctionnelle, l'orobanche dévie l'eau et les composés organiques et minéraux dont elle a besoin, un tubercule se forme alors. Le tubercule se développe et peut atteindre jusqu'à 5 cm de diamètre et constitue un organe transitoire de réserve, accumulant principalement des hexoses, du mannitol, des AA et de l'amidon (Singh et al., 1968; Aber et al., 1983; Abbes et al., 2009; Draie, 2009). Les tubercules possèdent de nombreuses racines adventives. Elles n'ont ni coiffe ni zone pilifère et bien qu'elles possèdent des tissus conducteurs, elles ne sont pas fonctionnelles (Hibberd et al., 1999). Néanmoins chacune de ces racines est un organe en croissance et contribue ainsi à accroître la force de puits du tubercule. Celui-ci développe ensuite une tige écailleuse achlorophylienne à partir du méristème caulinaire qui formera à son tour l'inflorescence une fois émergée. Une hampe florale d'orobanche peut comporter plusieurs dizaines de fleurs selon l'espèce. Chaque capsule florale peut contenir quelques milliers de graines. Ainsi, un seul pied d'orobanche est capable de disséminer jusqu'à 500 000 graines. Une fois enfouies dans le sol, ces graines entrent en phase de dormance et attendent une période propice à leur préconditionnement pour germer à proximité d'une plante hôte.

C'est lors de sa phase de croissance souterraine que l'orobanche inflige le plus de dégâts à la plante hôte. Ainsi, l'orobanche perturbe le cours normal des relations source-puits de son hôte. *Orobanche crenata* est capable de détourner jusqu'à 73% du carbone transitant vers une racine hôte de tabac, 99% de ce carbone étant directement prélevé dans le phloème de cet hôte (Hibberd et al., 1999). La source principale de carbone que l'orobanche prélève chez son hôte est le saccharose, puisqu'il est trouvé en abondance dans le phloème de la plupart des plantes hôtes (Aber et al., 1983). L'orobanche a la faculté de prélever facilement le saccharose car elle accumule beaucoup de solutés et développe donc un potentiel hydrique toujours plus négatif que celui des racines hôtes la rendant ainsi en permanence très attractive vis-à-vis du saccharose (Abbes et al., 2009).
2. COMMENT LUTTER CONTRE L'OROBANCHE AUJOURD'HUI ?

La nécessité de lutter contre l'orobanche est une évidence. Les dommages causés par ce parasite sur certaines cultures engendrent de telles pertes économiques qu'il devient urgent de trouver des moyens efficaces pour enrayer sa propagation. L'orobanche n'est pas un phytopathogène comme les autres. Contrairement aux insectes nuisibles pour lesquels il existe des traitements chimiques adaptés pour les éradiquer, la mise au point d'un traitement agissant spécifiquement sur la plante parasite et n'ayant pas d'effets néfastes sur la plante hôte semble plus complexe. De plus, l'orobanche présente de nombreuses caractéristiques qui rendent difficile l'élaboration de techniques de lutte efficaces. Ainsi, les dégâts qu'elle provoque sont générés essentiellement durant sa phase de vie souterraine, c'est-à-dire durant une phase de son cycle où il est impossible de soupçonner sa présence. Lorsqu'elle émerge du sol, il est ainsi souvent trop tard pour empêcher la perte de rendement dans les cultures infestées. Rappelons que chaque pied d'orobanche produit une quantité très élevée de graines : celles-ci sont minuscules, facilement disséminables et ont une longévité dans le sol très importante. Une parcelle infestée par l'orobanche est donc susceptible de le rester définitivement. A partir de cette constatation, deux grandes voies peuvent être envisagées en termes de lutte. La première consisterait à éliminer le potentiel infectieux de l'orobanche en détruisant les graines présentes dans le sol ou en les contraignant à germer sans qu'elles puissent interagir avec un hôte. La seconde voie viserait plutôt à minimiser les conséquences de l'infestation par l'orobanche en trouvant un moyen de la détruire précocément au cours de son cycle de vie, notamment par la culture de variétés résistantes. Malheureusement il n'existe à ce jour aucun moyen de lutte, s'inscrivant dans l'une de ces deux voies, qui soit totalement efficace.

2.1 "Élimination du potentiel infectieux de l'orobanche"

Une première façon de confiner et donc de limiter le potentiel infectieux de l'orobanche consiste à enfouir les graines par un labour profond. Ce sont effectivement les graines d'orobanche se trouvant dans les couches superficielles du sol qui se fixent préférentiellement sur les racines hôtes. Un décalage dans la date du semis peut aussi être envisagé (Castejon-Munoz et al., 1993). La fertilisation des sols permet également de réduire

l'infestation par le parasite (Haidar et al., 2003). En effet, des travaux démontrent qu'une fertilisation ammoniacale ou potassique altère la production de stimulants de germination du trèfle rouge (Yoneyama et al., 2001). D'autres stratégies consistent à épurer le sol de son stock de graines parasites en induisant leur "germination suicide" aux moyen de plantes pièges qui stimulent la germination mais ne sont pas hôtes du parasite (Gibot-Leclerc et al., 2003).

La technique culturale la plus efficace mais aussi la plus contraignante, consiste à arracher manuellement les jeunes émergences d'orobanche avant qu'elles ne produisent leurs graines. Cette méthode permet d'assurer un contrôle de la propagation du parasite, mais elle impose un suivi permanent de l'état des parcelles et nécessite une importante main d'œuvre (Aly, 2007).

L'inondation, le brulis ou bien encore la solarisation (Mauromicale et al., 2001), sont des méthodes physiques contribuant à détruire le stock grainier des parcelles infestées. Solariser consiste à à détruire les graines du parasite par la chaleur en recouvrant le sol d'une bâche permetant ainsi d'élever la température dans les couches superficielles du sol.

A une époque, certains produits comme le bromure de méthyle ou le méthamsodium étaient utilisés pour fumiger les sols infestés par l'orobanche. La fumigation est une technique qui n'est plus utilisée à cause de ses conséquences sur l'environnement. Une autre approche chimique peut être néanmoins envisagée avec l'usage de molécules inductrices de la germination suicide des plantes parasites telles que des strigolactones de synthèse ou toutes molécules équivalentes. C'est le cas par exemple pour l'orobanche rameuse traitée avec des dérivés de fusicoccine (Evidente et al., 2006) ou bien encore par le Nijmegen 1 (Wigchert et al., 1999). Néanmoins l'usage de ces moléculs pourraient avoir des conséquences inattendues sur la rhizosphère étant donné leur activité potentielle sur les champignons mycorhiziens à arbuscules (Akiyama et al., 2005; Bouwmeester et al., 2007).

2.2 "<u>Minimisation des conséquences d'infestations par l'orobanche</u>"

Certains herbicides comme le chlorsulfuron, l'imazapyr ou le glyphosate permettent dans certains cas une réduction prononcée de l'infestation par l'orobanche (Nandula et al., 2001; Haidar et al., 2005). L'utilisation de ces herbicides doit être contrôlée car ils sont non sélectifs et peuvent donc aussi nuire à la plante hôte. Ce sont des herbicides systémiques à mobilité phloémienne. Des applications faiblement dosées au niveau des feuilles de l'hôte

suffisent, la force de puits du parasite entraînant une accumulation de l'herbicide et donc une toxicité pour les tissus de l'orobanche (Jurado-Exposito et al., 1999).

Certains traitements chimiques pouraient également être appliqués sur la plante hôte dans le but de stimuler ses défenses naturelles et donc de mieux lutter contre l'orobanche. C'est le cas du benzothiadiazole (BTH) ou de l'acibenzolar-S-methyl (ASM) (Kusumoto et al., 2007; Veronesi et al., 2009).

Des approches de lutte biologique existent pour lutter contre l'orobanche. En effet, certains champignons du genre *Fusarium* (Amsellem et al., 2002; Boari et Vurro, 2004) ou des insectes comme la mouche *Phytomyza orobanchia* Kalt. (Klein et Kroschel, 2002) peuvent être de véritables pathogènes pour l'orobanche. Toutefois, leur impact sur la diminution du stock grainier d'orobanche semble limité.

D'autres voies de lutte plus attrayantes consistent à générer, par transgenèse, des plantes présentant une multitude de formes de résistances à l'orobanche. Ainsi, des lignées de tomate surproduisant une toxine induisant des nécroses chez l'orobanche ont été produites (Aly et al., 2006). La même équipe a également réalisé des lignées de tomate capables d'induire chez l'orobanche le silencing d'un gène clé de son métabolisme (M6PR) (Aly et al., 2009). Une autre stratégie serait d'utiliser des plantes transgéniques soit surproductrices de stimulants de germination (plantes pièges) pour induire la germination suicide de l'orobanche (Lopez-Raez et al., 2008), soit au contraire exsudant peu de strigolactones pour réduire la germination du parasite et ainsi limiter sa pathogénicité (Gomez-Roldan et al., 2008). D'autres travaux visent à pouvoir utiliser les herbicides précédemment cités sans craindre leurs effets sur l'hôte. Certains travaux ont consisté à générer des hôtes transgéniques résistants aux herbicides en question (Joel et al., 1995; Slavov et al., 2005). Mais une approche encore plus prometteuse serait d'utiliser des cultures CLEARFIELD[®] tolérantes aux herbicides de type imidazolinones (Tan et al., 2005). En France, le CETIOM a déjà commencé à tester des variétés de tournesols CLEARFIELD[®] en 2009.

Une alternative innovante serait de faire appel aux "nanotechnologies" en s'inspirant de ce qui est fait notamment en médecine. Certaines nanoparticules (capsules, capsides virales) pourraient permettre d'adresser spécifiquement à l'orobanche des molécules toxiques comme les herbicides (Perez-de-Luque et Rubiales, 2009).

Pour parvenir à générer de la résistance chez une plante hôte d'intérêt sans avoir à créer des lignées transgéniques, il existe la possibilité de faire de la mutagénèse chimique.

La lignée résistante de tomate *Sl-ORT1* a notamment été obtenue par ce procédé (Dor et al., 2010). Une faible sécrétion de stimulants ou une production d'inhibiteur de la germination sont des voies proposées pour expliquer le mode de résistance de cette nouvelle lignée.

2.3 Les différentes formes de résistance à l'orobanche

L'un des moyens les plus sûrs pour s'affranchir de la présence de l'orobanche dans les parcelles est l'exploitation de plantes résistantes. Pour y parvenir, il faut d'abord identifier puis comprendre les mécanismes de résistances mis en œuvre (Perez de Luque et al., 2009). L'enjeu est de procéder ensuite à une sélection variétale qui permettra de conserver cette résistance, sachant néanmoins que la résistance peut être contournée avec l'apparition de nouvelles races d'orobanche. Ce phénomène a notamment pu être observé lors de l'interaction *O. cumana*/tournesol (Perez-Vich et al., 2004).

Dans l'absolu, la résistance à l'orobanche se traduit par le fait qu'elle ne se développe pas ou très peu sur l'hôte. Les conséquences sur le rendement agronomique de ce dernier sont alors nulles ou négligeables. Dans les faits, il existe un certain panel de degré de résistance à l'orobanche, pouvant aller de la résistance partielle à la résistance totale. Concernant la résistance à l'orobanche, aucun phénomène de réaction hypersensible n'a été observé à ce jour (Lozano-Baena et al., 2007). La résistance au parasite s'avère plutôt être de type horizontale, faisant intervenir plusieurs QTL (quantitative trait loci) et donc de nature multigénique (Labrousse et al., 2004; Roman et al., 2004). Un tel mode de résistance est donc un processus multifactoriel (génétique et physiologique), sa mise en place peut s'effectuer à différents stades de développement du parasite : de précoce jusqu'à tardif.

Ainsi, une plante peut ne pas stimuler et/ou inhiber la germination de l'orobanche. Soit l'appareil racinaire de la plante exsude peu de stimulants de germination ou beaucoup d'ihnibiteurs, soit l'orobanche est insensible aux stimulants. Par exemple, *Arabidopsis thaliana* n'induit pas la germination d'*O. cumana* ni celle d'*O. crenata* (Goldwasser et Yoder, 2001). Ce mode de résistance est le plus intéressant car il permet de s'affranchir de la présence de l'orobanche dans la parcelle à cultiver.

Certains travaux suggèrent que le développement de l'orobanche peut être stoppé durant la phase de croissance du tube germinatif. Des molécules toxiques présentes dans les exsudats racinaires de l'hôte, telles que des coumarines, phytoalexines ou défensines,

pourraient en être la cause, ces molécules provoquant des nécroses tissulaires des orobanches (Serghini et al., 2001; de Zelicourt et al., 2007).

D'autres mécanismes de résistance surviennent avant la mise en place de l'*haustorium*. Il s'agit souvent de renforcements pariétaux à proximité de la zone de pénétration du parasite visant à former des barrières mécaniques pour empêcher sa propagation. Ces renforcements pariétaux peuvent se traduire par l'accumulation d'un réseau protéique insoluble, de callose, de subérine ou de lignine (Perez-de-Luque et al., 2005; Echevarria-Zomeno et al., 2006; Perez-de-Luque et al., 2006a).

Dans certaines interactions, des occlusions vasculaires ont pu être observées, permettant ainsi de réduire, voire suprimer, l'apport nutritionnel du parasite. Ces occlusions peuvent être causées par des dépôts de callose ou par la formation d'un mucilage (El-Halmouch, 2004; Perez-de-Luque et al., 2006b; Letousey et al., 2007).

Dans certains cas, les formes de résistance ne conduisent pas à l'apparition de nécroses et donc à la mort du parasite fixé. Cela est peu décrit dans la littérature, mais certaines formes de résistance partielle semblent provoquer un ralentissement du développement du parasite. Une occlusion partielle du système vasculaire alimentant l'orobanche ne semble pas pouvoir expliquer un tel ralentissement puisque, la croissance des tubercules est maintenue. Le phénotype consiste en un développement de tiges souterraines et de hampes florales beaucoup plus rare que sur une variété d'hôte sensibles. Ce type de résistance partielle à *P. ramosa* est notamment observé sur une variété de colza (Shakira, Maïsadour Semences).



Figure 9 : Relations sources / puits au sein d'une plante.



Figure 10 : Structure du phloème (Taiz et Zeiger, 2002).

L'association : élément de tube criblé (TC) et cellule compagne (CC) forme le complexe tube criblé-cellule compagne (TC-CC). Protéine P = protéine phloémienne.

3. NOTION DE FORCE DE PUITS

• Les relations sources / puits

Les plantes autotrophes réalisent la photosynthèse et produisent ainsi la matière organique leur permettant de subvenir à une grande partie de leurs besoins nutritionnels, le reste étant prélevé dans le sol par les racines. Tous les organes d'une plante ont des besoins en produits issus de la photosynthèse (photoassimilats), mais ils ne sont pas tous à même d'effectuer ce processus. Les plantes doivent donc procéder à une répartition des photoassimilats afin d'approvisionner les organes qui en produisent peu ou pas. Une relation source / puits est alors mise en place au sein de la plante. Les feuilles matures sont hautement photosynthétiques (excédentaires en photoassimilats) et sont par conséquent les principaux organes sources d'une plante annuelle. Les organes tels que les jeunes feuilles, les bourgeons ou les racines sont peu voire pas photosynthétiques (déficitaires en photoassimilats) et ont par conséquent besoin d'être alimentés par les organes sources. Ils constituent les organes puits de la plante (**Fig. 9**). Au cours de la vie d'une plante, certains organes, comme les jeunes feuilles, sont initialement des organes puits avant de devenir à leur tour des organes sources.

• Translocation des photoassimilats via le phloème

Les photoassimilats sont véhiculés des organes sources jusqu'aux organes puits par la sève élaborée du phloème (**Fig. 9**). Les cellules du phloème impliquées dans la translocation des produits de la photosynthèse sont les éléments de tube criblé (TC). Ces éléments phloémiens sont des cellules allongées qui, agencées bout à bout et séparées par des cribles, constituent les tubes criblés. Les éléments des tubes criblés sont des cellules vivantes hautement spécialisées. Elles possèdent une membrane plasmique mais n'ont quasiment plus d'organelles et sont entre autre dépourvues de noyau. Des cellules voisines, les cellules compagnes (CC), sont reliées de manière symplasmique (*via* des plasmodesmes branchés) aux TC et forment ainsi le complexe tube criblé-cellule compagne (TC-CC) (**Fig. 10**). Une relation fonctionnelle existe entre les TC et les cellules compagnes qui leurs sont associées. En effet, les CC possèdent souvent de nombreuses mitochondries et peuvent ainsi alimenter les TC en énergie sous la forme d'ATP. Elles sont également le siège des synthèses protéiques indispensables au bon fonctionnement des TC. Plusieurs types de cellules compagnes existent



Figure 11 : Potentiel hydrique / Flux de masse (Modifiée d'après Campbell et Reece, 2007).

Potentiel hydrique, osmose et diffusion : le potentiel hydrique d'une cellule végétale (ψ_w) a une valeur inférieure ou égale à zéro. Plus celui-ci est négatif, plus la cellule est attractive vis-à-vis de l'eau. Le potentiel osmotique (ψ_s) est la composante de ψ_w qui lui confère sa valeur négative. Plus la cellule contient de soluté, plus la valeur de ψ_s est négative. Le potentiel de turgescence (ψ_p) a une valeur d'autant plus élevée que la cellule contient de solutés. <u>Principe du flux de masse</u> : au niveau des tissus sources, le phloème s'enrichit en solutés (excès de photoassimilats) ψ_s diminue favorisant l'influx d'eau et augmentant ainsi la pression de turgescence. Au niveau des tissus puits, le phloème s'appauvrit en solutés (déficit en photoassimilats). ψ_s augmente favorisant l'efflux d'eau vers le xylème et abaissant ainsi la pression de turgescence. Le maintien de ce gradient de pression de turgescence permet l'établissement du courant de masse entre source et puits. (CC ordinaire, cellule de transfert et cellule intermédiaire), qui diffèrent en fonction du nombre de plasmodesmes qui les relient aux cellules parenchymateuses voisines ainsi que par la présence ou non d'invaginations pariétales (caractéristiques des cellules de transfert).

Chez la majorité des plantes, le saccharose est la principale forme de carbone organique transporté par la sève élaborée. La sève véhiculée par le phloème contient effectivement des teneurs élevées en saccharose, de l'ordre de 0,3 à 0,9 M. Cette sève contient également d'autres éléments comme de l'azote organique sous la forme d'acides aminés telle que l'aspartate, ou bien encore des phytohormones comme l'auxine. Le saccharose est un sucre non-réducteur (contrairement au glucose), ce qui en fait une molécule de choix pour le transport à longue distance de carbone organique. En effet, de part cette propriété, le saccharose est moins exposé à la métabolisation durant son transport phloémien que ne le serait le glucose ou le fructose, possédant respectivement un groupement aldéhyde ou cétone. Néanmoins, bien que ce soit majoritairement le cas, le saccharose n'est pas toujours la source de carbone privilégiée pour le transport à longue distance. En effet, des exemples de plantes de la famille des Cucurbitaceae ou des Scrophulariaceae transportent majoritairement le carbone sous forme de RFOs (raffinose-family oligosaccharides) (Thomas et Webb, 1978; Knop et al., 2001). D'autres plantes transportent à la fois du saccharose et des polyols comme le mannitol chez le céleri ou le sorbitol chez le plantain (Noiraud et al., 2000; Ramsperger-Gleixner et al., 2004). Finalement, quelle que soit la nature des molécules présentes dans les tubes criblés du phloème, leur transport à longue distance s'effectue selon un courant de masse.

• La théorie du flux de masse

La théorie du flux de masse a été proposée pour expliquer les mouvements de sève élaborée entre les organes sources et les organes puits (Münch, 1930). L'explication de ces mouvements ne peut pas reposer sur le principe de la gravité puisqu'une partie de ces mouvements peut s'effectuer entre une feuille source et un bourgeon se situant plus en hauteur. La théorie du flux de masse résiderait sur l'existence d'un gradient décroissant de pression de turgescence entre les organes sources et les puits (**Fig. 11**). Ce gradient s'explique par la différence de capacité photosynthétique entre les organes sources et puits. Les organes sources produisent des photoassimilats en excès chargés abondamment dans les complexes TC-CC puis acheminés jusqu'aux puits qui en sont déficitaires. Au niveau des puits, les photoassimilats sont prélevés à partir des complexes TC-CC, puis consommés et/ou stockés.



Figure 12 : Charge du phloème en saccharose (Campbell et Reece, 2007).

A <u>La voie du symplasme ou de l'apoplasme</u> : le saccharose produit dans le mésophylle peut emprunter la voie du symplasme (= *continuum* cellulaire) (flèches bleues) pour se rendre dans les cellules criblées du phloème. La seconde possibilité est que le saccharose soit exporté dans l'apoplasme (= *continuum* extracellulaire, pariétal) (flèches rouges) puis chargé dans un deuxième temps dans les cellules criblées. **B** <u>Transport actif associé à la charge apoplastique</u> : le saccharose est chargé dans la cellule criblée aux moyens d'un cotransporteur : saccharose - H⁺. Contrairement au saccharose (très abondant dans le tube criblé), les protons sont transportés selon leur gradient de concentration (l'apoplasme étant un compartiment acide). Une pompe à protons consommatrice d'énergie (ATPase) permet de maintenir le gradient de protons assurant le maintien du transport actif de saccharose.

Il existe donc en permanence un déséquilibre entre la teneur en assimilats d'un tissu source et celle d'un tissu puits au niveau des complexes TC-CC. Ces différences en quantités d'assimilats ont un impact sur le potentiel hydrique des complexes TC-CC et permettent d'expliquer l'existence d'un gradient décroissant de pression de turgescence entre source et puits (**Fig. 11** page 36). Le flux de masse est un mécanisme passif reposant sur la pression hydrostatique qui repousse physiquement les solutés (ainsi que tout ce que contient la sève élaborée) en direction des organes puits. L'existence de cribles entre chaque élément de tube criblé permet d'assurer un maintien du gradient de pression hydrostatique entre source et puits, sans eux la pression hydrostatique aurait tendance à s'équilibrer entre les différents tissus.

Le flux de masse s'effectue bien de manière passive le long de l'axe phloémien. Néanmoins, un apport d'énergie est nécessaire pour entretenir la présence des membranes plasmiques dans les tubes criblés ainsi que pour récupérer en partie les assimilats ayant fui naturellement hors du phloème. Un apport d'énergie est également indispensable pour maintenir le gradient de pression de turgescence, les assimilats doivent être continuellement et activement chargés en "entrée" de phloème (source) puis activement déchargés en "sortie" (puits).

• La charge du phloème (tissus sources)

Le cheminement des photoassimilats jusqu'au phloème s'effectue en plusieurs étapes. Le saccharose effectue d'abord un transport de courte de distance (quelques cellules). Ensuite, la charge du saccharose dans le complexe TC-CC peut s'effectuer de deux manières en empruntant soit la voie du symplasme soit celle de l'apoplasme (Giaquinta, 1983) (**Fig. 12 A**). La charge du phloème s'effectue principalement de manière apoplasmique, ce qui implique une charge du saccharose en deux étapes. La première consiste en l'efflux du saccharose dans le compartiment extracellulaire (apoplasme), la seconde implique une récupération du saccharose au sein du symplasme du complexe TC-CC. Au cours de ces étapes le saccharose doit franchir à deux reprises la membrane plasmique, une première fois dans le sens de l'efflux, dont le mécanisme reste assez incertain, et une seconde fois dans le complexe TC-CC nécessite la mise en place d'un transport actif. En effet, le potentiel osmotique étant beaucoup plus faible dans le tube criblé que dans le mésophylle (Geiger et al., 1973), le saccharose est chargé contre son gradient de concentration. Un transport actif



Figure 13 : Charge symplastique du phloème (Modifiée d'après Taiz et Zeiger, 2002).

Modèle simplifié du "piégeage de polymères" de type RFOs (raffinose-family oligosaccharides) au niveau d'une cellule compagne particulière (cellule intermédiaire).

secondaire du saccharose est alors mis en place grâce à des cotransporteurs spécialisés (symporteurs saccharose- H^+ = type SUT) couplés à une pompe à protons (ATPase) fournissant l'énergie nécessaire pour assurer le transport du saccharose en maintenant le gradient de concentration en protons favorable (Bouche-Pillon et al., 1994) (**Fig. 12 B** page 38). Contrairement au saccharose, les hormones ainsi que les acides organiques entreraient préférentiellement de façon passive dans le complexe TC-CC (Taiz et Zeiger, 2002). Notons toutefois que certains travaux suggèrent l'intervention du transporteur (type facilitateur) AUX1 dans la charge phloémienne de l'auxine (Swarup et al., 2001; Marchant et al., 2002).

Certaines plantes en revanche, comme celles de la famille des *Cucurbitaceae*, empruntent la voie du symplasme pour charger le phloème (**Fig. 13**). Au niveau du site de charge, ces plantes ont la particularité d'avoir des cellules compagnes de type "intermédiaire", contrairement aux plantes dont la charge se fait *via* l'apoplasme *via* des cellules compagnes de type "ordinaire" et/ou "des cellules de transfert". La charge symplasmique du phloème se fait selon le modèle du "piégeage de polymères"(Turgeon et Gowan, 1990). Le saccharose est transformé, au sein des cellules intermédiaires, en RFOs par ajout de résidus galactose, ces molécules sont piégées dans la mesure où la taille d'exclusion des plasmodesmes ne leur permet plus de migrer vers les cellules de mésophylle. Ainsi, la transformation du saccharose en nouvelles molécules de type RFOs permet de maintenir un gradient décroissant de la concentration en saccharose entre le mésophylle et le complexe TC-CC, ceci assurant une diffusion continuelle de ce dernier en direction du phloème.

• La décharge du phloème (tissus puits)

La décharge phloémienne au niveau des organes puits apparait comme l'étape finale de la translocation longue distance des photoassimilats. Une grande variété de tissus puits existe et en fonction de l'organe considéré, la nature de la décharge peut être de deux types : symplasmique ou apoplasmique. Ainsi, les cellules de garde des stomates et les grains de pollen sont des "puits apoplastiques", tandis que les apex racinaires sont des "puits symplastiques" (Stadler et al., 2005a; Stadler et al., 2005b).

Au cours d'une décharge de type apoplastique, deux voies sont envisageables. La première consiste en l'efflux du saccharose dans l'apoplasme suivi d'un influx dans les cellules puits grâce à des transporteurs de saccharose. La seconde implique l'intervention d'une invertase pariétale qui hydrolyse le saccharose en hexoses au sein de l'apoplasme. Les hexoses sont ensuite acheminés dans les cellules puits grâce à des transporteurs d'hexoses.

Au cours d'une décharge de type symplasmique l'énergie métabolique mise en place par le puits a une importance de premier ordre car elle est garante du maintien de gradient de concentration décroissant en solutés entre le complexe TC-CC et les cellules puits.

De manière générale, l'allocation du carbone au sein des puits, représentée par l'ensemble des voies disponibles pour métaboliser le carbone prélevé dans le phloème, est un processus clé permettant d'assurer la décharge phloémienne. Les stratégies d'allocation carbonée dépendent du type de puits : un organe puits de stockage accumule essentiellement le carbone dans la vacuole (hexose, saccharose, mannitol, inuline...) ou dans des plastes (amidon), alors qu'un organe puits en croissance utilise majoritairement le carbone pour la respiration cellulaire et pour la synthèse de composés pariétaux. Un autre aspect joue un rôle important pour le devenir du carbone véhiculé dans le phloème, il s'agit de sa répartition au sein des différents organes puits de la plante. Les puits rentrent en compétition les uns avec les autres vis-à-vis du prélèvement du carbone organique. Un puits est d'autant plus concurrentiel qu'il a la capacité à stocker ou à métaboliser le carbone issu du phloème. Une étude a ainsi montrée une réduction de la quantité de carbone allouée aux grains d'un maïs mutant incapable de synthétiser l'amidon (Koch et al., 1982). L'existence d'une compétition entre les puits introduit donc la notion de force de puits.

• La force de puits

La force de puits reflète la capacité d'un organe à importer des assimilats. Elle est quantifiable et se mesure de la façon suivante : force de puits = taille du puits × activité du puits (Wolswinkel, 1984). L'activité d'un puits se mesure par sa capacité à métaboliser mais aussi à prélever activement les photoassimilats en provenance du phloème. Il apparaît alors clairement toute l'importance et le rôle crucial que vont jouer les différents acteurs de la force de puits impliqués dans le transport du saccharose (décharge du phloème), ainsi que dans sa métabolisation.

Des études montrent que l'activité des puits ainsi que celle des sources est en partie contrôlée par l'abondance relative en ressources carbonées. Une déficience en ressources stimulerait l'expression de gènes impliqués dans la photosynthèse, la remobilisation des réserves carbonées ainsi que dans l'export de carbone organique. En revanche, l'abondance de ressources stimulerait préférentiellement l'expression des gènes impliqués dans leur utilisation et leur stockage (Koch, 1996). Néanmoins, le même auteur a également rapporté que certains

gènes impliqués dans le métabolisme du saccharose, *sh1* et *sus1* codant tous deux pour une saccharose synthétase chez le maïs, ont une expression régulée de façon opposée par les glucides (Koch et al., 1992). La disponibilité en ressources carbonées semble donc jouer un rôle complexe dans la régulation de l'activité des puits. A cela vient s'ajouter le fait que d'autres signaux, tels que la pression de turgescence ou les phytohormones, régulent et coordonnent également l'activité des puits ainsi que celle des sources. Les hormones végétales joueraient un rôle dans le transport et la métabolisation du saccharose. Une action concertée entre les gibbérellines et les glucides a été rapportée concernant la régulation des gènes codant pour les alpha-amylase au cours du développement des plantules de céréales (Thomas et Rodriguez, 1994).

La force de puits est un processus dont la régulation est complexe, faisant intervenir différents paramètres tels que la teneur en glucides et les signaux hormonaux. Les acteurs fondamentaux de cette force de puits, soumis à ces régulations fines, sont entre autres les transporteurs de saccharose de type SUT et les enzymes impliqués dans le clivage du saccharose, telles que les invertases et les saccharose synthétases. Les transporteurs de saccharose sont déterminants puisqu'ils conditionnent la charge active du phloème au niveau des tissus sources et également l'acheminement du saccharose en direction de certains organes puits. Les enzymes hydrolysant le saccharose ont un rôle primordial puisqu'elles catalysent la réaction initiale qui conditionne toutes les autres associées à l'allocation du carbone organique : stockage, respiration cellulaire, croissance. De plus, ayant un impact sur l'évolution des pools de saccharose et d'hexoses, reconnues comme étant des molécules signales, ces enzymes interviennent directement dans la régulation de la signalisation glucidique ("sugar sensing") (Jang et Sheen, 1994; Smeekens et Rook, 1997; Roitsch, 1999).



Figure 14 : Transport de saccharose à l'échelle d'une cellule photosynthétique.

Les différents types de transporteurs de saccharose sont représentés et localisés sur cette figure (Kuhn et Grof, 2010). En bleu : les facilitateurs, en vert : les symporteurs SUT (saccharose - H^+), en orange : les supposés antiporteurs SUT (saccharose - H^+). Suc: saccharose; plastid: chloroplaste.

4. LES COMPOSANTES MAJEURES DE LA FORCE DE PUITS

4.1 Les transporteurs actifs secondaires de type SUT (sucrose transporter)

• Les différents types de transporteurs de saccharose (SUT)

Les transporteurs de saccharose de type SUT (parfois appelés SUC : sucrose carrier) sont des acteurs majeurs de la force de puits. Ils appartiennent à la MFS (Major Facilitator Superfamily) (Marger et Saier, 1993) et sont spécifiques des plantes, contrairement aux transporteurs d'hexoses également présents chez les procaryotes et les levures (Williams et al., 2000).

Les SUT seraient à la fois ATP dépendant et liés à un transfert de protons, constituant ainsi des cotransporteurs saccharose-H⁺ (Giaquinta, 1979). Le fait que les SUT fonctionnent à un *optimum* de pH et qu'ils soient sensibles aux agents découplants ainsi qu'aux inhibiteurs de groupement sulfhydriles (présents sur les ATPases) supporte l'idée d'un tel cotransport. La preuve de ce cotransport et de sa stœchiométrie (transport d'un proton pour une molécule de saccharose) a été apporté un peu plus tard par expression hétérologue chez le xénope (Boorer et al., 1996). Les SUT sont relativement spécifiques de leur substrat, bien qu'il ait été rapporté qu'ils soient aussi capables de transporter le maltose et la biotine (vitamine H) (Ludwig et al., 2000).

La localisation des SUT au niveau de la membrane plasmique a souvent été déduite des observations faites suite aux expressions hétérologues des transporteurs en levure (Gahrtz et al., 1994; Sauer et Stolz, 1994; Meyer et al., 2000). Des travaux ont pu démontrer que les SUT avaient bien une localisation membranaire suite à leur détection dans les fractions microsomales (Bick et al., 1998). Le transport de saccharose médié par les SUT peut s'effectuer à différents niveaux cellulaire étant donné que les SUT peuvent être localisés à la fois au niveau du plasmalemme et aussi au niveau des membranes et/ou enveloppe d'organelles (**Fig. 14**). En fonction de leur localisation, le sens du transport du sacharose varie. Au niveau du plasmalemme, ils seraient impliqués dans l'influx cellulaire en saccharose (Lemoine, 2000; Aldape et al., 2003), tandis qu'au niveau tonoplastique (Endler et al., 2006) et de l'enveloppe chloroplastique (Rolland et al., 2003), ils seraient impliqués dans l'efflux en direction du cytoplasme (Reinders et al., 2008; Kuhn et Grof, 2010). Néanmoins, certains



Figure 15 : Schématisation du transport de saccharose à l'échelle d'une plante photosynthétique (Shiratake, 2007).

Le saccharose issu de la photosynthèse (tissu source) est acheminé dans l'apoplasme par un transporteur putatif ou par diffusion (pointillés). Il est ensuite chargé dans le complexe TC-CC par des SUT. Dans le tube criblé, le saccharose subit le flux de masse. Au cours du transport, le saccharose fuit dans l'apoplasme et est récupéré par des SUT. Finalement, le saccharose est déchargé (tissu puits) par le symplasme *via* des plasmodesmes, par l'apoplasme *via* des SUT ou par des transporteurs d'hexoses après hydrolyse par une invertase pariétale (INV). Des transporteurs de saccharose sont impliqués dans le stockage et la remobilisation du saccharose vacuolaire. Suc: saccharose; glu: glucose; fru: fructose; triose-P: trioses phosphates.

résultats suggèrent que des interactions, entre le potentiel membranaire, le gradient de protons et la concentration cellulaire et/ou extracellulaire en saccharose, peuvent influencer la direction du transport de saccharose (Carpaneto et al., 2005). Ainsi, les transporteurs SUT seraient aussi capable de réaliser l'efflux de saccharose en direction des compartiments acides tels que l'apoplasme ou la vacuole. Un mode de transport basé sur le gradient de concentration en saccharose ne nécessitant pas d'apport énergétique avait déjà été proposé (Winter et al., 1994). Notons également que plusieurs travaux suggèrent aussi l'existence d'antiporteurs de saccharose (Walker et al., 2000), notamment au niveau tonoplastique (Briskin et al., 1985; Lemoine, 2000; Martinoia et al., 2000) (**Fig. 14** page 46).

D'autres protéines que les SUT peuvent médier le transport de saccharose, des protéines de type facilitateurs pourraient elles aussi permettre son mouvement (dans les deux sens) au travers des membranes cellulaires (Zhou et al., 2007) (**Fig. 14** page 46). Les Sucrose Binding Proteins (SBP) initialement découvertes chez le soja (Ripp et al., 1988), pourraient accomplir ce rôle puisque leur caractérisation chez la levure révèle leur capacité à réaliser l'influx et l'efflux de saccharose de manière non saturable et indépendante du gradient de protons (Overvoorde et al., 1996).

• Localisation, fonctions et rôles des transporteurs SUT

De par leur habilité à transporter le saccharose au travers des membranes cellulaires, les transporteurs SUT jouent des rôles clés pour l'acheminement du saccharose dans les "puits apoplastiques" et dans certains compartiments cellulaires. Le rôle précis des SUT est conditionné par leur expression et régulation spatio-temporelle (**Fig. 15**) (Shiratake, 2007).

Le rôle prépondérant des SUT au niveau des tissus sources est la charge apoplastique des complexes TC-CC et donc l'export de saccharose en direction des puits. Des stratégies antisens visant à éteindre l'expression de gènes SUT exprimés au niveau des sources entrainent le nanisme chez le tabac (Burkle et al., 1998), ainsi qu'une accumulation d'amidon au niveau des sources et une réduction de la croissance des tubercules chez la pomme de terre (Schulz et al., 1998). Le rôle des SUT dans la charge apoplastique du phloème a été rapporté aussi bien chez les dicotylédones que chez les monocotylédones (Ishimaru et al., 2001; Slewinski et al., 2009). Une codistribution d'ATPase et de SUT a été observée dans les cellules compagnes (DeWitt et Sussman, 1995; Truernit et Sauer, 1995) mais aussi dans les tubes criblés (Langhans et al., 2001). Les gènes *SUT* peuvent être exprimés dans les CC du phloème, qui possèdent un noyau contrairement aux TC. Néanmoins, certains messagers *SUT*,

notamment chez les Solanacées, sont détectés dans les TC suggérant leur possible transport depuis leur site de transcription (Kuhn et al., 1997). Bien entendu, les gènes SUT sont très souvent retrouvés exprimés dans les CC, et plus particulièrement au niveau des nervures secondaires, sièges de la charge phloémienne. D'autres travaux démontrent également l'expression de gènes SUT au niveau des pétioles et des nervures principales, attestant de leur rôle dans la récupération phloémienne du saccharose perdu par fuite au cours du transit (Meyer et al., 2000; Schulze et al., 2000). L'implication des SUT dans la charge phloémienne des tissus sources apparaît évidente au cours de la transition puits/source qui se produit de façon basipète chez les jeunes feuilles. En effet, le saccharose se décharge de manière symplasmique dans les feuilles immatures. Au moment de la transition, la pointe de la feuille s'isole symplastiquement par obstruction et/ou diminution du nombre de plasmodesmes (Roberts et al., 1997). Par ailleurs, la quantité d'ATPase ainsi que celle des SUT augmente dans la zone en transition (Riesmeier et al., 1993). Finalement, si l'expression de gènes SUT au niveau des organes sources est bien caractérisée, il s'avère que ces gènes sont aussi exprimés au niveau des complexes TC-CC à tous les niveaux de la plante. Certains auteurs suggèrent ainsi un rôle des SUT dans la décharge du phloème au niveau des organes puits (Riesmeier et al., 1994; Truernit et Sauer, 1995; Kuhn et al., 2003), avec une fonction possible dans l'efflux de saccharose dans l'apoplasme des CC puits (Carpaneto et al., 2005). Toutefois, le rôle des SUT dans la charge phloémienne n'est pas incompatible avec leur localisation au niveau des complexes TC-CC puits. En effet, la force de puits d'un organe fait intervenir d'autres acteurs dont l'activité contribue activement à la décharge du phloème.

Il existe également de très nombreux organes puits exprimant des transporteurs SUT. C'est notamment le cas d'organes ayant pour vocation de stocker le saccharose comme chez la carotte ou la betterave sucrière (Shakya et Sturm, 1998; Rae et al., 2005). Les SUT peuvent êtres associés aux graines comme chez l'arabette (Baud et al., 2005), la fève ou le pois (Weber et al., 1997; Tegeder et al., 1999); aux grains comme chez l'orge (Weschke et al., 2000); ou bien encore aux organes floraux comme chez le plantain et l'arabette (Gahrtz et al., 1996; Sivitz et al., 2007). Au niveau des fleurs, les SUT pourraient jouer un rôle dans la déhiscence des anthères. Ils semblent également jouer un rôle au niveau du grain de pollen puisque de nombreux travaux y relatent la présence de transporteurs SUT, notamment chez l'arabette (Stadler et al., 1995; Meyer et al., 2004), le tabac (Lemoine et al., 1999) ou le plantain (Barth et al., 2003; Lauterbach et al., 2007). Une étude a clairement montrée que la viabilité du pollen se retrouvait réduite suite à l'inhibition (stratégie antisens) d'un transporteur

SUT (Hackel et al., 2006). Les SUT ont des rôles tout aussi importants à jouer dans les organes puits qu'au niveau des sources. L'importation de saccharose au niveau d'un puits (cas d'une décharge apoplastique) implique l'intervention de SUT à différents niveaux : l'efflux à partir du phloème, l'influx au niveau des cellules puits et enfin l'influx vacuolaire pour le stockage (Rae et al., 2005). L'existence de transporteurs SUT tonoplastiques a été démontrée chez l'orge, l'arabette (Endler et al., 2006) et le lotus (Reinders et al., 2008). Néanmoins, la caractérisation biochimique de ces transporteurs semble indiquer un fonctionnement dans le sens de l'efflux, allant donc à l'encontre d'un stockage vacuolaire du saccharose (Neuhaus, 2007). De nombreux travaux suggèrent l'implication d'antiporteurs saccharose-H⁺ dans l'influx et le stockage vacuolaire du saccharose, sans pour autant les avoir identifiés (Kuhn et Grof, 2010). Une autre éventualité serait qu'un même transporteur puisse fonctionner dans les deux directions à la fois, en n'étant pas systématiquement dépendant du gradient de protons comme cela a été suggéré chez le maïs (Carpaneto et al., 2005).

De façon plus anecdotique, un transporteur SUT du noyer a été localisé à l'interface entre les vaisseaux du xylème et des cellules spécialisées (VACs = vessel-associated cells) du parenchyme avoisinant. Ce transporteur serait impliqué dans la remobilisation du saccharose contenu dans les vaisseaux en direction du parenchyme xylémien (Decourteix et al., 2006).

• La petite famille multigénique des transporteurs SUT

Depuis la découverte du premier transporteur SUT (Riesmeier et al., 1992), de nombreux autres gènes et/ou ADNc ont été identifiés et caractérisés, ce à la fois chez des plantes qui transportent essentiellement du saccharose (Sauer et al., 2004), du saccharose et des RFOs (Knop et al., 2004), ou du saccharose et des polyols (Noiraud et al., 2000). Chez toutes les plantes, les SUT forment une petite famille multigénique. Neuf séquences apparentées à des gènes SUT ont été identifiées chez l'arabette, les séquences SUC6 et SUC7 seraient des pseudogènes (Sauer et al., 2004). En ce qui concerne les homologies de séquences SUT entre elles, trois types de SUT semblent exister. Sur les neuf séquences d'*Arabidopsis thaliana*, sept partagent 75% d'acide aminés en commun formant ainsi le premier type de SUT (SUT1), tandis que les deux autres séquences (SUC3 et SUC4) présentent seulement 50% d'identité avec les séquences de type SUT1 et 50% d'identité également entre elles-deux, formant ainsi respectivement les SUT de type SUT2 et SUT4. D'un point de vue phylogénétique les avis divergent, allant de trois jusqu'à cinq groupes



Figure 16 : Arbre phylogénétique de 62 séquences de transporteurs SUT (confirmés ou putatifs) accessibles dans les bases de données publiques (Sauer, 2007).

L'arbre révèle l'existence de quatre groupes distincts discutés dans le texte. Ab : Asarina barclaiana; Ag : Apium graveolens; Am : Alonsoa meridionalis; At : Arabidopsis thaliana; BoSUC1 et BoSUC2 : Brassica oleracea; BoSUT1 : Bambusa oldhamii; Cs : Citrus sinensis; Dg : Datisca glomerata; Dc : Daucus carota; Ee : Euphorbia esula; Eu : Eucommia ulmoides; Hb : Hevea brasiliensis; Hv : Hordeum vulgare; Jr : Juglans regia; Le : Lycopersicum esculentum; Lj : Lotus japonicus; Md : Malus domestica; Me : Manihot esculenta; Nt : Nicotiana tabacum; Os : Oryza sativa; Pm : Plantago major; Pt : Populus tremula × Populus tremuloides; Ps : Pisum sativum; Rc : Ricinus communis; Sd : Solanum demissum; Sh : Saccharum hybridum; So : Spinacea oleracea; St : Solanum tuberosum; Ta : Triticum aestivum; Vf : Vicia faba; Vv : Vitis vinifera; Zm : Zea mays. Les alignements protéiques et la construction de l'arbre ont été respectivement effectués avec les programmes CLUSTAL (Chenna et al., 2003) et TREEVIEW. La barre indique la distance d'évolution. distincts (Sauer, 2007; Shiratake, 2007; Braun et Slewinski, 2009). Ici sera développé et décrit la classification des SUT en quatre groupes phylogénétiques distincts (**Fig. 16**) (Sauer, 2007).

Les SUT du premier groupe (bleu) appartiennent à la classe des monocotylédones. Certains d'entre eux ont été caractérisés biochimiquement : OsSUT1 (Hirose et al., 1997), ShSUT1 (Reinders et al., 2006) et ZmSUT1 (Carpaneto et al., 2005). Les transporteurs ZmSUT1 et OsSUT1 auraient un rôle dans la charge du phloème (Aoki et al., 1999; Scofield et al., 2007) tandis que d'autres SUT de ce groupe sembleraient plutôt impliqués dans le transport du saccharose au niveau des organes puits (Weschke et al., 2000; Aoki et al., 2002). Les SUT de ce groupe sont considérés comme des transporteurs du plasmalemme impliqués dans l'import de saccharose au niveau des complexes TC-CC et des cellules puits.

Les SUT du second groupe (vert) appartiennent à la classe des dicotylédones. Les transporteurs de ce groupe seraient, comme ceux du groupe 1, plasmalemmiques et impliqués dans l'import phloémien de saccharose au niveau des sources et des cellules puits. Les SUT du premier et second groupe constituent le type "SUT1". La plupart des espèces possèdent plusieurs transporteurs du type SUT1, suggérant des phénomènes de duplication de gène, qui en revanche n'auraient pas eu lieu pour les gènes des groupes 3 et 4. Des duplications de gène pour les transporteurs du type SUT1 indiquent leur importance pour les plantes ainsi qu'une faculté d'adaptation plus importante pour les fonctions physiologiques qu'ils assurent.

Les SUT du troisième groupe (rose) appartiennent à la fois aux monocotylédones et aux dicotylédones. Ils constituent le type "SUT2". Jusqu'à présent chaque plante ne semble posséder qu'un seul transporteur de ce type. Les protéines de ce groupe sont plus longues que les autres (environ 600 AA). Les transporteurs de type SUT2 ont souvent été décrits comme étant des senseurs (Barker et al., 2000); aujourd'hui cela fait encore débat (Eckardt, 2003). Les SUT du troisième groupe ont été localisés au niveau des tubes criblés, y compris au niveau des puits, et pourraient par conséquent avoir un rôle dans la décharge du phloème (Barker et al., 2000; Barth et al., 2003; Meyer et al., 2004).

Les SUT du quatrième groupe (rouge) appartiennent à la fois aux monocotylédones et aux dicotylédones et constituent le type "SUT4". Au même titre que les transporteurs SUT2, un seul gène SUT4 a été identifié chez les différentes espèces étudiées. Les transporteurs SUT4 peuvent être plasmalemmiques ou tonoplastiques (Weise et al., 2000; Endler et al., 2006) et semblent jouer un rôle important au niveau des organes puits, notamment dans la régulation du stock de saccharose vacuolaire.



Figure 17 : Modèles structuraux des différents types de transporteurs SUT (Sauer, 2007).

Trois modèles en deux dimensions sont proposés pour les transporteurs de types SUT 1, 2 et 4. Les extrémités N- et C-terminales ainsi que les boucles reliant les hélices VI et VII sont supposées cytoplasmiques. Les hélices transmembranaires sont représentées de différentes couleurs. Des couleurs identiques sont utilisées pour les hélices de la première et de la seconde moitié de la protéine pour mettre en évidence l'existence de conservations de séquences entre elles. Les principales différences entre ces modèles résident dans les régions extra-membranaires. Un modèle de structure tridimensionnel, basé sur la structure de LacY, un autre membre de la MFS, est proposé pour les SUT.

• Caractéristiques des différents types de transporteurs SUT

Les transporteurs SUT sont tous composés de 12 segments transmembranaires (hélices alpha) et ont des éléments cytosoliques jouant des rôles importants comme les extrémités N- et C-terminales, ainsi qu'une boucle reliant les hélices 6 et 7 (Stolz et al., 1999). Initialement, les SUT, comme les autres membres de la MFS, résulteraient d'une duplication d'un transporteur à 6 éléments transmembranaires (Marger et Saier, 1993). La structure des SUT diffère selon le groupe phylogénétique auquel ils appartiennent (**Fig. 17**) (Sauer, 2007).

Les transporteurs de type SUT1 (groupe 1 et 2) sont impliqués dans la charge phloémienne et la récupération du saccharose qui s'en échappe. En effet, ils sont localisés au niveau du plasmalemme des CC (Stadler et al., 1995), des TC (Kuhn et al., 1997; Barker et al., 2000; Weise et al., 2000; Aoki et al., 2004), et parfois des deux (Knop et al., 2004; Scofield et al., 2007). Les SUT1 sont parfois aussi qualifiés de transporteurs HALC (high-affinity-low-capacity) en raison de leur très forte affinité pour le saccharose. Ils ont un K_m compris entre 0,1 et 2 mM chez les dicotylédones (Kuhn et al., 2003) et entre 2 et 8 mM chez les monocotylédones (Reinders et al., 2006).

Les transporteurs de type SUT2 (groupe 3) ont été qualifiés de transporteurs senseurs (Lalonde et al., 1999; Barker et al., 2000). Cette suggestion a été faite pour plusieurs raisons : la première vient des similitudes qu'il y a entre les SUT2 et les protéines Snf3 et Rgt2 qui sont des "glucose transporter like" ayant un rôle de senseur chez la levure (Ozcan et al., 1998). Ces protéines sont impliquées dans la perception et la transduction du signal glucidique (Smeekens et Rook, 1997); la seconde raison vient du fait que le transporteur LeSUT2 exprimé en levure n'est pas fonctionnel, allant dans le sens d'un rôle de senseur et non d'un transporteur (Barker et al., 2000). Néanmoins, le statut de senseur accordé aux SUT2 fait débat (Eckardt, 2003), surtout depuis qu'un transporteur de type SUT2 fonctionnel a été caractérisé chez le plantain (Barth et al., 2003). Les SUT2 sont retrouvés au niveau des membranes plasmiques des TC et aussi au niveau des organes puits (Barker et al., 2000; Barth et al., 2003; Meyer et al., 2004). D'un point de vue structural, les protéines SUT2 sont plus grandes que les autres SUT : environ 600 AA, avec une extrémité N-terminale possédant près de 20 AA de plus que celle des autres SUT et une boucle cytosolique également plus longue d'environ 60 AA. Les SUT2 ont une affinité pour le saccharose relativement faible avec un $K_{\rm m}$ compris entre 4 et 20 mM (Kuhn et Grof, 2010).

Les transporteurs de type SUT4 (groupe 4) ont été qualifiés de transporteurs LAHC (low -affinity- high -capacity) en raison de leur faible affinité pour le saccharose et ont un K_m du même ordre de grandeur que celui des SUT2 (Weise et al., 2000). Les SUT4 ont été retrouvés associés à l'enveloppe chloroplastique (Rolland et al., 2003), au tonoplaste (Endler et al., 2006) ainsi qu'au plasmalemme (Reinders et al., 2002; Chincinska et al., 2008). Leur rôle dans les organes puits semble prépondérant. Les SUT4 ont généralement une séquence protéique plus courte que les autres SUT, avec entre autre une extrémité C-terminale raccourcie et une boucle très courte entre les hélices 7 et 8.

Pour conclure sur la structure des transporteurs SUT, il faut noter l'importance de l'extrémité N-terminale dans l'affinité au saccharose (Schulze et al., 2000). La boucle cytosolique centrale n'aurait quant à elle pas d'effet sur l'affinité mais aurait en revanche un rôle dans l'activité des SUT, une grande boucle telle que celle des SUT2 réduirait notamment la V_{max} des transporteurs (Schulze et al., 2000).

• Régulation des transporteurs SUT

La régulation des transporteurs SUT est complexe et extrêmement contrôlée du fait de leur rôle clé au sein de la plante. L'exemple de la transition puits/source au cours de la croissance des feuilles illustre bien la régulation fine qui gouverne l'expression des SUT (Riesmeier et al., 1993; Truernit et Sauer, 1995).

Régulation transcriptionnelle

Des facteurs biotiques et/ou abiotiques ont un impact sur le niveau d'expression des gènes SUT, les exemples du stress mécanique, du vieillissement et des attaques de pathogènes peuvent être cités (Sakr et al., 1997; Delrot et al., 2000), ou bien encore celui du stress salin et/ou hydrique qui entraîne la sous expression des gènes *SUT* chez le plantain (Noiraud et al., 2000). La lumière du jour (effet diurne) a également un impact sur l'expression de certains gènes *SUT* comme chez les Solanacées ou la carotte avec DcSUT1 dont l'expression est accrue à la lumière (Kuhn et al., 1997; Shakya et Sturm, 1998). La lumière n'a en revanche pas d'impact sur le niveau d'expression de DcSUT2 qui reste stable (Shakya et Sturm, 1998). Des éléments de régulation par la lumière (I box) ont été identifiés dans les séquences promotrices des transporteurs AtSUC2 et VvSUC1 (Delrot et al., 2000).
Les glucides ont aussi une influence sur le niveau d'expression des *SUT*. Certains gènes sont insensibles aux glucides comme *AtSUC2* (Truernit et Sauer, 1995) ou *StSUT1* (Harms et al., 1994). D'autres au contraire sont réprimés : comme le gène *BvSUT1* par le saccharose (Chiou et Bush, 1998), ou comme*VfSUT1* à la fois par le saccharose et le glucose (Weber et al., 1997). Enfin, le saccharose induit une surexpression de certains gènes *SUT* comme *ZmSUT1* (Aoki et al., 1999). Des éléments *cis* régulateurs, connus pour répondre aux glucides, sont retrouvés dans la région promotrice de certains *SUT* (Delrot et al., 2000). Certains éléments comme les SURE (sucrose responsive element) sont impliqués dans l'induction de l'expression par les glucides (Tsukaya et al., 1991; Grierson et al., 1994), d'autres en revanche, comme les boîtes AMY (TATCCAT) retrouvées dans la séquence promotrice des gènes d'alpha-amylase, contribuent à la répression par les glucides (Lu et al., 1998). Ces motifs AMY sont aussi impliqués dans l'induction de l'expression par les glucides dans l'induction de l'expression par les glucides dans l'induction de l'expression par les glucides dans l'induction de l'expression par les pontribuent à la répression par les glucides (Lu et al., 1998). Ces motifs AMY sont aussi impliqués dans l'induction de l'expression par les glucides dans l'induction de l'express

Concernant le rôle des hormones dans la régulation transcriptionnelle des SUT, les données sont rares et parfois contradictoires, soulignant une fois de plus la complexité des mécanismes qui gouvernent la régulation des SUT. Ainsi, des éléments *cis* régulateurs pour l'acide abscissique (ABA) ou l'éthylène ont été identifiés dans les promoteurs de certains gènes *SUT* (Delrot et al., 2000). A ce titre, l'ABA stimule l'expression des *SUT* chez la betterave sucrière, tandis que l'auxine la réprime (Saftner et Wyse, 1984). Un résultat rigoureusement opposé a été observé chez le ricin (Lenton, 1984). Chez la pomme de terre, le gène *StSUT1* est surexprimé par l'auxine et les cytokinines (Harms et al., 1994), tandis que *StSUT4* serait induit par les gibbérellines et l'éthéphon (forme de l'éthylène en solution aqueuse) (Chincinska et al., 2008).

Régulation post-transcriptionnelle

Concernant les SUT, il a été rapporté que 7 des 9 gènes *SUT* d'arabette sont la cible d'une régulation par des micro ARN interférents (Lu et al., 2005). De même, un contrôle post-transcriptionnel semble s'opérer sur *AtSUC1* dont le messager est exprimé dans le grain de pollen mais dont la protéine n'est détectable qu'une fois la germination du grain établie (Stadler et al., 1999).

Régulation post-traductionnelle

De nombreux facteurs semblent affecter l'activité des transporteurs SUT. C'est le cas notamment de la phosphorylation qui semble avoir un effet négatif sur les SUT puisque

l'usage d'un inhibiteur de phosphatase (acide okadaïque) réduit l'activité des transporteurs (Roblin et al., 1998). D'autres éléments jouent un rôle sur l'activité des SUT, comme l'environnement lipidique ou le pH (Delrot, 1981; Delrot et al., 2000). L'activité des SUT étant intimement liée à celle des pompes à protons, le gradient de protons et donc le pH extracellulaire régule l'activité des SUT. Certains SUT sont donc dit "acides" (activité dépendante du pH) comme AtSUC2 et PmSUC2, d'autres au contraire sont dit "neutres" (insensibles au pH) comme AtSUC1 et PmSUC1 (Sauer et Stolz, 1994; Gahrtz et al., 1996). Le pH a également un effet sur le K_m apparent des transporteurs SUT (Delrot, 1981).

Des études en levure ont démontré la faculté des trois types de SUT à former des homo ou hétéro-oligomères. Ces études ont été menées pour les SUT de Solanacées et d'arabette (Reinders et al., 2002; Schulze et al., 2003). Si l'hétéro-oligomérisation des différents types de SUT parait envisageable *in vivo* chez les Solanacées car les SUT sont tous retrouvés dans les TC, en revanche cela semble plus improbable chez l'arabette puisque AtSUC2, 3 et AtSUT4 ont de localisations cellulaires et/ou tissulaires différentes. Des études ont confirmé *in vivo* la dimérisation de transporteurs SUT chez les solanacées (Krugel et al., 2008), ainsi que chez l'épinard (Liesche et al., 2008). La régulation par oligomérisation de différents types de SUT est alors une éventualité. Ainsi comme certains auteurs le suggèrent, le transporteur "senseur" (SUT2) des Solanacées pourrait réguler l'activité des transporteurs SUT1 et/ou SUT4 (Weise et al., 2000). Une étude a montré en effet qu'une inhibition de l'expression de StSUT4 engendrait le même phénotype que la surexpression de StSUT1, les auteurs proposent alors que StSUT4 pourrait inhiber l'activité de StSUT1 par interaction protéique (Chincinska et al., 2008). D'autres protéines pourraient également interagir avec les SUT et en réguler l'activité, comme les SBP (Harrington et al., 1997), ou le cytochrome b5 qui confère aux SUT une meilleur affinité pour leur substrat (Fan et al., 2009).

Enfin, notons que les SUT ont une demie vie de quelques heures (Kuhn et al., 1997), après quoi ils sont dégradés par protéolyse vacuolaire (Hicke et Riezman, 1996; Hicke et al., 1998).

• Les SUT, des acteurs parmi d'autres

Le transport de saccharose joue un rôle essentiel dans le déterminisme des relations source / puits au sein des plantes, ce qui place les transporteurs SUT parmi les acteurs majeurs de la force de puits. Une fois le saccharose acheminé jusqu'aux puits, d'autres acteurs prennent

le relai comme les enzymes impliquées dans son utilisation. Cela s'illustre déjà au niveau de la décharge apoplastique du phloème au niveau des tissus puits, où le saccharose peut être hydrolysé dès son entrée dans l'apoplasme par une invertase pariétale. La voie des SUT se retrouve alors contournée au profit de celle des transporteurs d'hexoses.



Figure 18 : Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse du saccharose.

Les invertases catalysent l'hydrolyse irréversible du saccharose en glucose + fructose. Les saccharose synthétases catalysent l'hydrolyse réversible du saccharose en UDP-glucose + fructose. UDP: uridine diphosphate.

4.2 Les enzymes catalysant l'hydrolyse du saccharose

Chez les plantes supérieurs, l'hydrolyse du saccharose est un processus essentiel pour réguler l'allocation du carbone, la force de puits mais aussi pour initier la signalisation glucidique et les réponses qui en découlent (Koch, 2004). Seules deux familles d'enzymes sont capables d'hydrolyser le saccharose, les invertases et les saccharose synthétases (SuSy). Les invertases sont des β -fructofuranosidases (EC 3.2.1.26) et clivent irréversiblement le saccharose en deux monosaccharides, le glucose et le fructose. Les SuSy sont des glycosyltransférases (EC 2.4.1.13) et clivent de façon réversible le saccharose en UDP-glucose et fructose (Fig. 18). Les plantes possèdent trois types d'invertases qui se distinguent par leur localisation subcellulaire, leur pH optimal de fonctionnement et leur état de glycosylation. Ainsi, les invertases neutres du cytosol (SNI), fonctionnant à pH neutre et/ou alcalin, sont non glycosylées; en revanche, les invertases acides (AI), fonctionnant à pH acide, sont glycosylées et sont soit solubles (SAI = vacuolaire), soit liées ioniquement à la paroi (CWI = pariétale) (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998a; Roitsch et Gonzalez, 2004). Les SuSy sont des protéines cytosoliques non glycosylées. Elles sont capables de synthétiser du saccharose mais fonctionnent préférentiellement (in vivo) dans le sens du clivage du diholoside (Nguyen-Quoc et Foyer, 2001).

Les invertases et les SuSy participent activement au développement de la plante. Leur implication relative fluctue au cours du temps et en fonction de la nature de la décharge phloémienne du saccharose (**Fig. 19**) (Koch, 2004). Ces enzymes ont un impact majeur sur la force de puits des organes en développement et participent non seulement au métabolisme carboné mais également à la signalisation glucidique. Notons que, de part leur fonctionnement respectif, les invertases produisent deux fois plus d'hexoses susceptibles d'engendrer un signal glucidique que les SuSy (Koch, 1996; Wobus et Weber, 1999; Koch et al., 2000). Le *ratio* invertase/SuSy, aura donc une implication très importante au cours du développement de la plante car il impact directement sur la signalisation liée aux glucides (Zeng et al., 1999).

4.2.1 Les Invertases

• Localisations, fonctions et rôles des invertases

Les invertases jouent leurs rôles essentiellement au niveau des organes puits. En effet, elles sont en première ligne pour catalyser l'hydrolyse du saccharose et donc favoriser la



Figure 19 : Localisation au sein d'une cellule puits des enzymes impliquées dans l'hydrolyse du saccharose (Modifiée d'après Koch, 2004).

Le saccharose produit au cours de la photosynthèse est véhiculé dans le phloème et acheminé jusqu'aux tissus puits. La décharge du saccharose peut se faire par la voie du symplasme *via* des plasmodesmes, ou par l'apoplasme aux moyens de transporteurs de saccharose d'efflux. Le saccharose peut donc soit être hydrolysé dans le cytosol par des invertases neutres (SNI = soluble neutral invertase) ou par des saccharose synthétases (SuSy = sucrose synthase), soit être clivé dans la paroi par des invertases pariétales (CWI = cell wall invertase). Les hexoses issus de cette réaction sont ensuite transportés par des transporteurs de monosaccharides dans le cytoplasme de la cellule puits. Le saccharose peut également quitter l'apoplasme sans être clivé et rejoindre le cytoplasme *via* des transporteurs SUT. Des transporteurs SUT permettent également l'acheminement du saccharose jusque dans la vacuole, où il pourra être hydrolysé par des invertases vacuolaires (SAI = soluble acid invertase). Ce schéma ne tient pas compte de données récentes qui montrent que les SuSy et les SNI peuvent avoir d'autres localisations subcellulaires. Les SuSy peuvent être, entre autre, localisées au niveau des complexes TC-CC ainsi que dans les mitochondries. Les SNI, quand à elles, peuvent également être mitochondriales ou chloroplastiques. G: glucose; F: fructose; UDPG: uridine diphosphate glucose.

force de puits des organes qui en sont importateurs (Roitsch et al., 1995; Godt et Roitsch, 1997; Roitsch, 1999) (**Fig. 19**). Le fait d'hydrolyser le saccharose permet de conserver un gradient de concentration décroissant entre la source et le puits, et ainsi maintenir l'attractivité du puits pour le diholoside (Eschrich, 1980).

Les invertases acides vacuolaires (SAI) et pariétales (CWI)

Les invertases acides ont des implications vitales pour la production d'énergie (métabolisme respiratoire), la croissance et le développement des plantes (Karuppiah et al., 1989; Sturm, 1999; Roitsch et Gonzalez, 2004). Les invertases acides, principalement les SAI, sont effectivement impliquées dans la croissance et l'expansion cellulaire (Andersen et al., 2002).

Les SAI sont impliquées dans le contrôle, la régulation et la remobilisation du pool glucidique vacuolaire. Les conséquences en termes d'osmorégulation et de turgescence expliquent en partie leur rôle dans l'expansion cellulaire (Morris et Arthur, 1984b; Wyse et al., 1986; Klann et al., 1996; Tang et al., 1996; Sturm et Tang, 1999). Néanmoins, l'impact des activités invertases sur la signalisation glucidique peut éventuellement aussi conduire à la croissance cellulaire (Smeekens, 2000). D'une façon générale, les SAI ont un rôle prépondérant au niveau des tissus puits en contribuant, entre autre, à la régulation de la balance glucidique au sein des fruits de tomate et des tubercules de pomme de terre, indispensable à leur bon développement (Ohyama et al., 1995; Zrenner et al., 1996).

Les CWI ont aussi un rôle déterminant dans la force de puits puisqu'elles sont susceptibles d'agir dès lors que la décharge phloémienne du saccharose se fait par l'apoplasme. Ainsi, le développement de certains organes puits comme les fruits de tomate (Klann et al., 1993), les grains de maïs (Miller et Chourey, 1992), ou le pollen de tabac (Goetz et al., 2001) nécessitent une décharge phloémienne apoplastique faisant intervenir les CWI. Pour que l'action des CWI aboutisse à une décharge effective dans les cellules puits, cela implique également l'intervention de transporteurs de monosaccharides. Or il a été observé à plusieurs reprises que l'expression et l'activité des CWI étaient coordonnées à celles de transporteurs d'hexoses (Weber et al., 1997; Weschke et al., 2003). Les CWI ont également des fonctions très importantes liées à la signalisation glucidique qui découle de leur action. En effet, elles permettraient de retarder la sénescence (Roitsch et Gonzalez, 2004; Jin et al., 2009) et également d'activer l'activité mitotique en coopération avec les cytokinines

(Vilhar et al., 2002), certaines cyclines étant induites par le glucose (Soni et al., 1995; Riou-Khamlichi et al., 2000).

Les SAI peuvent également être impliquées au cours de réponses liées à des stress de nature biotique ou abiotique. Le besoin accru en ressources carbonées au cours d'une attaque de pathogène (besoin énergétique) (Sturm et Chrispeels, 1990), ou suite à une blessure (besoin structuraux) (Matsushita et Uritani, 1974) explique en quoi les invertases ont un rôle à jouer au cours de ces différents stress. Les SAI jouent aussi un rôle clé au cours de phénomènes gravitropiques au niveau de la partie basale des tiges d'avoine (Wu et al., 1993b). L'expression du gène *Ivr2*, codant pour une invertase vacuolaire, et l'activité SAI sont également stimulées au niveau des feuilles de tomate en réponse à un stress hydrique (Pelleschi et al., 1999). D'autres travaux ont démontré que l'ABA induisait l'expression du gène *Ivr2* et l'accroissement de l'activité SAI au niveau des mêmes organes, permettant ainsi de clarifier le lien entre l'activité invertase vacuolaire et le stress hydrique chez la tomate (Trouverie et al., 2003).

Les invertases neutres cytosoliques (SNI)

Pendant longtemps les SNI n'ont pas été considérées comme des acteurs physiologiques de grande importance, apparemment restreintes aux tissus matures (Ricardo et Ap Rees, 1970). Une fonction dans la formation d'amidon dans les tissus dépourvus d'activité SuSy leur était attribuée (Ricardo et Ap Rees, 1970; Hsiao et al., 2002). De part leur faible activité, les SNI étaient soupçonnées d'avoir un rôle constitutif et basal dans la dégradation cytosolique du saccharose (Albertson et al., 2001). Depuis quelques années, un regain d'intérêt s'est porté sur les SNI. En effet, les SNI semblent être indispensables au bon développement de certaines plantes comme le lotus japonais (Welham et al., 2009). Il en va de même pour l'arabette où les SNI semblent jouer un rôle bien plus important que les SuSy (Barratt et al., 2009). En effet, contrairement au mutant SuSy d'Arabidopsis thaliana, les mutants SNI présentent des phénotypes marqués avec notamment une réduction importante de la croissance racinaire ainsi qu'une tendance pour certains types cellulaires (cellules de la zone d'élongation racinaire) à se collapser (Barratt et al., 2009). Enfin, des travaux ont démontré l'existence d'isoformes de SNI fonctionnelles au sein des mitochondries, des chloroplastes et du noyau remettant ainsi en perspectives un bon nombre de conception sur le trafique intracellulaire du saccharose (Murayama et Handa, 2007; Szarka et al., 2008; Vargas et al., 2008). Le rôle des SNI au sein du chloroplaste pourrait être lié à l'accumulation d'amidon au cours de la photosynthèse (Vargas et al., 2008).

• Structure et caractéristiques biochimiques des invertases

Les invertases (EC 3.2.1.26) ont toutes en commun le fait de cliver le saccharose au niveau de la liaison glycosidique α 1- β 2. Néanmoins, les invertases appartiennent à deux familles de glycoside hydrolases (GH), les invertases acides d'un côté (GH32) et les invertases neutres de l'autre (GH100) (Lammens et al., 2009). De nombreuses invertases ont pu être identifiées (> 200) et ce chez beaucoup d'espèces différentes (~50) (Roitsch et Gonzalez, 2004).

Les invertases acides SAI et CWI

Il existe au moins deux isoformes de SAI chez les plantes (Karuppiah et al., 1989; Hashizume et al., 2003) et plusieurs isoformes de CWI ont également été détectées (Sturm, 1999). Les SAI sont solubles et vacuolaires tandis que les CWI sont insolubles car ioniquement liées à la paroi. Néanmoins, certains travaux suggèrent l'existence d'une forme soluble d'invertase acide au niveau de la paroi (Hirose et al., 2002). Les invertases acides ont des propriétés enzymatiques similaires : elles clivent le saccharose en agissant sur le résidu fructose (β-fructofuranosidases) et sont de ce fait capables de cliver d'autres molécules, comme le raffinose ou le stachyose. Néanmoins, leur substrat de prédilection reste le saccharose avec lequel elles ont une forte affinité (K_m inférieur au millimolaire) (Quiroga et al., 1995; Tang et al., 1996; Sturm, 1999). Elles se présentent le plus souvent sous forme monomérique, possèdent des N-glycosylations et ont une masse moléculaire comprise entre 55 et 70 kDa (Venuat et al., 1993; Isla et al., 1999; Sturm, 1999). Les SAI et CWI possèdent des motifs peptidiques conservés qui les caractérisent, le motif β-fructosidase NDPNG (côté N-terminal) et le motif WECXDF (côté C-terminal) dont le résidu cystéine joue un rôle clé dans la catalyse de l'hydrolyse du saccharose (Sturm et Chrispeels, 1990; Sturm, 1999). L'activité des invertases acides étant inhibée par des métaux lourds, comme l'ion Hg²⁺ et Ag⁺, cela suggère la présence de groupes sulfhydriles au sein du site catalytique (Sturm, 1999).

Malgré les nombreuses homologies qu'il existe entre les SAI et les CWI, certaines particularités permettent toutefois de les distinguer. Le point isoélectrique (pI) des SAI est acide tandis que celui des CWI est basique. Le résidu X du motif WECXDF est très souvent une valine pour les SAI alors qu'il s'agit systématiquement d'une proline pour les CWI. Cette particularité permet aux CWI d'avoir un pH de fonctionnement optimum plus bas (pH 3,5-5,0) que celui des SAI (pH 5,0-5,5) (Goetz et Roitsch, 1999). Les protéines SAI sont plus grandes que les CWI, avec une petite extension C-terminale (Unger et al., 1994) riche en AA



Figure 20 : Structure tridimensionnelle de la CWI d'arabette (AtcwINV1), complexée à son substrat : le saccharose.

AtcwINV1 apparaît en cyan et le saccharose en orange. AtcwINV1 appartient à la famille des glycoside hydrolases 32 (GH32), elle possède donc trois résidus conservés : D23, D149 (acide aspartique) et E203 (acide glutamique). Ces trois résidus se trouvent à proximité du saccharose attestant de leur rôle clé dans la réaction enzymatique. Le résidu D23 appartient au motif NDPNG (acides aminés en rose) et le résidu E203 au motif WECXDF (acides aminés en vert), ces deux motifs conservés caractérisent les invertases acides (Sturm, 1999). Structure téléchargée à partir de la Protein Data Bank (http : //www.rcsb.org/pdb ; numéro d'accession (ID, PDB) : 2QQV (Verhaest et al ., 2006). L'image a été réalisée à partir du logiciel Swiss-PdbViewer 3.7 (SP5).

hydrophobes (Bednarek et Raikhel, 1992). Elles ont également une extrémité N-terminale plus longue qui présente peu d'homologie avec celle des CWI (Sturm et Tang, 1999).

Le fait d'appartenir à la famille des GH32 confère aux invertases acides certaines caractéristiques structurales. Elles possèdent notamment des résidus conservés (D23, D149 et E203) qui participent à la formation de la poche de fixation du saccharose (Lammens et al., 2008). Ces résidus sont bien retrouvés à proximité du substrat chez l'invertase d'arabette (AtcwINV1) dont la structure cristallographique a été résolue récemment (Verhaest et al., 2006) (**Fig. 20**).

Les invertases neutres SNI

Généralement les différentes espèces possèdent au moins deux isoformes de SNI (Sturm, 1999). Les SNI sont cytosoliques, mitochondriales, chloroplastiques ou nucléaires et ne présentent pas de glycosylation (Ricardo et Ap Rees, 1970; Vargas et al., 2009). Les SNI sont spécifiques de leur substrat, contrairement aux AI et ainsi ne catalysent pas l'hydrolyse de molécules autres que le saccharose. En fonction des espèces, le K_m des SNI est très variable (entre 2 et 70 mM) (Morell et Copeland, 1984; Asthir et Singh, 1997). Elles ont un pI neutre et un pH optimal de fonctionnement compris entre 6,8 et 8 (Roitsch et Gonzalez, 2004). La forme monomérique des SNI a une masse moléculaire d'environ 60 kDa, mais les invertases neutres ont souvent un poids moléculaire bien supérieur car elle peuvent s'agencer en tétramères ou en octamères (Lee et Sturm, 1996; Ross et al., 1996). Les séquences peptidiques des SNI sont très similaires entre elles, et particulièrement au niveau de l'extrémité C-terminale qui est très conservée. Les SNI présentent en revanche peu d'homologies avec les invertases acides (Roitsch et Gonzalez, 2004).

Les SNI appartiennent à la famille des GH100. De ce fait, leurs propriétés catalytiques diffèrent de celles des GH32 et restent d'ailleurs à être élucidées (Lammens et al., 2009). Le fait que l'activité SNI ne soit pas inhibée par les métaux lourds atteste des différences qu'il peut exister entre leur site catalytique et celui des AI (Roitsch et Gonzalez, 2004).

• Les petites familles multigéniques d'invertases

Les invertases acides SAI et CWI

Les invertases constituent de petites familles multigéniques avec seulement 5 gènes chez la carotte (2 *Sai* et 3 *Cwi*) et 8 gènes chez l'arabette (2 *Sai* et 6 *Cwi*) (Lorenz et al., 1995; Sturm, 1999; Roitsch et Gonzalez, 2004). Les gènes codant pour des invertases acides ont la particularité d'avoir une organisation génomique (intron-exon) conservée entre les monocotylédones et les dicotylédones (Roitsch et Gonzalez, 2004). Ils sont constitués de 6 à 8 exons et possèdent quasiment tous un second exon de 9 nucléotides très important puisqu'il code pour le tripeptide <u>DPN</u> du motif β -fructosidase (Lorenz et al., 1995; Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998a; Simpson et al., 2000). L'arrangement en tandem de deux gènes *Cwi* observé chez la pomme de terre est également retrouvé chez d'autres espèces (Fridman et Zamir, 2003; Proels et al., 2003).

Les invertases neutres SNI

Les gènes codant pour les SNI forment aussi une petite famille. Il existe 7 gènes chez le lotus (Welham et al., 2009), 9 chez l'arabette, 8 chez le riz, 16 chez le peuplier (Bocock et al., 2008) et 9 chez la vigne (Nonis et al., 2008). Deux clades se distinguent parmi les gènes d'invertases neutres, ceux du clade α possèdent 6 exons et codent pour des SNI retrouvées au niveau des organelles (mitochondrie, chloroplaste), tandis que ceux du clade β possèdent 4 exons et codent pour des SNI du cytosol (Ji et al., 2005; Vargas et al., 2009). Les gènes *Sni*, comme beaucoup d'autres au sein de la plante, trouveraient leur origine dans un phénomène d'endosymbiose d'une cyanobactérie (Vargas et al., 2003). Le modèle couramment admis est que la majorité des gènes provenant des cyanobactéries a été intégralement transférée dans le génome nucléaire, et qu'ensuite les protéines codées par ces gènes sont adressées aux organelles (Rujan et Martin, 2001).

• Régulation des invertases

Contrairement aux invertases acides, très peu de choses sont connues concernant la régulation des SNI. Le faible taux d'expression des gènes *Sni* laissait penser qu'elles étaient exprimées à un niveau basal et qu'elles n'avaient pas un rôle primordial à jouer (Gallagher et al., 2004). Avec les découvertes récentes sur les multiples localisations subcellulaires des SNI, ainsi que le rôle majeur que semble jouer une SNI du clade β chez l'arabette

(Barratt et al., 2009), il serait intéressant de chercher à mieux comprendre comment se fait leur régulation. Les quelques données disponibles indiquent qu'à l'inverse des invertases acides, les SNI sont insensibles aux métaux lourds. En revanche, elles sont inhibées par les produits de la réaction qu'elles catalysent au même titre que les AI. Ainsi les invertases, toutes confondues, sont inhibées de façon compétitive par le fructose et non-compétitive par le glucose (Quiroga et al., 1995; Isla et al., 1999).

Régulation transcriptionnelle des invertases acides

Les AI sont très sensibles aux mécanismes de régulation transcriptionnelle, et ce à la fois par des stimuli internes ou externes (Roitsch et Gonzalez, 2004). La transcription des gènes *Ai* est sensible aux glucides et notamment au saccharose (Xu et al., 1996). Tous les gènes *Ai* ne répondent pas de la même manière à la signalisation glucidique. Chez *Chenopodium rubrum*, le saccharose induit l'expression des *Cwi* mais pas celle des *Sai* (Roitsch et al., 1995). En revanche, le saccharose n'induit l'expression d'aucun gène *Ai* chez la carotte (Sturm, 1999). Enfin, les hexoses d'une manière générale favorisent la transcription des gènes *Ai* (Morris et Arthur, 1984a; Roitsch et Gonzalez, 2004).

La transcription des gènes *Ai* répond à un éventail très large de phytohormones (Roitsch et Gonzalez, 2004). Les hormones stimulent bien souvent la croissance ou des processus physiologiques qui nécessitent un apport accru en carbone organique, d'où l'implication des invertases en réponse aux hormones. Ainsi, l'auxine (Morris et Arthur, 1984a), les gibbérellines (Wu et al., 1993a), les cytokinines (Ehness et Roitsch, 1997), l'ABA (Trouverie et al., 2004) et les brassinostéroïdes (Goetz et al., 2000) stimulent l'expression de certains gènes *Ai*. Des travaux montrent que chez *Chenopodium rubrum*, les cytokinines stimulent à la fois l'expression des *Cwi* et celle de transporteurs d'hexoses (Roitsch et Ehness, 2000). De même, le retardement de la sénescence par les cytokinines semble se produire par l'intermédiaire d'une CWI. En effet, la surexpression d'un gène *Cwi* retarde la sénescence sans nécessiter l'apport de cytokinines. De plus, l'apport de cytokinine ne retarde pas la sénescence en présence d'inhibiteur d'invertase acide (Balibrea Lara et al., 2004).

Certains stress biotiques ou abiotiques ont une influence sur la transcription des gènes *Ai*. Une stimulation d'expression est observée lors d'attaques de pathogènes (Benhamou et al., 1991), de blessures mécaniques (Sturm et Chrispeels, 1990) ou de stress hydrique (Pelleschi et al., 1999; Trouverie et al., 2003). En revanche, d'autres résultats ont montré que le stress hydrique réprime la transcription d'un gène *Sai* chez le blé et provoque ainsi la



Figure 21 : Modèle de dégradation vacuolaire des SAI (Koch, 2004).

Ce schéma illustre le transfert et le turnover des SAI, potentiellement modulés par des vésicules de précurseurs à protéase (PPV) et les enzymes impliquées dans la dégradation des protéines (VPE γ). Au sein des PPV, les SAI sont protégées de la protéolyse car les VPE γ sont inactives. Une fois dans la vacuole, les VPE γ sont activées et dégradent leurs cibles dont font partie les SAI. SAI: soluble acid invertase; PPV: precursor protease vesicle; VPE γ : vacuolar processing enzyme.

stérilité mâle (Dorion et al., 1996). L'hypoxie induit également une répression rapide de l'expression d'un gène *Sai* (Zeng et al., 1999).

Régulation post-transcriptionnelle des invertases acides

Certains processus de régulation ont été observés concernant les gènes invertases. Le maïs exprime un gène *Cwi* sous deux versions différentes : un long messager et un plus court, la différence de taille provenant de la longueur variable de la région 3'UTR (Cheng et al., 1999). C'est uniquement lorsque le messager court est exprimé que l'activité CWI est mesurable. Un autre mécanisme tout à fait singulier a été observé chez la pomme de terre en condition de stress par le froid. Un épissage alternatif se met en place et supprime le petit exon n°2 des gènes *Ai* (Bournay et al., 1996), cet exon codant pour le tripeptide <u>DPN</u> indispensable à la fonction de la protéine.

Régulation post-traductionnelle des invertases acides

Les invertases subissent un rétrocontrôle négatif par leurs produits de catalyse (hexoses) (Zhang et Wang, 2002). Leur état de glycosylation est aussi un facteur déterminant de leur régulation puisqu'il a été montré qu'en inhibant la glycosylation d'une CWI, celle-ci était alors dégradée (Pagny et al., 2003). Il existe aussi des inhibiteurs protéiques, dépendant du pH, spécifiques des invertases acides. Ils ont été initialement purifiés chez le tabac (Weil et al., 1994). Leur colocalisation *in situ* avec les AI suggère un rôle physiologique dans la régulation de leur activité enzymatique (Greiner et al., 1998; Rausch et Greiner, 2004). Une complexation entre l'inhibiteur et l'invertase pourrait être ainsi à l'origine de l'inhibition. Des travaux ont montré que le saccharose pouvait protéger les CWI et non les SAI de ce type d'inhibiteurs (Sander et al., 1996). Enfin, un autre mécanisme de régulation n'affectant que les SAI implique l'enzyme VPE γ (vacuolar processing enzyme) qui est acheminée dans la vacuole pour participer au turnover des SAI en les dégradant spécifiquement (Rojo et al., 2003) (**Fig. 21**).

L'étendue des moyens de régulation existant vis-à-vis des invertases (en particulier pour les AI) montre bien l'importance que ces acteurs ont au cours du développement de la plante.



Figure 22 : Localisations et fonctions des SuSy dans la cellule (Modifiée d'après Koch, 2004).

Ce schéma illustre les différentes localisations subcellulaires des SuSy et suggère ainsi les multiples rôles joués par ces enzymes. Les SuSy auraient un rôle dans la respiration cellulaire au niveau du cytoplasme et un rôle inconnu dans les mitochondries. Les SuSy associées aux membranes et au cytosquelette auraient des rôles divers : biosynthèse de composés pariétaux (membrane plasmique et golgi), synthèse d'amidon (amyloplastes), orientation/guidage des métabolites (actine) et mobilisation de saccharose (vacuole).

4.2.2 <u>Les Saccharose synthétases (SuSy = sucrose synthase)</u>

• Localisations, fonctions et rôle des SuSy

Les SuSy convertissent réversiblement in vitro et in vivo le saccharose en fructose et UDP-glucose en présence d'UDP (Geigenberger et Stitt, 1993) (Fig. 18 page 66). Son principal rôle in vivo reste néanmoins l'hydrolyse du saccharose (Chourey et Nelson, 1979; Cobb et Hannah, 1988). Au même titre que les invertases, une implication dans la dégradation du saccharose présage que les SuSy ont un rôle très important à jouer chez les plantes. Cela ce confirme aux vues des nombreuses voies de régulation des SuSy (Winter et Huber, 2000), et de la multitude de localisations subcellulaires qu'elles peuvent avoir, laissant penser qu'elles accomplissent de nombreuses fonctions (Fig. 22) (Koch, 2004). Les SuSy se caractérisent par une dualité dans leur capacité à adresser le carbone pour la synthèse de polysaccharides et dans celle à permettre une conservation énergétique. En effet, les SuSy produisent de l'UDPglucose utile pour la respiration cellulaire car il ne nécessite pas de consommation d'ATP pour permettre la glycolyse, contrairement aux produits de dégradation des invertases (Koch, 2004). La production d'UDP-glucose suggère aussi que les SuSy ont moins d'impact en termes de signalisation glucidique. Cette particularité est en adéquation avec un rôle de conservation énergétique qui est utile sous certaines conditions de stress comme une anoxie consécutive à une immersion (Koch et al., 2000; Subbaiah et Sachs, 2003). Comme le suggère la principale fonction des SuSy, leur rôle dans les organes importateurs de saccharose et donc dans la force de puits a déjà été démontrée (Sun et al., 1992; Wang et al., 1993; Zrenner et al., 1995).

Compte tenu de leurs différentes localisations subcellulaires, les SuSy semblent impliquées dans certains processus clés de la cellule incluant, entre autres, le stockage (mise en réserve) ou la croissance cellulaire (synthèses de polymères). En effet des études mettent en évidence l'implication des SuSy dans l'accumulation d'amidon (Dejardin et al., 1997; Asano et al., 2002) et l'aspect collapsé ainsi que la teneur amoindrie en amidon de grains de maïs déficients en activité SuSy (Chourey et Taliercio, 1994). D'autres études chez le maïs (Cheng et al., 1996), le coton (Ruan et al., 2003) ou la carotte (Sturm et Tang, 1999), ont également montré que les SuSy jouent un rôle dans la synthèse de cellulose. Un rôle clé des SuSy au cours de l'acquisition de la paroi secondaire des éléments de xylème en différentiation a de nombreuses fois été suggérée (Salnikov et al., 2001; Uggla et al., 2001; Gardiner et al., 2003; Coleman et al., 2009). Un modèle propose que les SuSy sont directement associées aux rosettes des cellulose synthétases pour expliquer leur rôle dans la





Ce modèle, proposé par Delmer et Amor en 1995, suggère l'existence d'une relation étroite entre les SuSy et les rosettes de cellulose synthétases. Une telle association protéique permettrait un transfert direct d'UDPglucose de la SuSy à la cellulose synthétase pour la formation de cellulose, ainsi qu'un recyclage rapide de l'UDP. UDP: uridine diphosphate. synthèse de cellulose (Delmer et Amor, 1995) (**Fig. 23**). En s'associant aux callose synthétases, les SuSy pourraient également être impliquées dans la synthèse de callose (Amor et al., 1995; Subbaiah et Sachs, 2001; Salnikov et al., 2003).

Les SuSy ont un rôle particulièrement important en condition d'anoxie. En effet, il a été rapporté que les SuSy permettent une forte synthèse de callose ou de cellulose malgré de faible teneurs en O₂ (Subbaiah et Sachs, 2001; Albrecht et Mustroph, 2003). Cette particularité explique que les SuSy jouent un rôle de premier ordre dans des organes ou tissus puits naturellement pauvres en oxygène, c'est le cas notamment des tubercules de pomme de terre (Bologa et al., 2003), des graines en développement (Rolletschek et al., 2002) et du phloème (van Dongen et al., 2003). Les rôles supposés des SuSy au sein du phloème sont divers, l'un d'eux consisterait à fournir l'énergie nécessaire au chargement du phloème en saccharose. En effet, des études sur le tabac ont montré la dépendance du chargement phloémien vis-à-vis du pyrophosphate inorganique (PPi). Or le PPi est nécessaire pour former le glucose-1-phosphate entrant dans la glycolyse, à partir de l'UDP-glucose produit par les SuSy (Lerchl et al., 1995). D'autres travaux ont montré que les SuSy pouvaient être associées à la membrane plasmique des TC (Wachter et al., 2003) et joueraient un rôle dans la synthèse de bouchons de callose en réponse aux blessures et/ou aux attaques de pathogènes (Koch, 2004).

D'autres particularités caractérisent les SuSy en termes de localisation tissulaire ou subcellulaire. En revanche, certaines fonctionnalités restent à déterminer. Les SuSy ont ainsi été retrouvées de façon caractéristique au niveau du méristème apical et des *primordia* foliaires chez la tomate (Pien et al., 2001). Les SuSy sont également impliquées au cours d'interactions mycorhiziennes à arbuscules (Blee et Anderson, 2002) et retrouvées au niveau des nodules fixateurs d'azote dans le cadre de symbioses chez les légumineuses (Gordon et al., 1999). Les SuSy sont associées aux membranes de divers organites cellulaires et possèderaient, de ce fait, des rôles caractéristiques pour chacun d'eux (**Fig. 22** page 82). Les SuSy associées à l'appareil de golgi permettraient la synthèse de xyloglucanes (Buckeridge et al., 1999), celles associées aux amyloplastes joueraient un rôle dans l'accumulation d'amidon (Koch, 2004) et celles fixées au tonoplaste permettraient notamment une remobilisation du saccharose vacuolaire (Etxeberria et Gonzalez, 2003). Des incertitudes demeurent concernant le rôle précis des SuSy associées à l'actine (Winter et al., 1998) et de celles retrouvées dans les mitochondries étant donné qu'elles sont dépourvues de saccharose (Subbaiah et al., 2006).





L'arbre révèle l'existence de trois groupes principaux discutés dans le texte. At : *Arabidopsis thaliana*; Bo : *Bambusa oldhamii*; Bv : Beta vulgaris; Cl : *Citrullus lanatus*; Cp : *Craterostigma plantagineum*; Cr : *Chenopodium rubrum*; Cu : *Citrus unshiu*; Dc : *Daucus carota*; Gh : *Gossypium hirsutum*; Gm : *Glycine max*; Hv : *Hordeum vulgare*; Le : *Lycopersicum esculentum*; Ms : *Medicago sativa*; Mt : *Medicago truncatula*; My : *Mokara* 'Yellow'; Og : *Oncidium goldiana*; Os : *Oryza sativa*; Pd : *Potamogeton distinctus*; Pt : *Populus tremuloides*; Pv : *Phaseolus vulgaris*; Ps : *Pisum sativum*; So : *Saccharum officinarum*; St : *Solanum tuberosum*; Ta : *Triticum aestivum*; Tg : *Tulipa gesneriana*; Vf : *Vicia faba*; Vr : *Vinia radiata*; Zm : *Zea mays*. Les alignements protéiques ont été effectués avec le programme Clustal W (Chenna et al., 2003). La barre indique la distance d'évolution. D'une façon assez générale, les Susy seraient majoritairement impliquées dans des rôles de stockage et de maturation au sein des organes puits (King et al., 1997; Fernie et al., 2002).

• La petite famille multigénique des SuSy

Des gènes codant pour des SuSy ont d'abord été isolés à partir de plantes stockant de l'amidon ou des hexoses (Sturm et Tang, 1999). Les gènes Sus codant pour ces SuSy appartiennent à une petite famille multigénique chez les monocotylédones et les dicotylédones (Komatsu et al., 2002). Six gènes ont été identifiés chez l'arabette contre trois chez le maïs (Baud et al., 2004; Duncan et al., 2006). Les gènes Sus sont codés par au moins deux gènes non-alléliques caractérisés par des régulations d'expression différentes (Winter et Huber, 2000). L'existence de ces deux classes de gènes Sus coïncide avec une organisation en deux groupes phylogénétiques principaux : SUS1 et SUSA. En réalité un troisième groupe existe (le nouveau groupe) mais comporte peu de représentants (Komatsu et al., 2002; Harada et al., 2005) (Fig. 24). Les gènes Sus des différents groupes phylogénétiques se différencient par leur organisation exon/intron (une douzaine d'exons environ) et aussi par leur taille puisque les gènes du nouveau groupe possèdent généralement des extensions C-terminales (Bieniawska et al., 2007). Le premier intron des gènes Sus est assez caractéristique puisqu'il est reconnu pour ses propriétés d'enhancer, c'est notamment le cas de "l'intron leader" du gène sh1 de maïs (Clancy et Hannah, 2002). Un grand nombre de gènes du groupe SUS1 sont surexprimés dans des conditions d'anoxie et leur protéine présente souvent un peptide de transit pour les mitochondries. Ces caractéristiques permettent notamment de distinguer les SuSy du groupe SUS1 de celles du groupe SUSA (Baud et al., 2004; Harada et al., 2005).

Les gènes *Sus* codent pour des monomères d'environ 90 kDa. Ceux-ci forment ensuite des tétramères d'environ 360 kDa (Winter et Huber, 2000). Chez le maïs, les tétramères de SuSy sont de nature homo-oligomérique ou hétéro-oligomérique (Duncan et al., 2006). Les SuSy ont une bonne affinité pour le saccharose avec un K_m d'environ 8 mM (Winter et Huber, 2000).

• Régulation des SuSy

Régulation transcriptionnelle des SuSy

Beaucoup de travaux ont été menés sur les gènes Sus de maïs et servent donc de références pour explorer les modes de régulation transcriptionnelle des SuSy. Deux

principaux facteurs jouent sur l'expression des gènes *Sus* : la teneur en glucides et celle en oxygène, en revanche jusqu'à présent aucun travail n'a démontré l'implication de phytohormones dans la régulation transcriptionnelle des *Sus* (Sakalo et Kurchii, 2004).

La teneur en glucides peut avoir différentes incidences sur l'expression des gènes *Sus*. En effet, chez le maïs, une forte teneur en glucose entraîne la surexpression du gène *sus l* et une diminution de celle du gène *sh1* (Koch et al., 1992). Par opposition, une faible teneur en glucose stimule l'expression du gène *sh1* (Koch, 1996). Des études chez la pomme de terre ont montré que le saccharose induit l'expression du gène *sus4* et n'a pas d'effet sur celle du gène *sus3* (Fu et al., 1995a, , 1995b). L'induction de l'expression du gènes *sus4* de pomme de terre par le saccharose nécessite l'intervention d'une protéine kinase de type SnRK (Purcell et al., 1998; Halford et al., 2003). Les SnRK (sucrose-nonfermenting related kinase) sont des orthologues des SNF1 de levure. Chez la levure, les SNF1 sont impliquées dans la dérépression des gènes dont l'expression est réprimée par le glucose (Winter et Huber, 2000). Comme pour les *SUT*, des éléments *cis*-régulateurs de type SURE dans la région promotrice de certains gènes *Sus* permet d'expliquer la stimulation de leur expression par le saccharose (Martin et al., 1993; Grierson et al., 1994).

L'anoxie est également responsable de la surexpression de certains gènes *Sus*. Par ailleurs, il s'avère souvent que les gènes induits par de faibles teneurs en glucides (comme *sh1*) le sont également par des taux bas en O_2 (Koch et al., 2000). L'induction par l'anoxie est une caractéristique des gènes *Sus*. Rappelons à l'inverse que les gènes invertases sont réprimés par de faibles concentrations en oxygène. Cette particularité confère des avantages aux plantes car les SuSy fournissent des substrats pour la glycolyse sans perte d'énergie (Ricard et al., 1991). Par ailleurs, le rôle primordial joué par les SuSy en contrainte anoxique a été démontré chez un double mutant SuSy de maïs dont la tolérance aux faibles teneurs en oxygène est affectée (Ricard et al., 1998). Par contre, le mécanisme de régulation transcriptionnelle associé aux teneurs en O_2 reste assez énigmatique. Il semblerait qu'il résulte plutôt d'une corrélation entre l'anoxie et la teneur glucidique (Winter et Huber, 2000).

Régulation traductionnelle des SuSy

Si l'anoxie entraîne la surexpression des gènes *Sus*, en revanche le niveau d'activité de l'enzyme reste assez variable et semble être régulée de manière plus complexe qu'une simple régulation transcriptionnelle (Zeng et al., 1998). Une voie de régulation traductionnelle a été ainsi démontrée en phase d'anoxie : les ARNm *Sus* sont chargés sur les grands



Figure 25 : Phosphorylation et modèle de régulation du turnover des SuSy (Koch, 2004).

Les SuSy sont activées par phosphorylation au niveau du résidu sérine 15 (ou équivalents). Cette phosphorylation peut se faire *via* des CDPK ou des SnRK. Les protéines ENOD protègent et empêchent une seconde phosphorylation au niveau du résidu sérine 170 (ou équivalents), assurant la stabilité de la protéine SuSy. En l'absence de protéine ENOD, la première phosphorylation en S15 favorise une seconde phosphorylation en S170 (uniquement *via* des CDPK) et prédispose les SuSy pour le processus de dégradation faisant intervenir le système protéolytique ubiquitine-protéasome-dépendant. ENOD: protéines ayant un rôle au cours du "early nodule development"; P: phosphate; S: sérine; +P: phosphorylation; SuSy: sucrose synthase; CDPK: calcium-dependant protein kinase; SnRK: SNF-related (sucrose-nonfermenting) protein kinase.

polysomes avec pour conséquence une traduction protéique accrue grâce à un plus grand nombre d'initiation et des élongations plus rapides (Fennoy et al., 1998).

Régulation post-traductionnelle des SuSy

L'un des mécanismes de régulation post-traductionnelle les plus importants concernant les SuSy est la phosphorylation. En effet l'état de phosphorylation des SuSy conditionne leur localisation subcellulaire, les active et/ou favorise leur turnover (Winter et Huber, 2000; Rohrig et al., 2002; Hardin et al., 2003) (Fig. 25). Les SuSy de maïs possèdent deux sites clés de phosphorylation: les résidus sérine S15 et S170, ou leurs équivalents (Huber et al., 1996; Hardin et al., 2003). Le premier résidu est crucial puisqu'il permet d'activer la protéine, un motif conservé correspondant à ce résidu est retrouvé dans toutes les séquences protéiques de SuSy : -L-[STA]-R-[LV]-H-S*-[VLQ]-R- (Winter et Huber, 2000). La phosphorylation joue aussi sur l'affinité des SuSy pour leur substrat. En effet, une SuSy recombinante déphosphorylée présente moins d'affinité pour le saccharose avec un Km 10 fois plus élevé. En revanche, le K_m pour l'UDP-glucose et le fructose reste inchangé (Nakai et al., 1998). L'état de phosphorylation des SuSy a aussi une incidence sur leur localisation subcellulaire. Les SuSy phosphorylées sont cytosoliques et les non-phosphorylées seraient associées aux membranes (Winter et al., 1997; Hardin et al., 2004). A l'état déphosphorylé, les SuSy présentent une hydrophobicité plus importante et la perte de la phosphorylation pourrait permettre une meilleure exposition d'un domaine transmembranaire, favorisant ainsi l'interaction des SuSy avec les membranes plasmiques (Winter et Huber, 2000).

A l'état phosphorylé, les SuSy possèdent aussi la faculté de se fixer à l'actine du cytosquelette (Winter et al., 1998). Les SuSy présentent un motif ayant une forte homologie avec le motif d'une aldolase de mammifère connu pour être impliquée dans la fixation à l'actine (O'Reilly et Clarke, 1993). Le mode de fixation à l'actine pourrait être du à l'existence d'un site de fixation au saccharose autre que le site catalytique. La fixation du saccharose entraînerait un changement conformationnel qui permettrait une meilleur exposition du motif de fixation à l'actine (Winter et Huber, 2000). Ce second site de fixation présentant peu d'affinité pour le saccharose avec un K_m de 80 mM, la fixation des SuSy à l'actine ne se ferait donc qu'en cas de forte concentration en saccharose. Cela sous-entend que cette régulation doit avoir une signification physiologique importante. Il se pourrait que les SuSy fixées à l'actine soient en meilleure interaction avec les amyloplastes et donc prédisposées dans ces conditions d'excès en saccharose à contribuer à la mise en réserve du carbone organique sous la forme d'amidon (Koch, 2004).



Figure 26 : L'orobanche, un puits surnuméraire pour son hôte.

Les flux xylémiens et surtout phloémiens sont détournés par l'orobanche qui constitue un organe puits plus puissant que les racines avoisinantes, perturbant ainsi les relations sources-puits au sein de la plante hôte.

5. L'OROBANCHE, UN PUITS SURNUMÉRAIRE POUR SON HÔTE

Les orobanches sont des holoparasites racinaires dépourvus de chlorophylle et donc totalement dépendantes de leur hôte pour leur alimentation organique (Stewart et Press, 1990). Une fois attachée et suite à la mise en place d'un haustorium fonctionnel, l'orobanche prélève chez son hôte l'eau et les éléments minéraux et organiques dont elle a besoin pour son développement, perturbant ainsi les relations sources-puits de la plante parasitée (Fig. 26). L'orobanche étant un "phloem feeder", les connexions phloémiennes établies au niveau de l'haustorium sont primordiales pour lui permettre l'accès aux photoassimilats. La décharge des assimilats phloémiens au niveau de l'interface hôte/parasite est accentuée, comme cela a été démontré chez la fève parasitée par la cuscute (Wolswinkel et Ammerlaan, 1983; Wolswinkel et al., 1984). Les plantes parasites sont des puits concurrentiels de ceux de l'hôte et ont systématiquement un potentiel hydrique plus faible que celui des tissus hôtes, les rendant ainsi toujours plus attractifs vis-à-vis des assimilats. Chez les parasites chlorophylliens comme le striga, les flux d'eau entre l'hôte et le parasite sont principalement dus au niveau élevé de transpiration (Stewart et Press, 1990). En revanche, ce n'est pas le cas pour l'orobanche dont l'activité transpiratoire et les flux d'eau dans le xylème sont extrêmement réduits (Hibberd et al., 1999). Ainsi, l'ajustement osmotique permettant aux orobanches d'avoir un potentiel hydrique plus négatif que celui des racines hôte est lié à une forte accumulation de solutés minéraux et organiques (potassium, glucides solubles) dans les tissus puits de l'orobanche (Abbes et al., 2009).

Il est clairement établi, depuis plus de vingt ans maintenant, que le saccharose est la principale source de carbone prélevée chez l'hôte par l'orobanche (Aber et al., 1983; Fer et al., 1987). La nature du prélèvement et du transport du saccharose, ainsi que son métabolisme conduisant à l'accumulation d'hexoses et de mannitol dans les tissus puits du parasite (Delavault et al., 2002), sont des éléments déterminants de la force de puits de l'orobanche qu'il convennait de caractériser.



Figure 27 : Différents types de contacts et voies d'accès potentielles aux solutés de l'hôte chez les plantes parasites (Hibberd and Jeschke, 2001).

A Contact xylème-xylème entre l'hôte et le parasite. Le xylème du parasite 1 (XP.1) est en contact avec le xylème de l'hôte (XH) mais sans connexion luménale directe. Le xylème du second parasite (XP.2), quant à lui, forme des connexions luménales avec le xylème de l'hôte. Aucune connexion n'est établie avec le parenchyme xylémien de l'hôte (PAR XH). **B** Des cellules de transfert du parenchyme xylémien du parasite (PAR XP), avec quelques (XP.3) ou beaucoup (XP.4) d'invaginations membranaires facilitant les flux de solutés, relient le xylème de l'hôte avec celui du parasite. **C** Contact phloème-phloème entre l'hôte et le parasite. Les tubes criblés de l'hôte (TCH) sont bordés de cellules de transfert haustauriales (CTHau) permettant la décharge des solutés phloémiens de l'hôte vers l'*haustorium* du parasite. CC: cellule compagne; PAR: parenchyme. **D** Des plasmodesmes interspécifiques (PI) apparaissent à l'interface entre les tubes criblés du parasite (TCP) et ceux de l'hôte (TCH).

5.1 <u>Prélèvement et transport du saccharose chez l'orobanche</u>

Lors de la mise en place de l'haustorium, le système vasculaire des plantes parasites établit des connexions directes (symplasmiques) ou indirectes (apoplasmiques) avec celui de l'hôte. La formation de ces connexions est vitale pour l'orobanche et va conditionner le reste de son développement. Il est néanmoins très difficile, du fait de la proximité des tissus hôtes et parasites au sein de l'haustorium, d'identifier clairement la nature de ces connexions. L'interface hôte parasite a été étudiée néanmoins à de nombreuses reprises. Alors que chez certaines plantes parasites, comme Olax phyllanthi, le phloème est absent de l'haustorium (Pate et al., 1990), les deux types de tissus conducteurs, xylème et phloème, sont retrouvés dans celui des orobanches (Dörr et Kollmann, 1995; Labrousse, 2002). Des connexions xylème-xylème ont été observées entre P. ramosa et la tomate (Pennypacker et al., 1979). Certains travaux suggèrent même que les connexions xylémiennes entre l'orobanche et son hôte sont de type symplasmique (Kuijt et Toth, 1976). Concernant les connexions phloémiennes, qui sont les plus importantes pour l'orobanche, l'existence de plasmodesmes interspécifiques a été démontrée, suggérant ainsi la nature symplasmique de ces connexions (Dörr et Kollmann, 1995) (Fig. 8 page 20). Toutefois, ce type d'observation ne prouve pas que l'orobanche prélève les photoassimilats de l'hôte par la voie du symplasme, un prélèvement par voie apoplastique reste une possibilité. Hibberd et Jeschke (2001) ont recensé les différents types de connexions vasculaires pouvant être mises en place au sein d'un haustorium (Fig. 27).

Si des incertitudes demeurent concernant la nature du contact phloémien entre l'hôte et l'orobanche, en revanche des études portant sur l'interaction entre la cuscute et différents hôtes ont clairement démontré, grâce à un traceur fluorescent, l'existence d'un *continuum* symplasmique phloémien entre l'hôte et le parasite (Haupt et al., 2001; Birschwilks et al., 2006). L'utilisation de tels traceurs phloémiens devait donc être envisagée pour caractériser les connexions établies par l'orobanche. Certains arguments sont néanmoins en faveur d'un *continuum* symplasmique entre le phloème de l'orobanche et celui de l'hôte : des études récentes montrent que des particules virales, inoculées chez un hôte et connues pour transiter dans le phloème, parviennent jusque dans les tissus de l'orobanche (Gal-On et al., 2009; Vachev et al., 2010). Il en va de même pour certains herbicides systémiques à mobilité phloémienne qui, appliqués en faible quantité sur les parties aériennes de l'hôte, s'accumulent fortement chez l'orobanche (Joel et al., 1995; Jurado-Exposito et al., 1999).



Figure 28 : Voie de biosynthèse du mannitol chez l'orobanche.

1 : Invertase ou saccharose synthétase; 2 : Hexokinase; 3 : Mannose 6-phosphate isomérase; 4 : Mannose 6-phosphate réductase; 5 : Mannitol 1-phosphate phosphatase; 6 : Glucose 6-phosphate isomérase.
Concernant le transport du saccharose chez l'orobanche et d'une manière générale chez l'ensemble des plantes parasites, aucun travail portant sur la caractérisation de transporteurs actifs de type SUT n'a été publié à ce jour. Pourtant leur rôle est probablement essentiel, avec une implication possible dans la décharge phloémienne du saccharose au niveau des tissus puits. Pour apprécier dans sa globalité la régulation de la force de puits de l'orobanche, la caractérisation de ce type de transporteurs était incontournable.

5.2 <u>Métabolisme du mannitol chez l'orobanche</u>

Une tendance à l'accumulation de polyalcools chez les angiospermes parasites est reconnue depuis de nombreuses années (Lewis et Smith, 1967; Smith et al., 1969). Le mannitol est particulièrement présent chez de nombreux parasites de racines telles que le striga ou le thésium (Smith et al., 1969; Stewart et al., 1984; Simier et al., 1994), et semble être présent chez toutes les orobanches (Harloff et Wegmann, 1987). Le mannitol constitue une réserve de carbone et de pouvoir réducteur (Loescher, 1987), mais il joue surtout un rôle majeur d'osmorégulateur, permettant de maintenir un potentiel hydrique très bas dans les tissus de l'orobanche (Stewart et al., 1984; Wegmann, 1986).

Le mannitol produit par l'orobanche provient de la métabolisation initiale du saccharose prélevé chez l'hôte. Il s'accumule particulièrement dans les organes puits, tels que la tige souterraine et l'inflorescence (Delavault et al., 2002). Ainsi, la production de mannitol contribue au maintien d'un gradient décroissant de concentration en saccharose entre le phloème et les tissus puits au sein de l'orobanche. Sa décharge s'en retrouve facilitée et la force d'appel (force de puits) permettant le prélèvement du saccharose chez l'hôte est maintenue (Harloff et Wegmann, 1987).

La voie de biosynthèse du mannitol chez l'orobanche est commune à celle des autres plantes et implique les trois enzymes suivantes : la mannose 6-phosphate isomérase (M6PI, EC 5.3.1.8), la mannose 6-phosphate réductase NADPH dépendante (M6PR, EC 1.1.1.224) et la mannitol 1-phosphate phosphatase (M1PP, EC 3.1.3.22) (Loescher et al., 1992) (**Fig. 28**). La M6PR est l'enzyme clé et spécifique de cette voie. Elle a été purifiée et caractérisée chez *P. ramosa* (Harloff et Wegmann, 1993; Robert et al., 1999). La M6PR est codée par un gène unique chez *P. ramosa* qui présente un niveau d'expression constitutif au cours du développement du parasite (Delavault et al., 2002). La tige en croissance étant l'organe majeur



Figure 29 : Accumulation de mannitol et d'hexoses chez P. ramosa.

A Stades de développement de l'orobanche. Stade III (orangé), stade IV (vert) et stade V (rouge). B Quantification du saccharose, des hexoses et du mannitol dans les organes de l'orobanche rameuse à différents stades de développement (Delavault et al., 2002). Tu: tubercule; Ti: tige souterraine; BH: base de la hampe florale; Hf: partie apicale en croissance de la hampe florale; F: fleurs (fruits en développement); MF: matière fraiche. d'accumulation du polyalcool, un transport de mannitol du tubercule vers la tige, *via* le phloème, est suggéré.

Le métabolisme du mannitol joue un rôle important dans la force de puits de l'orobanche. Les résultats obtenus avec des lignées transgéniques de tomate, entraînant le silencing du gène M6PR du parasite, l'attestent (Aly et al., 2009). Néanmoins, la biosynthèse du mannitol découle des hexoses issus de la dégradation du saccharose. Or l'accumulation d'hexoses est elle-aussi très importante dans les tissus puits de l'orobanche et contribue activement à l'abaissement du potentiel hydrique (Delavault et al., 2002) (**Fig. 29**).

5.3 <u>Métabolisme du saccharose chez l'orobanche</u>

Le saccharose étant la principale source de carbone réduit prélevé chez l'hôte par l'orobanche (Aber et al., 1983; Fer et al., 1987), sa capacité à le métaboliser est déterminante pour entretenir le flux de saccharose indispensable au développement du parasite. Comme cela a pu être observé, l'orobanche n'accumule pas, ou très peu, de saccharose dans ses tissus, attestant ainsi de sa capacité à le dégrader (Delavault et al., 2002) (Fig. 29). En effet, comme nous l'avons déjà évoqué, l'orobanche accumule préférentiellement de l'amidon, du mannitol ou bien encore des hexoses (Singh et al., 1968; Aber et al., 1983; Harloff et Wegmann, 1987; Delavault et al., 2002). Si le métabolisme du mannitol a été étudié chez de nombreuses plantes parasites et notamment chez l'orobanche rameuse (Delavault et al., 2002), peu d'études se sont focalisées paradoxalement sur les enzymes impliquées dans la dégradation du saccharose prélevé par les plantes parasites. Néanmoins, ces enzymes (invertases et saccharose synthétases) semblent jouer un rôle majeur dans la force de puits de l'orobanche en permettant d'assurer un maintien de gradient décroissant de concentration en saccharose à l'interface hôte-parasite. De plus, les invertases et les SuSy sont connues pour être impliquées dans des processus centraux chez les plantes, comme la turgescence, l'expansion cellulaire et le développement (Sturm, 1999; Sturm et Tang, 1999; Koch, 2004; Roitsch et Gonzalez, 2004; Abid et al., 2009).

La forte accumulation de glucose et de fructose dans les tissus puits de *P. ramosa* (Delavault et al., 2002), mais aussi d'*Orobanche foetida* (Abbes et al., 2009), semble indiquer l'action prépondérante des invertases par rapport aux SuSy. Cette allégation se vérifie par les profils d'activités des différentes enzymes impliquées dans la dégradation du saccharose





Les stades de développement sont décrits **Figure 29** (page 98). SAI: invertase acide soluble (vacuolaire); SNI: invertase neutre soluble (cytosolique); CWI: invertase acide pariétale; SuSy: saccharose synthétase; MF: matière fraiche.





A1, A2 et A3 Coupes transversales dans la base de la hampe florale. B1, B2 et B3 Coupes transversales dans la partie apicale en croissance de la hampe florale. A1 et B1 Coupes incubées dans le milieu réactionnel sans saccharose. A2 et B2 Coupes colorées au carmin vert d'iode. A3 et B3 Coupes incubées dans le milieu réactionnel avec saccharose : activité SAI en bleue. Fcv: faisceau cribro-vasculaire; Pm: parenchyme médullaire; Pc: parenchyme cortical. Barre d'échelle = 1 mm (A1, A2 et A3) et 0,5 mm (B1, B2 et B3).

montrant de forts ratios d'activités invertase/SuSy au cours du développement de P. ramosa sur tomate (Draie, 2009) (Fig. 30). La forme soluble d'invertase acide (SAI = vacuolaire) se démarque en présentant un niveau d'activité bien supérieur aux autres enzymes de dégradation du saccharose. C'est dans les organes puits en croissance, tels que les tiges souterraines (stade IV), les hampes florales ou bien les fruits en développement (stade V), que l'activité SAI est la plus élevée. Une approche histochimique a conforté ces résultats en permettant de localiser l'activité SAI in situ dans les hampes florales d'orobanche (Draie, 2009) (Fig. 31). En effet, dans la partie basale de la hampe florale, l'activité SAI est localisée exclusivement dans le parenchyme médullaire, tandis que dans la partie apicale en croissance, l'activité s'étend également au parenchyme cortical. Une distribution plus large de l'activité SAI dans la zone en croissance s'accorde avec les mesures d'activités réalisées in vitro. Les invertases acides vacuolaires semblent donc jouer un rôle prépondérant dans les organes puits en cours de développement chez l'orobanche. Chez d'autres plantes, les invertases de type SAI sont responsables, de part la forte accumulation vacuolaire d'hexoses de la turgescence et de l'expansion cellulaire favorisant la croissance (Ricardo et Ap Rees, 1970; Morris et Arthur, 1985; Ohyama et al., 1995; Klann et al., 1996).

Les SuSy, quant à elles, semblent jouer un rôle moins déterminant dans l'accumulation d'hexoses chez l'orobanche. En effet, elles présentent un niveau d'activité inférieur à celui des invertases SAI dans les organes en croissance (Draie, 2009) (**Fig. 30**). Les SuSy convertissent réversiblement le saccharose en UDP-glucose et fructose, mais leur rôle dominant *in vivo* consiste à cliver le saccharose (Chourey et Nelson, 1979; Cobb et Hannah, 1988). Ainsi, les SuSy jouent un rôle dans la production de précurseurs de la synthèse de polymères de glucanes (amidon, cellulose), ce qui leur confère un rôle clé dans la force de puits des organes accumulateurs d'amidon (Baroja-Fernandez et al., 2009; Tang et al., 2009), et aussi au cours du développement xylémien durant l'acquisition de parois secondaires cellulosiques (Coleman et al., 2009).

Le niveau d'activité SuSy reste relativement constant au cours du développement de *P. ramosa*. L'accumulation d'amidon, qui représente en moyenne 9% de la matière sèche de l'orobanche, est elle aussi assez homogène dans les tissus du parasite (Draie, 2009). L'implication des SuSy dans l'accumulation d'amidon chez l'orobanche reste à démontrer, une implication des invertases cytosoliques de type SNI n'étant pas exclue. Les différents rôles physiologiques des SuSy suggèrent l'existence de plusieurs isoformes enzymatiques ayant des attributions ainsi que des localisations tissulaires spécifiques (Duncan et al., 2006). Ainsi,

les niveaux d'activité SuSy, apparemment équivalents dans les différents organes de l'orobanche, pourraient être en réalité bien plus élevés dans certains tissus spécifiques du parasite, tels que les méristèmes et les zones de différentiation du xylème où une néosynthèse abondante de cellulose est requise.

La contribution des enzymes de dégradation du saccharose au cours de la régulation de la force de puits de l'orobanche rameuse est ainsi évidente : les invertases acides de type SAI semblent y prendre une part importante, le rôle des saccharose synthétases reste quant à lui à être déterminé plus précisément. La caractérisation moléculaire de ces différents acteurs est une étape indispensable pour affiner nos connaissances sur la régulation de la force de puits du parasite. La caractérisation chez l'orobanche des gènes codant pour les différentes enzymes de dégradation du saccharose nous permettrait d'identifier le ou les gènes impliqués dans l'augmentation de l'activité SAI dans les organes en croissance, et aussi d'avoir une meilleure compréhension, à l'échelle moléculaire, des rôles éventuels des SuSy.

A terme, les marqueurs moléculaires les plus fortement impliqués dans la régulation de la force de puits de l'orobanche rameuse pourront être des cibles potentielles pour des stratégies biotechnologiques de lutte antiparasitaire. Ainsi, la création de lignées hôtes capables d'induire chez l'orobanche le silencing d'un gène clé de son métabolisme pourra être envisagée (Aly et al., 2009).

Problématique

Les orobanches sont des plantes parasites pouvant être responsables de ravages considérables sur certaines cultures d'intérêt agronomique. En France, cette réalité est illustrée par les nombreuses parcelles de colza infestées par *Phelipanche ramosa*, essentiellement dans la region Poitou-Charentes. Incapables d'effectuer la photosynthèse, les orobanches établissent des connexions vasculaires (phloème-phloème préférentiellement) au niveau des racines de leurs hôtes et y prélèvent la matière organique (saccharose notamment) indispensable à leur développement. En détournant à leur profit les éléments nutritifs de l'hôte, les orobanches constituent des organes puits surnuméraires entrant en compétition avec ceux de l'hôte. Le développement de l'orobanche repose donc en grande partie sur sa force de puits.

Les travaux de Rida Draie (2009) ont confirmé ces propos en indiquant que les invertases acides de type SAI sembleraient prendre une part importante dans la régulation de la force de puits de l'orobanche rameuse et que des rôles plus discrets mais néanmoins importants pourraient être joués par les saccharose synthétases. La caractérisation moléculaire de ces différents acteurs de la physiologie de l'orobanche était donc l'une des priorités de ce présent travail de thèse. Afin d'isoler et d'identifier les gènes impliqués dans la force de puits de l'orobanche, une méthode classique consistant à utiliser des couples d'amorces dégénérées dessinées à partir de régions conservées au sein des protéines d'intérêts, a été employée. Une démarche différente serait utilisée aujourd'hui pour entreprendre ce type d'étude. En effet, depuis peu un nouvel outil nous est accessible, il s'agit du "Parasitic Plant Genome Project" (PPGP) (http://ppgp.huck.psu.edu/). Ce projet mené par des équipes américaines a permis de constituer des bases de données comportant de nombreuses EST pour trois plantes parasites de la famille des Orobanchaceae dont : Phelipanche aegyptiaca, une orobanche très proche de P. ramosa. La confrontation des séquences identifiées au cours de cette étude avec les séquences d'EST contenues dans les bases du PPGP révèle effectivement des taux d'identité très élevés : de l'ordre de 90 à 95%. Les futures études sur l'orobanche rameuse seront grandement facilitées grâce à ce nouvel outil.

Ainsi, à partir des différents marqueurs moléculaires que nous avons identifiés et par des approches cytologiques, biochimiques et moléculaires, nous avons cherché à comprendre comment l'orobanche entretient sa force de puits. Nous nous sommes focalisés sur les acteurs impliqués dans le transport et la métabolisation du saccharose, molécule carbonée majoritairement prélevée chez l'hôte. Au cours de ces travaux, nous avons utilisé un traceur phloémien pour élucider la nature des connexions reliant le parasite et son hôte, et de celles

107

reliant les différents organes sources et puits au sein du parasite. Nos travaux ont eu également comme objectif de caractériser les invertases, les saccharose-synthétases et les transporteurs de saccharose impliqués. Des approches d'hybridation *in situ* ont permis également d'affiner les analyses et de mieux comprendre le rôle respectif de certains acteurs de la force de puits de l'orobanche.

Enfin, l'ensemble de ces données a pu être valorisé par une étude comparative du niveau d'expression de ces différents acteurs et du taux d'auxines et de cytokinines dans des orobanches fixées sur une variété sensible de colza et sur une variété partiellement résistante (induisant un fort ralentissement de la croissance souterraine du parasite). Ces travaux ont permis de mieux caractériser les dysfonctionnements de la force de puits du parasite, qui sont à la base de la résistance partielle de cette variété.

Partie. II

Matériel et Méthodes

Composition	Pour 1 L
MaKro I B5	100mL
MaKro II B5	10 mL
Myo-inositol	10 mL
Vitamine B5	10 mL
FeNaEDTA	10 mL
Sporen B5	1 mL
Saccharose	30 g
NAA 200 mg/mL (1 µM final)	1 mL

Tableau 1 : Composition du Cell Medium.

1. MATÉRIEL

1.1 <u>Matériel végétal</u>

• Phelipanche ramosa

L'espèce d'orobanche utilisée au cours de ces travaux de thèse est *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel pathovar C, encore appelée orobanche rameuse. Les graines ont été prélevées en 2005 dans un champ de colza infesté, situé à St Martin de Fraigneau (Vendée), et sont conservées à l'obscurité à 25°C.

• Solanum lycopersicum

La variété sensible de tomate (Strain B) utilisée au cours des travaux de R. Draie (2009) a servi aux expérimentations de cette étude.

• Brassica napus

Trois variétés de colza ont été sélectionnées pour cette étude. Les variétés ES Alienor (Euralis) et Campo (Dekalb) ont été choisies pour leur comportement très favorable au développement du parasite. La variété Shakira (Maïsadour Semences) est quant à elle une plante hôte moins favorable au développement de l'orobanche en post-fixation. Ainsi, les orobanches émergent plus rapidement et en plus grand nombre sur ES Alienor et Campo que sur Shakira. (M. Gauthier, LBPV, comm. pers.).

• Culture cellulaire d'Arabidopsis thaliana

Une suspension de 200 mL de cellules d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia (Axelos et al., 1992) maintenue au laboratoire dans une solution Cell Medium (**Tableau 1**) sous agitation constante à 150 rpm (22° C- 15° C jour/nuit, photopériode 16 h, PAR 200 µmol m⁻² s⁻¹).

1.2 <u>Souche bactérienne et de levure</u>

• Souche bactérienne

La souche d'*Escherichia coli* XL1-Blue a été utilisée pour les clonages moléculaires. Génotype : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F´ *proAB lacI*qZ∆*M15* Tn10 (Tetr)] (Stratagene).

• Souche de levure

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* SUSY7 (trp1, inv) a été utilisée pour les complémentations hétérologues. Tout comme la souche sauvage, cette souche mutante ne possède pas de transporteur de saccharose. Elle est munie d'un gène codant pour une saccharose synthétase cytosolique et est incapable d'excréter d'invertases. Ainsi, pour se développer sur un milieu contenant du saccharose comme unique source de carbone, ces levures doivent obligatoirement internaliser le saccharose présent dans le milieu de culture et sont de ce fait adaptées pour caractériser les transporteurs de saccharose de type SUT.

1.3 <u>Vecteurs</u>

• Plasmide pGEM-T Easy

Le plasmide pGEM-T Easy (Promega) est un vecteur de 3015 pb adapté au clonage de produits PCR. Il possède également les séquences promotrices des ARN polymérases T7 et SP6 aux extrémités flanquantes du site d'insertion rendant ainsi possible la transcription *in vitro*.

• Plasmide pDR296

Le plasmide pDR296 nous a été fourni par le docteur Rémi Lemoine [Université de Poitiers, laboratoire PHYMOTS (Physiologie Moléculaire de Transport des Sucres)]. Ce vecteur d'environ 6000 pb possède un promoteur et un terminateur, aux extrémités flanquantes du site multiple de clonage, permettant l'expression hétérologue en système levure.

• Plasmide pRT 101

Le plasmide pRT 101 (Topfer et al., 1987) est un vecteur de 3340 pb adapté pour l'expression en cellule végétale. Il possède en effet un promoteur 35S et un site de polyadénylation du CaMV aux extrémités flanquantes du site multiple de clonage.

2. MÉTHODES

2.1 Manipulations du matériel végétal

• Stérilisation des graines

La stérilisation est effectuée par immersion des graines d'orobanche, de tomate et de colza dans une solution d'hypochlorite de sodium (3,61%) durant 5 min, sous agitation vigoureuse, suivie de 3 rinçages à l'eau distillée stérile de 30 s, puis 3 rinçages à l'eau distillée stérile de 5 min, également sous agitation vigoureuse.

• Préconditionnement des orobanches in vitro

Après stérilisation, les graines d'orobanche sont déposées sur un filtre de fibres de verre (90 mm, Macherey-Nagel), lui-même placé dans une boîte de Petri (90 mm) en présence de 6 mL d'eau distillée, de mannitol 50 mM ou de saccharose 50 mM. Les graines sont laissées en préconditionnement pendant une semaine à l'obscurité à 21°C et sont ensuite stockées -20°C ou plongées dans de l'azote liquide pour être conservées à -80°C.

• Induction de la germination des orobanches in vitro

Après une semaine de préconditionnement (dans de l'eau), les graines d'orobanche sont stimulées par ajout de 5 mL d'une solution à 1 μ g/L de GR24, analogue structural des strigolactones provoquant l'induction de la germination. Les graines ainsi traitées sont alors placées à 21°C. Après 2 jours, les graines stimulées sont aptes pour l'infestation d'appareils racinaires de plantes hôtes. Six jours après stimulation, les graines germées sont stockées à - 20°C ou plongées dans de l'azote liquide pour être conservées à -80°C.

• Co-culture de l'association *Phelipanche ramosa*/plante hôte en boîte de culture

Directement après la stérilisation, les graines de tomate (variété Strain B) et de colza (variété Campo) sont placées en ligne sur un filtre en fibre de verre humidifié avec de l'eau distillée (120 mm, Macherey-Nagel), dans une boîte de Petri (120 mm). La moitié d'un second filtre est alors déposée sur les graines (ombrage). Les graines sont mises à germer en chambre de culture (21°C-15°C jour/nuit, photopériode 16 h, PAR 200 µmol m⁻² s⁻¹). Les plants âgés

de 14 jours (tomate) ou 7 jours (colza) sont ensuite transférés en boîte de Petri carrée [120×120 mm (tomate) ou 245×245 mm (colza), Nunc Lab-TekTM], préalablement percée dans les parties hautes et basses pour permettre le passage de la tige et l'alimentation des racines en milieu de culture. Le système racinaire est recouvert d'un filtre en fibre de verre stérile [120×120 mm (tomate) ou 260×260 mm (colza), Macherey-Nagel] et d'une couche de laine de roche. Les boîtes sont placées verticalement dans des bacs de culture contenant 3 L de milieu de culture neutrophile Coïc, stérile (Coïc et Lesaint, 1975), aéré (bullage). Les bacs de culture sont transférés en phytotron (21°C-17°C jour/nuit, photopériode 16 h, PAR 200 µmoles PAR m⁻² s⁻¹, HR 70%). Le milieu nutritif est renouvelé toutes les semaines. L'inoculation des racines de tomate est réalisée 1 semaine après le transfert des plants, contre 4 semaines pour les racines de colza. Les graines de *P. ramosa* stimulées au GR24 depuis deux jours, sont préalablement mises en suspension dans de l'eau distillée, et sont ensuite dispersées à proximité des racines de la plante hôte à l'aide d'une pipette (environ 10 mg par appareil racinaire).

• Inhibition du transport polaire de l'auxine au cours de l'interaction *Phelipanche ramosa/L. esculentum*

Le modèle ainsi que la mise en œuvre de cette expérimentation sont calqués sur la méthodologie utilisé par Harb et ses collaborateurs (2004). Trois semaines après l'inoculation des racines de tomate par *P. ramosa*, un traitement se traduisant par une application de lanoline seule ou de lanoline + acide triiodo-benzoïque (TIBA 1%) au niveau du collet du plant de tomate est effectué. Un traitement au TIBA inhibe le transport polaire de l'auxine et mime ainsi une décapitation du bourgeon apical caulinaire. Trois semaines après le traitement, les tubercules d'orobanches sont soit plongés dans de l'azote liquide pour être conservés à - 80°C soit fixés dans du PBS 1X [NaCl (130 mM), Na₂HPO₄ (7 mM), NaH₂PO₄ (3 mM), pH 7,0] contenant 4% de paraformaldéhyde.

• Traçage du flux phloémien à l'interface hôte/*P. ramosa* et au sein de *P. ramosa*

L'hôte utilisé pour cette étude est la variété de colza Campo. L'observation des flux phloémiens à l'interface hôte/parasite et au sein du parasite est réalisée par utilisation d'un traceur phloèmien ; la 6-carboxyfluorescéine (CF). Cet agent est piégé dans le phloème alcalin (pH 7,5-8,5). Une fois soumis à une excitation de λ_{485} nm, il réémet une fluorescence à λ_{520} nm. Deux cent µL de solution de CF (Sigma) à 10 mM (pH 6,3) sont déposés à l'aide

Composition	Pour 1 L
MaKro I B5	100mL
MaKro II B5	10 mL
Myo-inositol	10 mL
Vitamine B5	10 mL
FeNaEDTA	10 mL
Sporen B5	1 mL
Glucose (100 mM final)	18 g
Mannitol (250 mM final)	45,5 g
NAA 200 mg/mL (1 µM final)	1 mL

 Tableau 2 : Composition du Protomedium.

d'une pipette sur des feuilles matures préalablement abrasées du colza parasité par *P. ramosa*. Après 120 min, les orobanches (entières ou coupées à main levée de façon transversale) sont observées à la loupe à fluorescence Leica MZ FL III (filtre GFP2), ainsi qu'au microscope confocal à balayage laser Nikon A1 (MCBL de la plate-forme BIBS de l'INRA de Nantes) à partir de coupes de 200 µm d'épaisseur, réalisées au vibratome (Thermo Scientific HM650V) montées entre deux lamelles dans une goutte d'huile à immersion.

• Co-culture de l'association *Phelipanche ramosa*/plante hôte en pot

Le préconditionnement des graines de *P. ramosa* (5 mg par pot, lot 2005) est réalisé en serre (22°C ± 5°C, 7 j) dans des Jiffy pots de 0,4 L contenant un mélange tamisé de terre, tourbe et sable (1/1/1). Les mélanges sont humidifiés puis les pots recouverts d'une bâche de plastique noire. Les plants hôtes [tomate (Strain B) et colza : variété ES Alienor et Shakira] sont ensuite mis en culture dans ces mêmes Jiffy pots, à raison de 3 graines par pot, une seule plante étant conservée après germination. Les Jiffy pots sont placés au centre de pots de 2 L contenant le même mélange terre, tourbe et sable. Les cultures sont maintenues en serre (25°C ± 5°C, photopériode de 16 h, 300 µmoles PAR m⁻² s⁻¹). Pendant la période de production en serre, l'apport d'engrais est effectué une fois par semaine par addition de 200 mL par pot de Liquoplant FD 134 Hiver 3‰. Après trois mois de culture en serre, une fois que les premières émergences d'orobanche sont visible, les stades développementaux d'intérêts de *P. ramosa* sont prélevées sur tomate et colza puis plongés dans de l'azote liquide pour être conservés à -80°C. Le dépotage et la caractérisation du modèle *P. ramosa/B. napus* est réalisé une fois que tous les pots de colza de la variété ES Alienor (la variété la plus favorable au parasite) présentent des orobanches ayant terminé leur cycle de développement.

• Obtention de protoplastes d'Arabidopsis thaliana

Un jour avant la transfection, la suspension de cellules d'Arabidopsis thaliana (Axelos et al., 1992) est diluée cinq fois dans du Cell Medium. Le lendemain, 50 mL de cette suspension sont centrifugés (1 min à 600 g). Après élimination du surnageant, les cellules sont re-suspendues avec 20 mL d'une solution enzymatique [macérozyme (0,4%), cellulase R10 (2%), sorbitol (12%)] permettant la dégradation des parois. Après 180 min d'incubation à 28°C sous 25 rpm d'agitation, les protoplastes sont filtrés et re-suspendus dans 50 mL de Protomedium (**Tableau 2**) puis re-culotés 5 min à 400g. Suite à deux autres re-suspensions similaires, les cellules sont à nouveau culotées puis re-suspendues dans 15 mL de Protomedium. Les protoplastes sont dénombrés à l'aide d'une lame de Malassez afin

d'effectuer une dernière re-suspension à 4.10^6 cellules/mL. Afin d'effectuer la transfection, 250 µL de suspension de protoplastes (10^6 cellules) sont mis en présence de 10 µg de vecteurs d'expression (pRT 101 contenant la construction d'intérêt), 250 µL de solution PEG [PEG 4000 (40%), mannitol (200 mM), CaCl₂ (100 mM)] sont ensuite ajoutés. Après agitation douce et 20 min d'incubation à température ambiante, les protoplastes sont transférés dans une boîte de Petri contenant 2,5 mL de Protomedium et incubés à l'obscurité une nuit à 25°C. Les protoplastes sont observés (excitation λ_{485} nm) au microscope confocal à balayage laser Nikon A1 (MCBL de la plate-forme BIBS de l'INRA de Nantes).

2.2 <u>Analyses histo-cytologiques</u>

• Préparation des échantillons

Fixation et inclusion en paraffine

Les échantillons prélevés sont fixés à 4°C sous vide durant 120 min dans du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde. Le fixateur est renouvelé et les échantillons sont placés une nuit à 4°C. Les échantillons sont ensuite lavés dans du PBS 1X durant 30 min puis déshydratés par bains d'éthanol de concentration croissante : 30% 90 min ; 50% 90 min ; 70% 90 min ; 85% 90 min ; 95% 90 min ; 100% une nuit ; 100% 60 min (×2). Les échantillons sont ensuite placés dans des bains [éthanol + histoclear (National diagnostic)] de concentration en histoclear croissante : 25% 60 min ; 50% 60 min ; 75% 60 min ; 100% 60 min (×2). Ils sont ensuite placés à 60°C dans des bains (histoclear + paraffine) de concentration en paraffine croissante : 5% une nuit ; 20% une journée ; 50% une nuit ; 75% une journée ; 100% une journée (×3). La paraffine liquide contenant les échantillons est ensuite coulée en boîte de Petri et placée à 4°C. Une fois inclus dans la paraffine, les échantillons sont coupés au microtome et les coupes (10 μ M d'épaisseur) sont placées sur lames traitées à la polylysine (VWR). Après une nuit à 37°C, celles-ci sont stockées à 4°C.

Fixation et inclusion en résine

Les échantillons sont fixés dans du PBS 1X contenant 0,5% du glutaraldéhyde et 3% de paraformaldéhyde. Les échantillons sont ensuite lavés dans du PBS 1X durant 10 min (\times 3) puis dans de l'eau distillée 10min (\times 5). Ils sont ensuite déshydratés par bains d'éthanol de concentration croissante : 30% 30 min ; 50% 30 min ; 70% 60 min ; 85% 60 min ;

95% 60 min ; 100% 120 min ; 100% une nuit. Les échantillons sont ensuite placés dans des bains (éthanol + résine) de concentration en résine LR White Hard Grade (Oxford Instrument) croissante : 20% 120 min ; 40% 120 min ; 60% 120 min ; 80% 120 min ; 100% une nuit ; 100% une journée ; 100% une nuit. Les échantillons sont inclus en gélules. La polymérisation est réalisée en quatre jours à 56°C.

• Immunodétection des SuSy de P. ramosa

Les échantillons inclus en résine sont coupés à l'ultra-microtome et les coupes (1 μ M d'épaisseur) sont placées sur des lames à puits. Les échantillons sont saturés durant 30 min en chambre humide avec du tampon PBS 1X contenant 3% de BSA, puis incubés 60 min avec l'anticorps anti SuSy de fève (dénaturée) (Ross et Davies, 1992) dilué au 100^{ème} dans du tampon PBS 1X contenant 1% de BSA et 0,1% de Tween 20. En parallèle, la même opération est réalisée avec le sérum pré-immun dilué dans les mêmes conditions (témoin négatif). Les échantillons sont rincés dans du tampon PBS 1X contenant 1% de BSA et 0,1% de Tween 20 durant 5 min (×6). Ensuite, les échantillons sont incubés à température ambiante durant 60 min avec l'anticorps secondaire, couplé au fluorochrome Alexa-488, diluée au 100^{ème} dans du tampon PBS 1X contenant 1% de BSA et 0,1% de Tween 20, puis rincés 5 min (×3) dans le même tampon et finalement 5 min (×5) dans de l'eau distillée. Les coupes sont alors observables après avoir recouvert les lames d'une lamelle.

• Techniques de coloration

Graines de P. ramosa

Les graines sont traitées dans une solution d'hypochlorite de sodium (3.61%) durant 30 min, rincées dans de l'eau acétique 10% 5 min (×3), puis immergées dans une solution de réactif de Mirande (= carmin vert d'iode) (Mondolot et al., 2001) durant 30 min, ou rincées dans de l'eau distillée 5 min (×3), puis immergées dans une solution d'iodure de potassium (= lugol). Les graines sont ensuite rincées à l'eau distillée et observées. Le réactif de Mirande colore la cellulose en rose et la lignine en vert émeraude, tandis que le lugol colore l'amidon en violet.

Coupes en paraffine

Réhydratation des coupes par bains successifs : d'histoclear 10 min (\times 2) ; d'éthanol en concentration décroissante [100% (\times 2), 95%, 70%, 50%, 30%] 1 min chacun

et d'H₂O 2 min (×2). Une coloration de 5 min par application (500 μ L/lame) d'une solution de calcofluor (0,01%) / auramine-O (0,001%) (Pesquet et al., 2005) est réalisée. Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée puis montées à l'aide du milieu de montage aqueux Aquatex (Merck).

2.3 <u>Analyses biochimiques</u>

• Extraction des protéines

Les procédures sont réalisées à 4°C. Cent mg de graines (préconditionnées ou germées) sont broyés dans 1 ml de tampon A [Tris-HCL pH 7,0 (100 mM), EDTA (5 mM), acide ascorbique (10 mM), β -mercaptoéthanol (1 mM), phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) (0,1 mM), benzamidine (1 mM)] et 50 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). L'homogénat est centrifugé à 10 000 g pendant 15 min. Le surnageant collecté est utilisé pour les tests d'activités invertase soluble et saccharose synthétase. Le culot est rincé avec le tampon A sans PVPP jusqu'à élimination complète des contaminants de protéines solubles (contrôle à λ_{280} nm). Les invertases acides pariétales (CWI) présentes dans le culot sont extraites dans le tampon A additionné de 1 M NaCl sous agitation vigoureuse pendant une nuit. Après centrifugation 10 000 g pendant 15min, le surnageant est utilisé pour le dosage de l'activité CWI.

Mesure des activités invertases

Les extraits enzymatiques sont dessalés sur colonne PD-10 Sephadex (Amersham Pharmacia, G-25), pré-équilibrées avec 20 mL de tampon phosphate de sodium (10 mM, pH 5,0 pour les invertases acides et pH 7,5 pour les invertases neutres) contenant 1 mM de benzamidine et 0,1 mM de PMSF. Les réactions enzymatiques sont effectuées en plaque 96 puits. Les fractions protéiques purifiées (40 μ L) sont incubées avec un milieu réactionnel contenant 50 mM de tampon acétate de sodium (50 μ L) et 1 M de saccharose (10 μ L) pendant 30 min à 37°C. La réaction est stoppée par ajout de 100 μ L de réactif DNSA (dinitro-salicylic acid) [DNSA (1%), NaOH (400 mM), tartrate de sodium (30%)] et refroidie à 4°C. Le contenu des puits est dilué avec de l'eau distillée (v/v) avant de déterminer les valeurs de DO à λ_{540} nm à l'aide d'un lecteur à plaque (LABOSYSTEMS lecteur iEMS). Les capacités enzymatiques sont exprimées en nkat g⁻¹ MF.

• Mesure des activités saccharose synthétase

Les extraits enzymatiques sont dessalés sur colonne PD-10 Sephadex (Amersham Pharmacia, G-25), pré-équilibrées avec 20 mL de tampon [Hepes/KOH pH 7,5 (50 mM), MgCl₂ (5 mM), DTT (4 mM), EDTA (2 mM), glycérol (10%)] additionné de 33 μ L L⁻¹ d'un cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma). La réaction enzymatique (1 mL final) est initiée en cuve spectrophotométrique par l'addition de saccharose 200 mM dans le milieu réactionnel [Hepes/KOH pH 7,5 (50 mM), (4 mM), NAD (2 mM), UDPG déshydrogénase (EC 1.1.1.22) (0,02 U)]. Le milieu réactionnel est incubé à 30°C pendant 30 min. Les activités saccharose synthétase (SuSy) sont déterminées en quantifiant la quantité d'UDP-glucose produite en 30 min. La quantité de NADH formée (2 molécules pour 1 UDP-glucose) est mesurée en déterminant les valeurs de DO à λ_{340} nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les capacités enzymatiques sont exprimées en nkat g⁻¹ MF.

• Dosage de l'amidon

Le dosage de l'amidon a été effectué en suivant les instructions du kit de dosage de Boehringer Mannheim/R-Biopharm. L'amidon est hydrolysé en D-glucose en présence d'amyloglucosidase à pH 4,6. Le D-glucose est phosphorylé en D-glucose-6-phosphate par l'hexokinase, en présence d'ATP, à pH 7,6. Cette phosphorylation s'accompagne de la formation d'ADP. Le D-glucose-6-phosphate est ensuite oxydé en gluconate-6-phosphate par la Glucose 6P-déshydrogénase en présence de NADP⁺, avec formation de NADPH et H⁺. La quantité de NADPH est déterminée par spectrophotométrie en mesurant les valeurs de DO à λ_{340} nm.

• Dosage des phytohormones (auxine et cytokinines)

Les dosages hormonaux (analyses LC-MS) ont été effectués par Stéphanie Boutet-Mercey du Plateau Spécifique de Chimie du Végétal (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA centre Versailles-Grignon) <u>http://www.versailles-grignon.inra.fr/green_chemistry_platform</u>.
2.4 <u>Analyses moléculaires</u>

• Extraction et manipulations d'acides nucléiques

Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique est réalisée en utilisant le kit "DNeasy Plant Mini Kit" selon les instructions du fournisseur (Qiagen). La quantité et la qualité de l'ADN génomique extrait sont estimées par dosage sprectrophométrique au Nanodrop (Thermoscientific) et par migration sur gel d'agarose 1% en milieu TEB [Tris base (89 mM), acide borique (89 mM), EDTA pH 8,0 (1 mM)] additionné de bromure d'éthidium (0,25 µg/mL).

Extraction d'ADN plasmidique

Les minipréparations et maxipréparations plasmidiques sont réalisées en utilisant respectivement les kits "QIAprep Spin Miniprep Kit" et "QIAGEN Plasmid Maxi Kit" selon les instructions du fournisseur (Qiagen). De manière alternative, les minipréparations plasmidiques de routine sont réalisées à partir de 2 mL de culture bactérienne en suivant le protocole de lyse alcaline (Sambrook et al., 1989). La quantité d'ADN plasmidique extrait est mesurée par dosage sprectrophométrique au Nanodrop (Thermoscientific).

Extraction d'ARN totaux et obtention d'ADNc simple brin

Le matériel végétal conservé à -80°C est broyé dans de l'azote liquide. L'extraction des ARN totaux est réalisée en utilisant le kit "RNeasy Plant Mini Kit", selon les instructions du fournisseur (Qiagen). Une étape de dégradation de l'ADN génomique a été réalisée en utilisant l'enzyme DNase I (0,02 U μ l⁻¹, New England Biolabs) conformément au protocole fourni. La quantité d'ARN extraits est mesurée par dosage sprectrophométrique au Nanodrop (Thermoscientific). L'intégrité des ARN traités est estimée par migration sur gel d'agarose 1% en milieu TEB additionné de bromure d'éthidium (0,25 µg/mL).

Pour la synthèse des ADNc simples brins par reverse transcription (RT-PCR), le kit "SuperScript II Reverse Transcriptase" (Invitrogen, Life Technologies) a été utilisé selon les instructions du fabricant. Un oligo(dT)₂₀, complémentaire de l'extrémité poly(A) des ARNm, sert d'amorce pour cette réaction.

• Analyses par PCR

Amplifications de routine

Les réactions sont réalisées dans un volume de 25 μ L, celui-ci comporte 5 μ L de matrice d'ADN (~25 ng), 1 μ L de chaque amorce 10 μ M, 1 μ L de dNTP 10 mM, 2,5 μ l de tampon réactionnel pour la Taq Polymerase [Tris-HCl (100 mM), KCl (1,5 M), MgCl₂ (150 mM), pH 8,3] (New England Biolabs) et 0,5 μ L de Taq DNA Polymerase 5 U/ μ L (New England Biolabs). Les conditions d'amplification pour chaque séquence sont : 95°C 5 min ; 30 cycles 95°C 1 min, 1 min à la température d'hybridation de chaque couple d'amorces et 72°C (1 min/kb), puis une élongation finale de 5 min à 72°C. Le résultat des amplifications est analysé sur gel électrophorétique d'agarose 1% en milieu TEB additionné de bromure d'éthidium (0,25 μ g/mL).

Amplifications ''fidèles''

Pour les produits d'amplification destinés à être clonés, séquencés ou utilisés pour des constructions moléculaires, la polymérase *LA Taq* (Takara) à activité $3' \rightarrow 5'$ exonucléasique (proofreading) a été utilisée. Les réactions sont réalisées dans un volume de 25 µL, celui-ci comporte 5 µL de matrice d'ADN (~25 ng), 1 µL de chaque amorce 10 ou 100 µM, 4 µL de dNTP 2,5 mM, 2,5 µL de tampon réactionnel 10X LA PCR Buffer II (Mg²⁺ free) (Takara), 2,5 µL de Mg²⁺ 25 mM (Takara) et 0,25 µL de *LA Taq* 5 U/µL (Takara). Les conditions d'amplification et l'analyse de leur résultat se fait de façon identique aux amplifications de routine.

PCR en temps réel

Les réactions de PCR en temps réel sur matrice ADNc (RT-qPCR) sont réalisées en plaque 96 puits (Applied Biosystem) dans un thermocycleur 7300 real-time PCR (Applied Biosystem). Chaque puits comporte 5 μ L d'ADNc (~5 ng équivalent ARN), 300 nM de chaque amorce, 12,5 μ L de 2× Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) dans un volume final de 25 μ L. Les conditions d'amplification sont toujours les mêmes quelque soit le gène étudié : une dénaturation de 10 min à 95°C ; puis 40 cycles : 95°C 15 s et 60°C 1 min. Pour chaque réaction, des contrôles négatifs (puits sans ADNc matrice) sont inclus afin d'exclure ou de détecter d'éventuelles contaminations. A la fin d'une réaction de PCR en temps réel, un cycle de dissociation (en augmentant la température de 60 à 95°C)

Gène	Amorce	Séquences forward & reverse 5' \rightarrow 3'	amplicon (pb)	
PrSUT1	Q-Pr-SUT1 UP	CGG GTT CAT ACA CCC ACC TCT A	66	
	Q-Pr-SUT1 DOWN	AGT ATA TGT CGC AGG CTG TGG TT	66	
	Q-Pr-SUT2 UP	GCA TTT GGT TTG CTA TTG AAT TCT G	67	
PrSUIZ	Q-Pr-SUT2 DOWN	GGC ACA TTG GCT CAA TAA AGA AG	67	
D-OUT2	Q-Pr-SUT3 UP	CCT TCG GTG CGG CTC TT	54	
PISUIS	Q-Pr-SUT3 DOWN	CAG CGG CAT AAC CAA TCA AA	54	
D=0-11	Q-Pr-SAI1 UP	GGC GGT GCG GCT AAA AG		
PrSall	Q-Pr-SAI1 DOWN	AGA CAG AGT TTC ATC GGC TAG GA	69	
D-0-i0	Q-Pr-SAI2 UP	GGC ACC AAC ACG ACC TAC AGT T	00	
PrSaiz	Q-Pr-SAI2 DOWN	CGG TCC TAA TGC TCC TCT CTG A	66	
D -Oi	Q-Pr-CWI UP	GAC CCG TAC CTT CGT AAA TGG A		
PrCwi	Q-Pr-CWI DOWN	CGG ACT TGT CAG CAA CGA CTA G	63	
D O 1	Q-Pr-SNI1 UP	GCA TTC GAC TTA CCA TGA CAT TGT	24	
PrSnii	Q-Pr-SNI1 DOWN	CAT AAC AGG GTC GGG AAA GTG	64	
D O 10	Q-Pr-SNI2 UP	CCT TTG TTT GTC TGA TGG TTT CG		
PrSni2	Q-Pr-SNI2 DOWN	TCC CAT CCG CCG ATC TAT C	82	
D-Over 1	Q-Pr-SUS1 UP	CTC TAC GCC AAG AGT CCA AAG C	64	
PrSus1	Q-Pr-SUS1 DOWN	TTC TGT CGC CAC CAA CTA TGA C	64	
D -00	Q-Pr-SUS2 UP	CCA TCG AAG CCC ATA ATC TTC T	64	
PrSus2	Q-Pr-SUS2 DOWN	CCA ATC CCG AGA TGT TTT TAA CA	64	
0.107	Q-Pr-IPT UP	CCA CCA CCT GCT CGG AAT TA		
PriPT	Q-Pr-IPT DOWN	GAG CCA TGT CGC GGA AAT	68	
5.000	Q-Pr-CKX UP	CTG GCG GTC TTC GTT CTT CT	50	
PrCKX	Q-Pr-CKX DOWN	CGG CGT TAA GAG ACG AAA TCT T	59	
D-00D7	Q-Pr-CCD7 UP	TGG ACG TGG CGG CTA AAA	<u></u>	
PICCD7	Q-Pr-CCD7 DOWN	TCT TTG GAG GCA TCT TGA ACA CT	63	
D 554 4	Q-Pr-EF1 UP	TTG CCG TGA AGG ATC TGA AAC		
Pr-EF1α1	Q-Pr-EF1 DOWN	CCT TGG CAG GGT CGT CTT TA	63	

Tableau 3 : Couples d'amorces utilisés pour la PCR en temps Réel.

Gène	Amorce	Séquences forward & reverse 5' \rightarrow 3'	amplicon (pb)	
PrSUT1	SUT fwd deg	TWH ATH TGG YTN TGY GGN CC	718	
PrSUT2	SUT rev deg	TCN YKN SCC ATC CAR TCD GTR TC	898	
PrSUT3			709	
PrSai1	INV fwd deg	TAY CAY TTR TTY TAY CAH TAY AAY CC	1348	
PrSai2	SAI rev deg	TCN ACD ATN GAR TGA TCN ACY AA	1339	
Deceni	INV fwd deg TAY CAY TTR TTY TAY CAH TAY AAY CC		1012	
PrCW	CWI rev deg	NGW NAC YTC NAC RTC NGC DTG	1013	
PrSni1	SNI fwd deg	CCW GTD GAY TCT GGN YTN TGG TGG ATY AT	751	
PrSni2	SNI rev deg	GGC CAD GAD CCW SCA TTR TGR TA	752	
PrSus1	SuSy fwd deg	GGN GTN SAN TTY CTN AAY MGN CA	1570	
PrSus2	SuSy rev deg	ACN GTN ARN CCR AAN GCY TCR TA	1573	
DHDT	IPT fwd deg	GGH GCH ACH GGN DCN GGV AAR TC	205	
PHPT	IPT rev deg	GCN TSN AYG WAN GAR TTN GAN CCD CC	295	
PrCKX	CKX fwd deg	CKX fwd deg TNG GNG GNY TNG GDC ART TYG G		
	CKX rev deg	TTV ARC CAN GGR TGH GGN RCN TCC CA	492	

Tableau 4 : Couples d'amorces dégénérées utilisés pour identifier et cloner les ADNc d'intérêt. (R = A ou G; M = A ou C; W = A ou T; S = G ou C; K = G ou T; Y = C ou T; H = A, T ou C; B = G, T ou C; D = G, A ou T; V = G, A ou C;N = G, A, T ou C)

permet de calculer la température de dissociation des amplicons et d'en déterminer ainsi la spécificité.

Les couples d'amorces spécifiques de chaque gêne d'intérêt (température d'hybridation optimale de 60°C, pourcentage de GC compris entre 30 et 80%, taille maximale de l'amplicon de 150 pb) sont élaborés en utilisant le logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) (**Tableau 3**). L'efficacité des amorces est testée sur une gamme décroissante de concentrations en ADNc afin de s'assurer qu'elle est comparable entre chaque couple.

Les niveaux d'expression de chaque gène d'intérêt sont exprimés en pourcentage de celui de $PrEF1\alpha 1$ (numéro d'accession : HM219554) codant pour un facteur d'élongation exprimé de manière constitutive. Chaque niveau d'expression est déterminé pour trois réplicats biologiques (+ trois réplicats techniques/réplicat biologique).

Identification d'un gène d'intérêt

Des amorces dégénérées sont dessinées à partir de motifs conservés retrouvés dans les séquences de nombreux orthologues (une cinquantaine de séquences) du gène d'intérêt (**Tableau 4**). Ces amorces sont employées (1µL de chaque à 100 µM) au cours d'une amplification "fidèle" à partir d'ADNc représentatifs de tous les organes de *P. ramosa*. Le produit d'amplification est cloné et séquencé (cf. clonage moléculaire classique). De nouvelles amorces spécifiques sont dessinées et utilisées (1µL de chaque à 10 µM) au cours d'amplifications "fidèles" pour obtenir les extrémités de l'ADNc d'intérêt par stratégie de RACE-PCR en utilisant une matrice d'ADNc obtenue à l'aide du kit "GeneRacer" (Invitrogen, Life Technologies) en suivant les instructions du fabricant. Ces nouveaux produits d'amplification sont clonés et séquencés. L'ADNc d'intérêt pleine longueur est obtenu à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques (1µL de chaque à 10 µM) par amplification "fidèle" à partir d'ADNc représentatifs de tous les organes de *P. ramosa* (**Tableau 5** page 138), il est ensuite cloné puis séquencé.

Identification d'une séquence promotrice

Pour identifier une séquence promotrice, deux amorces sont dessinées par gène d'intérêt (**Tableau 6** page 138). Elles sont spécifiques de régions situées à proximité du premier codon du cadre ouvert de lecture du gène d'intérêt. Ces amorces sont utilisées pour effectuer une marche sur chromosome à partir de matrices d'ADN génomique de *P. ramosa*

Gène	Amorce	Amorce Séquences forward & reverse 5' → 3'		
PrSUT1	FL fwd Pr-SUT1	wd Pr-SUT1 ACA CCT ACT ACT CTC TAC ACT CCT ATG CTT		
	FL rev Pr-SUT1	ATG CAA TCC CAC AAT ATC ATA TAG TAT TC	1787	
D*CUT2	FL fwd Pr-SUT2	TTT TCA CAT AGA ATT ATG GAT GCA GAT TCG	0.170	
PISU12	FL rev Pr-SUT2	GAT CTT TCC CCA ACT ATT ATT CAA AAT CAG	2176	
D*CUT2	FL fwd Pr-SUT3	TAG TCA AGA AAT AAG ATT AGT TAG ATA TAC TGA	1662	
PISU13	FL rev Pr-SUT3	AAC CAA CAA GTA CTA GTT TAT TTA GGT AGT CTC	1662	
PrSoi1	FL fwd Pr-SAI1	AGC GAG ACT TTT CCA ACG AAA CTC	2160	
PISali	FL rev Pr-SAI1	CTA AAG TAA AAG GTC TTT GCA TTG GAG A	2160	
Prowi	FL fwd Pr-CWI	GTC ACT TGC AGT TGC ACA TAG TAT CAT CTA ACG	0107	
PICWI	FL rev Pr-CWI	GAT TCC GAT CAC CTA CTC TTT ATG GGT AGG TGA TAC	2107	
DrSni1	FL fwd Pr-SNI1	TGG TCT TTC TGA TTT TCA GTA TTT GC	2022	
FISHI	FL rev Pr-SNI1	AAC AAT TTA TGT ATG ATA AAA ACA AAA CAA ATA C	2032	
0.0.10	FL fwd Pr-SNI2	ACA AAA GTC TCA TAT CTT CTT CTC CAC GAA	2445	
P13/112	FL rev Pr-SNI2	ATG GTA AAT CTT AGT ACA TAC ACA TAT ACA AAT AAT AAG		
DrSug1	FL fwd Pr-SUS1	ACC TTC AAA GGC AAA ACT CTT CAT TTG CT	0700	
PrSust	FL rev Pr-SUS1	AAC AAG AAA CTG AAT TAT TTT ATT TAT ATT AAT AC	2786	
DrCust	FL fwd Pr-SUS2	AAA ACG ACA TTT ATC TAA AAA TGT TGG TCT C	2052	
PrSus2	FL rev Pr-SUS2	CAG GAA ACC ATA CAT CGT AAA ACA TTA CAT C	2803	
Droky	FL fwd Pr-CKX	GCG CCG TTG CCA CCA TTC CCT CTC TAT	1007	
PICKX	FL rev Pr-CKX CAA CTC ACT CAA TAA TAA AAT ATA AAT AAC AAT TAC AAT G		1827	

Tableau 5 : Couples d'amorces utilisés pour cloner les ADNc d'intérêt en pleine longueur.

Gène	Amorce	Séquences 5' \rightarrow 3'	amplicon (pb)
D#CUT1	Pr-SUT1GenWalk1	CCT AGA ACA TTC CCC ACC GCC ATG AA	
PISUTT	Pr-SUT1GenWalk2	TGC GGT ATG CCC AGC AAC TGC ACG TA	842
Dreuto	Pr-SUT2GenWalk1	GGC CCA TCC AAA CTG TAC CCC A	
P13012	Pr-SUT2GenWalk2	CCG TGC AAC TAA GGA TCA GCG TCA GTA	1271
DrSUT2	Pr-SUT3GenWalk1	CAC TTA TTG GCC TCC TCG TCA TCG TT	
F13013	Pr-SUT3GenWalk2	GTG AGT GCG ATT ATT GTG ACG ATC AAT AGA AG	2210
DrSai1	Pr-SAI1GenWalk1	CGC CTC CAA CTG GCC GGA AAA CCT TTT C	
FISAII	Pr-SAI1GenWalk2	GAA TCA GCG GAA GCT GAA GGG GTT TGG GTA A	794
DrSuc1	Pr-SUS1GenWalk1	CTG TGT GCT CTT GAG AAC TTC TTG AAA AGC ATG ATC	
PISUSI	Pr-SUS1GenWalk2	GAG GCT TCA AAA TTC CTT TGC CAT GGG CTT CA	1305
Pr CKV	Pr-CKXGenWalk1	ATC CAG AGT TAA TCC GAC GGT CAC GAT CAG	
PICKX	Pr-CKXGenWalk2	GAT TGC GAA CGT AAG TAG TAA TTT GTT AGC CAT G	906

Tableau 6 : Amorces utilisées pour cloner les séquences promotrices d'ADNc d'intérêt.

Gène	ène Amorce Séquences forward & reverse $5' \rightarrow 3'$		amplicon (pb)	
DrSUT1	SUT1Spe fwd	fwd ACA CTA GTC ACC TAC TAC TCT CTA CAC T		
PISUTI	SUT1stBamHI	GTG GAT CCT CAA TGA AAT CCT CCC ATA GTC ATA G	1039	
Dreuto	SUT2Spe fwd	GTA CTA GTC ACA TAG AAT TAT GGA TGC AGA TTC G	1045	
PISUIZ	SUT2stBamHI	GTG GAT CCT CAA CCA AAA TGG AAA CCC GAG GAT	1645	
D=CL/T2	SUT3Spe fwd	ACA CTA GTT AGT CAA GAA ATA AGA TTA G	4540	
PISU13	SUT3stBamHI	GTG GAT CCT CAG TGA AAT CCT CCG ACA GCC AAA G	1549	

Tableau 7 : Amorces utilisées en vue d'un clonage des *PrSUT* dans le pDR296.

obtenues en suivant les instructions du kit "GenomeWalker Universal Kit" (BD Biosciences Clontech). Deux amplifications PCR successives sont réalisées avec la polymérase *LA Taq* (Takara) en suivant les recommandations du kit de marche sur chromosome, le produit d'amplification de la seconde PCR est ensuite cloné et séquencé.

• Clonages moléculaires

Clonage classique en vue d'un séquençage

Un produit d'amplification destiné à être séquencé est mis à migrer sur gel électrophorétique d'agarose 1% additionné de bromure d'éthidium (0,25 µg/mL) en milieu TEB frais. Le produit d'amplification est purifié à partir du gel électrophorétique en utilisant le kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen). L'amplicon purifié est ensuite ligué dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega) et cloné dans des bactéries compétentes XL1-Blue (Stratagene). Le plasmide est extrait et purifié en utilisant le kit "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen), puis séquencé par la société GATC Biotech (Allemagne).

Clonage en vue d'une caractérisation biochimique des transporteurs PrSUT

Le but est de cloner les séquences PrSUT (1, 2 ou 3 : 5'UTR + CDS) dans le vecteur pDR296 adapté pour l'expression hétérologue en système Levure. Pour cela, des amplifications "fidèles" à partir d'une dilution de plasmide contenant les ADNc pleine longueur PrSUT ont été réalisées avec des amorces permettant l'ajout d'un site de restriction Spe I en amont du 5'UTR et BamH I en aval de la CDS (Tableau 7). Ces produits d'amplification sont clonés puis séquencés. Un clone recombinant (pour chaque PrSUT) ainsi que le vecteur pDR296 sont digérés par les enzymes de restriction Spe I et BamH I (New England Biolabs), les inserts PrSUT et le vecteur pDR296 ainsi digérés sont mis à migrer sur gel électrophorétique d'agarose 1% additionné de bromure d'éthidium (0,25 µg/mL) en milieu TEB frais, puis sont purifiés en utilisant le kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen). Les réactions de ligation entre les séquences PrSUT et pDR296 sont réalisées dans un volume final de 20 µL pendant une nuit à 4°C à l'aide de la T4 DNA ligase du système "LigaFast Rapid DNA Ligation" (Promega) en suivant les recommandations du fournisseur, les produits de ligation sont clonés. Après minipréparation plasmidique, criblage par restriction ou amplification PCR de routine, des vecteurs pDR296-PrSUT (1, 2 ou 3) sont obtenus.

Gène	Amorce	Séquences forward & reverse 5' \rightarrow 3'	amplicon (pb)
	GFPKpn fwd	ACG GTA CCA TGA GCA AAG GAG AAG AAC TT	
GFP	GFPstBamHIRev	TGG ATC CTT AAT TAC CGG TTT TGT AGA GCT CAT	
	SUT1KpnSpe fwd	ACG GTA CCA CTA GTC ACC TAC TAC TCT CTA CAC T	
P13011	SUT1KpnRev	CAG GTA CCA TGA AAT CCT CCC ATA GTC ATA G	
DrellTo	SUT2KpnSpe fwd	ACG GTA CCG GAT CCA GCT TGA GAC TCC GTC TAG A	
P13012	SUT2KpnRev	CAG GTA CCA CCA AAA TGG AAA CCC GAG GAT T	
PrSUT3	SUT3KpnSpe fwd	ACG GTA CCA CTA GTT AGT CAA GAA ATA AGA TTA G	
	SUT3KpnRev	GGT ACC GTG AAA TCC TCC GAC AGC CAA AG	

Tableau 8 : Amorces utilisées en vue d'un clonage des *PrSUT-GFP* dans le pDR296.

Clonage en vue d'une localisation cellulaire des transporteurs PrSUT

Le but est de cloner les séquences PrSUT (1, 2 ou 3 : 5'UTR + CDS) avec la CDS de la GFP en 3' des PrSUT et dans le même cadre de lecture (Annexe 4 page 357). Dans un premier temps, la CDS de la GFP est amplifiée de façon "fidèle" par un couple d'amorce permettant l'ajout d'un site de restriction Kpn I en amont de la CDS et d'un codon stop suivi d'un site BamH I en aval de la CDS (Tableau 8), le produit d'amplification est cloné. Dans un second temps, des amplifications "fidèles" à partir de dilutions de plasmides contenant les ADNc pleine longueur PrSUT ont été réalisées avec des amorces permettant l'ajout des sites de restriction Kpn I-Spe I en amont du 5'UTR et d'un site Kpn I en aval de la CDS, les amorces utilisées permettent aussi la suppression du codon stop présent à l'extrémité 3' des CDS PrSUT (Tableau 8). Ces produits d'amplification sont clonés puis séquencés. Un clone recombinant (pour chaque PrSUT) ainsi qu'un clone recombinant contenant la CDS de la GFP sont digérés par Kpn I (New England Biolabs), les inserts PrSUT et le vecteur pGEM-T Easy-GFP ainsi digérés sont mis à migrer sur gel électrophorétique d'agarose 1% additionné de bromure d'éthidium (0,25 µg/mL) en milieu TEB frais, puis sont purifiés en utilisant le kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen). Les réactions de ligation entre les séquences PrSUT et pGEM-T Easy-GFP sont réalisées dans un volume final de 20 µL pendant une nuit à 4°C à l'aide de la T4 DNA ligase du système "LigaFast Rapid DNA Ligation" (Promega) en suivant les recommandations du fournisseur, les produits de ligation sont clonés. Après minipréparation plasmidique, criblage par restriction ou amplification PCR de routine, des vecteurs pGEM-T Easy-PrSUT (1, 2 ou 3)-GFP sont obtenus.

Le sous-clonage des séquences *PrSUT* (1, 2 ou 3)-GFP dans le vecteur pDR296 est réalisé comme décrit précédemment grâce aux enzymes de restriction *Spe* I et *Bam*H I (New England Biolabs). Ainsi, les vecteurs pDR296 recombinants permettent la localisation cellulaire des protéines de fusion PrSUT-GFP en système levure. La transformation des levures et les études associées ont été réalisées à Poitiers au laboratoire PHYMOTS dirigé par le docteur Rémi Lemoine.

Le sous-clonage des séquences *PrSUT* (1, 2 ou 3)-GFP dans le vecteur pRT 101 est réalisé de façon identique au sous-clonage dans le pDR296 excepté que les différents plasmides sont digérés par les enzymes de restriction *Eco*R I et *Bam*H I (New England Biolabs). Ainsi, les vecteurs pRT 101 recombinants permettent la localisation cellulaire des protéines de fusion PrSUT-GFP dans des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*.

Gène	Amorce	Séquences forward & reverse 5' \rightarrow 3'	amplicon (pb)	
D-OLITA	SUT1.3 fwd	CGG CGT TTG TGG TGG GAG CGG T	057	
PISUTT	FL rev Pr-SUT1	ATG CAA TCC CAC AAT ATC ATA TAG TAT TC	207	
Drelita	SUT2.3 fwd	GAC GCC GAT GAA TTT AAC AAA TTC CTT TA	270	
P13012	FL rev Pr-SUT2	GAT CTT TCC CCA ACT ATT ATT CAA AAT CAG	279	
Dr SIIT2	SUT3.3 fwd	T3.3 fwd AGC GGT GTT TGT GCC CTT GTA TT		
FI-3013	SUT3.3 rev	GCA AAA TTT AAA ACC AAC AAG TAC TAG TTT ATT TAG G	219	
	SUS1 GEN2 fwd	CCA CGC TTG CTG CTC ATC GCA AT	285	
DrSuc1	SuSy1 RT rev	GGA CAG TGA GTT CTT CAA CAA CAA G		
FIGUSI	3' S20 1	AAG AAA TCA CTG CAG AAT TAC AGT CCA A	1401	
	FL rev Pr-SUS1	AAC AAG AAA CTG AAT TAT TTT ATT TAT ATT AAT AC	1401	
PrSus2	FL fwd Pr-SUS2	AAA ACG ACA TTT ATC TAA AAA TGT TGG TCT C	225	
	SUS2 rev HIS	GCT CTG CAA GAG TCA TCA TCA A		
Pr-EF1α1	PrEF1 UP	CAG ACA AGC CCC TCC GTC T	470	
	PrEF1 DOWN ACC AGC ATC ACC ATT CTT CAA		470	

 Tableau 9 : Amorces utilisées en vue d'obtenir des sondes spécifiques d'ARNm d'intérêt pour l'hybridation in situ.

Clonage en vue d'obtenir des ribosondes pour hybridation in situ

Des couples d'amorces sont dessinés pour amplifier des fragments d'ADNc (pour la plupart compris entre 200 et 300 pb) spécifiques des gènes d'intérêts (**Tableau 9**). Les fragments amplifiés font le plus souvent partie intégrante des UTR. Les amorces sont utilisées au cours d'amplifications PCR de routine à partir de dilutions de plasmides contenant les ADNc pleine longueur d'intérêt, les produits d'amplification sont clonés. Après minipréparation plasmidique et criblage par amplification PCR de routine, des vecteurs pGEM-T Easy contenant les séquences d'intérêt dans l'orientation voulue sont obtenus.

Avant de synthétiser les sondes, 2 µg de plasmide d'intérêt sont linéarisés par Apa I (sonde anti-sens) ou Nde I (sonde sens) (New England Biolabs) puis purifiés à l'aide du kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen). Les vecteurs ainsi linéarisés et purifiés servent de matrice à la synthèse des ribosondes à l'aide le kit "Riboprobe Combination Systems" (Promega). La synthèse des sondes est réalisée en utilisant la polymérase T7 (sondes sens) ou SP6 (sondes antisens). Au cours de la transcription in vitro, de l'UTP couplé à la digoxigénine (Roche) est utilisé pour marquer les sondes. Après transcription des sondes, un traitement à la DNase (Promega) dans un volume de 70 µL est effectué en suivant les instructions du fournisseur. Une précipitation des sondes est effectuée par ajout de 20 µL d'acétate d'ammonium 10 M et 240 µL d'éthanol 100% durant 30 min à -80°C. Après une centrifugation de 30 min à 20 000 g et à 4°C, les culots sont lavés à l'éthanol 70% froid puis une nouvelle fois centrifugés comme indiqué précédemment. Les culots sont ensuite séchés et resuspendus dans 30 μ L (sondes courtes < 500 pb) ou 100 μ L (sondes longues > 500 pb) de tampon TE [Tris-HCL pH 7,5 (10 mM), EDTA pH 8,0 (1 mM)] stérile. Les grandes sondes (1400 pb) sont hydrolysées pour générer des fragments plus courts (150 pb). Après ajout de 100 µL de tampon carbonate [Na₂CO₃ '120 mM), NaHCO₃ (80 mM), pH 10,2] aux 100 µL de sonde, le mélange est incubé 30 min à 60°C. La réaction est stoppée par ajout de 493 µL de tampon d'arrêt [10 µl acide acétique, 21 µl acétate de sodium (3 M pH 6,0), 462 µl éthanol (95 %)]. Les sondes sont précipitées durant 30 min à -80°C. Après une centrifugation de 30 min à 20 000 g et à 4°C, les culots sont lavés à l'éthanol 70% froid puis une nouvelle fois centrifugés comme indiqué précédemment. Les culots sont ensuite séchés et resuspendus dans 30 µL de tampon TE stérile. La concentration des sondes est mesurée par dosage sprectrophométrique au Nanodrop (Thermoscientific). L'intégrité et la taille des sondes sont estimées par migration sur gel d'agarose 1% additionné de bromure d'éthidium (0,25 µg/mL) en milieu TEB.

• Hybridation *in situ*

Prétraitement des échantillons sur lames

Les différentes étapes de prétraitement sont les suivantes :

- Réhydratation des coupes par bains successifs : d'histoclear 10 min (×2) ; de méthanol 15 min ; d'éthanol en concentration décroissante [100% (×2), 95%, 70%, 50%, 30%] 1 min chacun et d'H₂O 2 min (×2).
- Nouvelle série de bains : PBS 1X 2 min ; HCl 0,2 M 20 min ; H₂O 2 min ; SSC 2X [SSC 20X stock : NaCl (3 M), citrate de sodium (300 mM)] 20 min.
- Traitement à la protéinase K (Sigma) (5μg/mL) dans une solution de NTE [NaCl (0,5 M), Tris-HCL pH 8,0 (10 mM), EDTA pH 8,0 (5 mM)] 30 min à 37°C.
- Nouvelle série de bains : PBS 1X 2 min ; formaldéhyde 3,7% 10 min (dilué dans du PBS 1X) ; solution d'acétylation [triéthanolamine (0,1 M), acétique anhydre (0,5%), pH 8,0] 10min sous agitation ; PBS 1X 2 min ; H₂O 2 min.
- Déshydratation des coupes en suivant le gradient d'éthanol inverse à celui précédemment effectué. Les lames sont ensuite stockées dans une atmosphère d'éthanol à 4°C jusqu'à l'étape suivante.

Pré-hybridation

Une application (200 μ L/lame) de solution de pré-hybridation [formamide (50%), Denhardt's (1X) (Sigma), inhibiteur de RNase (10 U/ml) (Fermentas), ARNt (200 μ g/ml) (Roche), sel (1X)] [sel 10X stock : Tris-HCL pH 8,0 (100 mM), NaCl (3 M), EDTA (10 mM)] est réalisée, les lames sont ensuite recouvertes d'une lamelle. La pré-hybridation est réalisée en chambre humide (boîte avec papier absorbant imbibé de SSC 5X) durant 60 min à température ambiante.

Hybridation

Les sondes sont dénaturées 1 min à 80°C. Une application (180 μ L/lame) de solution d'hybridation [formamide (50%), Denhardt's (1X) (Sigma), sulfate de dextran (10%), inhibiteur de RNase (10 U/ml) (Fermentas), ARNt (200 μ g/ml) (Roche), sel (1X)] contenant 150 ng de sonde dénaturée est réalisée, les lames sont ensuite recouvertes d'une lamelle. L'hybridation est réalisée en chambre humide durant une nuit à 55°C.

Traitements post-hybridation

Les différentes étapes de traitement sont les suivantes :

- Première série de bains : SSC 1X 50% formamide 120 min à 55°C sous agitation (×2), rinçage au NTE.
- Une application (200 µL/lame) de solution NTE + RNase A (10 µg/mL) est réalisée, les lames sont ensuite recouvertes d'une lamelle. Le traitement à la RNase est réalisé en chambre humide durant 30 min à 37°C.
- Nouvelle série de bains : NTE 5 min à 37°C (×3) ; SSC 0,5X 50% formamide 60 min à 55°C sous agitation ; PBS 1X 5 min ; solution de blocage [Blocking reagent (Roche) (0,5%), triton X100 (0,3%), Tris-HCL pH 7,5 (100 mM), NaCl (150 mM)] 45 min sous agitation ; tampon A [BSA (1%), triton X100 (0,3%), Tris-HCL pH 7,5 (100 mM), NaCl (150 mM)] 45 min sous agitation.
- Une application (500 µL/lame) de tampon A + anticorps anti-digoxygénine (Roche) dilué au 1000^{ème} est réalisée. L'incubation avec l'anticorps est réalisée en chambre humide durant 60 min à température ambiante.
- Nouvelle série de bains : tampon A 20 min sous agitation (×3) ; tampon de détection [MgCl₂ (50 mM), Tris-HCL pH 9,5 (100 mM), NaCl (100 mM)] 5 min sous agitation (×2).
- Une application (500 µL/lame) de BCIP/NBT-Purple Liquid Substrate System for membranes (Sigma) est réalisée, les lames sont ensuite recouvertes d'une lamelle. Le produit ainsi appliqué est le substrat de la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps anti-digoxygénine. La révélation est réalisée en chambre humide pendant une nuit à 25°C et à l'obscurité. La réaction est stoppée par rinçage dans le tampon de détection, les lames sont montées à l'aide du milieu de montage aqueux Aquatex (Merck) puis directement observées.

2.5 <u>Analyses bioinformatiques</u>

Les analyses bioinformatiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Vector NTI 9.1.0 software (Invitrogen). Les homologies de séquences ont été vérifiées à partir des bases de données du "Parasitic Plant Genome Project" (PPGP) (<u>http://ppgp.huck.psu.edu/</u>) ou celles de GenBank en utilisant les programmes BLAST (<u>www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</u>)

(Altschul et al., 1990). Les prédictions de localisation subcellulaire ont été réalisées à l'aide de deux applications différentes : "TargetP 1.1 Server" (<u>http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</u>) (Emanuelsson et al., 2000) et WoLF PSORT (<u>http://wolfpsort.org/</u>) (Horton et al., 2007). Les analyses phylogénétiques, les alignements protéiques et les construction d'arbres, ont été effectués avec le logiciel MEGA4 utilisant le programme Clustal W (Chenna et al., 2003).

Partie. III

Résultats Discussion



Figure 32 : Traçage du flux de sève phloémienne entre *B. napus* et *P. ramosa* par application de carboxyfluorescéine (CF) sur les feuilles de l'hôte.

A Feuille de colza non traitée observée sous excitation UV. **B** La même feuille de colza après une heure de traitement à la CF : la fluorescence est bien localisée au niveau des nervures. **C** Coupe longitudinale d'un tubercule de *P. ramosa* (G×340) (Pennypacker et al., 1979). **D** et **E** Observations en microscopie confocale d'une coupe longitudinale de tubercule de *P. ramosa* (zone comparable à celle observée en **C**) après traitement de l'hôte à la CF, la fluorescence émise par la CF est spécifiquement localisée dans le phloème de *P. ramosa*. **D** Image en mode MCBL. **E** Superposition des images MCBL et transmission. p: phloème; s: grain d'amidon; x: xylème. Barre d'échelle = 5 mm (**A** et **B**) ou 50 µm (**D** et **E**).

1. LE PUITS OROBANCHE, PRÉLÈVEMENT DU SACCHAROSE-HÔTE ET ACTEURS IMPLIQUÉS DANS SON TRANSPORT ET SA MÉTABOLISATION DURANT LA PHASE PARASITAIRE

1.1 <u>Nature de la décharge phloémienne à l'interface hôte-parasite et dans</u> différents organes puits de l'orobanche

L'orobanche est une plante parasite de type "phloem feeder" dont l'une des principales ressources nutritives est le saccharose véhiculé par la sève élaborée de l'hôte (Aber et al., 1983). Les connexions phloémiennes établies via l'haustorium au niveau des racines hôtes sont donc primordiales pour son développement. De nombreux arguments suggèrent l'existence d'un continuum symplasmique entre le phloème de l'hôte et celui de l'orobanche. L'existence de plasmodesmes interspécifiques a notamment été observée entre les cellules phloémiennes d'Orobanche crenata et celles de Vicia narbonensis (Dörr et Kollmann, 1995) (Fig. 8 page 20). Avant de pouvoir conclure à une réelle existence d'une continuité phloémienne symplasmique entre l'hôte et l'orobanche, il reste à démontrer que ces plasmodesmes sont fonctionnels. Cette étude tente précisément de répondre à cette question en utilisant un traceur fluorescent à mobilité phloémienne, la carboxifluorescéine (CF). Ce composé, qui ne traverse pas les membranes, a déjà fait les preuves de son utilité dans l'étude des flux et des types de décharge du phloème (Roberts et al., 1997; Viola et al., 2001; Birschwilks et al., 2006; Zhang et al., 2006). La CF a d'ailleurs permis d'établir l'existence d'une continuité phloémienne symplasmique entre l'holoparasite de tige Cuscuta reflexa et son hôte, le tabac (Haupt et al., 2001).

Afin de mener le même type d'étude, il a été choisi d'utiliser le pathosystème colza sensible (variété Campo) parasité par *Phelipanche ramosa*. Dans un premier temps, suite aux applications de CF sur une feuille de colza abrasée, la charge spécifique de la CF au niveau des nervures secondaires et principales a été validée (**Fig. 32 A** et **B**). Une fois la CF localisée au sein des tissus de l'orobanche, le signal émis est strictement localisé au niveau des tubes criblés du phloème du parasite (**Fig. 32 C**, **D** et **E**). De plus, aucun tissu (hôte ou parasite) ne présentant d'autofluorescence en l'absence de CF, l'étude des continuités phloémiennes de l'interaction hôte-parasite a pu être entreprise. Les expériences ont été menées pour différents stades de développement de l'orobanche (stade III : jeune tubercule avec de nombreuses



Figure 33 : Traçage du flux de sève phloémienne entre *B. napus* et des jeunes tubercules (stade III) de *P. ramosa*, 2 heures après application de CF sur l'hôte.

A-D Observations macroscopiques. A et B tubercule entier. C et D coupe transversale de tubercule. A et C Lumière blanche. B et D Fluorescence. E-J Observations en microscopie confocale. E-G Coupe transversale de tubercule. H-J Coupe transversale de racine adventive. E et H Imagerie en mode MCBL. F et I Imagerie en mode transmission. G et J Superposition des images MCBL et transmission. Tu: tubercule; Rh: racine hôte; Ra: racine adventive; P: phloème. La CF, cantonnée au phloème, est responsable de l'émission de fluorescence verte observée en macroscopie et au MCBL. Barre d'échelle = 500 µm.

racines adventives, stade de transition entre III et IV : tubercule avec formation du bourgeon caulinaire et stade IV : tubercule avec tige développée).

Ainsi, comme en témoignent les résultats obtenus avec de jeunes tubercules d'orobanche (stade III) (Fig. 33), l'existence d'une continuité symplasmique entre le phloème du colza et celui de l'orobanche a été mise en évidence. Les observations macroscopiques de tubercules entiers (Fig. 33 B) attestent que la sève phloémienne de l'hôte irrigue intégralement les organes du parasite. Sur les coupes transversales de tubercules (Fig. 33 D) une fluorescence plus intense permet de localiser le phloème du parasite. Celui des racines est particulièrement bien identifiable. Néanmoins. observations adventives ces macroscopiques ne permettent pas de statuer sur la nature de la décharge phloémienne dans les tissus du parasite. En effet, l'examen des coupes suggère que le signal associé à la CF est présent dans toute la structure du tubercule. De plus, les signaux émis au niveau des apex racinaires ne sont pas clairement interprétables. Les observations ont donc été affinées par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) (Fig. 33 E-J). La technique de MCBL apporte de nouveaux renseignements. En effet, il apparait que la CF est strictement confinée au phloème au sein du tubercule (Fig. 33 E-G). Ce résultat indique donc que la décharge phloémienne dans le parenchyme d'accumulation du tubercule se fait de façon apoplastique. Un résultat comparable est observé chez de jeunes stolons de pomme de terre avant leur tubérisation (Viola et al., 2001). Par contre, en ce qui concerne les apex de racines adventives d'orobanche, la diffusion du signal associé à la CF démontre la nature symplastique de la décharge au sein de ces organes (Fig. 33 H-J). Ce dernier résultat est cohérent avec ce qui est déjà connu sur la décharge phloémienne dans les apex racinaires d'autres plantes (Stadler et al., 2005a; Stadler et al., 2005b). Les racines adventives d'orobanche sont non fonctionnelles, par conséquent leur utilité pour le parasite soulève de nombreuses questions. Aux vues de ces résultats et tenant compte du fait qu'un jeune tubercule peut posséder un nombre important de racines adventives (Fig. 33 A), un rôle non négligeable dans la force de puits du tubercule pourrait leur être attribué. En effet, chaque apex racinaire constitue pour l'orobanche un organe puits (symplastique) en croissance. De ce fait, ils contribueraient de façon active au prélèvement des assimilats de l'hôte.

Les expériences menées pour des stades de développement plus avancés d'orobanche (stade IV) (**Fig. 34 A-E** page 156-157) ont également permis de montrer que, dans certains cas, la continuité phloémienne est maintenue et que la sève élaborée en provenance de l'hôte irrigue l'intégralité de l'orobanche, y compris l'apex de la jeune tige. Les résultats montrent





Figure 34 : Traçage du flux de sève phloémienne entre *B. napus* et des tubercules âgés (stade III-IV) et des stades IV de *P. ramosa*, 2 heures après application de CF sur l'hôte.

A-G Stade IV de *P. ramosa*. H et I Stade de transition III-IV de *P. ramosa*. A (lumière blanche) et B (fluorescence) Observations macroscopiques d'une coupe transversale. C-I Observations en microscopie confocale de coupes longitudinales. D, E, G et I Imagerie en mode MCBL. C, F et H Imagerie en mode transmission. D (tige) et E (tubercule) sont des agrandissements des deux encadrés blancs (mode superposition des images MCBL et transmission) figurant sur la coupe longitudinale entière d'un stade IV (C). Tu: tubercule; Ti: jeune tige; Bf: bourgeon floral; Ba: bourgeon caulinaire apical. La CF, cantonnée au phloème, est responsable de l'émission de fluorescence verte observée en macroscopie et au MCBL. Barre d'échelle = 500 μ m.

que la décharge au sein du tubercule se fait toujours par la voie de l'apoplasme (**Fig. 34 B** et **E**). Dans le cas du développement du tubercule de pomme de terre, une transition entre une décharge apoplastique et symplastique s'oppère (Viola et al., 2001), dans celui du développement des grains de raisin c'est une transition symplastique-apoplastique qui est mise en place (Zhang et al., 2006). Contrairement à ces deux exemples, le tubercule d'orobanche conserve une décharge phloémienne de nature apoplastique au cours de son développement. Il aurait été intéressant de le confirmer en examinant le traçage des flux pour des stades beaucoup plus âgés. Notons aussi que la CF reste confinée au phloème de la jeune tige d'orobanche et que les bourgeons floraux semblent symplastiquement isolés à ce stade puisqu'aucune fluorescence n'y est détectée (**Fig. 34 D**). La décharge phloémienne serait donc également apoplastique dans ces différents organes. Ce résultat est assez surprenant car la plupart des régions méristématiques d'une plante sont des puits symplastiques (Taiz et Zeiger, 2002), c'est notamment le cas chez la cuscute (Haupt et al., 2001).

D'autres résultats intéressants ont été obtenus avec d'autres stades IV (**Fig. 34 F** et **G**), ainsi que des stades de transition III-IV (**Fig. 34 H** et **I**). Ces résultats montrent que la sève phloémienne n'est pas toujours acheminée jusque dans la jeune tige des orobanches (**Fig. 34 F** et **G**). Il apparaît également que certains organes du parasite ne sont que partiellement irrigués par l'hôte (**Fig. 34 H** et **I**). Ces constatations témoignent certainement de l'existence d'une compétition trophique entre les orobanches fixées sur un même appareil racinaire, qui ne semblent pas être toutes capables d'exercer la même force de puits vis-à-vis de la sève élaborée de l'hôte. L'absence de CF au sein de la tige en croissance suggère donc que l'orobanche est capable d'approvisionner elle-même cet organe en assimilats, probablement en remobilisant ses propres réserves (tubercule et/ou tige). A ce titre, il a été montré récemment que l'amidon subissait une phase de remobilisation en fin de cycle de développement de *P. ramosa* (C. véronési, LBPV, com. pers.).

En résumé, l'utilisation de la CF comme traceur phloémien a permis pour la première fois de prouver l'existence d'une continuité symplasmique entre le phloème d'un hôte et celui d'une orobanche. Cela permet de valider ce qui avait été suggéré auparavant (Dörr et Kollmann, 1995; Hibberd et Jeschke, 2001), à savoir l'existence de plasmodesmes interspécifiques fonctionnels entre les deux partenaires. De plus, il apparaît clairement qu'à l'exception des apex de racines adventives, chaque organe d'orobanche (stade III et IV) constitue un puits apoplastique. Par conséquent, la décharge des photoassimilats de l'hôte se fait nécessairement par l'intermédiaire de transporteurs spécialisés. Si le saccharose est clivé

par une invertase pariétale, des transporteurs d'hexoses participeraient alors à la décharge, sinon ce sont des transporteurs de saccharose (SUT) qui pourraient être impliqués. Dans le cas de l'interaction, tomate/*P. ramosa*, l'analyse des différentes activités invertases révèle que les invertases pariétales joueraient un rôle mineur comparé aux invertases vacuolaires (**Fig. 30** page 100) (Draie, 2009). La piste d'une décharge apoplastique *via* des SUT semble donc plus probable. Enfin, l'hypothèse que l'orobanche remobilise elle-même une partie de ses réserves pour assurer son développement ouvre de nouvelles perspectives dans l'étude de la physiologie du parasite. Le tubercule pourrait, à l'instar des jeunes feuilles (Roberts et al., 1997), subir une transition puits/source ou bien remplir simultanément les deux fonctions en étant à la fois puits et source.

1.2 Les transporteurs de saccharose (SUT) chez *P. ramosa*

Les résultats obtenus précédemment soulignent le rôle prépondérant que pourraient jouer des transporteurs de type SUT chez *P. ramosa*. En effet, la décharge en direction des puits de l'orobanche étant principalement apoplastique, une intervention de SUT à plusieurs niveaux est très probable. Les SUT d'orobanche pourraient avoir une fonction dans l'efflux de saccharose dans l'apoplasme des cellules compagnes puits (Carpaneto et al., 2005), ou dans l'influx au niveau des cellules puits et enfin dans l'influx vacuolaire (Rae et al., 2005).

• Identification et caractéristiques des gènes *PrSUT*

Trois ADNc partiels codant pour des gènes *SUT* putatifs d'orobanche rameuse ont été clonés par RT-PCR aux moyens d'un couple d'amorces dégénérées. Par une stratégie de RACE-PCR, les ADNc pleine longueur nommés *PrSUT1*, *PrSUT2* et *PrSUT3* ont pu être isolés. Les caractéristiques des ces trois ADNc, ainsi que celles des protéines putatives pour lesquelles ils codent, sont décrites dans le **Tableau 10** (page 164). L'analyse phylogénétique a pu être réalisée à partir des séquences protéiques PrSUT1, PrSUT2 et PrSUT3. Celle-ci s'appuie sur la classification en quatre groupes distincts décrite précédemment par Sauer (2007) (**Fig. 35** page 164). Les séquences protéiques codées par *PrSUT1* et *PrSUT3* possèdent respectivement 76,6 et 68% d'identité avec la séquence AmSUT1 (*Alonsoa meridionalis*, AAF04295) (Knop et al., 2001). Elles appartiennent donc au groupe 2 qui comprend les transporteurs de type SUT1 des Dicotylédones. *A. meridionalis* est de la famille des *Scrophulariaceae*, famille voisine de celle des *Orobancaceae*. La séquence protéique codées par *PrSUT2* possède 78,7% d'identité avec celle de PmSUC3 (*Plantago major*, CAD58887) (Barth et al., 2003) et appartient donc au groupe 3 qui comprend les transporteurs de type SUT2 des Monocotylédones et Dicotylédones.

Une analyse, à partir de l'application PSIPRED (Protein Structure Prediction Server, http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/), a permis d'établir que les trois séquences PrSUT possèderaient bien 12 domaines (hélices alpha) transmembranaires. Ce résultat est cohérent puisque tous les transporteurs de type SUT sont membres de la MFS (Major Facilitator Superfamily) (Marger et Saier, 1993) (**Fig. 36** page 165). De plus, cette analyse permet d'évaluer la taille de chaque domaine des protéines, ceci incluant les domaines caractéristiques des SUT tels que les extrémités terminales et la boucle cytosolique

Gène	ADNc	5'-UTR	ORF	3'-UTR	Protéine	Identité		N° d'accessio n
PrSUT1	1787	109	1512	166	52,5	76,6	A. meridionalis	AAF04295
						74,4	A. barclaiana	AAF04294
PrSUT2	2176	10	1818	348	65,3	78,7	P. major	CAD58887
						70,8	A. thaliana	NP_178389
PrSUT3	1662	32	1494	136	52,3	68	A. meridionalis	AAF04295
						65,4	A. barclaiana	AAF04294

Tableau 10 : Caractéristiques des ADNc PrSUT et des protéines correspondantes.

Les tailles des ADNc, des régions non codantes (5'-UTR et 3'UTR) ainsi que des cadres ouverts de lecture (ORF = open reading frame) sont indiqués en nombre de bases. La taille des protéines déduites est indiquée en kDa. Le pourcentage d'identité avec les deux plus proches séquences est mentionné.





Les alignements protéiques et la construction de l'arbre ont été effectués avec le logiciel MEGA4 (utilisant le programme Clustal W). Les *AtSUC* sont représentés en gras. La barre indique la distance d'évolution. Se référer à la légende de la **Figure 16** (page 54) pour la nomenclature.



Figure 36 : Prédiction des domaines transmembranaires des protéines PrSUT.

Protéine	N-term	Boucle S6-S7	C-term
PrSUT1	27	37	22
PrSUT2	67	93	26
PrSUT3	26	34	22
AtSUC1	32	44	18
AtSUC3	61	87	17
AtSUC4	43	38	11

Tableau 11 : Taille des régions protéiques (cytoplasmiques) caractéristiques des PrSUT et de représentants des transporteurs de type SUT1, SUT2 et SUT4 d'A. thaliana.

Les tailles sont indiquées en nombre d'AA.



Figure 37 : Effets du saccharose sur le niveau d'expression des gènes *PrSUT* dans les graines préconditionnées de *P. ramosa*.

Les niveaux d'expression relatifs sont mesurés pour des graines d'orobanche préconditionnées une semaine dans différentes solutions (eau = témoin, mannitol 50 mM = témoin *osmoticum* et saccharose 50 mM = test). Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1* (n° d'accession : HM219554). Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Pour chaque gène, les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05).

centrale (**Tableau 11** page 165). Ainsi, les protéines PrSUT1 et PrSUT3 possèdent des caractéristiques comparables entre-elles et plus proches de celles d'AtSUC1. Ceci renforce le fait que PrSUT1 et PrSUT3 sont bien des transporteurs de type SUT1. Notons que AtSUC1 a été démontré comme étant un symporteur saccharose-H⁺ fonctionnel (Sauer et Stolz, 1994). De la même manière, PrSUT2, qui avoisine les 600 AA, possède une extrémité N-terminale allongée et une boucle entre les segments S6 et S7 plus longue d'une soixantaine d'AA que les autres PrSUT. Ainsi, PrSUT2 a toutes les caractéristiques structurales d'un transporteur de type SUT2 (Sauer, 2007).

La régulation transcriptionnelle des SUT par les glucides n'est pas corrélée à leur appartenance à un type de SUT donné. En effet, l'expression des transporteurs de type SUT1 peut être induite (ZmSUT1) (Aoki et al., 1999), réprimée (BvSUT1) (Chiou et Bush, 1998) ou encore indifférente aux glucides (StSUT1) (Harms et al., 1994). L'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes PrSUT par les glucides présente cependant un intérêt dans la mesure où l'orobanche perçoit le saccharose de son hôte (Aber et al., 1983). Pour réaliser cette étude le modèle graine préconditionnée semble le plus approprié. En effet, à ce stade l'orobanche est isolée de son hôte et a repris son activité métabolique (Bar-Nun et Mayer, 1993). Il est donc plus aisé à ce stade de tester l'effet de différents glucides sur l'expression génique de l'orobanche, tout en s'affranchissant d'un effet hôte. Les résultats montrent qu'à l'état de préconditionnement, le transcrit PrSUT majoritairement exprimé dans la graine d'orobanche est PrSUT1 (Fig. 37). L'induction de l'expression par le saccharose (50 mM) est faible pour PrSUT1 (×1,4), inexistante pour PrSUT2 et relativement importante pour PrSUT3 $(\times 3)$ (Fig. 37). Notons que le mannitol n'influe pas sur le niveau d'expression de *PrSUT3* indiquant ainsi que l'induction de son expression par le saccharose n'est pas liée à un effet osmoticum. Concernant PrSUT1 en revanche, cette hypothèse ne peut pas être écartée.

L'orobanche rameuse posséderait donc au moins trois séquences PrSUT codant pour des protéines ayant les caractéristiques des symporteurs saccharose-H⁺ (SUT). Les transporteurs putatifs PrSUT1 et PrSUT3 seraient de type SUT1, et PrSUT2 de type SUT2. Le fait d'identifier plusieurs transporteurs de type SUT1 n'est pas surprenant car des phénomènes de duplication sont fréquemment observés pour les gènes codant ce type de transporteurs (Sauer, 2007). Ainsi, sur les 9 SUT de l'arabette, 7 d'entre eux sont de type SUT1 (**Fig. 35** page 164). L'existence de plusieurs SUT1 chez une même espèce traduirait leur importance physiologique et offrirait aux plantes une éventuelle faculté d'adaptation aux conditions environnementales. Dans ce contexte, rappelons que les transporteurs SUT1
peuvent présenter des modes de régulation différents pour un même stimulus. *PrSUT1* et *PrSUT3* illustrent d'ailleurs ces propos aux vues de leur régulation respective par le saccharose. *PrSUT2* est l'unique représentant de son groupe chez l'orobanche. Ce résultat est en accord avec ce qui est observé chez d'autres espèces (Sauer, 2007). En revanche, aucun représentant SUT4 n'a été identifié au cours de cette étude chez l'orobanche. Il reste donc à le découvrir puisque chaque espèce est susceptible d'en posséder une copie (Sauer, 2007). Une recherche récente à partir de la base de données du PPGP révèle l'existence chez *Phelipanche aegyptiaca* d'un EST de 402 pb codant pour une protéine partielle qui partage 65,5% d'identité ave AtSUT4. Il apparaît indispensable, dans un avenir proche, d'intégrer ce nouveau transporteur putatif pour compléter l'étude des SUT chez l'orobanche.

Les études menées jusqu'à ce jour sur les SUT laissent penser qu'à l'image des autres transporteurs SUT1, PrSUT1 et PrSUT3 pourraient être plasmalemmiques et impliqués à la fois dans la charge et la décharge du phloème au niveau des organes puits de l'orobanche. D'un point de vue biochimique, les transporteurs d'orobanche PrSUT1 et PrSUT3 auraient probablement, comme les autres SUT1 de Dicotylédones, une bonne affinité pour le saccharose (HALC = hight-affinity-low-capacity) avec un K_m compris entre 0,1 et 2 mM (Kuhn et al., 2003). Par opposition, PrSUT2 a toutes les caractéristiques des SUT décrits comme" senseurs" (Lalonde et al., 1999; Barker et al., 2000). La fonction de senseur est bien décrite chez la levure (Ozcan et al., 1998), mais elle est loin d'être démontrée chez les plantes. Le statut de senseur accordé aux SUT2 fait d'ailleurs débat (Eckardt, 2003). Rappelons que PrSUT2 présente 78,7% d'identité avec le transporteur SUT2 du plantain démontré comme étant fonctionnel (Barth et al., 2003). PrSUT2 doit avoir des propriétés biochimiques comparables à celles des autres SUT2, à savoir une faible affinité pour le saccharose avec un K_m compris entre 4 et 20 mM (Kuhn et Grof, 2010). Pour vérifier l'ensemble de ces hypothèses la caractérisation biochimique des PrSUT s'est avérée indispensable.

• Caractérisation biochimique des PrSUT en système hétérologue (levure)

Afin de mieux caractériser les trois transporteurs putatifs PrSUT, les ADNc pleine longueur ont été clonés dans un vecteur d'expression de levure (pDR296). La transformation a ensuite été effectuée avec une souche mutante de *S. cerevisiae* (SUSY7, trp1, inv). Tout comme la souche sauvage, cette souche mutante ne possède pas de transporteur de saccharose. Cependant, elle est munie d'un gène codant pour une saccharose synthétase cytosolique et est



Figure 38 : Expressions hétérologues chez *Saccharomyces cerevisiae* **des constructions PrSUT-GFP.** Les observations ont été faites au microscope confocale (MCBL).

WoLF PSORT						
PrSUT1	9 plas		2 golg	1 cyto		1 vacu
PrSUT2	5 plas		3 ER	3 nucl		1 mito
PrSUT3	12 vacı	ı	1 plas			
TargetP	сТР	mT	'P SP	other	Loc	RC
PrSUT1	0,095	0,0	59 0,02	0,942	_	1
PrSUT2	0,023	0,2	73 0,026	0,867	_	3
PrSUT3	0,077	0,1	15 0,073	0,931	_	1

Tableau 12 Analyse in silico de prédiction de localisation des PrSUT.

<u>TargetP Server</u> : Ce serveur permet de déterminer si une protéine est chloroplastique (cTP = chloroplast transit peptide), mitochondriale (mTP = mitochondrial targeting peptide), sécrétées (SP = signal peptide) ou autre (other). Les prédictions sont données en pourcentage. La localisation la plus probable est indiquée (Loc). Enfin, la puissance de la prédiction est aussi indiquée (RC = Reliability class). La valeur du RC est comprise entre 1 et 5, la valeur 1 est attribuée aux prédictions les plus fortes. En grisé sont indiqués les prédictions les plus élevées ainsi que les RC égal à 1.

<u>WoLF PSORT</u> : Ce serveur permet de prédire un plus grand nombre de localisations que TargetP mais est néanmoins peu performant pour les protéines sécrétées. WoLF PSORT analyse les séquences et propose une liste des 14 séquences protéiques les plus proches en indiquant leur localisation subcellulaire (si celle-ci est connue). En grisé sont indiquées les localisations vers lesquelles plus de la moitié des "protéines voisines" sont adressées. plas: plasmalemme; golg: appareil de golgi; cyto: cytoplasme; vacu: vacuole; ER: réticulum endoplasmique; nucl: noyau; mito: mitochondrie. incapable d'excréter d'invertases. Ainsi, pour se développer sur un milieu contenant du saccharose comme unique source de carbone, ces levures doivent obligatoirement internaliser le saccharose présent dans le milieu de culture à l'aide des transporteurs codés par les constructions. Les levures ainsi complémentées deviennent capables de se développer en présence de saccharose comme seule source de carbone, cela uniquement à la condition qu'un transporteur SUT fonctionnel soit adressé à leur membrane. Dans le but de déterminer le K_m des transporteurs, des cinétiques d'absorption peuvent alors être envisagées par suivi de l'absorption de ¹⁴C-saccharose.

Cependant, après transfert des levures transformées sur milieu contenant du saccharose comme unique source de carbone, aucune différence de développement entre les levures transformées par les constructions PrSUT et le vecteur vide n'a été observée. Deux conclusions sont envisageables. Les PrSUT sont soit non fonctionnels, soit mal adressés aux membranes des levures. Pour répondre à cette question, la même opération a été réalisée avec des vecteurs pDR296 contenant des constructions permettant l'expression de protéines de fusion PrSUT-GFP. Après transformation des levures, l'observation au MCBL a révélée que les protéines de fusion n'étaient pas adressées aux membranes. En effet, la fluorescence émise par la GFP semble diffuse et parfois localisée au niveau du réticulum endoplasmique (**Fig. 38**). Un éventuel biais de codon entre la levure et l'orobanche pourrait être à l'origine des problèmes rencontrés en système levure. Une autre éventualité serait que le couplage à la GFP ait engendré un problème de conformation des protéines de fusion et ait perturbé leur adressage. Afin de caractériser les PrSUT, l'utilisation d'un autre système d'expression tel que les ovocytes de xénope pourrait être envisagée (Boorer et al., 1996).

• Localisation intracellulaire des PrSUT

Afin d'examiner le possible adressage intracellulaire des trois transporteurs putatifs PrSUT, deux types d'analyses ont été menées. Dans un premier temps une analyse de prédiction de localisation *in silico* a été réalisée à l'aide de deux applications différentes : "TargetP 1.1 Server" (<u>http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</u>) (Emanuelsson et al., 2000) et WoLF PSORT (<u>http://wolfpsort.org/</u>) (Horton et al., 2007). Dans un second temps l'expression de protéines de fusion PrSUT-GFP en protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* a été effectuée. Les constructions PrSUT-GFP ont été clonées dans le vecteur d'expression pRT 101. L'application TargetP indique un résultat attendu (**Tableau 12**), les PrSUT ne





Les observations ont été faites au microscope confocale (MCBL). A Observations en mode plan de la fluorescence émise par la GFP. **B** Observations en mode 3D. **B1** Observations de la fluorescence émise par la GFP. **B2** Observations de l'autofluorescence émise par la chlorophylle. **B3** Superposition des observations **B1** et **B2**. n : noyau. Barre d'échelle = $10 \mu m$.

possèdant ni peptide de transit (chloroplastiques ou mitochondriale) ni peptide signal pour la voie de sécrétion. Ils auraient donc une autre localisation subcellulaire, ce qui est compatible avec un adressage attendu pour la membrane plasmique. L'application WoLF PSORT répond en partie à cette attente puisque les transporteurs PrSUT1 et PrSUT2 possèdent principalement des caractéristiques retrouvées dans d'autres protéines localisées au niveau du plasmalemme. Un autre résultat pour le moins inattendu a été obtenu : PrSUT3 aurait des caractéristiques de protéines vacuolaires. Sur les 12 protéines vacuolaires "voisines" phylogénétiquement de PrSUT3, l'application WoLF PSORT précise que 10 d'entre elles sont intégrées au tonoplaste. Ce résultat est à la fois surprenant et intéressant. En effet, jusqu'à présent les seuls SUT qui ont été démontrés comme étant tonoplastiques sont du type SUT4 (Endler et al., 2006; Reinders et al., 2008). Cela montre à nouveau les différences qu'il peut y avoir entre deux membres d'un même groupe SUT. Malgré leur affiliation commune au type SUT1, PrSUT1 et PrSUT3 auraient effectivement une localisation cellulaire très différente puisqu'ils sembleraient être respectivement adressés au plasmalemme ou au tonoplaste. L'autre point intéressant est qu'un transporteur SUT tonoplastique (PrSUT3) pourrait avoir un rôle important à jouer dans l'adressage vacuolaire du saccharose, d'autant plus que l'orobanche présente une forte activité SAI (invertase vacuolaire) dans les organes puits en croissance (Fig. 30 et 31 page 100) (Draie, 2009).

La localisation subcellulaire des protéines de fusion PrSUT-GFP (GFP en position C-terminale) en protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* donne des résultats encourageants mais devra être répétée pour affiner les résultats (**Fig. 39**). En effet, les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer la localisation plasmalemmique ou tonoplastique des PrSUT. Le signal émis par le GFP est détecté en périphérie des protoplastes et donc compatible avec une localisation plasmalemmique (**Fig. 39 A** et **39 B** pour PrSUT2 et 3). Néanmoins, la fluorescence est également présente autour du noyau semblant indiquer aussi une localisation cytoplasmique des protéines (**Fig. 39 A**). De plus, des contraintes techniques ont rendu difficile la réalisation d'une lyse osmotique des protoplastes. Une telle approche permetrait d'isoler les vacuoles afin de détecter la présence éventuelle des protéines de fusion au niveau du tonoplaste (Voelker et al., 2006). Notons qu'un résultat inattendu a été obtenu avec PrSUT1-GFP. Le signal émis par la GFP colocalise exactement avec celui émis par la chlorophylle (**Fig. 39 B**). Un transporteur de maltose caractérisé comme étant intégré à l'enveloppe chloroplastique donne le même type de résultat (Reidel et al., 2008). Cela indiquerait que la protéine de fusion PrSUT1-GFP est chloroplastique. Or l'analyse *in silico*,



Figure 40 : Niveau d'expression des gènes *PrSUT* dans différents organes de *P. ramosa* au cours de son développement sur tomate.

A Rappel des stades de développement de l'orobanche. stade III (orangé), stade IV (vert) et stade V (rouge). B Etude de l'expression des *PrSUT*. Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). Tu: tubercule; Ti: tige souterraine; BH: base de la hampe florale; Hf: partie apicale en croissance de la hampe florale; F: fleurs (fruits en développement). n'a révélée l'existence d'aucun peptide de transit chloroplastique au sein de PrSUT1. De plus, jusqu'à présent seul un membre SUT4 avait été identifié comme étant chloroplastique (Rolland et al., 2003). Pour compléter et affiner cette étude, il apparaît essentiel de la renouveler en incluant différentes constructions témoins : des protéines de fusion ayant une localisation subcellulaire connue (plasmalemmique, tonoplastique et chloroplastique), la GFP seule pour avoir un signal spécifique du cytoplasme ainsi que des fusions où la GFP serait placée en position N-Terminale (GFP-PrSUT) pour s'affranchir d'éventuels artéfacts liés à l'emplacement de la GFP.

• Étude de l'expression des gènes *PrSUT*

Niveau d'expression des gènes PrSUT au cours du développement de P. ramosa sur tomate

A l'image de ce qui a déjà été observé au niveau des graines d'orobanche, le transcrit PrSUT1 est majoritaire tout au long du développement du parasite (Fig. 40). Ce résultat suggère le rôle particulièrement important joué par ce transporteur. L'accumulation de transcrits PrSUT1 est stable durant les premiers stades de développement de l'orobanche (stade III et IV). Une modification dans l'accumulation du transcrit s'opère dans les stades plus âgés (stade V) puisqu'environ 2 fois plus de transcrits PrSUT1 sont détectés dans la base de la hampe ainsi que dans les fruits en développement. Enfin, l'accumulation la plus importante (×3 par rapport aux tubercules) a lieu dans l'apex en croissance de la hampe florale. Cette accumulation d'ARNm peut trouver son origine dans une augmentation de la transcription, une meilleur stabilité des messagers ou encore une modification de régulation par d'éventuels micro ARN interférents, comme cela a déjà été proposé pour certains gènes SUT de l'arabette (Lu et al., 2005). Le fait que PrSUT1 soit plus exprimé dans la hampe florale que dans le tubercule serait cohérent avec un rôle dans la récupération du saccharose qui fuit naturellement hors du phloème durant le transport longue distance. Une forte expression d'AmSUT1 (transporteur partageant 76,6% d'identité avec PrSUT1) au niveau des tiges d'alonsoa a conduit à la même interprétation (Knop et al., 2001).

A l'image de son orthologue *LeSUT2*, le transcrit *PrSUT2* est globalement peu accumulé (Barker et al., 2000). En revanche, contrairement à *LeSUT2* dont le niveau d'expression est plus élevé au sein des organes puits tels que les feuilles immatures, le transcrit *PrSUT2* s'accumule de manière identique quel que soit l'organe d'orobanche



Figure 41 : Expression tissulaire du gène PrSUT1 dans les bourgeons floraux de P. ramosa.

A Coupe longitudinale d'une jeune tige d'un stade IV, la zone encadrée et en couleur correspond à un bourgeon floral. **B-E** Résultats d'hybridation *in situ* sur bourgeons floraux. **B** Résultat "type" d'une hybridation de sonde sens (gène d'intérêt ou constitutif). **C** Résultat d'une hybridation de sonde antisens pour le gène constitutif *PrEF1a1*. **D** Résultat d'une hybridation de sonde antisens pour le gène d'intérêt **D**, la flèche noire indique un marquage positif au niveau des tissus phloémiens d'une écaille de bourgeon floral. Ti: jeune tige; Bf: bourgeon floral. Barre d'échelle = 200 μ m.

considéré. L'accumulation du messager *PrSUT2* varie peu au cours du développement du parasite, semblant indiquer un rôle moins important que celui de *PrSUT1*.

Le transcrit *PrSUT3* s'accumule lui aussi faiblement comparé à *PrSUT1*. Néanmoins, une accumulation de transcrits beaucoup plus importante est détectée dans certains organes puits en croissance tels que les jeunes tiges stade IV (×3 par rapport aux tubercules), les hampes en croissance et les fruits en développement du stade V (×10 par rapport aux tubercules) (**Fig. 40** page 174). Le gène *PrSUT3*, tout comme d'autres membres SUT1 (Truernit et Sauer, 1995), serait donc spécifiquement exprimé au niveau des organes puits de *P. ramosa* (autres que les jeunes tubercules) et y jouerait probablement un rôle déterminant. Aux vues des résultats précédents, une fonction dans l'acheminement du saccharose en direction de la vacuole pourrait lui être accordée. Notons par ailleurs que l'élévation de l'accumulation du transcrit *PrSUT3* coïncide avec les stades de développement du parasite qui présentent les plus importantes activités SAI (invertase vacuolaire) (**Fig. 30** page 100) (Draie, 2009).

Expression tissulaire du gène PrSUT1

Une approche d'hybridation *in situ*, utilisant une sonde ribonucléotidique spécifique du gène *PrSUT1*, a donné des résultats encourageants concernant la localisation à l'échelle tissulaire de l'expression du gène (**Fig. 41**). Bien que préliminaires, les résultats démontrent la fiabilité de la technique avec l'absence de bruit de fond en présence des sondes sens (**Fig. 41 B**) ainsi qu'un marquage uniforme et total des tissus en présence d'une sonde antisens spécifique du gène constitutif *PrEF1a1* (**Fig. 41 C**). La sonde antisens du gène *PrSUT1* a permis de mettre en évidence une expression spécifique de ce gène au niveau des tissus phloémiens des écailles de bourgeons floraux (**Fig. 41 D** et **E**). Ainsi, un rôle prépondérant dans la décharge apoplastique phloémienne du saccharose au niveau des organes puits de l'orobanche semble se confirmer pour PrSUT1. Toutefois, les résultats d'hybridation *in situ* pour les *PrSUT* sont perfectibles. Les sondes spécifiques des gènes *PrSUT2* et *PrSUT3* n'ont pas donné de résultats concluants. La cause vient probablement du trop faible niveau d'expression des ces gènes enregistrés en RT-qPCR (**Fig. 40** page 174). En revanche, l'amplification du signal obtenu pour *PrSUT1* serait à tester afin de détecter l'expression du gène dans d'autres organes (sources et puits).



Figure 42 : Représentation des différents modes de décharge phloémienne au sein de l'orobanche rameuse et modélisation théorique de l'implication des transporteurs SUT majeurs. Ce schéma illustre un stade IV d'orobanche rameuse.

• Conclusions concernant le rôle des PrSUT chez P. ramosa

Phelipanche ramosa possède au moins trois transporteurs SUT (2 SUT1 et 1 SUT2) dont les caractérisations fonctionnelle et biochimique restent à être réalisées. PrSUT1 serait le transporteur majoritaire (quantitativement) et aurait de ce fait un rôle clé à jouer à tous les stades de développement du parasite (Fig. 42). La localisation phloémienne du transcrit PrSUT1, démontrée au niveau d'un organe puits, place ce transporteur en première ligne pour effectuer la décharge apoplastique du saccharose en provenance de l'hôte au niveau du tubercule ainsi que la tige et hampe florale en croissance (Riesmeier et al., 1994; Truernit et Sauer, 1995; Kuhn et al., 2003). Les résultats précédents suggéraient qu'une transition puits/source pourrait avoir lieu chez l'orobanche à des stades de développement avancés. L'accumulation plus importante du transcrit PrSUT1 au niveau de la hampe florale des stades V après émergence hors du sol pourrait refléter cette transition. En effet, *PrSUT1* pourrait jouer un rôle dans la charge phloémienne des éventuelles réserves remobilisées à partir du tubercule ou de la tige. Une présence plus importante du transporteur tout le long de l'axe de la hampe traduit aussi son implication probable dans la récupération du saccharose perdu au cours de son transport ("longue distance") (Knop et al., 2001; Shiratake, 2007). L'éventualité d'une localisation chloroplastique du transporteur PrSUT1 reste à vérifier mais soulève néanmoins de nombreuses questions. Un transporteur SUT a déjà été identifié au niveau de l'enveloppe chloroplastique (Rolland et al., 2003) et fonctionnerait dans le sens de l'efflux en direction du cytoplasme (Kuhn et Grof, 2010). L'orobanche est dépourvue de chloroplaste mais possède en revanche de nombreux amyloplastes. Il serait alors probable que PrSUT1 soit localisé au niveau de l'enveloppe amyloplastique. Durant la nuit, les plantes chlorophylliennes remobilisent leurs réserves d'amidon chloroplastique, principalement sous la forme de maltose (Weise et al., 2004). Le maltose doit impérativement être exporté dans le cytosol par un transporteur spécialisé (Mex1) pour permettre la synthèse de saccharose (Niittyla et al., 2004). La question est : en est-il de même pour la remobilisation des réserves amylacées contenues dans les grains d'amidon ? Si oui, rappelons que malgré leur forte affinité pour le saccharose, les SUT sont également capables de transporter le maltose (Kuhn et Grof, 2010). Une question intéressante se pose alors, PrSUT1 serait il impliqué dans une quelconque remobilisation de l'amidon des amyloplastes en permettant l'export de maltose (Fig. 42)?

Le transporteur PrSUT2 a toutes les caractéristiques des SUT2. Est-il fonctionnel comme PmSUC3 auquel il ressemble beaucoup (Barth et al., 2003), ou possède-t-il des

attributs de senseurs comme cela est suggéré pour certains de ses orthologues (Lalonde et al., 1999; Barker et al., 2000) ? La faible et relative constante expression du gène *PrSUT2* semble indiquer que ce transporteur n'exerce pas de rôle capital pour l'orobanche. Ne perdons pas de vue tout de même que les régulations post-traductionnelles sont fréquentes chez les SUT et que PrSUT2 pourrait réguler (au moins en partie) le fonctionnement des autres PrSUT, notamment par des interactions protéiques (Weise et al., 2000; Reinders et al., 2002; Chincinska et al., 2008; Krugel et al., 2008).

Enfin, le transporteur PrSUT3 (type SUT1) semble jouer un rôle prépondérant au niveau des organes puits de l'orobanche. Bien que cela reste à vérifier, il se pourrait que ce transporteur soit tonoplastique et favorise ainsi l'entrée de saccharose dans la vacuole (Carpaneto et al., 2005; Endler et al., 2006) (**Fig. 42** page 178). Ce résultat serait une originalité car jusqu'à présent seuls des transporteurs de type SUT4 ont été localisés au niveau du tonoplaste (Endler et al., 2006; Reinders et al., 2008). L'entrée de saccharose dans la vacuole est d'autant plus importante pour l'orobanche que ses organes puits en croissance sont caractérisés par une forte activité invertase vacuolaire (Draie, 2009).

Gène	ADNc	5'-UTR	ORF	3'-UTR	Protéine	Pi	Identité		N°d'access ion
PrSai1	2160	62	1986	112	73,1	5,42	65,6	N. tabacum	CAC83577
							64,6	D. carota	CAA77267
PrSai2 *	1711	-	-	74	-	-	71	D. carota	CAA77266
							65,4	C. sinensis	BAF34362
PrCwi	2187	40	1761	386	66,2	8,68	66,6	L. esculentum	AAM28823
							63,8	D. carota	CAA55188
PrSni1	2032	115	1710	207	64,8	6,72	80,9	L. esculentum	ABQ28669
							78,6	V. vinifera	CAP59642
PrSni2	2445	67	2001	377	76,4	7,16	69	V. vinifera	ABS52644
							67,9	D. carota	CAA76145

Tableau 13 : Caractéristiques des ADNc d'invertases de P. ramosa et des protéines correspondantes.

Les tailles des ADNc, des régions non codantes (5'-UTR et 3'UTR) ainsi que des cadres ouverts de lecture (ORF = open reading frame) sont indiqués en nombre de bases. La taille des protéines déduites est indiquée en kDa. Le valeur du point isoélectrique (pI) théorique et le pourcentage d'identité avec les deux plus proches séquences est mentionné. *, l'ADNc de *PrSai2* n'a pas été obtenu en pleine longueur.



Figure 43 : Arbre phylogénétique de séquences protéiques des trois types d'isoenzymes d'invertases incluant celles de *P. ramosa* (déduites des 4 ADNc pleine longueur identifiés).

Les alignements protéiques et la construction de l'arbre ont été effectués avec le logiciel MEGA4 (utilisant le programme Clustal W). Cet arbre consensus a été obtenu par la méthode de Neighbor-joining, bootstrap (n=500). Les embranchements pour lesquels la valeur de bootstrap est inférieure à 50% sont collapsés.

1.3 Les invertases chez *P. ramosa*

Des études antérieures ont permis d'établir que l'orobanche rameuse accumule fortement des hexoses dans ses tissus puits en croissance (Delavault et al., 2002) (**Fig. 29** page 98). Une étude plus récente suggère que des invertases de type vacuolaire (SAI = soluble acid invertase) seraient responsables de cette accumulation d'hexoses (Draie, 2009). Les invertases de type SAI présentent en effet un niveau d'activité nettement supérieur à celui des autres enzymes impliquées dans le clivage du saccharose, cela notamment au niveau de la tige en croissance du stade V (**Fig. 30** et **31** page 100) (Draie, 2009). L'isoforme SAI majoritaire a d'ailleurs pu être purifiée et caractérisée d'un point de vue biochimique (Draie, 2009). L'étape manquante pour compléter ces travaux était d'identifier le gène invertase codant pour l'enzyme SAI qui joue un rôle majeur dans la force de puits de *Phelipanche ramosa*.

• Identification et caractéristiques des gènes invertases de *P. ramosa (PrInv)*

Cinq ADNc partiels codant pour des gènes invertases putatifs d'orobanche rameuse (*PrInv*) ont été clonés par RT-PCR aux moyens de couples d'amorces dégénérées. Par une stratégie de RACE-PCR, quatre ADNc pleine longueur nommés *PrSai1*, *PrCwi*, *PrSni1* et *PrSni2* (numéro d'accession respectifs : GU997130, GU99132, GU99133, GU99134) et un ADNc partiel *PrSai2* (numéro d'accession : GU997131) ont pu être isolés. Les caractéristiques de ces cinq ADNc, ainsi que celles des protéines putatives pour lesquelles ils codent (uniquement pour les ADNc pleine longueur), sont décrites dans le **Tableau 13**. L'analyse phylogénétique a été réalisée à partir des séquences protéiques PrSAI1, PrCWI, PrSNI1 et PrSNI2 (**Fig. 43**).

Les invertases acides (AI) de P. ramosa

PrSai1, PrSai2 et PrCwi coderaient pour des invertases acides (AI). La séquence en AA codée par *PrSai1* a 65,6% d'identité avec une invertase vacuolaire de tabac (CAC83577), tandis que la séquence partielle codée par *PrSai2* partage 71% d'identité avec une invertase SAI de carotte (CAA77266) (Sturm, 1996). La séquence codée par *PrCwi* possède quand à elle 66,6% d'identité avec une invertase pariétale CWI (cell wall invertase) de tomate (AAM28823) (Fridman et Zamir, 2003). Comme le montre la **Figure 43**, les protéines codées par *PrSai1* et *PrCwi* possèdent une proximité évolutive plus grande avec d'autres invertases des groupes respectifs SAI et CWI.

TargetP	сТР	mTP	SP	other	Loc	RC
PrSAI1	0,321	0,04	0,017	0,693	-	4
PrCWI	0,008	0,057	0,976	0,074	S	1
PrSNI1	0,665	0,067	0,004	0,517	С	5
PrSNI2	0,402	0,347	0,003	0,112	С	5

WoLF PSORT									
PrSAI1	5 plas	4 cyto	3 ER	2 vacu					
PrCWI	4 chlo	3 plas	2,5 nucl	2 vacu					
PrSNI1	11 chlo	2 ER							
PrSNI2	12,5 chlo	7,5 mito							

Tableau 14 Analyse in silico de prédiction de localisation des invertases de P. ramosa.

<u>TargetP Server</u> : cTP = chloroplast transit peptide; mTP = mitochondrial targeting peptide; SP = signal peptide; other = autre localisation. Les prédictions sont données en pourcentage. La localisation la plus probable est indiquée (Loc). Enfin, la puissance de la prédiction est aussi indiquée (RC = Reliability class). La valeur du RC est comprise entre 1 et 5, la valeur 1 est attribuée aux prédictions les plus fortes. En grisé sont indiqués les prédictions les plus élevées ainsi que les RC égal à 1.

<u>WoLF PSORT</u> : WoLF PSORT analyse les séquences et propose une liste des 14 séquences protéiques les plus proches en indiquant leur localisation subcellulaire (si celle-ci est connue). En grisé sont indiquées les localisations vers lesquelles plus de la moitié des "protéines voisines" sont adressées. plas: plasmalemme; cyto: cytoplasme; ER: réticulum endoplasmique; vacu: vacuole; chlo: chloroplaste; nucl: noyau; mito: mitochondrie.

De plus, les trois protéines déduites PrSAI1, PrSAI2 et PrCWI contiennent les motifs conservés chez l'ensemble des AI, ceci incluant le motif β -fructosidase "NDNPG" et le site catalytique supposé "WEC(I/V/P)DF" (Sturm et Chrispeels, 1990; Roitsch et al., 1995). Les fructosyltransférases impliquées dans le métabolisme des fructanes partagent certains domaines conservés avec les séquences des AI (Vijn et Smeekens, 1999). Néanmoins, à la différence des fructosyltransférases, les séquences protéiques d'AI contiennent certains triplets qui leur sont propres : WIN ou WMN (Gallagher et al., 2004). De ce fait, la présence d'un triplet WIN dans les séquences codées par *PrSai1* et *PrCwi* (résidus 139-141 et 57-59 respectivement) ainsi que celle d'un triplet WMN dans celle codée par *PrSai2*, confirme que ces trois gènes codent pour des invertases acides.

Comme le suggère l'étude phylogénétique (**Fig. 43**), d'autres points concernant les trois séquences AI d'orobanche viennent conforter cette classification : (i) le quatrième résidu du motif WEC(V/I/P)D est une isoleucine (I) pour PrSAI1 et une valine (V) pour PrSAI2, ce qui a déjà été observé pour des SAI, l'acide aminé correspondant pour PrCWI est une proline (P) ce qui est caractéristique des CWI (Roitsch et al., 1995) ; (ii) la valeur calculée du pI est respectivement de 5,42 et 8,68 pour PrSAI1 et PrCWI (**Tableau 13** page 182), cela étant en accord avec le fait que le pI est généralement acide pour les invertases vacuolaires et basique pour les invertases pariétales (Sturm, 1999; Roitsch et Gonzalez, 2004) ; (iii) l'application TargetP prédit fortement que PrCWI serait une protéine sécrétée, ce qui est en accord avec sa localisation apoplastique présumée (**Tableau 14**). Notons que l'application WoLF PSORT ne permet visiblement pas de prédire précisément la localisation des AI d'orobanche. Les prédictions de l'application TargetP suggèrent que PrSAI1 serait plus probablement adressée à un autre compartiment cellulaire que les chloroplastes, les mitochondries ou l'apoplaste, ceci allant dans le sens de sa localisation vacuolaire présumée (**Tableau 14**).

Les invertases neutres (SNI) de P. ramosa

Aux trois gènes d'invertases acides viennent s'ajouter deux autres ADNc codant pour des invertases neutres de type SNI (soluble neutral invertase) putatives. La séquence protéique déduite de *PrSni1* a 80,9% d'identité avec une invertase neutre de tomate (ABQ28669) et 78,6% d'identité avec une invertase neutre putative de vigne (CAP59642). La séquence codée par *PrSni2* partage respectivement 69 et 67,9% d'identité avec une invertase neutre de vigne (ABS52644) et une de carotte (CAA76145) (Sturm et al., 1999). Comme le montre la **Figure 43**, les protéines codées par *PrSni1* et *PrSni2* sont bien intégrées au groupe phylogénétique



Figure 44 : Effets du saccharose sur le niveau d'expression des gènes d'invertase dans les graines préconditionnées de *P. ramosa*.

Les niveaux d'expression relatifs sont mesurés pour des graines d'orobanche préconditionnées une semaine dans différentes solutions (eau = témoin, mannitol 50 mM = témoin *osmoticum* et saccharose 50 mM = test). Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Pour chaque gène, les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05).



Figure 45 : Séquence protéique déduite de l'ORF *PrSai1* et séquences des peptides générés par digestion tryptique de l'isoforme SAI purifiée à partir d'une jeune tige stade IV.

La séquence des peptides obtenus par digestion et correspondant à la séquence PrSAI1 est grisée (Draie, 2009). Les flèches indiquent les sites de clivage de la trypsine. Le motif β -fructosidase (rouge) et un motif peptidique conservé possédant un résidu cystéine jouant un rôle clé au sein du site catalytique (bleu) sont soulignés (Sturm, 1999)

des SNI. PrSNI1 et PrSNI2 appartiendraient plus précisément et respectivement au clade β et α .

Les valeurs de pI attribuées aux protéines PrSNI1 et PrSNI2, respectivement de 6,72 et 7,16 (proches de la neutralité), sont en accord avec les observations faites concernant l'ensemble des SNI (Roitsch et Gonzalez, 2004). De plus, les données prédictives suggèrent très fortement la présence de peptides de transit au sein des 2 protéines PrSNI, leur accordant préférentiellement une localisation chloroplastique (**Tableau 14** page 184). Ces données sont en accord avec les travaux récents réalisés sur les invertases de type SNI (Murayama et Handa, 2007; Szarka et al., 2008; Vargas et al., 2008). PrSNI2 étant intégrée au clade α , une localisation intra-organelle parait tout à fait cohérente. En revanche, il apparaît plus surprenant que PrSNI1 ait le même type de localisation puisque les SNI du clade β sont généralement cytoplasmiques (Ji et al., 2005; Vargas et al., 2009).

Effets du saccharose sur le niveau d'expression des gènes PrInv

Afin de compléter la caractérisation des gènes PrInv, une étude de l'induction transcriptionnelle par le saccharose (identique à celle menée pour les gènes PrSUT) a été réalisée (**Fig. 44**). Cette étude révèle que le saccharose induit peu (PrSai2 et PrSni2; induction ×1,4 et ×1,8 respectivement) ou pas du tout (PrSai1, PrCwi et PrSni1) l'expression des gènes PrInv. Ces résultats sont en accords avec le fait que, chez la carotte, le saccharose n'induit pas l'expression des gènes codant pour des invertases acides (Sturm, 1999).

• L'isoforme SAI majoritaire chez P. ramosa est codée par PrSai1

Les études menées par R. Draie (2009) ont permis de purifier et de caractériser l'invertase SAI principalement active dans les organes en croissance d'orobanche. L'isoforme SAI majoritaire a été purifiée à partir de jeunes tiges (stade IV). La caractérisation biochimique de cette enzyme a permis d'établir un certain nombre de propriétés cohérentes pour une invertase de type SAI. Ainsi, l'isoforme SAI purifiée présente entre autre une bonne affinité pour le saccharose ($K_m = 2,7$ mM), une valeur de pI et de pH de fonctionnement optimum attendues (Goetz et Roitsch, 1999), une inhibition de son activité de type compétitive par le fructose et non-compétitive par le glucose (Quiroga et al., 1995; Isla et al., 1999) et enfin une activité fortement inhibée par les métaux lourds (Hg²⁺) (Sturm, 1999).

L'invertase SAI purifiée a également été séquencée (Fig. 45) (Draie, 2009). Une digestion par la trypsine suivie d'une analyse par spectrométrie de masse (ECI-LS-MS/MS)



Figure 46 : Les invertases de *P. ramosa* au cours de son développement sur tomate.

A Niveau d'expression des gènes *PrInv*. Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3) **B** Mesure des activités des différentes isoformes d'invertase (Draie, 2009). Pour les différentes données, les valeurs portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). Tu: tubercule; Ti: tige souterraine; BH: base de la hampe florale; Hf: partie apicale en croissance de la hampe florale; F: fleurs (fruits en développement).



Figure 47 : Corrélation entre le niveau d'accumulation du transcrit *PrSai1* et l'activité SAI au cours du développement de *P. ramosa* sur tomate.

Les données sont les moyennes \pm SE (n=3 pour les analyses par RT-qPCR, n=6 pour les activités enzymatiques) voir **Figure 46**. Tu: tubercule; Ti: tige souterraine; BH: base de la hampe florale; Hf: partie apicale en croissance de la hampe florale; F: fleurs (fruits en développement).

ont permis d'obtenir 14 peptides. Après une comparaison de séquence, il s'avère que ces 14 peptides sont tous retrouvés (homologie de séquence de 100%) dans la séquence protéique déduite du gène *PrSai1*. Les 14 peptides identifiés permettent un recouvrement de séquence de 26% avec PrSAI1. Dans ce contexte, il est alors possible d'affirmer que le gène *PrSai1* code pour l'enzyme SAI majoritairement active au sein des organes puits en croissance de *P. ramosa*.

• Étude des invertases durant le développement parasitaire de P. ramosa

Afin de pouvoir comparer le profil d'activité des différentes isoformes d'invertases étudiées au cours du développement de Phelipanche ramosa sur l'hôte tomate (Fig. 46 B) (Draie, 2009), le niveau d'expression des gènes PrInv a été analysé lors d'une cinétique de développement comparable et en présence du même hôte (Fig. 46 A). Contrairement à ce qui avait été observé au niveau des graines d'orobanche (Fig. 44 page 186), le transcrit PrSail a un niveau d'accumulation nettement supérieur aux autres gènes PrInv tout au long de la phase de vie parasitaire de P. ramosa (Fig. 46 A). L'accumulation du transcrits PrSail est environ 2 fois plus importante (par rapport aux autres organes) au niveau des tiges de stades IV, des parties en croissances des hampes florales et des fruits en développement. Ces mêmes organes, aux mêmes stades de développement, présentent également un niveau d'activité SAI 2 à 3 fois supérieur à celui mesuré dans les autres stades de développement de l'orobanche (Draie, 2009). Aux vues des résultats précédents, il semblerait donc que la capacité enzymatique SAI soit corrélée au niveau d'accumulation du transcrit PrSail (Fig. 47). Quant aux quatre autres transcrits PrInv, leur faible niveau d'accumulation comparé à celui de PrSail, semble en accord avec le fait que les activités SNI et CWI sont systématiquement très inférieures à l'activité SAI. Chez l'orobanche rameuse les organes puits en croissance se caractérisent par une forte capacité enzymatique associée à l'invertase vacuolaire PrSAI1. Celle-ci jouerait un rôle déterminant dans la croissance du parasite (via l'accumulation d'hexose vacuolaires) et donc dans sa force de puits vis-à-vis des assimilats de son hôte. Les autres isoformes d'invertases semblent avoir une importance moindre dans le cadre de la force de puits de l'orobanche.

• Conclusions concernant le rôle des invertases chez P. ramosa

Phelipanche ramosa possède une petite famille multigénique d'invertases d'au moins cinq membres. *PrSai1*, *PrSai2* et *PrCwi* coderaient pour des invertases acides. En se basant

sur l'étude phylogénétique (**Fig. 43** page 182), l'identité du quatrième résidu du motif conservé "WECXDF" (Roitsch et al., 1995), la valeur théorique du pI (Sturm, 1999; Roitsch et Gonzalez, 2004), ainsi que sur les prédictions bioinformatiques, les gènes *PrSai1* et *PrSai2* coderaient pour des invertases vacuolaires (SAI) tandis que *PrCwi* coderait pour une invertase pariétale (CWI). L'orobanche rameuse possède également deux gènes codant pour des invertases neutres (SNI). *PrSni1* appartiendrait au clade β et *PrSni2* au clade α . Ces PrSNI putatives présentent l'originalité d'avoir des peptides de transit pour les chloroplastes alors que la littérature suggère que seules les SNI du clade α y sont adressées (Ji et al., 2005; Vargas et al., 2009). Aux vues de ce qui peut être observé chez d'autres espèces, il est très probable que l'orobanche possède encore d'autres copies de gènes *Cwi* et *Sni* (Sturm, 1999; Bocock et al., 2008; Welham et al., 2009), ce qui est en revanche moins probable pour les gènes *PrSai* (Lorenz et al., 1995; Roitsch et Gonzalez, 2004). Une fois encore, les bases de données du PPGP contiennent de multiples EST de *Phelipanche aegyptiaca* qui permettent d'envisager l'existence d'autres gènes invertases chez l'orobanche rameuse.

P. ramosa possède probablement deux isoformes d'invertases SAI comme l'arabette (Haouazine-Takvorian et al., 1997). Néanmoins, après purification et séquençage de l'isoforme SAI majoritaire (Draie, 2009), ainsi qu'après avoir analysé les profils d'expression des gènes *PrSai* au cours du développement du parasite, il ne fait à présent aucun doute que l'écrasante majorité de l'activité SAI de l'orobanche est régie par l'isoforme SAI1 codée par le gène *PrSai1*. PrSAI1 présente les caractéristiques d'une invertase vacuolaire (Draie, 2009), avec notamment une sensibilité aux ions Hg²⁺ qui reflète la présence de groupements sulfhydriles au sein de son site catalytique (Sturm, 1999). L'activité de PrSAI1 est également modulée (inhibée) (Draie, 2009), comme d'autre SAI, par les produits de la réaction qu'elle catalyse (Quiroga et al., 1995; Isla et al., 1999). Les hexoses ainsi que des inhibiteurs protéiques spécifiques constituent des modes d'inhibition post-traductionnelle des invertases SAI (Zhang et Wang, 2002; Rausch et Greiner, 2004; Privat et al., 2008). Le fait que l'orobanche n'accumule pas ou très peu de saccharose alors qu'elle accumule massivement des hexoses dans ses organes à forte activité SAI (Delavault et al., 2002; Draie, 2009) suggère que, *in vivo*, PrSAI1 ne subit pas de réel effet inhibiteur par les hexoses.

L'analyse comparative du niveau d'expression de *PrSai1* et du niveau d'activité SAI au cours du développement parasitaire de *P. ramosa* suggère un mode de régulation majoritairement transcriptionnelle de PrSAI1. Certains résultats indiquent néanmoins une possible régulation post-traductionnelle de PrSAI1 par clivage protéolytique (Draie, 2009).





Ce schéma illustre un stade IV d'orobanche rameuse.

En effet, PrSAI1 est monomérique et présente une taille de 86 kDa en condition native et de 35 kDa en condition dénaturante. Ce type de clivage protéolytique ne nuit pas à l'activité de l'enzyme et reflèterait simplement un état développemental particulier de la plante (Unger et al., 1994).

Le niveau d'expression du gène *PrSai1* est systématiquement plus élevé que celui des gènes codant pour les isoformes SNI et CWI. Cela se vérifie également pour les activités enzymatiques respectives (**Fig. 46** page 188). Dans les organes d'orobanche en croissance tels que l'apex de la hampe florale, le transcrit *PrSai1* s'accumule davantage et la capacité enzymatique SAI1 associée augmente. Ceci se traduit par une accumulation massive d'hexoses dans la hampe florale en croissance, et à l'échelle tissulaire, à une forte activité SAI dans les parenchymes corticaux et médulaires (**Fig. 31** page 100, Draie, 2009). En revanche, la base de la hampe florale, qui a achevée sa croissance, montre de moindres niveaux de transcrits *PrSai1* et d'activité SAI. En agissant ainsi, PrSAI1 contribue à l'abaissement du potentiel hydrique des organes puits de l'orobanche, favorisant ainsi le drainage du saccharose ainsi que sa décharge du phloème. Elle est donc fortement impliquée dans la force de puits et la croissance du parasite (**Fig. 48**).

Les autres isoformes d'invertase (SNI et CWI) jouent probablement des rôles plus discrets. Il n'en reste pas moins que leur rôle peut être tout aussi capital pour assurer un développement normal du parasite, comme le suggèrent certaines études récentes (Barratt et al., 2009; Welham et al., 2009). Les SNI d'orobanche semblant avoir des prédispositions à être localisées au niveau des plastes, un rôle dans l'accumulation d'amidon pourrait leur être attribué (**Fig. 48**) (Vargas et al., 2008).

Gène	ADNc	5'-UTR	ORF	3'-UTR	Protéine	Identité		N°d'accessio n
PrSus1	2786	196	2418	172	92,1	88	L. esculentum	CAA09593
						87,7	C. arabica	CAJ32596
PrSus2	2853	178	2436	239	92,5	83,8	C. plantagineum	CAB38021
						83	C. arabica	CAJ32597

Tableau 15 : Caractéristiques des ADNc SuSy de P. ramosa et des protéines correspondantes.

Les tailles des ADNc, des régions non codantes (5'-UTR et 3'UTR) ainsi que des cadres ouverts de lecture (ORF = open reading frame) sont indiqués en nombre de bases. La taille des protéines déduites est indiquée en kDa. Le pourcentage d'identité avec les deux plus proches séquences est mentionné.



Figure 49 : Arbre phylogénétique de séquences protéiques SuSy incluant celles de P. ramosa.

Les alignements protéiques et la construction de l'arbre ont été effectués avec le logiciel MEGA4 (utilisant le programme Clustal W). Cet arbre consensus a été obtenu par la méthode de Neighbor-joining, bootstrap (n=500). Se référer à la légende de la **Figure 24** (page 86) pour la nomenclature.

1.4 Les saccharose synthétases (SuSy) chez *P. ramosa*

Les SuSy convertissent réversiblement le saccharose en UDP-glucose + fructose et jouent de ce fait un rôle dans la production de précurseurs de la synthèse de polymères de glucanes (amidon, cellulose). Leur rôle dans la force de puits de certains organes accumulateurs d'amidon, tel que le tubercule de pomme de terre, est avéré (Baroja-Fernandez et al., 2009; Tang et al., 2009). Elles semblent aussi intervenir au cours du développement xylémien durant l'acquisition de parois secondaires cellulosiques (Coleman et al., 2009). Les SuSy ont la particularité de permettre une conservation énergétique et de maintenir leur activité même en condition d'anoxie (Subbaiah et Sachs, 2001), ce qui n'est pas le cas pour les invertases.

Le niveau d'activité SuSy ainsi que la teneur en amidon, pendant la phase de croissance du parasite, restent relativement constants au cours du développement de *P. ramosa* (Draie, 2009). Le rôle des SuSy d'orobanche dans l'accumulation d'hexoses est probablement moins déterminant que celui joué par PrSAI1. Néanmoins, des rôles plus discrets mais tout aussi importants, pourraient leur être attribués. Chez l'orobanche, les études menées ont cherchées à montrer l'existence de plusieurs isoformes de SuSy impliquées dans différents rôles physiologiques tels que l'accumulation d'amidon ou la synthèse de cellulose.

• Identification et caractéristiques des gènes SuSy de *P. ramosa (PrSus)*

Deux ADNc partiels codant pour des gènes SuSy putatifs d'orobanche ont été clonés par RT-PCR aux moyens d'un couple d'amorces dégénérées. Par une stratégie de RACE-PCR, les 2 ADNc pleine longueur nommés *PrSus1* et *PrSus2* ont pu être isolés. Les caractéristiques de ces deux ADNc, ainsi que celles des protéines putatives pour lesquelles ils codent, sont décrites dans le **Tableau 15**. L'analyse phylogénétique à pu être réalisée à partir des séquences protéiques PrSUS1 et PrSUS2 (**Fig. 49**). La séquence en AA codée par *PrSus1* a 88% d'identité avec une SuSy de tomate (CAA09593) et 87,7% d'identité avec une SuSy de café (CAJ32596) (Geromel et al., 2006). La séquence codée par *PrSus2* partage respectivement 83,8 et 83% d'identité avec une SuSy de *Craterostigma plantagineum* (CAB38021) (Kleines et al., 1999) et une de café (CAJ32597) (Geromel et al., 2006). Les protéines PrSUS1 et PrSUS2 ont des tailles théoriques de leur forme monomérique (~90 kDa) comparable aux autres SuSy (Winter et Huber, 2000) (**Tableau 15**). Comme le montre

TargetP	сТР	mTP	SP	other	Loc	RC
PrSUS1	0,009	0,732	0,037	0,457	Μ	4
PrSUS2	0,079	0,276	0,073	0,857	_	3
WoLF PSORT						
PrSUS1	7,5 mite	b	6 cyto	4,5 chlo-mi	to	
PrSUS2	9 cyto		2 pero	1 nucl		1 mito

Tableau 16 : Analyse in silico de prédiction de localisation des SuSy de P. ramosa.

<u>TargetP Server</u> : cTP = chloroplast transit peptide; mTP = mitochondrial targeting peptide; SP = signal peptide; other = autre localisation. Les prédictions sont données en pourcentage. La localisation la plus probable est indiquée (Loc). Enfin, la puissance de la prédiction est aussi indiquée (RC = Reliability class). La valeur du RC est comprise entre 1 et 5, la valeur 1 est attribuée aux prédictions les plus fortes. En grisé sont indiqués les prédictions les plus élevées.

<u>WoLF PSORT</u> : WoLF PSORT analyse les séquences et propose une liste des 14 séquences protéiques les plus proches en indiquant leur localisation subcellulaire (si celle-ci est connue). En grisé sont indiquées les localisations vers lesquelles plus de la moitié des "protéines voisines" sont adressées. mito: mitochondrie; cyto: cytoplasme; chlo: chloroplaste; pero: péroxisome nucl: noyau.



Figure 50 : Effets du saccharose sur le niveau d'expression des gènes SuSy dans les graines préconditionnées de *P. ramosa*.

Les niveaux d'expression relatifs sont mesurés pour des graines d'orobanche préconditionnées une semaine dans différentes solutions (eau = témoin, mannitol 50 mM = témoin *osmoticum* et saccharose 50 mM = test). Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Pour chaque gène, les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05).

la **Figure 49** (page 194), les SuSy codées par les 2 gènes *PrSus* appartiennent chacune à un groupe phylogénétique différent. Ainsi, à l'instar de ce qui s'observe chez la plupart des espèces (Winter et Huber, 2000; Geromel et al., 2006), l'orobanche possède au moins une SuSy dans chacun des deux principaux groupes phylogénétiques. PrSUS1 et PrSUS2 appartiendraient respectivement au groupe SUS1 et SUSA. L'analyse *in silico* visant à prédire la localisation subcellulaire protéique donne également des résultats cohérents concernant les protéines PrSUS putatives (**Tableau 16**). En effet, PrSUS1 possède vraisemblablement un peptide de transit pour les mitochondries et partage ainsi l'une des spécificités relatives aux SuSy du groupe SUS1 (Baud et al., 2004; Harada et al., 2005). Les résultats obtenus à partir des applications TargetP et WoLF PSORT semblent indiquer la probable localisation cytoplasmique de PrSUS2. Ce résultat est en accord avec ce qui différencie la SuSy SUSA des SuSy SUS1 de maïs. En effet, ZmSUS3 (groupe SUS1 (ZmSUS1 et ZmSH1), elle serait incapable de se fixer aux membranes (Duncan et al., 2006).

Un autre point permet de distinguer les gènes PrSus1 et PrSus2. Il s'agit de leur régulation transcriptionnelle respective en réponse au saccharose (Fig. 50). Le saccharose n'a aucun effet sur le niveau d'expression de *PrSus1* tandis qu'il induit spécifiquement, sans effet osmoticum du mannitol, la surexpression du gène PrSus2 (induction ×2). Le fait que la teneur en glucide induise une régulation transcriptionnelle différentielle pour deux gènes Sus d'une même espèce a déjà été démontrée. Ainsi chez le maïs, le glucose induit la surexpression du gène ZmSus1 et réprime celle de ZmSh1 (Koch et al., 1992). Le saccharose a également un impact différent sur le niveau d'expression des gènes Sus de pomme de terre, codant tous deux pour une SuSy du groupe SUS1. En effet, le saccharose induit la surexpression du gène StSus4 et n'a aucun effet sur celle de StSus3 (Fu et al., 1995a, , 1995b). Notons que jusqu'à présent l'effet inducteur des glucides n'avait été observé que pour des gènes Sus codant pour des SUS1 (Baud et al., 2004). A contrario, les gènes codant pour des SuSy du groupe SUSA ayant fait l'objet d'une étude de régulation transcriptionnelle par le saccharose (CpSus1 et CpSus2 ; CuSusA ; AtSus2 et AtSus3), ne présentent aucune modification de leur niveau d'expression en réponse au diholoside (Kleines et al., 1999; Komatsu et al., 2002; Baud et al., 2004).







A Niveau d'expression des gènes *PrSus*. Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3) **B** Activité SuSy (Draie, 2009). **C** Teneur en amidon (Draie, 2009). Pour les mesures d'activité et les dosages d'amidon, chaque point représente la moyenne de six mesures indépendantes \pm SE (n=6). Pour les différentes données, les valeurs portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). Tu: tubercule; Ti: tige souterraine; BH: base de la hampe florale; Hf: partie apicale en croissance de la hampe florale; F: fleurs (fruits en développement).

• Étude des SuSy durant le développement parasitaire de P. ramosa

L'existence de deux isoformes de SuSy chez l'orobanche, ayant de plus un mode de régulation transcriptionnelle distinct pour au moins un stimulus, suggère qu'elles auraient une implication et des rôles physiologiques différents au sein des tissus du parasite. Pour tenter de mieux comprendre leur degré d'implication respectif dans la physiologie de l'orobanche, une étude a été menée au cours du développement de *Phelipanche ramosa* sur l'hôte tomate. Il s'agit d'une étude se proposant de comparer trois points : (i) l'évolution transcriptionnelle des *PrSus*; (ii) l'évolution de l'activité SuSy; (iii) l'évolution de la teneur en amidon (**Fig. 51**). L'étude est réalisée à partir d'une cinétique de développement similaire aux travaux réalisés pour les SUT et les invertases, les points (ii) et (iii) sont tirés des résultats obtenus par R. Draie (2009).

L'évolution du niveau d'expression des gènes PrSus au cours du développement du parasite illustre une fois de plus les différences qui les distinguent (**Fig. 51 A**). Le transcrit PrSus1 est largement majoritaire tout au long du cycle de vie parasitaire de l'orobanche. Son niveau d'accumulation est maximal dans les jeunes tubercules (stade III) et minimal dans les fruits en développement (stade V). La tendance observée est une diminution de l'accumulation de PrSus1 associée à la maturation de l'orobanche.

Le transcrit PrSus2 est quand à lui très peu accumulé et présente un niveau d'expression constitutif. Compte tenu du fait que la teneur en saccharose régule le niveau d'expression de PrSus2, ce résultat semble cohérent. En effet la très faible teneur en saccharose du parasite (Delavault et al., 2002) pourrait expliquer le faible niveau d'expression de PrSus2.

L'activité SuSy varie peu au cours du développement de l'orobanche (Draie, 2009) (**Fig. 51 B**). Les deux organes Tu-III et F-V présentent des activités SuSy semblables mais des taux de transcrits *PrSus1*très différents. D'autres études ont déjà souligné le manque fréquent de corrélation entre le niveau d'expression des gènes *Sus* et le niveau d'activité SuSy (Fallahi et al., 2008). Un inconvénient à la mesure de l'activité SuSy est que l'activité mesurée reflète l'ensemble des isoformes présentes dans l'extrait (Draie, 2009). Il est alors impossible d'évaluer les possibles régulations post-traductionnelle propres à chaque isoenzyme. Un transcrit *Sus* fortement accumulé pourrait conduire à une importante traduction de protéines

SuSy, sans pour autant engendrer une hausse de l'activité. A l'inverse, un transcrit faiblement accumulé pourrait induire une forte activité SuSy. Cette subtilité vient du fait que les SuSy sont à la fois activées et/ou dégradées en fonction de leur état de phosphorylation (**Fig. 25** page 90) (Winter et Huber, 2000; Rohrig et al., 2002; Hardin et al., 2003). L'activité SuSy mesurée au sein des tubercules tend à décroître au fur et à mesure que ceux-ci vieillissent. Il en va de même pour l'accumulation du transcrit *PrSus1*. PrSUS1 pourrait donc être l'isoforme ayant l'activité dominante au cours des jeunes stades de développement de *P. ramosa*, d'autant que *PrSus1* s'accumule de façon largement majoritaire. En revanche, pour expliquer le niveau d'activité SuSy mesuré dans les fruits en développement, une régulation post-traductionnelle doit être envisagée. Cette éventuelle régulation pourrait aussi bien concerner PrSUS1 que PrSUS2.

L'orobanche accumule des quantités importantes d'amidon au cours de son développement (Singh et al., 1968; Abbes et al., 2009), environ 9% de sa matière sèche chez *P. ramosa* (**Fig. 51 C** page 198) (Draie, 2009). De nombreux travaux ont souligné l'implication probable des SuSy dans l'accumulation d'amidon au sein d'organes puits (Dejardin et al., 1997; Chourey et al., 1998; Asano et al., 2002; Fernie et al., 2002). Chez *P. ramosa*, un certain nombre de données suggèrent que PrSUS2 pourrait être impliquée dans l'accumulation d'amidon chez l'orobanche :

• PrSUS2 semble avoir les caractéristiques d'une isoforme cytosolique (**Tableau 16**), l'UDP-glucose qu'elle génère servira donc plus aisément à la synthèse d'amidon qu'à celle de composés pariétaux.

• PrSUS2 est une SUSA, or AtSUS2 (une autre SUSA) a été récemment colocalisée au niveau des grains d'amidon suggérant ainsi son rôle dans l'accumulation du polymère (Fallahi et al., 2008).

Les SuSy associées aux membranes (principalement les SUS1) sont généralement accréditées d'un rôle dans la synthèse de cellulose (Amor et al., 1995). PrSUS1 pourrait avoir une fonction physiologique différente de celle de PrSUS2 et être ainsi impliquée dans la synthèse de cellulose.

• Étude du rôle de PrSUS1

Les SuSy du groupe SUS1 sont connues pour leur rôle probable dans la synthèse de cellulose (Chourey et al., 1998). Afin de vérifier que PrSUS1 remplit ce type de fonction chez









Figure 52 : Expession tissulaire du gène PrSus1.

A Vue macroscopique d'un jeune tubercule stade III, la zone encadrée et en couleur correspond à l'extrémité en croissance d'une racine adventive. **B-E** Observations de coupes longitudinales de racines adventives. **F** Vue entière d'une coupe longitudinale de tubercule stade de transition III-IV. La zone encadrée correspond au bourgeon caulinaire apical. **G** et **H** Observations de coupes longitudinales de bourgeons apicaux. **B** et **G** Résultats d'une hybridation de sonde sens pour le gène *PrSus1*. **C** et **H** Résultats d'une hybridation de sonde antisens pour le gène *PrSus1*. **D** et **E** Observations, suite à une double coloration calcofluor/auramine-O, d'un apex (**D**) ou d'une partie basale (**E**) de racine adventive, au microscope à fluorescence. Tu: tubercule; Ra: racine adventive; m: méristème; xd: xylème (trachéide) en développement; xm: xylème (trachéide) mature; Ba: bourgeon caulinaire apical; é: écaille (primordium foliaire); p: procambium. Barre d'échelle = 500 µm.
l'orobanche, une analyse de l'expression tissulaire de PrSus1 a été menée (**Fig. 52** page 202-203). Des sondes ribonucléiques courtes (~300 pb) et spécifiques des gènes PrSus1 et PrSus2 ont été utilisées au cours d'expériences d'hybridation *in situ* sur des coupes de tubercules [jeune stade III (**Fig. 53 A**) et stade de transition III-IV (**Fig. 52 F**)]. L'absence de signal pour PrSus2 était prévisible étant donné le faible niveau d'expression du gène. En revanche, des résultats encourageants obtenus pour PrSus1 ont conduit à une optimisation de la sonde en optant pour une sonde plus longue (~1400 pb) hydrolysée en fragments d'environ 150 pb. Les résultats obtenus avec cette sonde sont présentés **Figure 52**. La sonde sens de PrSus1 ne montre aucun bruit de fond (**Fig. 52 B** et **G**).

Expression de PrSus1 dans les racines adventives (jeune stade III)

Comme cela a déjà été montré précédemment, les racines adventives d'orobanche constituent des organes puits (symplastiques) en croissance. Comme pour les autres racines de plantes, les tissus vasculaires (phloème et xylème) sont encore en développement et peu différenciés à l'apex (Taiz et Zeiger, 2002). Cela permet d'ailleurs d'expliquer pourquoi la décharge du phloème y est symplastique. La sonde antisens permet de révéler deux zones où le gène PrSus1 s'exprime spécifiquement : le méristème et les trachéides en cours de maturation (Fig. 52 C). Une coloration calcofluor/auramine-O permet d'attester que les trachéides exprimant PrSus1 sont en cours de différentiation. La double coloration permet de visualiser simultanément la cellulose et la lignine (Pesquet et al., 2005). Or, le signal fluorescent détecté à l'apex de la racine adventive est homogène pour toutes les cellules et donc cellulosique (Fig. 52 D). Les trachéides sont en train d'acquérir leur paroi secondaire. À ce stade, ce sont des cellules vivantes indifférenciées (Fig. 52 C et D). En revanche, lorsque les trachéides sont matures (cellules mortes) les parois sont imprégnées de lignine et émettent un signal fluorescent plus intense (auramine-O) (Fig. 52 E). PrSus1 est spécifiquement exprimé dans les éléments de xylème en cours de maturation. Ce résultat suggère le rôle de PrSUS1 dans la synthèse de cellulose requise pour l'acquisition des parois secondaires et est cohérent avec de nombreux autres travaux pour ce type de SuSy (Salnikov et al., 2001; Uggla et al., 2001; Gardiner et al., 2003).

Expression de PrSus1 dans les bourgeons apicaux (Stade III-IV)

Les résultats obtenus pour les bourgeons apicaux rejoignent ceux obtenus au niveau des racines adventives (**Fig. 52 H**). *PrSus1* est spécifiquement exprimé au niveau du méristème. Le transcrit est aussi retrouvé en abondance au niveau des tissus vasculaires en





A Niveau d'expression des gènes *PrInv* et *PrSus*. Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3) **B** Mesure de l'activité SuSy. **C** Teneur en amidon. Pour les mesures d'activité et les dosages d'amidon, chaque point représente la moyenne de six mesures indépendantes \pm SE (n=6). Pour les différentes données, les valeurs portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). **D** et **E** Traitement au lugol d'une graine traitée à l'eau (**D**) ou au saccharose (50 mM) (**E**). Barre d'échelle = 100 µm.

différentiation, et ce à la fois dans les écailles (*primordia* foliaires) et dans la zone procambiale. Des résultats comparables ont été obtenus pour le gène *Sus1* de tomate (Pien et al., 2001). Il est plus difficile de distinguer le xylème du phloème en cours de maturation au niveau du *procambium*. Il est probable que *PrSus1* soit aussi exprimé au sein des éléments de phloème en différentiation.

• Étude du rôle de PrSUS2

PrSUS2 pourrait jouer un rôle dans l'accumulation d'amidon chez l'orobanche rameuse. Pour tester cette hypothèse, le modèle graine préconditionnée semblait le plus approprié. En effet, à ce stade de développement, le gène *PrSus2* présente un taux de transcrit supérieur à *PrSus1*. De plus, il est possible d'induire spécifiquement l'expression de *PrSus2*, sans induire celle de *PrSus1*, en préconditionnant les graines dans une solution de saccharose 50 mM (**Fig. 50** page 196). L'expérience menée pour étudier la régulation transcriptionnelle des gènes *PrSus* par le saccharose a donc été répétée afin de voir si l'induction de l'expression de *PrSus2* est corrélée à une augmentation de l'activité SuSy, ainsi qu'à une accumulation d'amidon. Les résultats sont présentés **Figure 53**.

En présence de saccharose (50 mM), les graines d'orobanche accumulent deux fois plus de transcrits PrSus2 qu'en présence d'H₂O ou de mannitol (50 mM) (**Fig. 53 A**). Elles ont également une activité SuSy presque doublée (**Fig. 53 B**) et une teneur en amidon trois fois plus importante (**Fig. 53 C**), et ce préférentiellement au niveau de l'embryon (**Fig. 53 E**). Bien que les SuSy présentent des modes de régulation post-traductionnelle avérés, l'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une plus forte accumulation de transcrits PrSus2 dans les graines en préconditionnement entraîne une élévation du niveau d'activité SuSy accompagnée d'une accumulation accrue d'amidon. L'implication des invertases (notamment des SNI) n'étant pas exclue pour expliquer la plus forte teneur en amidon observée, il aurait d'ailleurs été intéressant de suivre l'évolution des activités invertase dans ces mêmes conditions expérimentales, et ce d'autant plus que l'expression de PrSni2 est induite par le saccharose (**Fig. 44** page 186). Remarquons néanmoins que, de toutes les enzymes de dégradation du saccharose identifiées chez *P. ramosa*, PrSUS2 est celle dont le taux de transcrit est le plus fort dans les graines préconditionnées en présence de saccharose (**Fig. 53 A**). PrSUS2 aurait donc bien un rôle dans l'accumulation d'amidon chez l'orobanche rameuse.



Figure 54 : Immunolocalisation des SuSy dans les tubercules (stade III) de P. ramosa.

Les observations sont réalisées sur des coupes transversales de tubercule. A Témoin, incubation avec le sérum pré-immun dilué au 1/100. **B-D** Essais, incubation avec un anticorps polyclonal anti-SuSy de fève (Ross et Davies, 1992) dilué au 1/100. Anticorps secondaire, anti-lapin de chèvre couplé au fluorochrome Alexa 488. Barre d'échelle = $50 \mu m$ (**A**, **B** et **C**) et $20 \mu m$ (**D**).

• Localisation cellulaire des protéines PrSUS

L'utilisation d'un anticorps spécifique d'une SuSy de fève (Ross et Davies, 1992) a permis d'identifier la localisation cellulaire des protéines PrSUS (**Fig. 54**). Les résultats obtenus sont en accord avec les rôles attribués à chacune des PrSUS. En effet, les analyses effectuées sur des coupes transversales de tubercule stade III révèlent que l'anticorps se fixe spécifiquement au niveau des parois (notamment secondaires) des trachéides (**Fig. 54 B** et **C**). Ce résultat est en accord avec le rôle supposé de PrSUS1 dans la maturation des trachéides. PrSUS1 serait ainsi localisée dans le cytoplasme, fixée à la membrane plasmique et associée à la cellulose synthétase (Amor et al., 1995) pour permettre la formation des parois secondaires des trachéides. Le fait de détecter le signal dans les parois est peut être un artéfact lié à la méthodologie. Notons toutefois que ce type d'observation a déjà été faite pour d'autres SuSy, notamment chez *Zinnia elegans* ou le tabac (Salnikov et al., 2001; Persia et al., 2008). Les SuSy peuvent être associées aux vésicules golgiennes pour la synthèse de xyloglucanes, comme c'est le cas chez le maïs (Buckeridge et al., 1999), et de ce fait se retrouver exportées dans la paroi (Persia et al., 2008).

L'anticorps s'est également spécifiquement fixé au niveau des grains d'amidon des cellules parenchymateuses et plus spécifiquement au niveau de l'enveloppe des amyloplastes (**Fig. 54 B** et **D**). Ce résultat est en accord avec le rôle supposé de PrSUS2 dans l'accumulation d'amidon.

De toute évidence, le manque de spécificité de l'anticorps utilisé ne permet pas de déterminer la localisation de chaque isoforme de SuSy d'orobanche. Seule une immunodétection spécifique de chaque PrSUS permettrait de répondre à cette question.

• Conclusion concernant le rôle des SuSy chez P. ramosa

Phelipanche ramosa possède deux gènes non-alléliques codant pour des saccharose synthétases apparentées aux deux grands groupes phylogénétiques connus, *PrSus1* (SUS1) et *PrSus2* (SUSA). Ce résultat est en accord avec ce qui existe chez d'autres espèces (Winter et Huber, 2000). L'existence d'un troisième gène non-allélique *PrSus*, appartenant au "nouveau groupe" (Komatsu et al., 2002), est suggéré par la présence d'EST aux séquences homologues à *AtSus6* dans les bases de données du PPGP. Le fait que *PrSus1* et *PrSus2* soient régulés de manière différente (**Fig. 50** page 196) et qu'ils codent pour des protéines appartenant à des



Figure 55 : Modélisation théorique de l'implication des SuSy dans la différentiation du xylème ou dans l'accumulation d'amidon dans les tissus puits de *P. ramosa*.

Ce schéma illustre un stade IV d'orobanche rameuse.

groupes différents, suggère que les PrSUS exercent des fonctions physiologiques distinctes au sein de l'orobanche (Geromel et al., 2006). Les résultats obtenus tendent à le démontrer.

L'expression du gène *PrSus1* n'est pas influencée par la teneur en saccharose. La protéine putative PrSUS1 possède également un peptide de transit pour les mitochondries, ce peptide constitue un marqueur spécifique des SUS1 (Harada et al., 2005). Chez le maïs, les SuSy SUS1 et SH1 ont effectivement été localisées à l'intérieur des mitochondries, mais leur rôle au sein de ces organelles est loin d'être établie à ce jour (Subbaiah et al., 2006).

L'ensemble de ces données concernant PrSUS1 sont compatibles avec le rôle supposé de certaines SUS1. En s'associant à la membrane plasmique, elles serraient en première ligne pour fournir les précurseurs nécessaires à la synthèse de composés tel que la cellulose (Delmer et Amor, 1995; Chourey et al., 1998). PrSUS1 pourrait avoir un rôle comparable si l'on se fie aux résultats d'expression tissulaire du gène. PrSus1 est spécifiquement exprimé au niveau des trachéides en cours de maturation, suggérant le rôle de PrSUS1 dans l'acquisition des parois secondaires cellulosiques caractéristiques des éléments de xylème fonctionnels (Fig. 55). En accord avec ce résultat, des travaux menés chez le peuplier montrent qu'une surexpression d'une SUS1 de coton entraîne une augmentation de l'activité SuSy couplée à un épaississement et une accumulation plus importante de cellulose au sein des parois secondaires du xylème en cours de développement (Coleman et al., 2009). A l'image du gène LeSus4 (Pien et al., 2001), PrSus1 est également exprimé au niveau des zones méristématiques et des régions vasculaires en cours de différentiation (primordium foliaire et procambium). Ce résultat est cohérent puisque ces régions en développement ont un besoin accru en composés pariétaux. Le rôle des SuSy dans la conservation de l'énergie pourrait favoriser la respiration cellulaire (Koch, 2004), particulièrement active au niveau des méristèmes. L'expression de PrSus1 au niveau vasculaire est compatible avec une localisation phloémienne (Wachter et al., 2003). Les SuSy sont suspectées de jouer un rôle dans la charge phloémienne (Lerchl et al., 1995), ce qui semble peu probable chez l'orobanche puisque le gène PrSus1 a été détecté uniquement dans des zones ou s'effectue la décharge, telles que l'apex des racines adventives et le bourgeon apical caulinaire.

Le gène *PrSus2* a quant à lui une activité transcriptionnelle régulée par la teneur en saccharose. C'est d'ailleurs une originalité pour un gène codant une SuSy du groupe SUSA (Kleines et al., 1999; Komatsu et al., 2002; Baud et al., 2004). Comme cela est suggéré pour d'autres SuSy (Baroja-Fernandez et al., 2009), PrSUS2 aurait un rôle dans l'accumulation d'amidon chez l'orobanche (**Fig. 55**). Sa localisation cytoplasmique supposée, ainsi que sa

plus proche relation évolutive avec AtSUS2 (Fallahi et al., 2008), tendent à corroborer un tel rôle fonctionnel. Dans les graines d'orobanche préconditionnées en présence de saccharose, le niveau d'expression de PrSus2, l'activité SuSy et la teneur en amidon augmentent significativement. A cela s'ajoute le fait que des SuSy semblent bien être localisées, à l'image de AtSUS2, au niveau de l'enveloppe des grains d'amidon (Nunez et al., 2008) (Fig. 55 page 210). L'ensemble de ces résultats convergent vers le rôle probable de PrSUS2 dans l'accumulation d'amidon. Notons que la plus forte activité SuSy détectée au sein des fruits en développement de l'orobanche pourrait notamment être due à l'action de PrSUS2. En effet, au cours de la fructification chez le café, des accumulations transitoires d'amidon sont souvent observées dans les fruits avant la maturation des graines (Geromel et al., 2006). Cette éventualité concernant l'implication de PrSUS2 nécessiterait toutefois un mode de régulation post-traductionnelle puisque le niveau d'expression de PrSus2 est stable tout au long du développement. Rappelons que la régulation de l'activité SuSy peut être complexe, une simple variation de l'état de phosphorylation de la protéine peut conditionner son activation, sa localisation et son turnover (Hardin et al., 2003; Hardin et al., 2004; Duncan et al., 2006; Hardin et al., 2006) (Fig. 25 page 90).

Les niveaux d'activité des PrSUS sont plus discrets que celui de l'invertase PrSAI1. Les rôles très spécifiques que les PrSUS semblent jouer seraient néanmoins capitaux pour le bon développement de la plante. L'orobanche est accumulatrice d'amidon, PrSUS2 contribuerait donc activement à la force de puits (Sun et al., 1992; Zrenner et al., 1995), alors que PrSUS1 apparaît essentielle dans la différentiation des tissus conducteurs.



Figure 56 : Modèle théorique de la décharge, du transport et du métabolisme du saccharose chez *P. ramosa*.

Ce modèle relate l'implication putative des 5 acteurs majeurs de la force de puits ayant été identifiés chez *P. ramosa.* A Jeune tubercule stade III. B Tubercule et tige stade IV. Tu: tubercule; Ra: racine adventive; Ti: jeune tige.

1.5 <u>Conclusions sur le puits orobanche</u>

Le saccharose étant la principale source de carbone réduit que l'orobanche prélève chez son hôte (Aber et al., 1983; Fer et al., 1987), sa capacité à le prélever et à le métaboliser est primordiale pour sa survie. L'orobanche se développe à condition de rester un puits "ultracompétitif" vis-à-vis des puits naturels de l'hôte. Dans ce contexte, le maintien d'un potentiel hydrique très bas et d'une faible concentration en saccharose permet à l'orobanche de rester attractive vis-à-vis des photoassimilats de l'hôte. Les voies métaboliques et les acteurs associés à la force de puits du parasite commencent à mieux être connus. Les travaux présentés dans ce manuscrit permettent en effet de mieux comprendre comment s'opère le passage des assimilats entre l'hôte et le parasite. L'identification d'au moins cinq acteurs majeurs permet aujourd'hui de proposer un modèle illustrant leur implication respective au sein de l'orobanche au cours de son développement parasitaire (**Fig. 56**).

Suivi du flux de saccharose et de sa décharge dans l'orobanche

Pour la première fois, la preuve a pu être apportée qu'il existe bien une continuité symplasmique fonctionnelle entre le phloème de l'hôte et celui du parasite. Les jeunes stades III de l'orobanche sont intégralement irrigués par la sève élaborée de l'hôte. Certains stades IV le sont également mais de façon non systématique. Les orobanches entrent vraisemblablement en compétition entre elles-mêmes au cours de leur croissance et ne réussissent pas toutes à maintenir le flux de sève hôte au sein de l'intégralité de leurs tissus. Pour subvenir à leurs besoins nutritionnels, les orobanches sont donc susceptibles de devoir remobiliser leurs propres réserves probablement à partir du tubercule et/ou de la hampe florale. La décharge des photoassimilats se fait de façon apoplastique dans la grande majorité des organes puits de l'orobanche, et ce à tous les stades de développement étudiés. Seules les racines adventives du tubercule sont des puits symplastiques. L'étude reste à être étendue aux stades V, des transitions dans le mode de décharge (apoplastique-symplastique) pourraient avoir lieu au niveau du tubercule ou de la hampe florale.

Cinq acteurs majeurs de la force de puits de l'orobanche

Le saccharose fourni par l'hôte est donc bien souvent directement véhiculé jusqu'aux organes puits de l'orobanche. Néanmoins, la décharge étant principalement apoplastique, cela nécessite l'intervention d'un transport actif pour alimenter les puits. Un transport direct du

saccharose *via* des transporteurs SUT semblerait être la voie de décharge privilégiée. Le transporteur PrSUT1 apparaît être l'acteur clé impliqué dans la décharge aux niveaux des puits apoplastiques du parasite. Un probable adressage au plasmalemme, une très forte accumulation de transcrits à tous les stades de développement ainsi qu'une expression phloème spécifique sont autant d'arguments qui corroborent le rôle essentiel attribué à PrSUT1. PrSUT1 est également susceptible de jouer un rôle dans la récupération phloémienne du saccharose perdu au cours de son transport au sein de la hampe florale (**Fig. 56** page 214). Enfin, il pourrait être sollicité pour la charge du phloème en cas de remobilisation des réserves à destination des organes puits. La piste d'une éventuelle localisation plastidiale de PrSUT1 reste à être approfondie. Elle pourrait apporter un éclairage nouveau et modifier les conceptions habituelles concernant les SUT.

Le transporteur PrSUT3 serait lui aussi très important pour l'orobanche, notamment et principalement au niveau des organes puits. En effet, son niveau d'expression est beaucoup plus élevé au sein des organes puits en croissance. De plus, une analyse *in silico* suggère que PrSUT3 serait tonoplastique (**Fig. 56**). Ainsi, le rôle prépondérant de PrSUT3 serait d'enrichir en saccharose le vacuome des organes puits en croissance. Le rôle de PrSUT3 serait d'autant plus important que ces organes présentent une très forte activité invertase vacuolaire.

L'un des autres acteurs essentiel de la force de puits de l'orobanche est précisément l'invertase vacuolaire PrSAI1. Elle est en effet responsable de la forte activité SAI mesurée dans les organes en croissance. Son action permet d'expliquer l'importante accumulation d'hexoses dans ces tissus. L'activité de PrSAI1 a des conséquences sur le potentiel hydrique des puits et donc sur leur force d'appel vis-à-vis du saccharose de l'hôte. Ces considérations font de PrSAI1 un acteur majeur de la force de puits de l'orobanche rameuse. Notons que le niveau d'accumulation du transcrit *PrSai1* contrôle la capacité enzymatique SAI de l'orobanche. Or, il est intéressant de constater que le transcrit *PrSai1* a un profil d'expression comparable à celui du gène *PrSUT3*. La coordination entre l'invertase vacuolaire (PrSAI1) et le transporteur tonoplastique "putatif" (PrSUT3) apparaîtrait alors comme une évidence. Cela n'est pas sans rappeler ce qui se passe généralement pour les invertases CWI couplées aux transporteurs de monosaccharides (Weber et al., 1997; Weschke et al., 2003).

Les PrSUS semblent exercer un rôle plus nuancé que PrSAI1, du moins dans les organes aériens à forte croissance. En effet, le ratio des activités SAI/SuSy est généralement élevé au cours du développement du parasite, excepté pour les jeunes stades III où il est proche de un (Draie, 2009). PrSUS1 pourrait être à l'origine du niveau d'activité SuSy mesuré

dans les jeunes tubercules. Ces derniers expriment fortement le transcrit *PrSus1* et possèdent également de nombreuses racines adventives en croissance. La maturation xylémienne à l'apex des racines adventives serait contrôlée en partie par PrSUS1 qui favoriserait la synthèse de cellulose requise pour l'acquisition des parois secondaires (**Fig. 56** page 214). Cette étape permet d'aboutir à des éléments du xylème matures et fonctionnels. Si ce rôle est généralisable à l'ensemble du parasite, la fonction de PrSUS1 serait alors capitale. En effet, l'orobanche est certes un phloème-feeder mais son développement requiert également la présence de connexions xylémiennes avec son hôte. Une perturbation dans la maturation du xylème aurait vraisemblablement des conséquences néfastes pour le parasite. PrSUS1 joue aussi un rôle au niveau des zones méristématiques, probablement également dans la synthèse de cellulose.

PrSUS2 aurait un rôle basal mais important puisqu'elle serait impliquée dans l'accumulation d'amidon au sein de l'orobanche (**Fig. 56**). PrSUS2 ne semble pas avoir de rôle particulièrement crucial à un moment précis du cycle du parasite, excepté peut être au cours de la fructification. L'orobanche n'a apparemment pas de phase où le stockage d'amidon est accru, l'amidon est accumulé de façon assez homogène jusqu'au stade fructification. Les stocks d'amidon sont probablement en perpétuelle renouvellement si l'on estime que des phases de remobilisation des réserves ont bien lieu.

Globalement ces cinq acteurs majeurs identifiés chez l'orobanche sont plus ou moins tous interconnectés. PrSUT1 jouerait un rôle central dans la décharge du phloème, son activité conditionnerait alors celle des autres acteurs. Seul PrSUS1 échappe en partie à ce constat car la décharge est symplastique à l'apex des racines adventives. PrSAI1 semble avoir l'un des rôles les plus importants dans la force de puits. Cette enzyme serait néanmoins celle dont l'activité est la plus soumise à une bonne coordination avec d'autres acteurs (PrSUT1 et PrSUT3) puisque le saccharose doit franchir une membrane supplémentaire avant d'atteindre la vacuole.

D'autres acteurs...

D'autres acteurs ont peut être un rôle important à jouer dans la force de puits de l'orobanche. Les SNI pourraient par exemple avoir une action couplée à celle de PrSUS2 dans l'accumulation d'amidon (Vargas et al., 2008). Certains travaux, menés chez *Arabidopsis thaliana*, proposent même que le rôle des SuSy n'est pas indispensable et qu'il peut être intégralement compensé par les SNI (Barratt et al., 2009). Les plantes sont effectivement

connues pour être dotées d'une grande faculté d'adaptation ("plasticité"). Néanmoins, si les SNI sont capables de compenser l'absence d'activité SuSy en condition de forte oxygénation (Bieniawska et al., 2007), rappelons qu'à l'inverse des SuSy, les invertases sont inhibées par de faibles teneur en oxygène.

Régulation de la force de puits de l'orobanche

Comprendre comment la régulation et la coordination des différents acteurs de la force de puits de l'orobanche rameuse s'opèrent est un défi complexe étant donné la multitude de voies possibles. Dans un premier temps, nous tenterons simplement de dresser une liste des différentes pistes de régulations transcriptionnelles. Il sera possible de juger si ces pistes sont intéressantes ou non à explorer.

La teneur en saccharose influe essentiellement sur l'accumulation des transcrits PrSus2 et PrSUT3 (surexpression). Or le niveau d'accumulation du transcrit PrSus2 n'évolue pas au cours du développement de l'orobanche. Ce résultat s'accorde avec le fait que la teneur en saccharose reste constamment très faible chez le parasite. Les variations du niveau d'expression du gène PrSUT3 ne seraient donc pas dues au saccharose. Le profil d'expression de PrSUT3 étant similaire à celui de PrSai1, il est possible qu'un même contrôle transcriptionnelle gouverne l'expression de ces deux gènes. Une régulation par les hexoses est envisageable d'autant qu'ils sont fortement accumulés au sein des organes affichant un plus fort taux de transcrit PrSUT3 et PrSail. Les gènes codant pour des AI sont connus en effet pour avoir une expression stimulée par les hexoses (Morris et Arthur, 1984a; Roitsch et Gonzalez, 2004). D'autres stimuli exercent aussi un contrôle sur l'expression, tels que la teneur en O₂ (gènes Sus) et la lumière (gène Sus et SUT) (Marana et al., 1990; Delrot et al., 2000). Enfin, l'une des pistes intéressantes est celle des phytohormones, les gènes SUT étant parfois régulés par les gibbérellines (Chincinska et al., 2008) et la plupart des invertases acides par les cytokinines (Ehness et Roitsch, 1997; Sokolova et al., 2002). Enfin, notons que même si les SuSy ne sont pas citées parmi les cibles de régulation par les phytohormones (Sakalo et Kurchii, 2004), il est intéressant de constater que PrSus1 est exprimé là ou l'auxine est connue pour exercer son action. L'auxine est notamment impliquée dans la maturation du xylème. Des expériences réalisées en fusionnant un promoteur inductible par l'auxine à un gène rapporteur ont démontré que l'expression de celui-ci était induite au niveau des trachéides en cours de maturation chez Arabidopsis (Aloni et al., 2003), en est-il de même pour PrSus1 ?

2. RÉGULATION DE LA FORCE DE PUITS DE *P. RAMOSA* : IMPLICATION DES PHYTOHORMONES

Les hormones végétales sont connues pour exercer une action de régulation dans de nombreux processus physiologiques et développementaux chez les plantes (Taiz et Zeiger, 2002), elles constituent de ce fait une piste privilégiée dans le cadre de l'étude de la régulation de la force de puits de *P. ramosa*.

Concernant l'orobanche, des études menées chez plusieurs espèces révèlent l'implication des phytohormones à différentes étapes du développement du parasite. Ainsi, l'étape de préconditionnement des graines de *Phelipanche ramosa* s'accompagne d'une synthèse d'éthylène et de gibbérellines (Zehhar et al., 2002). L'inhibition de la synthèse de gibbérellines affecte la capacité germinative de l'orobanche. D'autres travaux, menés chez *Orobanche minor*, ont complété l'étude précédente en démontrant que la synthèse de gibbérellines était accompagnée d'une production d'AMPc et qu'en l'absence de cette production l'orobanche perdait sa capacité germinative (Uematsu et al., 2007). La phase de germination a elle aussi été étudiée. En effet, après avoir perçu le signal chimique adéquat (des strigolactones le plus souvent), les graines d'orobanche rameuse germent en produisant et en sécrétant de l'auxine (AIA = acide indole 3-acétique) (Slavov et al., 2004). L'ensemble de ces données révèlent ainsi la capacité de l'orobanche à synthétiser elle-même au moins une partie de ses hormones.

D'autres travaux ont permis de mettre en évidence que l'orobanche pouvait également se comporter comme un puits à phytohormones et montrer une fois de plus une forme de dépendance vis-à-vis de son hôte. Ainsi, *Phelipanche aegyptiaca* serait sous la dépendance d'un approvisionnement en auxine de la part de son hôte (Bar-Nun et al., 2008). L'orobanche prélèverait abondamment l'auxine. Ainsi, la forte teneur en AIA dans les tissus du parasite serait à l'origine de l'organisation "chaotique" des tissus vasculaires au sein des tubercules. Une autre étude a elle aussi démontré, en inhibant le transport polaire de l'AIA chez l'hôte, l'implication de l'auxine-hôte dans la différentiation vasculaire du xylème de l'orobanche rameuse (Harb et al., 2004).

De plus, l'implication des phytohormones dans la régulation transcriptionnelle de certains acteurs de la force de puits est avérée (cf. conclusion du chapitre précédent).

Les résultats obtenus pour d'autres modèles de plantes ont donc servi de références et de guides pour privilégier quelques pistes dans cette étude.

2.1 La graine comme modèle d'étude

La graine d'orobanche constitue un modèle approprié pour évaluer les phénomènes de régulation indépendant de ceux pouvant être induits par l'hôte. Les travaux déjà réalisés sur le modèle graine d'orobanche permettent de poser comme hypothèse que l'auxine jouerait un rôle dans la régulation de certains gènes clés du parasite puisqu'il est clairement établi que l'orobanche rameuse synthétise et sécrète de l'AIA au cours du développement de la graine (Slavov et al., 2004).

En revanche, rien n'est connu concernant le rôle et les fluctuations en cytokinines au cours de ce processus chez le parasite. C'est pourquoi il a été jugé intéressant de caractériser certains gènes impliqués dans le métabolisme de cette famille d'hormone.

Ce modèle constitue également une opportunité de mesurer l'implication et le rôle des différents acteurs de la force de puits au cours de la phase pré-parasitaire, la régulation de leur expression par l'auxine pourra également être discutée.

• Variations du niveau d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des cytokinines au cours du développement de la graine de *P. ramosa*

Les cytokinines semblent jouer un rôle dans la régulation des invertases acides : CWI (Ehness et Roitsch, 1997) et SAI (Sokolova et al., 2002) et favorisent également la mise en place d'organes puits chez le tabac (Guivarc'h et al., 2002). Sachant le rôle primordial de PrSAI1 chez l'orobanche, il paraissait pertinent de se focaliser sur l'action éventuelle des cytokinines dans la régulation de l'activité de PrSAI1.

Afin de mieux cerner le métabolisme des cytokinines chez l'orobanche, les gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation de cette classe d'hormone ont été étudiés. Les gènes *IPT*, initialement identifiés chez *Agrobacterium tumefaciens* puis chez *Arabidopsis thaliana* (Kakimoto, 2001), codent pour des isopentényl transférases impliquées dans la synthèse des cytokinines. Les gènes *CKX*, initialement identifiés chez le maïs (Houba-Herin et al., 1999), codent pour des cytokinines oxydases responsables de la dégradation irréversible des cytokinines.

Chez l'orobanche rameuse, un ADNc partiel codant pour un gène *IPT* putatif (*PrIPT*) ainsi qu'un autre codant pour un gène *CKX* putatif (*PrCKX*) ont été clonés par RT-PCR aux moyens de couples d'amorces dégénérées. Par une stratégie de RACE-PCR, des





Les niveaux d'expression relatifs sont mesurés pour des graines d'orobanche préconditionnées ou germées (6 jours). Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif $PrEF1\alpha I$. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Pour chaque gène, les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P \leq 0,05). *PrIPT* code pour une isopentényl transférase putative, enzyme impliquée dans la biosynthèse des cytokinines. *PrCKX* code pour une cytokinine oxydase putative, enzyme impliquée dans la dégradation des cytokinines.

ADNc pleine longueur de *PrCKX* (1827 pb) et partiel de *PrIPT* ont été obtenus. Les protéines putatives (partielle ou complète) PrIPT et PrCKX partagent respectivement 65,4% et 69,6% d'identité avec AtIPT3 et AtCKX5. D'autres gènes *PrIPT* et *PrCKX* restent vraisemblablement à être identifiés puisque le génome d'arabette comporte 9 gènes *IPT* et 7 gènes *CKX*, les bases de données du PPGP pourraient nous permettre de compléter nos études.

L'analyse transcriptionnelle réalisée sur le modèle graine d'orobanche en développement consiste à comparer le niveau d'expression des gènes d'intérêts de *P. ramosa* entre des graines préconditionnées et des graines germées (six jours après stimulation au GR24).

L'évolution du taux de transcrits *PrIPT* et *PrCKX* suggère une diminution du pool en cytokinines dans les graines germées (**Fig. 57**). En effet, *PrIPT* est réprimé (répression \times 6) tandis que *PrCKX* est fortement induit (induction \times 200).

L'analyse transcriptionnelle des gènes *PrIPT* et *PrCKX* dans les graines germées présente un autre intérêt que celui de donner une indication indirecte sur l'évolution du pool hormonal. En effet, ces gènes sont considérés comme des marqueurs moléculaires répondant à une régulation par l'auxine. Que ce soit chez l'arabette ou le pois, l'auxine réprime l'expression de certains gènes *IPT* (Miyawaki et al., 2006; Tanaka et al., 2006) et induit celle de gènes *CKX* (Carabelli et al., 2007; Shimizu-Sato et al., 2009). Ainsi, la répression de l'expression de *PrIPT* et l'induction de celle de *PrCKX* dans les graines germées confirme l'implication de l'auxine dans le développement de la graine de *P. ramosa*.

• Variations du niveau d'expression et implication des acteurs de la force de puits de *P. ramosa* au cours du développement de la graine

À l'image de ce qui avait été observé durant la phase parasitaire du cycle de l'orobanche, les transcrits *PrSUT1*, *PrSai1* et *PrSus1* sont majoritairement exprimés dans les graines germées (**Fig. 58 A** page 230). Aux vues des résultats concernant les gènes *PrIPT* et *PrCKX*, l'induction de l'expression de *PrSUT1*, *PrSai1* et *PrSus1* pourrait être due à l'auxine.

PrSUT (transporteurs de saccharose)

L'expression des gènes PrSUT1 et PrSUT2 est induite dans les graines germées (induction $\times 4$ et $\times 9$ respectivement), tandis que celle du gène PrSUT3 ne l'est pas



Figure 58 : Expression des gènes impliqués dans la force de puits et activités invertasiques dans les graines préconditionnées et germées de *P. ramosa*.

A Niveau d'expression de l'ensemble des gènes *PrSUT*, *PrInv* et *PrSus*. **B** Mesure des activités SAI, SNI et CWI. **C** Mise en évidence de la nature cellulosique du procaulôme (coloration au carmin vert d'iode). Les niveaux d'expression relatifs sont mesurés pour des graines d'orobanche préconditionnées ou germées (6 jours). Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Pour chaque gène, les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). Pour les essais enzymatiques, chaque point représente la moyenne de six mesures indépendantes \pm SE (n=6). Pour chaque mesure d'activité, les valeurs portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). (**Fig. 58 A**). Une induction de l'expression par l'auxine a déjà été rapportée pour le gène *StSUT1* (Harms et al., 1994), ce qui pourrait également être le cas de *PrSUT1* et *PrSUT2*.

PrInv (invertases)

Concernant les gènes PrInv, le développement de la graine n'induit pas l'expression des gènes PrSai2 et PrCwi. Le seul gène d'orobanche codant pour une invertase acide dont l'expression est induite dans les graines germées est PrSai1. Les gènes PrSni1 et PrSni2 sont également plus exprimés (induction ×5 et ×3 respectivement) mais à un niveau moindre que PrSai1 (**Fig. 58 A**). Notons qu'à l'image de ce qui avait été constaté au cours du développement parasitaire de l'orobanche, PrSAI1 semble jouer un rôle prépondérant dans les graines germées. En effet, le transcrit PrSai1 s'accumule très peu au cours du préconditionnement, et devient très abondant dans les graines germées (induction ×900). De plus, l'induction de PrSai1 dans les graines germées s'accompagne d'une élévation de l'activité invertase vacuolaire (SAI) (**Fig. 58 B**). Ce résultat vient conforter ce qui avait été constaté précédemment, à savoir que l'activité de PrSAI1 semble majoritairement être régulée de façon transcriptionnelle (**Fig. 47** page 188). L'activité CWI est également accrue dans les graines germées (**Fig. 58 B**), cela malgré l'absence d'induction de l'expression de PrCwi. Une activité résiduelle de type SAI, ou une régulation post-transcriptionnelle du gène PrCwi à l'image de qui est observé chez le maïs (Cheng et al., 1999), pourraient expliquer ce résultat.

Le fait que l'auxine induise une très forte surexpression de *PrSai1* au cours de l'élongation du procaulôme (développement post germinatif) peut s'accorder avec ce qui est observé chez le haricot, où une action concertée entre auxine et invertase est responsable du processus d'élongation des entre-nœuds (Morris et Arthur, 1984a).

Une autre phytohormone pourrait réguler et induire de manière indirecte l'expression de *PrSai1*, il s'agirait des gibbérellines *via* l'AMPc. En effet, les gibbérellines induisent l'accumulation d'AMPc au cours du préconditionnement, et celui-ci s'avère être un métabolite secondaire indispensable à la germination du parasite (Uematsu et al., 2007). Or, chez certains microorganismes comme *Aspergillus niger*, l'AMPc est reconnu comme agent inducteur de l'expression et de l'activité des invertases (Rubio et Navarro, 2006). En admettant qu'un mécanisme de répression empêche l'expression du gène *PrSai1* au cours du préconditionnement, un rôle des gibbérellines *via* l'AMPc pourrait être envisagé pour expliquer la très forte induction de *PrSai1* au cours du développement de la graine d'orobanche.

A l'image de ce qui ce que nous avons montré dans les jeunes tiges d'orobanche, un rôle dans la croissance pourrait être attribué à PrSAI1 dans les graines germées. Au cours du développement de la graine, PrSAI1 hydrolyserait soit le saccharose issu du catabolisme des réserves lipidiques (Velasco et al., 2000) soit un autre substrat tel que le gentianose. En effet, une étude du métabolome d'*Orobanche minor* révèle que la quantité de gentianose diminue de façon importante dans les graines germées (Okazawa et al., 2009).

PrSus (saccharose synthétases)

Une fois de plus, les gènes *PrSus1* et *PrSus2* présentent une régulation transcriptionnelle très différente (**Fig. 58 A** page 230). Dans les graines germées, l'ARNm *PrSus1* s'accumule huit fois plus tandis que le transcrit *PrSus2* ne présente pas de variation significative d'accumulation. Le résultat obtenu concernant *PrSus2* est cohérent avec le fait que le saccharose, un métabolite inducteur de l'expression de *PrSus2*, ne s'accumule pas dans les graines du parasite (Delavault et al., 2002). En revanche, la surexpression de *PrSus1* dans les graines germées implique un mode de régulation différent de *PrSus2*. Une induction de son expression par l'auxine peut être suggérée puisque la synthèse et la sécrétion d'AIA sont induites dans les graines germées de l'orobanche (Slavov et al., 2004). La surexpression de *PrSus1* et l'abondance de cellulose dans le procaulôme, révélée par le carmin vert d'iode (**Fig. 58 C** page 230), sont en accord avec le rôle supposé de PrSUS1 dans la synthèse de cellulose.

• Conclusions

L'étude transcriptionnelle comparative menée sur les graines préconditionnées et germées, permet de proposer des perspectives de travail concernant la régulation transcriptionnelle des acteurs majeurs de la force de puits de *P. ramosa*. En effet, l'évolution du niveau d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des cytokinines serait alors en accord avec ce qui a déjà été montré pour d'autres espèces. Ainsi, les résultats obtenus confirmeraient qu'au cours du développement de la graine une signalisation auxinique permettrait de contrôler le niveau transcriptionnel de certains gènes de l'orobanche, aussi bien dans le sens d'une répression (*PrIPT*) que d'une induction (*PrCKX*). L'ensemble des gènes dont le niveau d'expression est accru dans les graines germées serait donc susceptible d'être régulé positivement par l'auxine, à l'image du gène *PrCKX*. Dans ce contexte, il apparaît

probable que les trois acteurs majeurs de la force de puits de l'orobanche *PrSUT1*, *PrSai1* et *PrSus1* soient induits par l'auxine.

Une régulation positive par les cytokinines paraît peu probable mais reste possible. En effet, au vu des résultats concernant les gènes *PrIPT* et *PrCKX*, le pool en cytokinines aurait tendance à diminuer dans les graines germées, cela restant à être confirmé. En revanche, une régulation négative par les cytokinines au cours du préconditionnement reste envisageable.

Enfin, notons que dans le cas de *PrSai1* une induction de l'expression par l'AMPc, impliquant indirectement les gibbérellines, n'est pas exclue.





Les niveaux d'expression relatifs sont mesurés à partir de tubercules d'orobanche (stade III) prélevés 7 semaines après infestation des appareils racinaires de l'hôte. Le traitement des plantes hôtes est réalisé 4 semaines après infestation par application au niveau de la base de l'appareil aérien d'un anneau de lanoline seule (témoin) ou de lanoline + TIBA 1% (essai). Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Pour chaque gène, les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). TIBA: acide triiodo-benzoïque = inhibiteur du transport polaire de l'auxine. *PrCCD7* code pour une "carotenoid cleavage dioxygenase" putative, enzyme impliquée dans les premières étapes de la biosynthèse des strigolactones.

2.2 Inhibition du transport polaire de l'auxine chez l'hôte par le TIBA

Afin de préciser le rôle de l'auxine dans la régulation transcriptionnelle des acteurs majeurs de la force de puits de l'orobanche, une étude semblable à celle réalisée en 2004 par Harb et ses collaborateurs a été entreprise. Cette étude a consisté à inhiber le transport polaire de l'auxine chez la tomate hôte, aux moyens de l'acide triiodo-benzoïque (TIBA), et à analyser l'impact de cette inhibition dans de jeunes tubercules d'orobanches (stade III) sur :

• Le niveau d'expression de gènes considérés comme des marqueurs moléculaires associés à une régulation par l'auxine. Ceci incluant les gènes *PrIPT* et *PrCKX* et *PrCCD7*.

• Le niveau d'expression de gènes clés de la force de puits (*PrSUT1*, *PrSai1*, *PrSus1* et *PrSus2*).

- Leur teneur en hormones (AIA et cytokinines).
- Leur phénotype.

• Impact du traitement sur les gènes impliqués dans le métabolisme de phytohormones

Pour les besoins de cette étude, un nouveau marqueur putatif a été ajouté. En se basant sur les séquences d'EST de *Phelipanche aegyptiaca* présentes dans les bases de données du PPGP (Parasitic Plant Genome Project), un couple d'amorces a été dessiné pour amplifier une région spécifique d'un transcrit codant pour une "carotenoid cleavage dioxygenase" (CCD7) putative. L'amplicon obtenu à partir des ADNc d'orobanche rameuse, nommé *PrCCD7*, apparaît spécifique. L'enzyme CCD7 est impliquée dans les premières étapes de la biosynthèse des strigolactones (Auldridge et al., 2006). Le choix de ce nouveau marqueur s'explique par le fait que les strigolactones sont des seconds messagers de l'auxine (Brewer et al., 2009).

Le traitement au TIBA a l'effet attendu pour au moins deux marqueurs moléculaires associés à une régulation par l'auxine. En effet, le traitement au TIBA de la plante hôte induit une surexpression du gène *PrIPT* (induction \times 3,5) (**Fig. 59**). Des résultats comparables ont été obtenus chez le pois où l'expression des gènes *PsIPT1* et *PsIPT2* est induite suite à une décapitation du bourgeon apical caulinaire (Ferguson et Beveridge, 2009) et celle de *PsIPT2* suite à un traitement au TIBA (Shimizu-Sato et al., 2009).



Figure 60 : Effets d'un traitement de la plante hôte (tomate) au TIBA sur l'expression les gènes *PrSUT1*, *PrSai1*, *PrSus1* et *PrSus2* de *P. ramosa*.

Les niveaux d'expression relatifs sont mesurés à partir de tubercules d'orobanche (stade III) prélevés 7 semaines après infestation des appareils racinaires de l'hôte. Le traitement des plantes hôtes est réalisé 4 semaines après infestation par application au niveau de la base de l'appareil aérien d'un anneau de lanoline seule (témoin) ou de lanoline + TIBA 1% (essai). Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Pour chaque gène, les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05).

Le traitement de la plante hôte au TIBA induit également une forte sous-expression du gène *PrCCD7* (répression \times 6) (**Fig. 59** page 236). Ce résultat concorde avec le fait que l'expression des gènes codant pour l'enzyme CCD7 est induite par l'auxine et réprimée suite à une inhibition du transport polaire de l'auxine et/ou par décapitation du bourgeon apical caulinaire chez le pois et l'arabette (Foo et al., 2005; Hayward et al., 2009; Beveridge et Kyozuka, 2010). Ces résultats suggèrent une altération de la signalisation auxinique dans les tubercules d'orobanche par un traitement de l'hôte au TIBA.

Le traitement de la plante hôte au TIBA n'a en revanche pas eu d'effet répresseur sur l'expression du gène *PrCKX* (**Fig. 59**). Ce résultat pourrait paraître surprenant sachant que l'expression de *PrCKX* serait, au même titre que *PrCCD7*, induite par l'auxine. Notons que les gènes codant pour les cytokinines oxydases ont fréquemment une expression induite par les cytokinines elles-mêmes (Brugiere et al., 2003). Si la surexpression du gène *PrIPT* conduit à une élévation de la teneur en cytokinines chez l'orobanche, cela pourrait expliquer le maintien du niveau d'expression de *PrCKX* dans les tubercules fixés à un hôte traité au TIBA.

• Impact du traitement sur les acteurs de la force de puits de P. ramosa

L'effet du TIBA sur le niveau d'expression des acteurs de la force de puits a été mesuré pour les gènes *PrSUT1*, *PrSai1*, *PrSus1* et *PrSus2* (**Fig. 60**), les trois premiers étant suspectés d'être régulés positivement par l'auxine. L'expression du gène *PrSus2* ne serait pas induite par l'auxine, ce marqueur moléculaire sert donc ici de témoin "d'insensibilité" à l'auxine.

Le traitement de l'hôte par le TIBA n'a en effet pas d'impact sur l'expression du gène *PrSus2*, cela permet donc de valider l'insensibilité de *PrSus2* à l'auxine. Le traitement au TIBA est également sans effet sur le niveau d'expression des gènes *PrSUT1* et *PrSai1* des jeunes tubercules du parasite. L'expression de ces deux gènes ne serait donc pas induite par l'auxine. La même hypothèse que celle émise pour *PrCKX* reste néanmoins envisageable pour expliquer l'absence de variation dans l'accumulation de ces transcrits suite au traitement par le TIBA. L'expression des gènes *PrSUT1* et *PrSai1* pourrait à la fois être induite par l'auxine et les cytokinines, ce type de régulation étant connue pour les gènes *CKX* (Werner et al., 2006) mais également pour un gène *SUT* de pomme de terre (Harms et al., 1994).

En revanche, il apparaît que le traitement au TIBA induit une nette sous-expression du gène PrSus1 (répression ×4) (**Fig. 60**). Ce résultat est à rapprocher de la sous-expression
également observée pour *PrCCD7*, et comparable à celle de son orthologue *AtCCD7* (Hayward et al., 2009), et suggère ainsi que l'expression du gène *PrSus1* est elle aussi induite par l'auxine.

• Impact du traitement sur les pools hormonaux

Les dosages hormonaux ont été effectués par le Plateau Spécifique de Chimie du Végétal (INRA de Versailles). Les résultats obtenus sont préliminaires et devront être répétés pour une analyse statistique. Les hormones quantifiées dans les tubercules sont l'auxine (AIA) et les cytokinines issues spécifiquement de la voie de synthèse iPRMP-dépendente (iPRMP, iPA et iP) et celles pouvant être issues à la fois de la voie de synthèse iPRMP-dépendente ou indépendante (ZRMP, ZR, ZROG tZ et cZ) (**Fig. 61** page 242) (Nordstrom et al., 2004).

Le pool d'auxine (AIA)

De façon surprenante, le pool d'AIA de l'orobanche n'est pas modifié de façon importante par le traitement de l'hôte au TIBA (**Fig. 62** page 243). La tendance serait toutefois une diminution de ce pool. Néanmoins, ces résultats sont loin de la réduction de 75% qui avait été observée par Harb et al. (2004). Si la teneur en auxine varie peu suite au traitement au TIBA, certains marqueurs moléculaires semblent pourtant attester d'une perturbation de la signalisation auxinique chez le parasite. Celle-ci pourrait donc être altérée à un autre niveau. L'hypothèse d'un effet négatif du traitement sur l'expression des récepteurs de l'auxine *AXR1* ou TIR1 peut être émise, d'autant que la "cascade AXR1-TIR1" a été identifiée comme responsable de l'induction transcriptionnelle du gène *CCD7* d'arabette et de pois (Hayward et al., 2009).

Les pools de cytokinines

Notons tout d'abord que certaines cytokinines ne sont pas détectées chez l'orobanche. C'est notamment le cas de la Zéatine riboside monophosphate (ZRMP) et de la *trans*-Zéatine (tZ) (**Fig. 62**). De ce fait, l'unique forme active de cytokinine détectée est l'Isopentényladénine (iP) (**Fig. 61** et **62**), les autres formes, l'Isopentényladénosine monophosphate (iPRMP), l'Isopentényladénosine (iPA), la Zéatine riboside (ZR) et la Zéatine riboside O-glucoside (ZROG), étant inactives. Ces cytokinines sont ainsi considérées comme des formes de stockage qui peuvent à tout moment être converties en formes actives (Hopkins, 2003). Au sein des tubercules d'orobanche, le traitement de l'hôte au TIBA induirait



Figure 61 : Voies de biosynthèse des cytokinines (Taiz et Zeiger, 2002).

Deux voies de biosynthèse existent : la voie iPRMP-dépendente et la voie iPRMP-indépendante. La voie iPRMP-dépendente est la seule à conduire à la formation d'iPA et d'iP. Des conversions étant possibles à partir des iPRMP, iPA et iP, la voie iPRMP-dépendente conduit également à la formation des cytokinines de type Zéatine (ZRMP, ZR, ZROG tZ et cZ). La voie iPRMP-indépendante permet uniquement la biosynthèse des cytokinines de type Zéatine (Nordstrom et al., 2004). iPRMP: Isopentényladénosine monophosphate; iPA: Isopentényladénosine; iP: Isopentényladénine; ZRMP: Zéatine riboside monophosphate; ZR: Zéatine riboside, ZROG: Zéatine riboside O-glucoside; tZ: *trans*-Zéatine; cZ: *cis*-Zéatine.



Figure 62 : Effets d'un traitement de la plante hôte (tomate) au TIBA sur la balance hormonale (auxine et cytokinines) de *P. ramosa*.

Les niveaux des différentes hormones sont mesurés dans des tubercules d'orobanche (stade III) prélevés 7 semaines après infestation des appareils racinaires de l'hôte. Le traitement des plantes hôtes est réalisé 4 semaines après infestation par application au niveau de la base de l'appareil aérien d'un anneau de lanoline seule (témoin) ou de lanoline + TIBA 1% (essai). Le niveau de chaque hormone représente la moyenne de deux à trois mesures indépendantes ± SE. AIA: acide indole 3-acétique; iPRMP: Isopentényladénosine monophosphate; iPA: Isopentényladénosine; iP: Isopentényladénine; ZRMP: Zéatine riboside monophosphate; ZR: Zéatine riboside, ZROG: Zéatine riboside O-glucoside; tZ: *trans*-Zéatine; cZ: *cis*-Zéatine.



Figure 63 : Effets d'un traitement de la plante hôte (tomate) au TIBA sur la morphologie des bourgeons caulinaires apicaux des tubercules de *P. ramosa*.

Les tubercules d'orobanche (stade III) sont prélevés 7 semaines après infestation des appareils racinaires de l'hôte. Le traitement des plantes hôtes est réalisé 4 semaines après infestation par application au niveau de la base de l'appareil aérien d'un anneau de lanoline seule (témoin) ou de lanoline + TIBA 1% (essai). **A** et **B** Observations de coupes longitudinales de bourgeons caulinaires apicaux de tubercules prélevés sur une plante hôte traitée à la lanoline seule. **C** et **D** Observations de coupes longitudinales de bourgeons caulinaires apicaux de tubercules prélevés sur une plante hôte traitée à la lanoline seule. **C** et **D** Observations de coupes longitudinales de bourgeons caulinaires apicaux de tubercules prélevés sur une plante hôte traitée à la lanoline + TIBA 1%. **A** et **C** Observations microscopiques en lumière blanche. **B** et **D** Observations, suite à une double coloration : calcofluor/auramine-O au microscope à fluorescence. Les flèches blanches indiquent les zones de différentiation vasculaires. **E** et **F** Observations de coupes longitudinales de bourgeons caulinaires d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage (WT = wild type : **E**) ou transgénique (surexpression d'une cytokinine oxydase *AtCKX1* : **F**) (Werner et al., 2001). Barre d'échelle = 1 mm (**A**-**D**) et 100 µm (**E** et **F**).

une légère hausse de la teneur en iP ainsi qu'une diminution des teneurs en iPRMP et iPA. Ces modifications pourraient s'expliquer par la surexpression du gène *PrIPT* dans ces conditions, l'isopentényl transférase PrIPT favorisant alors la synthèse d'iP en agissant sur la conversion des formes de stockage (iPRMP et iPA) en forme active (iP) (**Fig. 61** page 242). Cette hypothèse est confortée par le fait que, de toutes les IPT d'*Arabidopsis thaliana*, AtIPT3 est celle dont la séquence est la plus proche de la protéine putative PrIPT. Or AtIPT3 serait impliquée dans la voie iPRMP-dépendente conduisant à la synthèse des iP (Miyawaki et al., 2006).

Notons également que le traitement de l'hôte au TIBA induit chez l'orobanche une nette diminution des teneurs en ZR et ZROG (**Fig. 62** page 243). Ces cytokinines sont des formes de stockage de la Zéatine et peuvent donc être synthétisées à la fois par les voies iPRMP-dépendente et indépendante. Les isopentényl transférases AtIPT5 et AtIPT7 seraient en partie responsables de la synthèse des cytokinines de type Zéatine (Takei et al., 2003; Miyawaki et al., 2006). Il est alors intéressant de noter que l'auxine induit l'expression des gènes *AtIPT5* et *AtIPT7* (Miyawaki et al., 2004). En conséquence, le traitement de l'hôte au TIBA pourrait réduire le niveau d'expression des orthologues d'*AtIPT5* et *AtIPT7*, cela aussi bien chez l'orobanche que chez l'hôte, et ainsi expliquer les teneurs plus faibles en ZR et en ZROG dans les tissus du parasite.

• Phénotype des orobanches

Lorsque la même expérience avait été réalisée en 2004 par Harb et ses collaborateurs, le traitement de l'hôte au TIBA semblait avoir altéré le développement du xylème de l'orobanche. Les résultats obtenus au cours de notre étude semblent confirmer une désorganisation de la différentiation vasculaire (**Fig. 63 B** et **D**). Néanmoins, le phénotype le plus caractéristique obtenu suite au traitement par le TIBA est la réduction conséquente de la taille du bourgeon apical caulinaire (**Fig. 63 A-D**). L'ensemble des tubercules prélevés sur des hôtes non-traités présentent des bourgeons apicaux de type ordinaire. A contrario, la grande majorité des tubercules prélevés sur des hôtes traités au TIBA ne présentent pas de bourgeon identifiable à l'œil nu. Le tubercule présenté **Figure 63 B** et **D** est l'un des rares dont le bourgeon apical est visible. La réduction de la taille du bourgeon pourrait être du à la plus faible teneur en cytokinines ZR et ZROG au sein des tubercules. En effet, l'expression constitutive d'une cytokinine oxydase chez l'arabette provoque un phénotype comparable à celui observé chez l'orobanche (**Fig. 63 E et F**) (Werner et al., 2001). Or, la conséquence

d'une surexpression de CKX est la réduction du pool de cytokinines, à l'image de ce qui est observé dans les tubercules d'orobanche dont l'hôte est traité au TIBA (**Fig. 62** page 243).

• Conclusions

A la suite des résultats obtenus, plusieurs points importants émergent :

• Les gènes *PrIPT* et *PrCCD7* sont vraisemblablement de bons indicateurs de la régulation auxinique. Il est en revanche impossible d'affirmer l'inductibilité par l'auxine de l'expression des gènes *PrSUT1*, *PrSai1* et *PrCKX*. Finalement, seul le gène *PrSus1* semblerait avoir une régulation transcriptionnelle contrôlée positivement par l'auxine. Etant donné le rôle attribué à PrSUS1 dans la maturation du xylème, le fait que le gène *PrSus1* soit sous exprimé par le traitement au TIBA est cohérent avec l'altération de la différentiation xylémiène que Harb et ses collaborateurs (2004) avaient observée chez l'orobanche dans les mêmes conditions expérimentales.

• Dans les jeunes tubercules d'orobanche, la forme active dominante de cytokinine est l'Isopentényladénine (iP) et la forme majoritaire est la Zéatine riboside O-glucoside (ZROG), une forme de stockage. PrIPT serait probablement impliquée dans la voie de synthèse iPRMP-dépendante.

• Une réduction du pool en cytokinines de type ZR et ZROG semble affecter le bon développement des tubercules, notamment au niveau des bourgeons apicaux caulinaires. Ces résultats sont en accord avec l'importance des cytokinines dans le maintien et le bon développement des méristèmes apicaux caulinaires (Werner et al., 2001; Shani et al., 2006).

Ainsi, ces premiers éléments de réponse permettent de mettre en évidence que l'orobanche se comporte bien comme un puits à phytohormones (Bar-Nun et al., 2008). Il apparaît vraisemblable que l'orobanche soit capable de synthétiser ses propres hormones. Néanmoins, nos résultats montrent que les variations de flux hormonaux au sein de l'hôte affectent la balance hormonale du parasite, et conditionnent ainsi significativement son développement.



Figure 64 : Caractéristiques biométriques du modèle *P. ramosa/B. napus* en fonction de la variété de colza hôte.

A Masses sèches moyennes des différentes composantes du pathosystème : appareil racinaire et aérien du colza et masse totale d'orobanches fixées (tous stades confondus). **B** Stades de développement de l'orobanche. **C** Nombre moyen d'orobanches fixées (nombre total et par stade de développement) par pied de colza en fonction de sa variété. **D** Stade III et IV d'orobanches prélevées sur les deux variétés de colza. Les données sont les moyennes \pm SE (n=20). Pour chaque donnée, les valeurs portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). Tu: tubercule; Ti: tige souterraine; BH: base de la hampe florale; Hf: hampe florale émergée; F: fleurs (fruits en développement). ES Alienor: variété de colza sensible; Shakira: variété de colza à bon comportement (résistance partielle).

2.3 Le pathosystème *P. ramosa/B. napus* comme modèle d'étude

Pour les besoins de cette étude, deux variétés de colza ont été sélectionnées. La variété ES Alienor (Euralis) a été choisie pour son comportement d'hôte très favorable au développement du parasite. La variété Shakira (Maïsadour Semences) fait office de variété dite "ralentisseur" car moins favorable au développement du parasite. Ainsi, les orobanches émergent plus rapidement et en plus grand nombre sur ES Alienor que sur Shakira. (M. Gauthier, LBPV, comm. pers.).

Pour tenter d'élucider en quoi la force de puits de l'orobanche est affectée sur l'hôte Shakira, une étude comparative (ES Alienor *versus* Shakira) a été menée, visant à :

• Mieux caractériser les pathosystèmes *P. ramosa/B. napus* var. ES Alienor et Shakira.

• Déterminer dans les deux pathosystèmes le niveau d'expression de gènes considérés comme des marqueurs moléculaires associés à une régulation par l'auxine chez l'orobanche. Ceci inclue les gènes *PrIPT*, *PrCKX* et *PrCCD7*.

• déterminer le niveau d'expression des cinq gènes clés de la force de puits de l'orobanche rameuse (*PrSUT1*, *PrSUT3*, *PrSai1*, *PrSus1* et *PrSus2*) dans les deux pathosystèmes.

• déterminer la teneur en hormone (AIA et cytokinines) dans différents organes de l'orobanche fixée sur les variétés ES Alienor et Shakira.

Les trois derniers points ont été analysés sur des jeunes orobanches souterraines (stades III et IV).

• Caractéristiques du pathosystème P. ramosa/B. napus

Les colzas ont été cultivés sans étape de vernalisation sous faible amendement azoté. Les deux variétés de colza ont un développement végétatif semblable sous ces conditions (**Fig. 64 A**). Les résultats présentés **Figure 64 C**, montrent les caractéristiques des deux pathosystèmes. Ainsi, les deux variétés de colza sont parasitées par un nombre équivalent d'orobanches. L'incidence parasitaire est donc semblable sur les deux variétés. En revanche, la variété de colza influe sur le développement des orobanches fixées. En effet, tandis que sur la variété ES Alienor environ 50% des orobanches fixées ont atteint un stade avancé à la date de





Les niveaux d'expression relatifs sont mesurés à partir d'orobanches de stade III (tubercule) et IV (tubercule et tige). Le niveau de chaque transcrit est analysé par RT-qPCR et normalisé par rapport au niveau du transcrit constitutif *PrEF1a1*. Chaque point représente la moyenne de trois mesures indépendantes \pm SE (n=3). Pour chaque gène, les niveaux d'expression portant la même lettre ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, SNK, P≤0,05). ES Alienor: variété de colza sensible; Shakira: variété de colza à bon comportement (résistance partielle).

dépotage (stade V), seulement 15% de celles fixées sur la variété Shakira ont atteint un stade de développement comparable (**Fig. 64 C** page 248). A contrario, 50% des orobanches fixées sur Shakira sont au stade III contre 25% sur ES Alienor. Ces résultats traduisent un ralentissement du développement de l'orobanche sur la variété Shakira sachant que la période d'accrochage des orobanches est équivalente sur les deux variétés (M. Gauthier, LBPV, comm. pers.). La masse sèche totale des orobanches fixées sur Shakira est par ailleurs inférieure à celle fixée sur ES Alienor (**Fig. 64 A** page 248). Notons toutefois que cette différence de masse est relativement faible, du fait que les jeunes tubercules (III et IV) se développant sur la variété Shakira ont une croissance radiale conséquente, donnant naissance à des tubercules volumineux comparés à ceux observés sur ES Alienor (**Fig. 64 D** page 248).

Ainsi, la variété Shakira altère le développement souterrain de l'orobanche et plus précisément semble t-il le développement de la tige (stade IV-V). Ce type de perturbation évoque une altération de la force de puits, probablement en lien avec une dérégulation de la balance hormonale provoquée par l'hôte.

• Niveau d'expression des marqueurs moléculaires associés à une régulation par l'auxine

Le gène *PrIPT* ne présente pas ou peu de variation de son niveau d'expression en fonction du colza hôte et ce quelque soit l'organe et le stade de développement (**Fig. 65 A**). En revanche, les orobanches qui se développent sur variété Shakira se caractérisent par une nette élévation de l'accumulation des transcrits *PrCKX* et *PrCCD7* (accumulation moyenne ×4 et ×20, respectivement), aussi bien dans les tubercules et les tiges (**Fig. 65 A**). Ces résultats suggèrent en premier lieu que la balance hormonale des orobanches est effectivement différente en fonction de la variété de colza. En effet, la surexpression des gènes *PrCKX* et *PrCCD7* suggère que le parasite est soumis à une signalisation auxinique plus importante lorsqu'il se développe sur la variété Shakira. L'expression des gènes *CKX* (Werner et al., 2006; Shimizu-Sato et al., 2009) et *CCD7* (Hayward et al., 2009; Beveridge et Kyozuka, 2010) étant connue pour être surexprimée par l'auxine. La signalisation auxinique plus forte dans l'interaction *P. ramosa*/Shakira pourrait se traduire par une teneur plus élevée en AIA ou une cascade AXR1-TIR1 plus active (Hayward et al., 2009). A court terme, il conviendrait d'identifier et de suivre l'expression des gènes AXR1 et TIR1 de *P. ramosa* dans de telles conditions expérimentales.

Ainsi, ces premières constatations amènent à penser que les orobanches se développant sur la variété Shakira seraient soumises à une signalisation auxinique plus forte et une signalisation cytokinique plus faible que celles se développant sur la variété ES Alienor. Une telle dérégulation dans la signalisation hormonale pourrait expliquer les perturbations développementales de l'orobanche observées en fonction du colza hôte.

• Niveau d'expression des marqueurs moléculaires de la force de puits

L'analyse transcriptionnelle des marqueurs moléculaires associés à force de puits de l'orobanche apportent également des renseignements intéressants sur les éventuelles perturbations du métabolisme du saccharose des orobanches se développant en interaction avec la variété Shakira (**Fig. 65 B** page 250).

Ainsi, le transcrit *PrSUT1* est en moyenne deux fois moins accumulé dans les tubercules et les tiges du parasite dans le pathosystème *P. ramosa*/Shakira. Rappelons que PrSUT1 serait un acteur majeur de la décharge phloémienne du saccharose provenant de l'hôte. Une telle sous-expression du gène *PrSUT1* pourrait donc avoir pour conséquence une altération de la force de puits de l'orobanche, se traduisant par un prélèvement moins efficace des photoassimilats de l'hôte accompagné de troubles dans le développement du parasite. Puisque la surexpression des marqueurs *PrCKX* et *PrCCD7* suggèrent une signalisation auxinique plus forte lors de l'interaction *P. ramosa*/Shakira, la sous-expression de *PrSUT1* pourrait être causée par une répression *via* l'auxine.

Le niveau d'expression des gènes *PrSUT3* et *PrSai1* ne varie pas ou peu en fonction du colza hôte. Comme cela avait été suggéré auparavant, la régulation transcriptionnelle de ces deux gènes semble coordonnée au cours du développement du parasite. Aux vues des différentes hypothèses proposées jusqu'à présent, il apparaît de moins en moins probable que l'expression du gène *PrSai1* soit directement contrôlée par la signalisation auxinique ou cytokinique.

Concernant les gènes codant pour les SuSy, seul le niveau d'expression du gène *PrSus1* est soumis à des variations dépendantes de la variété hôte. Ces variations sont assez faibles, mais il est néanmoins intéressant de constater que dans l'interaction entre l'orobanche et la variété ES Alienor, le niveau d'accumulation de *PrSus1* au stade IV est deux fois plus faible dans la tige que dans le tubercule. Cette différence n'est pas observée pour les orobanches se développant sur la variété Shakira, chez qui au contraire le gène *PrSus1* est



Figure 66 : Effet de la variété de colza hôte sur la balance hormonale (auxine et cytokinines) de *P. ramosa.* Les hormones sont quantifiées à partir d'orobanches de stade III (tubercule) et IV (tubercule et tige). Le taux de chaque hormone représente la moyenne de deux à trois mesures indépendantes ± SE. AIA: acide indole 3-acétique; iPRMP: Isopentényladénosine monophosphate; iPA: Isopentényladénosine; iP: Isopentényladénine; ZRMP: Zéatine riboside monophosphate; ZR: Zéatine riboside, ZROG: Zéatine riboside O-glucoside; tZ: *trans*-Zéatine; cZ: *cis*-Zéatine. La forme active de cytokinine (iP) est entourée en rouge. ES Alienor: variété de colza sensible; Shakira: variété de colza à bon comportement (résistance partielle).

surexprimé. Ce résultat soutient l'hypothèse que l'expression de *PrSus1* est positivement régulée par la signalisation auxinique.

• Fluctuations des pools hormonaux chez P. ramosa

Les résultats obtenus concernant les dosages d'hormones sont préliminaires et devront être répétés pour réaliser une analyse statistique. Cette fois encore, la forme active dominante de cytokinine est l'Isopentényladénine (iP) et la forme majoritaire est la Zéatine riboside O-glucoside (ZROG) (**Fig. 66**).

Le pool d'auxine (AIA)

Les teneurs en auxine de l'orobanche diffèrent peu en fonction de la variété de colza (**Fig. 66**). Toutefois, alors que la teneur en AIA a tendance à diminuer dans les tubercules de stade IV dans l'interaction *P. ramosa*/ES Alienor, elle semble au contraire augmenter dans l'interaction *P. ramosa*/Shakira. Ce résultat est en accord avec le fait que plusieurs marqueurs moléculaires suggèrent qu'une plus forte signalisation auxinique est induite dans le pathosystème *P. ramosa*/Shakira.

Les pools de cytokinines

En comparant les deux interactions *P. ramosa/B. napus*, aucune différence importante dans la teneur en cytokinines de "stockage" (iPRMP, iPA, ZR et ZROG) n'a été détectée au sein de l'orobanche (**Fig. 66**). En revanche, les tubercules d'orobanche fixés sur la variété Shakira accumulent deux fois moins de cytokinine active (iP). Ces résultats sont en accord avec le fait que l'expression du gène *PrIPT* est plus importante que celle du gène *PrCKX* dans l'interaction *P. ramosa*/ES Alienor et que le contraire est observé pour l'interaction *P. ramosa*/Shakira. L'hypothèse avait déjà été émise que PrIPT soit impliquée dans la voie iPRMP-dépendante, voie responsable de la synthèse des cytokinines de type Isopentényladénine (iP). Une nouvelle hypothèse serait que PrCKX soit impliquée dans la dégradation du pool d'iP. Certaines cytokinines oxydases comme AtCKX1 et AtCKX3 sont spécifiquement localisées au niveau de la vacuole, tandis que d'autres comme AtCKX2, sont pariétales (Werner et al., 2003). L'expression du gène *AtCKX2* chez *Physcomitrella patens* entraîne une diminution de la concentration en cytokinines sont extracellulaires chez la mousse. Par ailleurs, l'application TargetP suggère que le gène *PrCKX* coderait pour une

cytokinine oxydase sécrétée dans la paroi. Ainsi, il apparaît vraisemblable que la surexpression du gène *PrCKX* au cours de l'interaction *P. ramosa*/Shakira soit à l'origine de la plus faible teneur en cytokinine active (iP) au sein des tubercules

Ainsi, les dosages d'hormones permettent de confirmer que la variété Shakira induit une dérégulation hormonale chez l'orobanche dont les effets sont perceptibles sur le développement des orobanches aux stades III et IV. Celle-ci est vraisemblablement due à une signalisation auxinique plus importante qui entraînerait, *via* la surexpression du gène *PrCKX*, la réduction du pool de cytokinines actives (iP).

Conclusions

Le modèle d'étude mettant en interaction l'orobanche rameuse avec deux variétés de colza est intéressant puisqu'il permet de mieux cerner les relations qui se créent entre la balance hormonale et la régulation de la force de puits du parasite. La variété Shakira semble empêcher le développement normal de l'orobanche par une inhibition du débourrement du bourgeon apical caulinaire.

Nos résultats suggèrent que la force de puits de l'orobanche est altérée dans le pathosystème *P. ramosa*/Shakira. Ces perturbations se traduiraient par une moindre capacité du parasite à prélever le saccharose de l'hôte. En effet, une fois fixée à la variété Shakira, l'orobanche exprime deux fois moins le gène *PrSUT1*. Toutefois, l'impact de ces perturbations sur la décharge phloémienne du saccharose et l'allocation du carbone chez le parasite restent à être précisé.

Un autre point important est que la signalisation auxinique est vraisemblablement plus importante chez l'orobanche fixée sur Shakira, comme l'atteste l'évolution du taux d'expression de quelques marqueurs moléculaires. L'amplification de la signalisation auxinique serait responsable de la surexpression du gène *PrCKX*, codant pour une cytokine oxydase pariétale putative. Il est fortement suspecté que l'action de PrCKX soit à l'origine de la réduction de la teneur en Isopentényladénine (iP) au sein des tubercules d'orobanche se développant sur la variété Shakira. La balance hormonale (auxine/cytokinine) est de ce fait perturbée. Un fort *ratio* Auxine/cytokinine, tel que celui observé pour les orobanches fixées sur la variété Shakira, est connu pour entretenir les cultures de cals en masses cellulaires indifférenciées (Taiz et Zeiger, 2002). A contrario, un *ratio* inversé peut contribuer à la

différentiation des cellules, notamment en *primordia* foliaires (Taiz et Zeiger, 2002), comme observé sur des cals de *Striga hermonthica* (Rousset et al., 2003).

Notons que certains champignons pathogènes de l'orobanche, ceux du genre *Fusarium* (Amsellem et al., 2002; Boari et Vurro, 2004), peuvent avoir des conséquences sur le développement du parasite similaires à celles observées dans l'interaction *P. ramosa*/Shakira. En effet, des souches de *Fusarium oxysporum* rendues hyper-virulentes par transgenèse inhibent sévèrement la croissance de *Phelipanche aegyptiaca* (en interaction avec la tomate), en induisant notamment une réduction du nombre et de la taille des tiges (Cohen et al., 2002). Les résultats de ces travaux sont particulièrement intéressants dans le cadre de notre étude puisque l'hyper-virulence des souches de champignons a été obtenue par surexpression des gènes de la synthèse d'acide indole 3-acétique (AIA) (Cohen et al., 2002).

Finalement, l'ensemble des données obtenues pour l'interaction *P. ramosa*/Shakira, soient une signalisation auxinique plus importante, la surexpression d'un gène (*PrCCD7*) impliqué dans la voie de biosynthèse des strigolactones et l'activation d'une cytokinine oxydase entraînant une réduction du pool de cytokinines actives, convergent vers un mode de régulation de type "dominance apicale" où l'auxine induirait, par l'intermédiaire des CKX et de ses seconds messagers (strigolactones), une répression du débourrement des bourgeons axillaires (Brewer et al., 2009; Ferguson et Beveridge, 2009; Shimizu-Sato et al., 2009). La variété Shakira serait-elle capable d'exercer une dominance apicale qui inhiberait en partie le développement de l'orobanche rameuse ? L'étude de tels mécanismes mériterait d'être approfondie, et ce notamment dans un contexte de mise au point de nouveaux moyens de lutte contre l'orobanche.



Figure 67 : Modèle hypothétique de la régulation de l'expression de *PrSUT1* dans les pathosystèmes *P. ramosa/B. napus*.

Ce modèle simplifié se base sur l'évolution de la teneur en cytokinine (iP) constatée au sein du modèle *P. ramosa/B. napus*. En rouge sont représentées les voies majoritaires en fonction de l'interaction *P. ramosa/B. napus* considérée. Les cytokinines inhibent l'induction de la synthèse d'éthylène par l'auxine (Coenen et al., 2003).

2.4 <u>Conclusions sur l'implication des phytohormones dans la régulation de</u> la force de puits de *P. ramosa*

Les résultats obtenus au cours des différentes expériences réalisées à partir des trois modèles d'étude se complètent pour déterminer l'implication des phytohormones dans la régulation transcriptionnelle des cinq acteurs majeurs de la force de puits de *P. ramosa*.

Les gènes de transporteurs de saccharose (PrSUT1 et PrSUT3)

L'expression du gène PrSUT1 est induite dans les graines germées mais réprimée dans les orobanches fixées sur la variété de colza Shakira. Ces résultats semblent contradictoires puisqu'une signalisation auxinique est mise en place dans les deux cas. Une stratégie de marche sur chromosome a permis d'identifier 560 pb de la région promotrice de PrSUT1. Une analyse in silico. réalisée avec l'application PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html), n'a pas révélé de séquences cisrégulatrices associées à une régulation phytohormonale. Cependant, il est probable que la totalité du promoteur ne nous soit pas connue. Néanmoins, le promoteur de PrSUT1 présente une séquence d'intérêt, il s'agit du motif CGAACTT (Loppes et Radoux, 2001). Ce motif a été décrit pour un gène dont l'expression est réprimée par l'ammonium. Un lien peut alors être fait entre la présence de ce motif dans la région promotrice de *PrSUT1* et le fait que le gène soit réprimé dans l'interaction P. ramosa/Shakira. En effet, la forte signalisation auxinique mise en œuvre dans cette interaction pourrait conduire à une synthèse accrue d'éthylène (Taiz et Zeiger, 2002; Coenen et al., 2003). Or la synthèse d'éthylène s'accompagne d'une production d'ammonium (Britto et Kronzucker, 2002). Quoique très spéculatif, il est possible de proposer un schéma de régulation de l'expression de PrSUT1 (Fig. 67). Nos résultats montrent que le pool de cytokinines actives de l'orobanche est plus élevé dans l'interaction impliquant la variété hôte ES Alienor. Les cytokinines sont connues pour exercer un contrôle négatif sur l'une des voies de l'auxine conduisant à la synthèse d'éthylène (Coenen et al., 2003). Les cytokinines permettraient ainsi de contrecarrer la répression de PrSUT1 par l'ammonium et d'une certaine façon, la régulation de l'expression de PrSUT1 serait induite de manière indirecte par les cytokinines (Fig. 67).

Les éléments concernant une éventuelle régulation hormonale du gène *PrSUT3* sont peu convaincants. Ils tendent à indiquer que ce gène *SUT* ne serait ni régulé par l'auxine ni par les cytokinines. En revanche, l'analyse *in silico* des 1400 pb de région promotrice identifiés



Figure 68 : Recherches d'élément *cis*-régulateur associés à une régulation de la transcription par les phytohormones (auxine et cytokinines) au sein des promoteurs de *PrSus1* et *PrCKX*.

Les séquences promotrices des gènes *PrSus1* et *PrCKX* ont été analysées à partir de l'application PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements) (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html).

pour ce gène indique sa probable régulation par les gibbérellines. En effet, trois motifs caractéristiques ont pu être identifiés (Ogawa et al., 2003; Sutoh et Yamauchi, 2003). Une régulation par les gibbérellines a par ailleurs été avancée pour le gène de pomme de terre *StSUT4* (Chincinska et al., 2008).

Le gène de l'invertase vacuolaire majoritaire (PrSai1)

La régulation transcriptionnelle de *PrSai1* par les hormones n'est pas clairement établie. Les premières données concernant la forte induction d'expression du gène dans les graines germées laissent penser qu'une régulation par l'auxine serait probable. Cependant, les résultats obtenus avec un traitement de l'hôte au TIBA et dans l'interaction *P. ramosa/B. napus* ont permis d'écarter le fait que l'expression de *PrSai1* puisse être gouvernée par l'auxine ou les cytokinines. Ainsi, une configuration identique à celle de *PrSUT3* semble se dessiner pour *PrSai1*, suggérant à nouveau que la régulation de ces deux gènes puisse être coordonnée. Une régulation de *PrSai1* par les gibbérellines pourrait être envisagée, bien que l'analyse des 400 pb de séquence promotrice du gène invertase ne révèle aucune séquence régulatrice associée aux phytohormones. Une autre hypothèse, suggérée par le modèle "graines germées", serait que l'AMPc interviendrait dans l'induction de l'expression du gène *PrSai1*. Cette sur-expression serait d'ailleurs étroitement associée à une régulation indirecte par les gibbérellines puisqu'elles sont impliquées dans l'accumulation d'AMPc au cour de la phase de préconditionnement des graines d'orobanche (Uematsu et al., 2007).

Les gènes de saccharose synthétases (SuSy) (PrSus1 et PrSus2)

Le gène *PrSus2* présente une stabilité d'expression au cours des différentes études réalisées. Le seul stimulus ayant un effet inducteur sur *PrSus2* est l'apport de saccharose exogène aux graines préconditionnées. Ce gène ne serait donc pas régulé par les phytohormones. Aux vues des résultats concernant *PrSus2*, la recherche de sa séquence promotrice n'a pas été entreprise.

L'expression du gène *PrSus1* serait quant à elle sujette à une régulation hormonale, elle serait en effet induite par l'auxine. Les différents résultats obtenus montrent que *PrSus1* se comporte comme d'autres marqueurs supposés de l'auxine *PrCKX* et *PrCCD7* (Hayward et al., 2009; Shimizu-Sato et al., 2009). L'analyse des séquences promotrices de *PrSus1* et *PrCKX* confirme d'ailleurs la présence d'éléments *cis*-régulateurs associés à une régulation positive par l'auxine (Baumann et al., 1999; Ulmasov et al., 1999; Klinedinst et al., 2000; Boyle et Brisson, 2001; Nag et al., 2005) (**Fig. 68**). Le gène *PrCKX* possède également un

élément régulateur associé à la régulation cytokinique (Fusada et al., 2005). Cela expliquerait pourquoi l'expression de *PrCKX* ne diminue pas suite au traitement de l'hôte au TIBA (Werner et al., 2006).

Le fait que l'expression de *PrSus1* puisse être induite par l'auxine est en accord avec un certain nombre de données recueillies dans nos travaux :

• PrSUS1 jouerait un rôle dans la maturation et la différentiation du xylème, ce rôle étant également attribué à l'auxine (Aloni et al., 2003).

• PrSUS1 serait particulièrement impliquée dans le développement des racines adventives des tubercules d'orobanche. Or, une forte teneur en auxine est connue pour induire la formation de racines à partir de cultures de cals (Taiz et Zeiger, 2002), y compris d'orobanche (Zhou et al., 2004).

Les jeunes tubercules d'orobanches sont les organes exprimant le plus le gène *PrSus1*. Or, la teneur en auxine serait très élevée au sein des ces organes (Bar-Nun et al., 2008).

Au cours d'un développement "normal" de l'orobanche (variété de colza ES Alienor), l'accumulation du transcrit PrSus1 est deux fois moins importante dans la jeune tige en croissance que dans le tubercule (stade IV). A contrario, au cours d'un développement "anormal" sur un hôte tel que la variété de colza Shakira, l'accumulation du transcrit PrSus1 dans la jeune tige en croissance est identique à celle mesurée dans le tubercule (stade IV). Ce phénomène pourrait à nouveau s'expliquer par l'existence d'une signalisation auxinique plus importante au cours de l'interaction P. ramosa/Shakira. Une forte signalisation auxinique favoriserait l'activité de PrSUS1 au détriment de celle de PrSAI1 et ainsi perturberait le développement de l'orobanche puisque nous avons montré au préalable le rôle majeur de PrSAI1 dans l'accumulation d'hexoses et la croissance des jeunes tiges. En accord avec cette hypothèse, le développement d'une orobanche fixée sur la variété Shakira se caractérise par une signalisation cytokinique réduite associée à une dégradation vraisemblable du pool d'iP par PrCKX. De la même manière, des plants de tabac sur-expresseurs de gènes CKX ont une force de puits altérée, avec des organes puits présentant une activité SAI réduite (Werner et al., 2008). Pour vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de mener une étude comparative des activités SuSy et SAI ainsi que du profil glucidique dans l'interaction P. ramosa/B. napus var. ES Alienor et Shakira.

Conclusion Générale et Perspectives Majeures

Dans la partie résultats discussion développée précédemment, des perspectives à court terme ont déjà été évoquées. Il apparaît que certains résultats de mes travaux permettent également d'envisager des perspectives plus larges pouvant conduire à développer de nouvelles pistes de recherches visant à approfondir nos connaissances sur la biologie de l'orobanche ainsi que sur la biologie des plantes en général.

De nouvelles connaissances sur la biologie de l'orobanche

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont souligné des points essentiels sur les mécanismes de la force de puits de *P. ramosa* et sur leur régulation.

Nous avons notamment démontré la nature symplasmique des connexions phloémiennes que l'orobanche établie avec une variété de colza hôte sensible. La méthodologie pour y parvenir est simple. Il est donc envisageable de vérifier pour une gamme d'hôtes plus large (tomate, tournesol, chanvre...) si la nature des connexions phloémienne est conservée. De nombreux travaux relatent que certains hôtes résistants à l'orobanche mettent en place des occlusions phloémienne et/ou xylémienne en guise de moyen de défense contre le parasite (El-Halmouch, 2004; Perez-de-Luque et al., 2006b; Letousey et al., 2007). L'utilisation de la carboxyfluorescéine comme traceur phloémien serait un bon moyen pour le vérifier. Une méthodologie comparable à celle que nous avons mise en place pour le traçage des flux phloémiens pourrait être employée pour connaître la nature des connexions xylémiennes. Un traceur tel que le rouge Texas pourrait être utilisé à cet effet (Birschwilks et al., 2007).

Nos résultats nous ont également permis de conclure que la force de puits de l'orobanche reposait en partie sur cinq acteurs majeurs impliqués à la fois dans le transport (PrSUT1 et PrSUT3) et le métabolisme du saccharose prélevé chez l'hôte (PrSAI1, PrSUS1 et PrSUS2). Un rôle dans l'accumulation d'hexoses vacuolaires et dans la maturation des trachéides sont respectivement avérés pour PrSAI1 et PrSUS1. En revanche, malgré le fait que nous savons désormais que la décharge phloémienne au sein des tissus puits de l'orobanche s'effectue principalement par la voie de l'apoplasme, la fonctionnalité des transporteurs PrSUT n'a pas été démontrée et reste une priorité. Concernant les SUT d'orobanche, leur localisation subcellulaire (plasmalemmique, tonoplastique ou plastidiale) reste également à être confirmée et/ou déterminée, ce qui est aussi le cas pour PrSUS2. En effet, nos résultats montrent de façon très prononcée que PrSUS2 jouerait un rôle dans l'accumulation d'amidon chez l'orobanche. Une localisation de PrSUS2 au niveau de

l'enveloppe amyloplastique est alors très probable mais demande à être précisée. Nous avons récemment fait produire des anticorps spécifiques de PrSUS1 et PrSUS2, nous devrions donc être en mesure de répondre à cette question. L'existence d'hétéro-oligomères PrSUS1-SUS2 pourra également être évaluée grâce à ces anticorps.

Nos études concernant chacune des trois familles d'acteurs auxquelles nous nous sommes intéressés pourraient être approfondies et complétées à l'aide des bases de données du Parasitic Plant Genome Project (PPGP) disponibles depuis peu. L'hypothétique transporteur d'orobanche de type SUT4, une éventuelle PrSUS appartenant au "nouveau groupe", ou bien encore une nouvelle invertase pariétale PrCWI, sont autant de pistes auxquelles nous pourrions nous intéresser afin d'affiner l'étude de la force de puits de *P. ramosa* vis-à-vis du saccharose prélevé chez l'hôte.

Nous avons également mis en évidence que des variations dans l'équilibre hormonal de l'orobanche pouvaient affecter son développement. Des marqueurs tels que PrIPT ou PrCKX semblent agir de façon importante sur les fluctuations du pool de cytokinines actives de type Isopentényladénine (iP).

Ainsi, l'ensemble des marqueurs moléculaires identifiés au cours de cette étude constituent des cibles potentielles pour valider l'efficacité d'une lutte biotechnologique contre l'orobanche. Le silencing des gènes impliqués dans le bon développement de l'orobanche pourrait être envisagé comme cela a déjà été fait pour le gène M6PR impliqué dans la synthèse de mannitol (Aly et al., 2009). Une validation préalable in planta à partir de la plante modèle Arabidopsis thaliana (exprimant des siRNA spécifiques des gènes du parasite), hôte de P. ramosa, pourrait permettre de sélectionner les gènes cibles les plus intéressants. L'extinction spécifique de ces gènes par transformation du parasite est difficilement envisageable car *P. ramosa* n'est pas transformable à ce jour. Cette approche est néanmoins possible avec Triphysaria versicolor, une plante parasite dont la transformation est maîtrisée (Tomilov et al., 2008). T. versicolor est à ce jour le seul système pour valider in planta l'implication de gènes dans le fonctionnement d'une interaction plante hôte-plante parasite. La disponibilité des banques d'EST de T. versicolor (PPGP) facilite la recherche chez cette espèce des orthologues de gènes clés de P. ramosa. Néanmoins, cette stratégie de validation de gènes candidats pourrait trouver ses limites dans le fait que T. versicolor est une plante parasite facultative chlorophyllienne principalement connectée aux tissus xylémiens de la plante hôte, tandis que l'orobanche est un parasite obligatoire non chlorophyllien et principalement connecté aux tissus phloémiens de la plante hôte. Une autre possibilité serrait



Figure 69 : Activation de l'expression du gène *hmg2* chez le tabac infesté par *P. aegyptiaca* (Westwood et al., 1998).

Tabac transgénique exprimant une construction génique : promoteur hmg2-gène rapporteur GUS. Le gène hmg2 code pour une 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR), enzyme activée durant les réactions de défenses associées à la production de phytoalexines. L'expression du gène GUS à l'interface entre l'hôte et le parasite est indiquée par une flèche blanche. hr: racine hôte. Barre d'échelle = 1 mm.

de concevoir des plantes hôtes qui surexprimeraient le gène *PrCKX* sous le contrôle d'un promoteur induit à l'interface hôte/parasite comme celui du gène *hmg2* (Westwood et al., 1998) (**Fig. 69**), la conséquence attendue serait une éventuelle perturbation du développemet du parasite à l'image de ce que nous avons observé au cours de l'interaction *P. ramosa*/Shakira. Une piste de stratégies visant à augmenter la signalisation auxinique au sein de l'orobanche est aussi à envisager pour lutter contre le parasite. Cela peut passer par une sélection et/ou une obtention [mutagénèse chimique (Kostov et al., 2007)] d'hôtes à forte dominance apicale, la création de pathogènes de l'orobanche surproducteurs d'AIA (Cohen et al., 2002), voire même l'utilisation de nanoparticules (Perez-de-Luque et Rubiales, 2009) pour acheminer de l'AIA en abondance au sein des orobanches.

De nouvelles connaissances sur la biologie des plantes en général

Les travaux réalisés au cours de cette thèse permettent aussi une meilleure compréhension de certains aspects de la biologie des plantes. Nous avons mis en évidence le fait que le gène *PrSus1* est spécifiquement exprimé au niveau de trachéides en cours de maturation. Ainsi, ce résultat conforte davantage le fait que les SuSy puissent être impliquées dans l'acquisition de parois cellulosiques secondaires au sein du xylème. Nos résultats suggèrent même, pour la première fois, que l'expression d'un gène SuSy peut être contrôlée positivement par la signalisation auxinique et être de ce fait un nouveau marqueur potentiel de la xylogénèse (Pesquet et al., 2005). Le fait que PrSUT1 puisse avoir une localisation plastidiale soulève aussi des interrogations qui ne se limitent pas à la biologie des plantes parasites. Bien que certains travaux suggèrent le fait qu'il existe des invertases SNI actives au sein d'organelles tels que les plastes (Murayama et Handa, 2007), ceux-ci ont toujours été considérés comme étant dépourvus de saccharose (Taiz et Zeiger, 2002). Les transporteurs SUT de l'enveloppe plastidiale fonctionneraient dans le sens de l'efflux (Kuhn et Grof, 2010). Il se pourrait que les SUT interviennent en "renfort" des transporteurs spécifiques du maltose pour permettre la remobilisation des réserves amylacées (Niittyla et al., 2004).

Enfin, notons que l'orobanche pourrait être un modèle approprié pour tenter de répondre à des questions sur les interconnexions entre auxine, cytokinine et strigolactone. En effet, le modèle de la germination des orobanches se prête particulièrement bien à l'étude des interactions hormonales. Nous savons que les graines d'orobanche, même préconditionnées, synthétisent de l'auxine (Slavov et al., 2004). Or celle-ci n'est sécrétée (vraisemblablement par l'intermédiaire de transporteurs PIN) qu'après que l'orobanche ait perçue un signal comme celui des strigolactones. Ainsi, des études plus approfondies sur le modèle orobanche

pourraient amener à découvrir de nouveaux rôles biologiques des strigolactones, éventuellement généralisables aux autres espèces.
Références Bibliographiques

- Abbes Z, Kharrat M, Delavault P, Chaibi W, Simier P (2009) Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed Orobanche foetida and susceptible and tolerant faba bean lines. Plant Physiol Biochem 47: 153-159
- Aber M, Fer A, Salle G (1983) Etude du transfert des substances organiques de l'hôte (Vicia faba) vers le parasite (Orobanche crenata Forsk.). Z Pflanzenphysiol Bd 112: 297-308
- Abid G, Silue S, Muhovski Y, Jacquemin JM, Toussaint A, Baudoin JP (2009) Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. Gene **439:** 1-10
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature **435**: 824-827
- Albertson PL, Peters KF, Grof CP (2001) An improved method for the measurement of cell wall invertase activity in sugarcane tissue. Australian Journal of Plant Physiology 28: 323-328
- Albrecht G, Mustroph A (2003) Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. Planta 217: 252-260
- Aldape MJ, Elmer AM, Chao WS, Grimes HD (2003) Identification and characterization of a sucrose transporter isolated from the developing cotyledons of soybean. Arch Biochem Biophys 409: 243-250
- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in Arabidopsis. Planta **216**: 841-853
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410
- Aly R (2007) Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant **43:** 304-317
- Aly R, Cholakh H, Joel DM, Leibman D, Steinitz B, Zelcer A, Naglis A, Yarden O, Gal-On A (2009) Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed Orobanche aegyptiaca through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. Plant Biotechnol J 7: 487-498
- Aly R, Dina P, Guy A (2006) Expression of sarcotoxin IA gene via a root-specific tob promoter enhanced host resistance against parasitic weeds in tomato plants. Plant Cell Rep 25: 297-303
- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP (1995) A membraneassociated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 9353-9357
- Amsellem Z, Cohen BA, Gressel J (2002) Engineering hypervirulence in a mycoherbicidal fungus for efficient weed control. Nat Biotechnol **20:** 1035-1039

- Andersen MN, Asch F, Wu Y, Jensen CR, Naested H, Mogensen VO, Koch KE (2002) Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. Plant Physiol 130: 591-604
- Aoki N, Hirose T, Takahashi S, Ono K, Ishimaru K, Ohsugi R (1999) Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter in maize (Zea mays L.). Plant Cell Physiol **40**: 1072-1078
- Aoki N, Scofield GN, Wang XD, Patrick JW, Offler CE, Furbank RT (2004) Expression and localisation analysis of the wheat sucrose transporter TaSUT1 in vegetative tissues. Planta 219: 176-184
- Aoki N, Whitfeld P, Hoeren F, Scofield G, Newell K, Patrick J, Offler C, Clarke B, Rahman S, Furbank RT (2002) Three sucrose transporter genes are expressed in the developing grain of hexaploid wheat. Plant Mol Biol 50: 453-462
- Asano T, Kunieda N, Omura Y, Ibe H, Kawasaki T, Takano M, Sato M, Furuhashi H, Mujin T, Takaiwa F, Wu Cy CY, Tada Y, Satozawa T, Sakamoto M, Shimada H (2002) Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. Plant Cell 14: 619-628
- Asthir B, Singh R (1997) Purification and characterization of neutral invertase from chickpea nodules. Indian J Biochem Biophys **34:** 529-534
- Auldridge ME, Block A, Vogel JT, Dabney-Smith C, Mila I, Bouzayen M, Magallanes-Lundback M, DellaPenna D, McCarty DR, Klee HJ (2006) Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. Plant J 45: 982-993
- Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C, Lescure B (1992) A protocol for transient gene expression in Arabidopsis thaliana protoplasts isolated from cell suspension cultures. Physiol. Biochem 30: 123-128
- Balibrea Lara ME, Gonzalez Garcia MC, Fatima T, Ehness R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. Plant Cell 16: 1276-1287
- **Bar-Nun N, Mayer AM** (1993) Preconditioning and germination of Orobanche seeds: respiration and protein synthesis. Phytochemistry **34:** 39-45
- **Bar-Nun N, Sachs T, Mayer AM** (2008) A role for IAA in the infection of Arabidopsis thaliana by Orobanche aegyptiaca. Ann Bot **101:** 261-265
- 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. Plant Cell 12: 1153-1164

- Baroja-Fernandez E, Munoz FJ, Montero M, Etxeberria E, Sesma MT, Ovecka M, Bahaji A, Ezquer I, Li J, Prat S, Pozueta-Romero J (2009) Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (Solanum tuberosum L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. Plant Cell Physiol 50: 1651-1662
- Barratt DH, Derbyshire P, Findlay K, Pike M, Wellner N, Lunn J, Feil R, Simpson C, Maule AJ, Smith AM (2009) Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. Proc Natl Acad Sci U S A **106**: 13124-13129
- Barth I, Meyer S, Sauer N (2003) PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from Plantago major. Plant Cell 15: 1375-1385
- **Baud S, Vaultier MN, Rochat C** (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. J Exp Bot **55**: 397-409
- Baud S, Wuilleme S, Lemoine R, Kronenberger J, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C (2005) The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in Arabidopsis. Plant J **43**: 824-836
- **Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G** (1999) The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. Plant Cell **11:** 323-334
- Bednarek SY, Raikhel NV (1992) Intracellular trafficking of secretory proteins. Plant Mol Biol 20: 133-150
- Ben-Hod G, Nun NB, Tzaban S, Mayer AM (1997) Inhibitors of polygalacturonase in calli of Orobanche aegyptiaca. Phytochemistry 45: 1115-1121
- Benhamou N, Grenier J, Chrispeels MJ (1991) Accumulation of beta-Fructosidase in the Cell Walls of Tomato Roots following Infection by a Fungal Wilt Pathogen. Plant Physiol 97: 739-750
- Benharrat H, Veronesi C, Theodet C, Thalouarn P (2002) Orobanche species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). Weed Research 42: 470-475
- **Beveridge CA, Kyozuka J** (2010) New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. Curr Opin Plant Biol **13:** 34-39
- Bick JA, Neelam A, Smith E, Nelson SJ, Hall JL, Williams LE (1998) Expression analysis of a sucrose carrier in the germinating seedling of Ricinus communis. Plant Mol Biol 38: 425-435
- Bieniawska Z, Paul Barratt DH, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R, Smith AM (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. Plant J 49: 810-828
- **Birschwilks M, Haupt S, Hofius D, Neumann S** (2006) Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite Cuscuta sp. J Exp Bot **57**: 911-921

- Birschwilks M, Sauer N, Scheel D, Neumann S (2007) Arabidopsis thaliana is a susceptible host plant for the holoparasite Cuscuta spec. Planta **226**: 1231-1241
- Blee KA, Anderson AJ (2002) Transcripts for genes encoding soluble acid invertase and sucrose synthase accumulate in root tip and cortical cells containing mycorrhizal arbuscules. Plant Mol Biol 50: 197-211
- **Boari A, Vurro M** (2004) Evaluation of Fusarium spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (Orobanche ramosa). BioControl **30:** 212-219
- Bocock PN, Morse AM, Dervinis C, Davis JM (2008) Evolution and diversity of invertase genes in Populus trichocarpa. Planta 227: 565-576
- Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, Geigenberger P (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. Plant Physiol 132: 2058-2072
- **Boorer KJ, Loo DD, Frommer WB, Wright EM** (1996) Transport mechanism of the cloned potato H+/sucrose cotransporter StSUT1. J Biol Chem **271**: 25139-25144
- Bouche-Pillon S, Fleurat-Lessard P, Fromont JC, Serrano R, Bonnemain JL (1994) Immunolocalization of the Plasma Membrane H+ -ATPase in Minor Veins of Vicia faba in Relation to Phloem Loading. Plant Physiol **105**: 691-697
- Bournay AS, Hedley PE, Maddison A, Waugh R, Machray GC (1996) Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. Nucleic Acids Res 24: 2347-2351
- Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S, Beale MH (2003) Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. Curr Opin Plant Biol 6: 358-364
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Becard G (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. Trends Plant Sci 12: 224-230
- **Boyle B, Brisson N** (2001) Repression of the defense gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF. Plant Cell **13:** 2525-2537
- Braun DM, Slewinski TL (2009) Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. Plant Physiol 149: 71-81
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C, Beveridge CA (2009) Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. Plant Physiol 150: 482-493
- Briskin DP, Thornley WR, Wyse RE (1985) Membrane Transport in Isolated Vesicles from Sugarbeet Taproot : II. Evidence for a Sucrose/H-Antiport. Plant Physiol **78**: 871-875
- **Britto DT, Kronzucker HJ** (2002) NH4⁺ toxicity in higher plants: a critical review. J Plant Physiol **159:** 567-584

- Brugiere N, Jiao S, Hantke S, Zinselmeier C, Roessler JA, Niu X, Jones RJ, Habben JE (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. Plant Physiol **132**: 1228-1240
- **Buckeridge MS, Vergara CE, Carpita NC** (1999) The mechanism of synthesis of a mixedlinkage (1-->3), (1-->4)beta-D-glucan in maize. Evidence for multiple sites of glucosyl transfer in the synthase complex. Plant Physiol **120**: 1105-1116
- **Burkle L, Hibberd JM, Quick WP, Kuhn C, Hirner B, Frommer WB** (1998) The H+sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. Plant Physiol **118**: 59-68
- Carabelli M, Possenti M, Sessa G, Ciolfi A, Sassi M, Morelli G, Ruberti I (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. Genes Dev 21: 1863-1868
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R (2005) Phloemlocalized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. J Biol Chem 280: 21437-21443
- Castejon-Munoz M, Romero-Munoz F, Garcia-Torres L (1993) Effect of planting date on broomrape (orobanche cernua Loefl.) infections in sunflower (Helianthus annuus). Weed Research 33: 171-176
- **Cheng WH, Taliercio EW, Chourey PS** (1996) The Miniature1 Seed Locus of Maize Encodes a Cell Wall Invertase Required for Normal Development of Endosperm and Maternal Cells in the Pedicel. Plant Cell **8**: 971-983
- **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. Proc Natl Acad Sci U S A **96:** 10512-10517
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res 31: 3497-3500
- Chincinska IA, Liesche J, Krugel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kuhn C (2008) Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. Plant Physiol **146**: 515-528
- Chiou TJ, Bush DR (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 4784-4788
- Chourey PS, Nelson OE (1979) Interallelic Complementation at the sh Locus in Maize at the Enzyme Level. Genetics 91: 317-325
- Chourey PS, Taliercio EW (1994) Epistatic interaction and functional compensation between the two tissue- and cell-specific sucrose synthase genes in maize. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 7917-7921

- Chourey PS, Taliercio EW, Carlson SJ, Ruan YL (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. Mol Gen Genet **259**: 88-96
- **Clancy M, Hannah LC** (2002) Splicing of the maize Sh1 first intron is essential for enhancement of gene expression, and a T-rich motif increases expression without affecting splicing. Plant Physiol **130**: 918-929
- Cobb BG, Hannah LC (1988) Shrunken-1 Encoded Sucrose Synthase Is Not Required for Sucrose Synthesis in the Maize Endosperm. Plant Physiol 88: 1219-1221
- Coenen C, Christian M, Luthen H, Lomax TL (2003) Cytokinin inhibits a subset of diageotropica-dependent primary auxin responses in tomato. Plant Physiol 131: 1692-1704
- Cohen BA, Amsellem Z, Maor R, Sharon A, Gressel J (2002) Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic Acid confers hypervirulence to plant pathogens. Phytopathology 92: 590-596
- **Coïc Y, Lesaint C** (1975) La nutrition minérale et en eau des plantes en horticulture avancée. La Documentation Technique de la SCPA **23:** 1-22
- Coleman HD, Yan J, Mansfield SD (2009) Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 13118-13123
- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME, Egley GH (1966) Germination of Witchweed (Striga lutea Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. Science 154: 1189-1190
- de Zelicourt A, Letousey P, Thoiron S, Campion C, Simoneau P, Elmorjani K, Marion D, Simier P, Delavault P (2007) Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in Orobanche parasitic plants. Planta 226: 591-600
- **Decourteix M, Alves G, Brunel N, Ameglio T, Guillio A, Lemoine R, Petel G, Sakr S** (2006) JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (Juglans regia L.). Plant Cell Environ 29: 36-47
- Dejardin A, Rochat C, Maugenest S, Boutin JP (1997) Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (Pisum sativum L.). Planta 201: 128-137
- Delavault P, Simier P, Thoiron S, Veronesi C, Fer A, Thalouarn P (2002) Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (Orobanche ramosa) parasitic on tomato roots. Physiol Plant 115: 48-55
- **Delavault P, Thalouarn P** (2002) The obligate root parasite Orobanche cumana exhibits several rbcL sequences. Gene **297:** 85-92
- Delmer DP, Amor Y (1995) Cellulose biosynthesis. Plant Cell 7: 987-1000

- **Delrot S** (1981) Proton Fluxes Associated with Sugar Uptake in Vicia faba Leaf Tissues. Plant Physiol **68:** 706-711
- Delrot S, Atanassova R, Maurousset L (2000) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. Biochim Biophys Acta 1465: 281-306
- **DeWitt ND, Sussman MR** (1995) Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H(+)-ATPase) in phloem companion cells. Plant Cell **7:** 2053-2067
- Dor E, Alperin B, Wininger S, Ben-Dor B, Somvanshi VS, Koltai H, Kapulnik Y, Hershenhorn J (2010) Characterization of a novel tomato mutant resistant to the weedy parasites Orobanche and Phelipanche spp. Euphytica 171: 371-380
- **Dorion S, Lalonde S, Saini HS** (1996) Induction of Male Sterility in Wheat by Meiotic-Stage Water Deficit Is Preceded by a Decline in Invertase Activity and Changes in Carbohydrate Metabolism in Anthers. Plant Physiol **111:** 137-145
- Dörr I (1997) How Striga parasitizes its host: a TEM and SEM study. Ann Bot 79: 463-472
- Dörr I, Kollmann R (1995) Symplasmic sieve element continuity between Orobanche and its host. Botanica acta 108: 47-55
- **Draie R** (2009) Effet du greffage sur la productivité de la tomate en condition de non infestation et d'infestation par l'orobanche. Caractérisation d'une invertase acide, enzyme majeure de la force de puits du parasite. Université de Nantes, Nantes
- **Dube MP, Olivier A** (2001) Striga gesnerioides and its host, cowpea: interaction and methods of control. Canadian Journal of Botany **79:** 1225-1240
- **Duncan KA, Hardin SC, Huber SC** (2006) The three maize sucrose synthase isoforms differ in distribution, localization, and phosphorylation. Plant Cell Physiol **47:** 959-971
- Echevarria-Zomeno S, Perez-de-Luque A, Jorrin J, Maldonado AM (2006) Pre-haustorial resistance to broomrape (Orobanche cumana) in sunflower (Helianthus annuus): cytochemical studies. J Exp Bot 57: 4189-4200
- **Eckardt NA** (2003) The Function of SUT2/SUC3 Sucrose Transporters: The Debate Continues. Plant Cell **15:** 1259-1262
- **Ehness R, Roitsch T** (1997) Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in Chenopodium rubrum by cytokinins. Plant J **11**: 539-548
- **El-Halmouch Y** (2004) Recherche de mécanismes de résistance à l'orobanche chez des génotypes de tomate: aspects histologiques, physiologiques, moléculaires et génétiques. Université de Nantes, Nantes
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol **300:** 1005-1016

- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. Plant Physiol 141: 196-207
- Eschrich W (1980) Free space invertase, its possible role in phloem unloading. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 93: 363-378
- **Etxeberria E, Gonzalez P** (2003) Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole. J Exp Bot **54:** 1407-1414
- Evidente A, Andolfi A, Fiore M, Boari A, Vurro M (2006) Stimulation of Orobanche ramosa seed germination by fusicoccin derivatives: a structure-activity relationship study. Phytochemistry 67: 19-26
- Fallahi H, Scofield GN, Badger MR, Chow WS, Furbank RT, Ruan YL (2008) Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of Arabidopsis thaliana reveals diverse roles for SUS during development. J Exp Bot 59: 3283-3295
- Fan RC, Peng CC, Xu YH, Wang XF, Li Y, Shang Y, Du SY, Zhao R, Zhang XY, Zhang LY, Zhang DP (2009) Apple sucrose transporter SUT1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars. Plant Physiol 150: 1880-1901
- Fennoy SL, Nong T, Bailey-Serres J (1998) Transcriptional and posttranscriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. Plant J 15: 727-735
- Fer A, De Bock F, Renaudin S, Rey L, Thalouarn P (1987) Relations trophiques entre les Angiospermes parasites et leurs hôtes respectifs. II- Voies de transport et mécanismes impliqués dans le transfert des substances trophiques à l'interface hôte-parasite. Bulletin de la Société Botanique de France 134: 109-120
- Fer A, Thalouarn P (1997) L'orobanche: une menace pour nos cultures. Phytoma 499: 34-40
- Ferguson BJ, Beveridge CA (2009) Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. Plant Physiol 149: 1929-1944
- Fernie AR, Willmitzer L, Trethewey RN (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. Trends Plant Sci 7: 35-41
- **Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C, Beveridge CA** (2005) The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. Plant Cell **17:** 464-474
- Fridman E, Zamir D (2003) Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato, and Arabidopsis. Plant Physiol **131**: 603-609
- Fu H, Kim SY, Park WD (1995a) High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato Sus4 sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. Plant Cell 7: 1387-1394

- **Fu H, Kim SY, Park WD** (1995b) A potato Sus3 sucrose synthase gene contains a contextdependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissuespecific effects. Plant Cell **7:** 1395-1403
- **Fusada N, Masuda T, Kuroda H, Shimada H, Ohta H, Takamiya K** (2005) Identification of a novel cis-element exhibiting cytokinin-dependent protein binding in vitro in the 5'-region of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase gene in cucumber. Plant Mol Biol **59:** 631-645
- Gahrtz M, Schmelzer E, Stolz J, Sauer N (1996) Expression of the PmSUC1 sucrose carrier gene from Plantago major L. is induced during seed development. Plant J 9: 93-100
- **Gahrtz M, Stolz J, Sauer N** (1994) A phloem-specific sucrose-H+ symporter from Plantago major L. supports the model of apoplastic phloem loading. Plant J **6:** 697-706
- Gal-On A, Naglis A, Leibman D, Ziadna H, Kathiravan K, Papayiannis L, Holdengreber V, Guenoune-Gelbert D, Lapidot M, Aly R (2009) Broomrape can acquire viruses from its hosts. Phytopathology 99: 1321-1329
- Gallagher JA, Cairns AJ, Pollock CJ (2004) Cloning and characterization of a putative fructosyltransferase and two putative invertase genes from the temperate grass Lolium temulentum L. J Exp Bot 55: 557-569
- Gardiner JC, Taylor NG, Turner SR (2003) Control of cellulose synthase complex localization in developing xylem. Plant Cell 15: 1740-1748
- Geigenberger P, Stitt M (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. Planta 189: 329-339
- Geiger DR, Giaquinta RT, Sovonick SA, Fellows RJ (1973) Solute Distribution in Sugar Beet Leaves in Relation to Phloem Loading and Translocation. Plant Physiol 52: 585-589
- Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SM, Cavalari AA, Pot D, Pereira LF, Leroy T, Vieira LG, Mazzafera P, Marraccini P (2006) Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (Coffea arabica) fruit development. J Exp Bot 57: 3243-3258
- Giaquinta RT (1979) Phloem Loading of Sucrose: Involvement of Membrane ATPase and Proton Transport. Plant Physiol 63: 744-748
- Giaquinta RT (1983) Phloem loading of sucrose. Annual Review of Plant Physiologie 34: 347-387
- Gibot-Leclerc S, Brault M, Pinochet X, Sallé G (2003) [Potential role of winter rape weeds in the extension of broomrape in Poitou-Charentes]. C R Biol **326**: 645-658
- Gibot-Leclerc S, Corbineau F, Sallé G, Côme D (2004) Responsiveness of Orobanche ramosa L. seeds to seeds to GR24 as related to temperature, oxygen availability and water potential during preconditionning and subsequent germination. Plant Growth Regulation 43: 63-71

- Godt DE, Roitsch T (1997) Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. Plant Physiol 115: 273-282
- Goetz M, Godt DE, Guivarc'h A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T (2001) Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 6522-6527
- Goetz M, Godt DE, Roitsch T (2000) Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggests a role for steroid hormones in assimilate partitioning. Plant J 22: 515-522
- Goetz M, Roitsch T (1999) The different pH optima and substrate specificities of extracellular and vacuolar invertases from plants are determined by a single amino-acid substitution. Plant J 20: 707-711
- Goldwasser Y, Plakhine D, Yoder JI (2000) Arabidopsis thaliana susceptibility to Orobanche spp. Weed Science 48: 342-346
- Goldwasser Y, Yoder JI (2001) Differential induction of Orobanche seed germination by Arabidopsis thaliana. Plant Sci 160: 951-959
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature 455: 189-194
- Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O (1999) Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. Plant Physiol 120: 867-878
- **Greiner S, Krausgrill S, Rausch T** (1998) Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. Plant Physiol **116**: 733-742
- 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. Plant J 5: 815-826
- **Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV** (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. Plant Cell **7:** 1879-1891
- Guivarc'h A, Rembur J, Goetz M, Roitsch T, Noin M, Schmulling T, Chriqui D (2002) Local expression of the ipt gene in transgenic tobacco (Nicotiana tabacum L. cv. SR1) axillary buds establishes a role for cytokinins in tuberization and sink formation. J Exp Bot 53: 621-629
- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie AR, Grimm B, Kuhn C (2006) Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. Plant J 45: 180-192

- Haidar MA, Bibi W, Sidahmed MM (2003) Response of branched broomrape (Orobanche ramosa) growth and development to various soil amendments in potato. Crop Protection 22: 291-294
- Haidar MA, Sidahmed MM, Darwish R, Lafta A (2005) Selective control of Orobanche ramosa in potato with rimsulfuron and sub-lethal doses of glyphosate. Crop Protection 24: 743-747
- 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. J Exp Bot 54: 467-475
- Haouazine-Takvorian N, Tymowska-Lalanne Z, Takvorian A, Tregear J, Lejeune B, Lecharny A, Kreis M (1997) Characterization of two members of the Arabidopsis thaliana gene family, At beta fruct3 and At beta fruct4, coding for vacuolar invertases. Gene 197: 239-251
- Harada T, Satoh S, Yoshioka T, Ishizawa K (2005) Expression of sucrose synthase genes involved in enhanced elongation of pondweed (Potamogeton distinctus) turions under anoxia. Ann Bot **96:** 683-692
- Harb AM, Hameed KM, Shibli RA (2004) Effect of Triiodobenzoic Acid on Broomrape (Orobanche ramosa) Infection and Development in Tomato Plants. Plant Pathology Journal 20(2): 81-84
- Hardin SC, Duncan KA, Huber SC (2006) Determination of structural requirements and probable regulatory effectors for membrane association of maize sucrose synthase 1. Plant Physiol 141: 1106-1119
- Hardin SC, Tang GQ, Scholz A, Holtgraewe D, Winter H, Huber SC (2003) Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis. Plant J 35: 588-603
- Hardin SC, Winter H, Huber SC (2004) Phosphorylation of the amino terminus of maize sucrose synthase in relation to membrane association and enzyme activity. Plant Physiol 134: 1427-1438
- Harloff HJ, Wegmann K (1987) Mannitol pathway in Orobanche. In HC Weber, W Forstreuter, eds, Parasitic Flowering Plants, Proceedings of the 4th International Symposium on Parasitic Flowering Plants. Philipps-Universität, Marburg, F.R.G., pp 295-309
- Harloff HJ, Wegmann K (1993) Evidence for a mannitol cycle in Orobanche ramosa and Orobanche crenata. Journal of Plant Physiology 141: 513-520
- Harms K, Wohner RV, Schulz B, Frommer WB (1994) Isolation and characterization of Ptype H(+)-ATPase genes from potato. Plant Mol Biol **26:** 979-988
- Harrington GN, Franceschi VR, Offler CE, Patrick JW, Tegeder M, Frommer WB, Harper JF, Hitz WD (1997) Cell specific expression of three genes involved in plasma membrane sucrose transport in developing Vicia faba seed. Protoplasma 197: 160-173

- Hashizume H, Tanase K, Shiratake K, Mori H, Yamaki S (2003) Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit. Phytochemistry 63: 125-129
- Haupt S, Oparka KJ, Sauer N, Neumann S (2001) Macromolecular trafficking between Nicotiana tabacum and the holoparasite Cuscuta reflexa. J Exp Bot 52: 173-177
- Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C, Leyser O (2009) Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. Plant Physiol **151**: 400-412
- Hibberd JM, Jeschke WD (2001) Solute flux into parasitic plants. J Exp Bot 52: 2043-2049
- Hibberd JM, Quick WP, Press MC, Scholes JD, Jeschke WD (1999) Solute fluxes from tobacco to the parasitic angiosperm Orobanche cernua and the influence of infection on host carbon and nitrogen relations. Plant, Cell and Environement 22: 937-947
- Hicke L, Riezman H (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. Cell 84: 277-287
- Hicke L, Zanolari B, Riezman H (1998) Cytoplasmic tail phosphorylation of the alphafactor receptor is required for its ubiquitination and internalization. J Cell Biol 141: 349-358
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield GN, Furbank RT, Ohsugi R (1997) cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (Oryza sativa L.). Plant Cell Physiol **38**: 1389-1396
- **Hirose T, Takano M, Terao T** (2002) Cell wall invertase in developing rice caryopsis: molecular cloning of OsCIN1 and analysis of its expression in relation to its role in grain filling. Plant Cell Physiol **43**: 452-459
- Hopkins WG (2003) Physiologie Végétale. De Boeck Université, 536 pages.
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. Nucleic Acids Res 35: W585-587
- Houba-Herin N, Pethe C, d'Alayer J, Laloue M (1999) Cytokinin oxidase from Zea mays: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. Plant J 17: 615-626
- Hsiao CC, Fu RH, Sung HY (2002) A novel bound form of plant invertase in rice suspension cells. Botanical Bulletin of Academia Sinica 43: 115-122
- Huber SC, Huber JL, Liao PC, Gage DA, McMichael RW, Jr., Chourey PS, Hannah LC, Koch K (1996) Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in vivo and possible regulatory significance. Plant Physiol 112: 793-802
- Ishimaru K, Hirose T, Aoki N, Takahashi S, Ono K, Yamamoto S, Wu J, Saji S, Baba T, Ugaki M, Matsumoto T, Ohsugi R (2001) Antisense expression of a rice sucrose transporter OsSUT1 in rice (Oryza sativa L.). Plant Cell Physiol **42**: 1181-1185
- Isla MI, Vattuone MA, Ordonez RM, Sampietro AR (1999) Invertase activity associated with the walls of Solanum tuberosum tubers. Phytochemistry 50: 525-534

Jang JC, Sheen J (1994) Sugar sensing in higher plants. Plant Cell 6: 1665-1679

- Ji X, Van den Ende W, Van Laere A, Cheng S, Bennett J (2005) Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of rice. J Mol Evol 60: 615-634
- Jin Y, Ni DA, Ruan YL (2009) Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. Plant Cell 21: 2072-2089
- **Joel DM** (2009) Taxonomic and evolutionary justifications for considering Phelipanche as a separate genus. In: Proceedings of the10th world congress on parasitic plants, D Rubiales, J Westwood, A Uludag (eds.). Kusadasi, Turkey, pp 15
- Joel DM, Kleifeld Y, Losner-Goshen D, Herzlinger G, Gressel J (1995) Transgenic crops against parasites. Nature 374: 220-221
- Joel DM, Losner-Goshen D (1994) The attachment organ of the parasitic angiosperms Orobanche cumana and O. aegyptiaca and its development. canadian Journal of Botany 72: 564-574
- **Jurado-Exposito M, Castejon-Munoz M, Garcia-Torres L** (1999) Uptake and translocation of imazethapyr in peas as affected by parasitism of Orobanche crenata and herbicide application methods. Weed Research **39**: 129-136
- **Kakimoto T** (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. Plant Cell Physiol **42:** 677-685
- Karuppiah N, Vadlamudi B, Kaufman PB (1989) Purification and characterization of soluble (cytosolic) and bound (cell wall) isoforms of invertases in barley (Hordeum vulgare) elongating stem tissue. Plant Physiol **91:** 993-998
- **Kebreab E, Murdoch AJ** (1999) A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of Orobanche spp. J Exp Bot **50**: 211-219
- King SP, Lunn JE, Furbank RT (1997) Carbohydrate Content and Enzyme Metabolism in Developing Canola Siliques. Plant Physiol **114:** 153-160
- Klann EM, Chetelat RT, Bennett AB (1993) Expression of Acid Invertase Gene Controls Sugar Composition in Tomato (Lycopersicon) Fruit. Plant Physiol **103**: 863-870
- Klann EM, Hall B, Bennett AB (1996) Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. Plant Physiol **112**: 1321-1330
- Klein O, Kroschel J (2002) Biological control of Orobanche spp. with Phytomyza orobanchia, a review. BioControl 47: 245-277
- Kleines M, Elster RC, Rodrigo MJ, Blervacq AS, Salamini F, Bartels D (1999) Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant Craterostigma plantagineum (Hochst.). Planta **209:** 13-24

- Klinedinst S, Pascuzzi P, Redman J, Desai M, Arias J (2000) A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. Plant Mol Biol **42:** 679-688
- **Knop C, Stadler R, Sauer N, Lohaus G** (2004) AmSUT1, a sucrose transporter in collection and transport phloem of the putative symplastic phloem loader Alonsoa meridionalis. Plant Physiol **134**: 204-214
- Knop C, Voitsekhovskaja O, Lohaus G (2001) Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. Planta **213**: 80-91
- Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Curr Opin Plant Biol 7: 235-246
- Koch KE (1996) Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 509-540
- Koch KE, Nolte KD, Duke ER, McCarty DR, Avigne WT (1992) Sugar Levels Modulate Differential Expression of Maize Sucrose Synthase Genes. Plant Cell **4:** 59-69
- Koch KE, Tsui CL, Schrader LE, Nelson OE (1982) Source-Sink Relations in Maize Mutants with Starch-Deficient Endosperms. Plant Physiol **70**: 322-325
- Koch KE, Ying Z, Wu Y, Avigne WT (2000) Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. J Exp Bot 51 Spec No: 417-427
- Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, Omura M, Akihama T (2002) Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. J Exp Bot 53: 61-71
- Kostov R, Batchvarova R, Slavov S (2007) Application of Chemical Mutagenesis to Increase the Resistance of Tomato to Orobanche ramosa L. Bulgarian Journal of Agricultural Science 13: 505-513
- **Kreutz CAJ** (1995) Orobanche, The European broomrape species. A field guide, Ed Stichting Natuurpublicaties. De Boer Cuperus, Maastricht
- Krugel U, Veenhoff LM, Langbein J, Wiederhold E, Liesche J, Friedrich T, Grimm B, Martinoia E, Poolman B, Kuhn C (2008) Transport and sorting of the solanum tuberosum sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. Plant Cell 20: 2497-2513
- Kuhn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. Science 275: 1298-1300
- Kuhn C, Grof CP (2010) Sucrose transporters of higher plants. Curr Opin Plant Biol 13: 288-298

- Kuhn C, Hajirezaei MR, Fernie AR, Roessner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer WB (2003) The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. Plant Physiol 131: 102-113
- Kuijt J, Toth R (1976) Ultrastructure of angiosperm Haustoria a review. Annals of Botany 40: 1121-1130
- Kusumoto D, Goldwasser Y, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y, Yoneyama K (2007) Resistance of red clover (Trifolium pratense) to the root parasitic plant Orobanche minor is activated by salicylate but not by jasmonate. Ann Bot **100**: 537-544
- Labrousse P (2002) Contribution à l'étude de la résistance de différents génotypes d'Helianthus (Astéracées) à Orobanche cumana Wallr. (Orobanchacées). Université de Nantes, Nantes
- Labrousse P, Arnaud MC, Griveau Y, Fer A, Thalouarn P (2004) Analysis of resistance criteria of sunflower recombined inbred lines against Orobanche cumana Wallr. Crop Protection 23: 407-413
- Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM (1999) The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing. Plant Cell **11**: 707-726
- Lammens W, Le Roy K, Schroeven L, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W (2009) Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. J Exp Bot 60: 727-740
- Lammens W, Le Roy K, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W (2008) Crystal structures of Arabidopsis thaliana cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. J Mol Biol 377: 378-385
- Langhans M, Ratajczak R, Lutzelschwab M, Michalke W, Wachter R, Fischer-Schliebs E, Ullrich CI (2001) Immunolocalization of plasma-membrane H+-ATPase and tonoplast-type pyrophosphatase in the plasma membrane of the sieve element-companion cell complex in the stem of Ricinus communis L. Planta 213: 11-19
- Lauterbach C, Niedermeier M, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N (2007) Immunolocalization of the PmSUC1 sucrose transporter in Plantago major flowers and reporter-gene analyses of the PmSUC1 promoter suggest a role in sucrose release from the inner integument. Plant Biol (Stuttg) 9: 357-365
- Lee HS, Sturm A (1996) Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. Plant Physiol **112**: 1513-1522
- Lemoine R (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. Biochim Biophys Acta 1465: 246-262
- Lemoine R, Burkle L, Barker L, Sakr S, Kuhn C, Regnacq M, Gaillard C, Delrot S, Frommer WB (1999) Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. FEBS Lett **454**: 325-330

- Lenton JR (1984) Are plant growth substances involved in the partitioning of assimilate to developing reproductive sinks? Plant Growth Regulation 2: 267-276
- Lerchl J, Geigenberger P, Stitt M, Sonnewald U (1995) Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. Plant Cell 7: 259-270
- Letousey P, De Zelicourt A, Vieira Dos Santos C, Thoiron S, Monteau F, Simier P, Thalouarn P, Delavault P (2007) Molecular analysis of resistance mechanisms to Orobanche cumana in sunflower. Plant Pathology **53**: 536-546
- Lewis D, Smith D (1967) Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. New Phytol **66**: 143-184
- Liesche J, Schulz A, Krugel U, Grimm B, Kuhn C (2008) Dimerization and endocytosis of the sucrose transporter StSUT1 in mature sieve elements. Plant Signal Behav 3: 1136-1137
- Loescher WH (1987) Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. Physiol Plant 70: 553-557
- Loescher WH, Tyson RH, Everard JD, Redgwell RJ, Bieleski RL (1992) Mannitol synthesis in higher plants. Evidence for the role and characterization of a NADPH-dependent mannose-6-phosphate reductase. Plant Physiol **98**: 1396-1402
- Lopez-Raez JA, Matusova R, Cardoso C, Jamil M, Charnikhova T, Kohlen W, Ruyter-Spira C, Verstappen F, Bouwmeester H (2008) Strigolactones: ecological significance and use as a target for parasitic plant control. Pest Manag Sci 65: 471-477
- Loppes R, Radoux M (2001) Identification of short promoter regions involved in the transcriptional expression of the nitrate reductase gene in Chlamydomonas reinhardtii. Plant Mol Biol 45: 215-227
- Lorenz K, Lienhard S, Sturm A (1995) Structural organization and differential expression of carrot beta-fructofuranosidase genes: identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme. Plant Mol Biol 28: 189-194
- Losner-Goshen D, Portnoy VH, Mayer AM, Joel DM (1998) Pectinolytic activity by the haustorium of parasitic Orobanche L. (Orobanchaceae) in host roots. Ann Bot 81: 319-326
- Lozano-Baena MD, Prats E, Moreno MT, Rubiales D, Perez-de-Luque A (2007) Medicago truncatula as a model for nonhost resistance in legume-parasitic plant interactions. Plant Physiol 145: 437-449
- Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ (2005) Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. Science **309**: 1567-1569
- Lu CA, Lim EK, Yu SM (1998) Sugar response sequence in the promoter of a rice alphaamylase gene serves as a transcriptional enhancer. J Biol Chem 273: 10120-10131

- Ludwig A, Stolz J, Sauer N (2000) Plant sucrose-H+ symporters mediate the transport of vitamin H. Plant J 24: 503-509
- Marana C, Garcia-Olmedo F, Carbonero P (1990) Differential expression of two types of sucrose synthase-encoding genes in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. Gene 88: 167-172
- Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklof J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. Plant Cell **14**: 589-597
- Marger MD, Saier MH, Jr. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. Trends Biochem Sci 18: 13-20
- Martin T, Frommer WB, Salanoubat M, Willmitzer L (1993) Expression of an Arabidopsis sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. Plant J 4: 367-377
- Martinoia E, Massonneau A, Frangne N (2000) Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. Plant Cell Physiol **41**: 1175-1186
- Matsushita K, Uritani I (1974) Change in Invertase Activity of Sweet Potato in Response to Wounding and Purification and Properties of Its Invertases. Plant Physiol **54**: 60-66
- Matusova R, Rani K, Verstappen FW, Franssen MC, Beale MH, Bouwmeester HJ (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic Striga and Orobanche spp. are derived from the carotenoid pathway. Plant Physiol **139**: 920-934
- Mauromicale G, Restuccia G, Marchese M (2001) Soil solarization, a non-chemical technique for controlling Orobanche crenata and improving yield of faba bean. Agronomie 21: 757-765
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N (2004) Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. Plant Physiol **134**: 684-693
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hummer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N (2000) AtSUC3, a gene encoding a new Arabidopsis sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. Plant J 24: 869-882
- Miller ME, Chourey PS (1992) The Maize Invertase-Deficient miniature-1 Seed Mutation Is Associated with Aberrant Pedicel and Endosperm Development. Plant Cell 4: 297-305
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. Plant J **37:** 128-138
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 16598-16603
- Mondolot L, Roussel JL, Andary C (2001) New applications for an old lignified element staining reagent. Histochem J 33: 379-385
- Mor A, Mayer AM, Levine A (2008) Possible peroxidase functions in the interaction between the parasitic plant, Orobanche aegyptiaca, and its host, Arabidopsis thaliana. Weed Biology and Management 8: 1-10
- Morell M, Copeland L (1984) Enzymes of Sucrose Breakdown in Soybean Nodules: Alkaline Invertase. Plant Physiol 74: 1030-1034
- Morris DA, Arthur ED (1984a) Invertase and auxin-induced elongation in internodal segments of Phaseolus vulgaris. Phytochemistry 23: 2163-2167
- Morris DA, Arthur ED (1984b) An association between acid invertase activity and cell growth during leaf epansion in Phaseolus vulgaris L. j Exp Bot 35: 1369-1379
- Morris DA, Arthur ED (1985) Invertase activity, carbohydrate metabolism and cell expansion in the stem of Phaseolus vulgaris L. J Exp Bot **36**: 623-633
- Münch E (1930) Die Stoffbewegungen in der Pflanze Gustav Fischer, Jena, Germany
- Murayama S, Handa H (2007) Genes for alkaline/neutral invertase in rice: alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids. Planta 225: 1193-1203
- Nag R, Maity MK, Dasgupta M (2005) Dual DNA binding property of ABA insensitive 3 like factors targeted to promoters responsive to ABA and auxin. Plant Mol Biol **59**: 821-838
- Nakai T, Konishi T, Zhang XQ, Chollet R, Tonouchi N, Tsuchida T, Yoshinaga F, Mori H, Sakai F, Hayashi T (1998) An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by in vitro phosphorylation or directed mutagenesis of Ser11. Plant Cell Physiol **39**: 1337-1341
- Nandula VK, Westwood JH, Foster JG, Foy CL (2001) Influence of glyphosate on amino acid composition of Egyptian broomrape. J Agric Food Chem **49:** 1524-1528
- Neuhaus HE (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. FEBS Lett **581:** 2223-2226
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH (2001) A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. J Exp Bot 52: 881-889
- Niittyla T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. Science 303: 87-89
- **Noiraud N, Delrot S, Lemoine R** (2000) The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. Plant Physiol **122**: 1447-1455

- Nonis A, Ruperti B, Pierasco A, Canaguier A, Adam-Blondon AF, Di Gaspero G, Vizzotto G (2008) Neutral invertases in grapevine and comparative analysis with Arabidopsis, poplar and rice. Planta 229: 129-142
- Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K, Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 8039-8044
- Nunez JG, Kronenberger J, Wuilleme S, Lepiniec L, Rochat C (2008) Study of AtSUS2 localization in seeds reveals a strong association with plastids. Plant Cell Physiol **49**: 1621-1626
- O'Reilly G, Clarke F (1993) Identification of an actin binding region in aldolase. FEBS Lett 321: 69-72
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. Plant Cell 15: 1591-1604
- Ohyama A, Ito H, Sato T, Nishimura S, Imai T, Hirai M (1995) Suppression of Acid Invertase Activity by Antisense RNA Modifies the Sugar Composition of Tomato Fruit. Plant Cell Physiol 36: 369-376
- Okazawa A, Joseph B, Bamba T, Fukusaki E, Yoneyama K, Takeuchi Y, Sugimoto Y, Kobayashi A (2009) Metabolome analysis of Orobanche minor seed germination for selective control of parasitic weeds. In: Proceedings of the10th world congress on parasitic plants, D Rubiales, J Westwood, A Uludag (eds.). Kusadasi, Turkey, pp 27
- Olmstead RG, dePamphilis CW, Wolfe AD, Young ND, Elisons WJ, Reeves PA (2001) Disintegration of the Scrophulariaceae. Am J Bot 88: 348-361
- **Overvoorde PJ, Frommer WB, Grimes HD** (1996) A soybean sucrose binding protein independently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeast. Plant Cell **8:** 271-280
- Ozcan S, Dover J, Johnston M (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Embo J 17: 2566-2573
- Pagny S, Denmat-Ouisse LA, Gomord V, Faye L (2003) Fusion with HDEL protects cell wall invertase from early degradation when N-glycosylation is inhibited. Plant Cell Physiol 44: 173-182
- Parker C (2009) Observations on the current status of Orobanche and Striga problems worldwide. Pest Manag Sci 65: 453-459
- Pate JS, Kuo J, Davidson NJ (1990) Morphology and anatomy of the haustorium of the rrot hemiparasite Olax phyllanthi (Olacaceae), with special reference to the haustorial interface. Annals of Botany 65: 425-436
- Pelleschi S, Guy S, Kim JY, Pointe C, Mahe A, Barthes L, Leonardi A, Prioul JL (1999) Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Genespecific expression under water stress. Plant Mol Biol **39**: 373-380

- **Pennypacker BW, Nelson PE, Wilhelm S** (1979) Anatomic changes resulting from the parasitism of Tomato by Orobanche ramosa. Phytopathology **69**: 741-748
- Perez-de-Luque A, Gonzalez-Verdejo CI, Lozano MD, Dita MA, Cubero JI, Gonzalez-Melendi P, Risueno MC, Rubiales D (2006a) Protein cross-linking, peroxidase and beta-1,3-endoglucanase involved in resistance of pea against Orobanche crenata. J Exp Bot 57: 1461-1469
- Perez-de-Luque A, Lozano MD, Cubero JI, Gonzalez-Melendi P, Risueno MC, Rubiales
 D (2006b) Mucilage production during the incompatible interaction between
 Orobanche crenata and Vicia sativa. J Exp Bot 57: 931-942
- Perez-de-Luque A, Rubiales D (2009) Nanotechnology for parasitic plant control. Pest Manag Sci 65: 540-545
- Perez-de-Luque A, Rubiales D, Cubero JI, Press MC, Scholes J, Yoneyama K, Takeuchi Y, Plakhine D, Joel DM (2005) Interaction between Orobanche crenata and its host legumes: unsuccessful haustorial penetration and necrosis of the developing parasite. Ann Bot 95: 935-942
- Perez-Vich B, Akhtouch B, Knapp SJ, Leon AJ, Velasco L, Fernandez-Martinez JM, Berry ST (2004) Quantitative trait loci for broomrape (Orobanche cumana Wallr.) resistance in sunflower. Theor Appl Genet 109: 92-102
- Perez de Luque A, Fondevilla S, Perez-Vich B, Aly R, Thoiron S, Delgrange S, Simier P, Delavault P (2009) Understanding broomrape-host plant interaction and developing resistance. Weed Research 49: 8-22
- Persia D, Cai G, Del Casino C, Faleri C, Willemse MT, Cresti M (2008) Sucrose synthase is associated with the cell wall of tobacco pollen tubes. Plant Physiol **147**: 1603-1618
- Pesquet E, Ranocha P, Legay S, Digonnet C, Barbier O, Pichon M, Goffner D (2005) Novel markers of xylogenesis in zinnia are differentially regulated by auxin and cytokinin. Plant Physiol **139**: 1821-1839
- **Pien S, Wyrzykowska J, Fleming AJ** (2001) Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. Plant J **25:** 663-674
- **Pieterse AH** (1979) The broomrapes (Orobanchaceae) a review. Abstracts on Tropical Agriculture **5:** 9-35
- Plakhine D, Ziadna H, Joel DM (2009) Is seed conditioning essential for Orobanche germination? Pest Manag Sci 65: 492-496
- Plaza L, Fernandez I, Juan R, Pastor J, Pujadas A (2004) Micromorphological studies on seeds of orobanche species from the iberian peninsula and the balearic islands, and their systematic significance. Ann Bot 94: 167-178

- Privat I, Foucrier S, Prins A, Epalle T, Eychenne M, Kandalaft L, Caillet V, Lin C, Tanksley S, Foyer C, McCarthy J (2008) Differential regulation of grain sucrose accumulation and metabolism in Coffea arabica (Arabica) and Coffea canephora (Robusta) revealed through gene expression and enzyme activity analysis. New Phytol 178: 781-797
- **Proels RK, Hause B, Berger S, Roitsch T** (2003) Novel mode of hormone induction of tandem tomato invertase genes in floral tissues. Plant Mol Biol **52:** 191-201
- **Purcell PC, Smith AM, Halford NG** (1998) Antisense expression of a sucrose nonfermenting-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. Plant J 14: 195-202
- Quiroga EN, Vattuone MA, Sampietro AR (1995) Purification and characterization of the invertase from Pycnoporus sanguineus. Biochim Biophys Acta 1251: 75-80
- Radomiljac AM, McComb JA, McGrath JF (1999) Intermediate host influences on the hemi-parasite Santalum album L. biomass and partitioning. Forest Ecology and Management 113: 143-153
- Rae AL, Perroux JM, Grof CP (2005) Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. Planta 220: 817-825
- Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R, Sauer N (2004) Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. Plant Physiol **134**: 147-160
- Rausch T, Greiner S (2004) Plant protein inhibitors of invertases. Biochim Biophys Acta 1696: 253-261
- **Raynal-Roques A, Paré J** (1998) Biodiversité des Phanérogames parasites : leur place dans la classification systématique. Adansonia **20:** 313-322
- **Reidel EJ, Turgeon R, Cheng L** (2008) A maltose transporter from apple is expressed in source and sink tissues and complements the Arabidopsis maltose export-defective mutant. Plant Cell Physiol **49**: 1607-1613
- 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. Plant Cell 14: 1567-1577
- Reinders A, Sivitz AB, Hsi A, Grof CP, Perroux JM, Ward JM (2006) Sugarcane ShSUT1: analysis of sucrose transport activity and inhibition by sucralose. Plant Cell Environ 29: 1871-1880
- Reinders A, Sivitz AB, Starker CG, Gantt JS, Ward JM (2008) Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from Lotus japonicus. Plant Mol Biol 68: 289-299

- Ricard B, Rivoal J, Spiteri A, Pradet A (1991) Anaerobic stress induces the transcription and translation of sucrose synthase in rice. Plant Physiol 95: 669-674
- **Ricard B, Toai TV, Chourey P, Saglio P** (1998) Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. Plant Physiol **116**: 1323-1331
- **Ricardo CP, Ap Rees T** (1970) Invertase activity during the development of carrot roots. Phytochemistry **9:** 239-247
- **Riesmeier JW, Hirner B, Frommer WB** (1993) Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. Plant Cell **5:** 1591-1598
- **Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB** (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. Embo J **11**: 4705-4713
- **Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB** (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. Embo J **13**: 1-7
- **Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM, Murray JA** (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. Mol Cell Biol **20**: 4513-4521
- **Ripp KG, Viitanen PV, Hitz WD, Franceschi VR** (1988) Identification of Membrane Protein Associated with Sucrose Transport Into Cells of Developing Soybean Cotyledons. Plant Physiol **88**: 1435-1445
- **Robert S, Simier P, Fer A** (1999) Purification and characterization of the mannose 6phosphate reductase, a potential target for the control of Striga hermonthica and Orobanche ramosa. Australian Journal of Plant Physiology **26**: 251-255
- Roberts AG, Cruz SS, Roberts IM, Prior D, Turgeon R, Oparka KJ (1997) Phloem Unloading in Sink Leaves of Nicotiana benthamiana: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. Plant Cell 9: 1381-1396
- Roblin G, Sakr S, Bonmort J, Delrot S (1998) Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. FEBS Lett **424**: 165-168
- Rohrig H, Schmidt J, Miklashevichs E, Schell J, John M (2002) Soybean ENOD40 encodes two peptides that bind to sucrose synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 1915-1920
- Roitsch T (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. Curr Opin Plant Biol 2: 198-206
- 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 Physiol **108**: 285-294
- **Roitsch T, Ehness R** (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. Plant Growth Regulation **32:** 359-367

- Roitsch T, Gonzalez MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. Trends Plant Sci 9: 606-613
- Rojo E, Zouhar J, Carter C, Kovaleva V, Raikhel NV (2003) A unique mechanism for protein processing and degradation in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 7389-7394
- Rolland N, Ferro M, Seigneurin-Berny D, Garin J, Douce R, Joyard J (2003) Proteomics of chloroplast envelope membranes. Photosynth Res 78: 205-230
- Rolletschek H, Borisjuk L, Koschorreck M, Wobus U, Weber H (2002) Legume embryos develop in a hypoxic environment. J Exp Bot **53**: 1099-1107
- Roman B, Torres AM, Rubiales D, Cubero JI, Satovic Z (2004) Mapping of quantitative trait loci controlling broomrape (Orobanche crenata Forsk.) resistance in faba bean (Vicia faba L.). Genome 45: 1057-1063
- Ross HA, Davies HV (1992) Purification and Characterization of Sucrose Synthase from the Cotyledons of Vicia faba L. Plant Physiol **100:** 1008-1013
- Ross HA, McRae D, Davies HV (1996) Sucrolytic Enzyme Activities in Cotyledons of the Faba Bean (Developmental Changes and Purification of Alkaline Invertase). Plant Physiol 111: 329-338
- Rousset A, Simier P, Fer A (2003) Characterisation of simple in vitro cultures of Striga hermonthica suitable for metabolic studies. Plant Biol 5: 265-273
- Ruan YL, Llewellyn DJ, Furbank RT (2003) Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. Plant Cell 15: 952-964
- **Rubio MC, Navarro AR** (2006) Regulation of invertase synthesis in Aspergillus niger. Enzyme Microbial Technol **39:** 601-606
- **Rujan T, Martin W** (2001) How many genes in Arabidopsis come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. Trends Genet **17:** 113-120
- Saftner RA, Wyse RE (1984) Effect of Plant Hormones on Sucrose Uptake by Sugar Beet Root Tissue Discs. Plant Physiol 74: 951-955
- Sakalo VD, Kurchii VM (2004) Hormonal Control of Sucrose Phosphate Synthase and Sucrose Synthase in Sugar Beet. Russ J Plant Physiol 51: 183-188
- Sakr S, Noubahni M, Bourbouloux A, Riesmeier J, Frommer WB, Sauer N, Delrot S (1997) Cutting, ageing and expression of plant membrane transporters. Biochim Biophys Acta 1330: 207-216
- Salnikov VV, Grimson MJ, Delmer DP, Haigler CH (2001) Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements. Phytochemistry 57: 823-833

- Salnikov VV, Grimson MJ, Seagull RW, Haigler CH (2003) Localization of sucrose synthase and callose in freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibers. Protoplasma 221: 175-184
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2nd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, New York.
- Sander A, Krausgrill S, Greiner S, Weil M, Rausch T (1996) Sucrose protects cell wall invertase but not vacuolar invertase against proteinaceous inhibitors. FEBS Lett 385: 171-175
- Sato D, Awad AA, Takeuchi Y, Yoneyama K (2005) Confirmation and quantification of strigolactones, germination stimulants for root parasitic plants Striga and Orobanche, produced by cotton. Biosci Biotechnol Biochem 69: 98-102
- Sauer N (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. FEBS Lett 581: 2309-2317
- Sauer N, Ludwig A, Knoblauch A, Rothe P, Gahrtz M, Klebl F (2004) AtSUC8 and AtSUC9 encode functional sucrose transporters, but the closely related AtSUC6 and AtSUC7 genes encode aberrant proteins in different Arabidopsis ecotypes. Plant J 40: 120-130
- Sauer N, Stolz J (1994) SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from Arabidopsis thaliana; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. Plant J 6: 67-77
- Schneeweiss GM, Colwell A, Park JM, Jang CG, Stuessy TF (2004) Phylogeny of holoparasitic Orobanche (Orobanchaceae) inferred from nuclear ITS sequences. Mol Phylogenet Evol **30**: 465-478
- Scholes JD, Press MC (2008) Striga infestation of cereal crops an unsolved problem in resource limited agriculture. Curr Opin Plant Biol **11:** 180-186
- Schulz A, Kuhn C, Riesmeier JW, Frommer WB (1998) Ultrastructural effects in potato leaves due to antisense-inhibition of the sucrose transporter indicate an apoplasmic mode of phloem loading. Planta 206: 533-543
- Schulze W, Weise A, Frommer WB, Ward JM (2000) Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. FEBS Lett **485**: 189-194
- Schulze WX, Reinders A, Ward J, Lalonde S, Frommer WB (2003) Interactions between co-expressed Arabidopsis sucrose transporters in the split-ubiquitin system. BMC Biochem 4: 3
- Scofield GN, Aoki N, Hirose T, Takano M, Jenkins CL, Furbank RT (2007) The role of the sucrose transporter, OsSUT1, in germination and early seedling growth and development of rice plants. J Exp Bot 58: 483-495
- Seel WE, Jeschke WD (1999) Simultaneous collection of xylem sap from Rhinanthus minor and the hosts Hordeum and Trifolium: hydraulic properties, xylem sap composition and effects of attachment. New Phytol 143: 281-298

- Serghini K, Perez de Luque A, Castejon-Munoz M, Garcia-Torres L, Jorrin JV (2001) Sunflower (Helianthus annuus L.) response to broomrape (Orobanche cernua Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. J Exp Bot 52: 2227-2234
- Shakya R, Sturm A (1998) Characterization of source- and sink-specific sucrose/H+ symporters from carrot. Plant Physiol 118: 1473-1480
- Shani E, Yanai O, Ori N (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function. Curr Opin Plant Biol 9: 484-489
- Shimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. Plant Mol Biol 69: 429-435
- Shiratake K (2007) Genetics of sucrose transporter in plants. Genes, Genomes and Genomics 1: 73-80
- Simier P, Renaudin S, Fer A (1994) Characteristics of the mannitol pathway in a root hemiparasitic species, Thesium humile Vahl. (Santalaceae). J Plant Physiol 143: 33-38
- Simpson CG, Hedley PE, Watters JA, Clark GP, McQuade C, Machray GC, Brown JW (2000) Requirements for mini-exon inclusion in potato invertase mRNAs provides evidence for exon-scanning interactions in plants. Rna 6: 422-433
- Singh M, Singh DV, Misra PC, Tewari KK, Krishnan PS (1968) Biochemical aspects of parasitism by angiosperm parasites: starch accumulation. Physiologia Plantarum 21: 525-538
- Sivitz AB, Reinders A, Johnson ME, Krentz AD, Grof CP, Perroux JM, Ward JM (2007) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. Plant Physiol 143: 188-198
- Slavov S, Valkov V, Batchvarova R, Atanassova S, Alexandrova M, Atanassov A (2005) Chlorsulfuron resistant transgenic tobacco as a tool for broomrape control. Transgenic Res 14: 273-278
- Slavov S, van Onckelen H, Batchvarova R, Atanassov A, Prinsen E (2004) IAA production during germination of Orobanche spp. seeds. J Plant Physiol 161: 847-853
- Slewinski TL, Meeley R, Braun DM (2009) Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. J Exp Bot 60: 881-892
- Smeekens S (2000) Sugar-Induced Signal Transduction in Plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **51:** 49-81
- Smeekens S, Rook F (1997) Sugar Sensing and Sugar-Mediated Signal Transduction in Plants. Plant Physiol 115: 7-13
- Smith D, Muscatine L, Lewis D (1969) Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis. Biol Rev 44: 17-90

- Sokolova SV, Balakshina NO, Krasavina MS (2002) Activation of Soluble Acid Invertase Accompanies the Cytokinin-Induced Source–Sink Leaf Transition. Russ J Plant Physiol **49:** 86-91
- Song WJ, Zhou WJ, Jin ZL, Cao DD, Joel DM, Takeuchi Y, Yoneyama K (2005) Germination response of Orobanche seeds subjected to conditioning temperature, water potential and growth regulator treatments. Weed Research **45**: 467-476
- Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JA (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. Plant Cell **7:** 85-103
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M, Sauer N (1995) Phloem Loading by the PmSUC2 Sucrose Carrier from Plantago major Occurs into Companion Cells. Plant Cell 7: 1545-1554
- Stadler R, Lauterbach C, Sauer N (2005b) Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in Arabidopsis seeds and embryos. Plant Physiol **139**: 701-712
- Stadler R, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N (1999) The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in Arabidopsis. Plant J 19: 269-278
- Stadler R, Wright KM, Lauterbach C, Amon G, Gahrtz M, Feuerstein A, Oparka KJ, Sauer N (2005a) Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. Plant J 41: 319-331
- Stewart GR, Nour J, MacQueen M, Shah N (1984) Aspects of the biochemistry of Striga. In: Ayensu ES, Dogett H, Keynes RD, Marton-Lefevre J, Musselman L, Parker C, Pickering A (eds) Striga Biology and Control. ICSU Press, Paris, pp 161–178
- Stewart GR, Press MC (1990) The physiologiy and biochemistry of parasitic angiosperms. Annual Review of Plant Physiologie and Plant Molecular Biology **41**: 127-151
- Stolz J, Ludwig A, Stadler R, Biesgen C, Hagemann K, Sauer N (1999) Structural analysis of a plant sucrose carrier using monoclonal antibodies and bacteriophage lambda surface display. FEBS Lett 453: 375-379
- Sturm A (1996) Molecular characterisation and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot (*Daucus carota* L.). J Exp Bot 47: 1187-1192
- Sturm A (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiol 121: 1-8
- Sturm A, Chrispeels MJ (1990) cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. Plant Cell 2: 1107-1119
- Sturm A, Hess D, Lee HS, Lienhard S (1999) Neutral invertase is a novel type of sucrosecleaving enzyme. Physiologia Plantarum **107:** 159-165

- Sturm A, Tang GQ (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. Trends Plant Sci 4: 401-407
- Subbaiah CC, Palaniappan A, Duncan K, Rhoads DM, Huber SC, Sachs MM (2006) Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize. J Biol Chem 281: 15625-15635
- Subbaiah CC, Sachs MM (2001) Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings. Plant Physiol 125: 585-594
- Subbaiah CC, Sachs MM (2003) Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. Ann Bot **91 Spec No:** 119-127
- Sun J, Loboda T, Sung SJ, Black CC (1992) Sucrose Synthase in Wild Tomato, Lycopersicon chmielewskii, and Tomato Fruit Sink Strength. Plant Physiol 98: 1163-1169
- Sutoh K, Yamauchi D (2003) Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. Plant J 34: 635-645
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. Genes Dev 15: 2648-2653
- Szarka A, Horemans N, Passarella S, Tarcsay A, Orsi F, Salgo A, Banhegyi G (2008) Demonstration of an intramitochondrial invertase activity and the corresponding sugar transporters of the inner mitochondrial membrane in Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) tubers. Planta 228: 765-775
- Taiz L, Zeiger E (2002) Plant Physiology. 3 edn.
- Takei K, Dekishima Y, Eguchi T, Yamaya T, Sakakibara H (2003) A new method for enzymatic preparation of isopentenyladenine-type and trans-zeatin-type cytokinins with radioisotope-labeling. J Plant Res 116: 259-263
- Tan S, Evans RR, Dahmer ML, Singh BK, Shaner DL (2005) Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. Pest Manag Sci 61: 246-257
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. Plant J 45: 1028-1036
- Tang T, Xie H, Wang Y, Lu B, Liang J (2009) The effect of sucrose and abscisic acid interaction on sucrose synthase and its relationship to grain filling of rice (Oryza sativa L.). J Exp Bot 60: 2641-2652
- Tang X, Ruffner HP, Scholes JD, Rolfe SA (1996) Purification and characterisation of soluble invertases from leaves of Arabidopsis thaliana. Planta 198: 17-23
- Tegeder M, Wang XD, Frommer WB, Offler CE, Patrick JW (1999) Sucrose transport into developing seeds of Pisum sativum L. Plant J 18: 151-161

- **Thomas B, Webb JA** (1978) Distribution of alpha-Galactosidase in Cucurbita pepo. Plant Physiol **62:** 713-717
- Thomas BR, Rodriguez RL (1994) Metabolite Signals Regulate Gene Expression and Source/Sink Relations in Cereal Seedlings. Plant Physiol **106**: 1235-1239
- Tomilov AA, Tomilova NB, Abdallah I, Yoder JI (2005) Localized hormone fluxes and early haustorium development in the hemiparasitic plant Triphysaria versicolor. Plant Physiol 138: 1469-1480
- Tomilov AA, Tomilova NB, Wroblewski T, Michelmore R, Yoder JI (2008) Transspecific gene silencing between host and parasitic plants. Plant J 56: 389-397
- **Topfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH** (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. Nucleic Acids Res **15**: 5890
- **Trouverie J, Chateau-Joubert S, Thevenot C, Jacquemot MP, Prioul JL** (2004) Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. Planta **219:** 894-905
- **Trouverie J, Thevenot C, Rocher JP, Sotta B, Prioul JL** (2003) The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. J Exp Bot **54:** 2177-2186
- **Truernit E, Sauer N** (1995) The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H+ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. Planta **196:** 564-570
- Tsukaya H, Ohshima T, Naito S, Chino M, Komeda Y (1991) Sugar-Dependent Expression of the CHS-A Gene for Chalcone Synthase from Petunia in Transgenic Arabidopsis. Plant Physiol 97: 1414-1421
- **Turgeon R, Gowan E** (1990) Phloem Loading in Coleus blumei in the Absence of Carrier-Mediated Uptake of Export Sugar from the Apoplast. Plant Physiol **94:** 1244-1249
- Tymowska-Lalanne Z, Kreis M (1998a) The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. Advances in Botanical Research 28: 71-117
- **Uematsu K, Nakajima M, Yamaguchi I, Yoneyama K, Fukui Y** (2007) Role of cAMP in gibberellin promotion of seed germination in Orobanche minor Smith. J Plant Growth Regul **26:** 245-254
- **Uggla C, Magel E, Moritz T, Sundberg B** (2001) Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in scots pine. Plant Physiol **125**: 2029-2039
- **Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. Plant J **19:** 309-319

- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyozuka J, Yamaguchi S (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. Nature **455**: 195-200
- **Unger C, Hardegger M, Lienhard S, Sturm A** (1994) cDNA cloning of carrot (Daucus carota) soluble acid beta-fructofuranosidases and comparison with the cell wall isoenzyme. Plant Physiol **104:** 1351-1357
- Vachev T, Ivanova D, Minkov I, Tsagris M, Gozmanova M (2010) Trafficking of the potato spindle tuber viroid between tomato and Orobanche ramosa. Virology 399: 187-193
- van Dongen JT, Schurr U, Pfister M, Geigenberger P (2003) Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. Plant Physiol **131**: 1529-1543
- Vargas W, Cumino A, Salerno GL (2003) Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? Planta **216**: 951-960
- Vargas WA, Mandawe JC, Kenerley CM (2009) Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between Trichoderma virens and maize plants. Plant Physiol 151: 792-808
- **Vargas WA, Pontis HG, Salerno GL** (2008) New insights on sucrose metabolism: evidence for an active A/N-Inv in chloroplasts uncovers a novel component of the intracellular carbon trafficking. Planta **227**: 795-807
- Velasco L, Goffman FD, Pujadas-Salva AJ (2000) Fatty acids and tocochromanols in seeds of Orobanche. Phytochemistry 54: 295-300
- Venuat B, Goupil P, Ledoigt G (1993) Molecular cloning and physiological analysis of an invertase isoenzyme in Helianthus tissues. Biochem Mol Biol Int **31:** 955-966
- Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, De Coninck B, De Ranter CJ, Van Laere A, Van den Ende W, Rabijns A (2006) X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from Arabidopsis thaliana. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 62: 1555-1563
- Veronesi C, Bonnin E, Calvez S, Thalouarn P, Simier P (2007) Activity of secreted cell wall-modifying enzymes and expression of peroxidase-encoding gene following germination of Orobanche ramosa. Biologia Plantarum 51: 391-394
- Veronesi C, Delavault P, simier P (2009) Acibenzolar-S-methyl induces resistance in oilseed rape (Brassica napus L.) against branched broomrape (Orobanche ramosa L.). Crop Protection 28: 104-108
- Vijn I, Smeekens S (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? Plant Physiol 120: 351-360
- Vilhar B, Kladnik A, Blejec A, Chourey PS, Dermastia M (2002) Cytometrical evidence that the loss of seed weight in the miniature1 seed mutant of maize is associated with reduced mitotic activity in the developing endosperm. Plant Physiol **129**: 23-30

- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmiroli N, Machray GC, Oparka KJ (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. Plant Cell 13: 385-398
- Voelker C, Schmidt D, Mueller-Roeber B, Czempinski K (2006) Members of the Arabidopsis AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta. Plant J 48: 296-306
- von Schwartzenberg K, Nunez MF, Blaschke H, Dobrev PI, Novak O, Motyka V, Strnad M (2007) Cytokinins in the bryophyte Physcomitrella patens: analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. Plant Physiol 145: 786-800
- Wachter R, Langhans M, Aloni R, Gotz S, Weilmunster A, Koops A, Temguia L, Mistrik I, Pavlovkin J, Rascher U, Schwalm K, Koch KE, Ullrich CI (2003) Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by Agrobacterium tumefaciens. Plant Physiol 133: 1024-1037
- Walker NA, Zhang WH, Harrington G, Holdaway N, Patrick JW (2000) Effluxes of solutes from developing seed coats of Phaseolus vulgaris L. and Vicia faba 1.: locating the effect of turgor in a coupled chemiosmotic system. J Exp Bot 51: 1047-1055
- Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A (1993) Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength. Plant Physiol 101: 321-327
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. Plant Cell **9:** 895-908
- Wegmann K (1986) Biochemistry of osmoregulation and possible biochemical reasons of resistance against Orobanche. In: ter Borg SJ, ed. Proceeding of a workshop in biology and control of Orobanche. LH/VPO, Wageningen, 107-117
- Weil M, Krausgrill S, Schuster A, Rausch T (1994) A 17-kDa Nicotiana tabacum cell-wall peptide acts as an in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. Planta 193: 438-445
- Weise A, Barker L, Kuhn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer WB, Ward JM (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. Plant Cell **12:** 1345-1355
- Weise SE, Weber AP, Sharkey TD (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. Planta **218**: 474-482
- Welham T, Pike J, Horst I, Flemetakis E, Katinakis P, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Perry J, Parniske M, Wang TL (2009) A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, Lotus japonicus. J Exp Bot 60: 3353-3365

- Werner T, Holst K, Pors Y, Guivarc'h A, Mustroph A, Chriqui D, Grimm B, Schmulling T (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. J Exp Bot **59:** 2659-2672
- Werner T, Kollmer I, Bartrina I, Holst K, Schmulling T (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. Plant Biol (Stuttg) 8: 371-381
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmulling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. Plant Cell 15: 2532-2550
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmulling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 10487-10492
- Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H, Wobus U (2003) The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. Plant J **33**: 395-411
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. Plant J 21: 455-467
- Westwood JH, Yu X, Foy CL, Cramer CL (1998) Expression of a defense-related 3hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene in response to parasitization by Orobanche spp. Mol Plant Microbe Interact 11: 530-536
- Wigchert SC, Kuiper E, Boelhouwer GJ, Nefkens GH, Verkleij JA, Zwanenburg B (1999) Dose-response of seeds of the parasitic weeds Striga and Orobanche toward the synthetic germination stimulants GR 24 and Nijmegen 1. J Agric Food Chem 47: 1705-1710
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N (2000) Sugar transporters in higher plants--a diversity of roles and complex regulation. Trends Plant Sci 5: 283-290
- Winter H, Huber JL, Huber SC (1997) Membrane association of sucrose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. FEBS Lett 420: 151-155
- Winter H, Huber JL, Huber SC (1998) Identification of sucrose synthase as an actinbinding protein. FEBS Lett **430**: 205-208
- Winter H, Huber SC (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. Crit Rev Biochem Mol Biol **35**: 253-289
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW (1994) Subcellular volumes and metabolite concentrations in spinach leaves. Planta 193: 530-535
- Wobus U, Weber H (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. Biol Chem 380: 937-944

- Wolswinkel P (1984) Phloem unloading and "sink strength': the parallel between the site of attachment of Cuscuta and developing legume seeds, Plant Growth Regul. Plant Growth Regulation 2: 309-317
- Wolswinkel P, Ammerlaan A (1983) Sucrose and hexose release by excised stem segments of Vicia faba L.: the sucrose-specific stimulating of Cuscuta on sugar release and the activity of acid invertase. J Exp Bot 34: 1516-1527
- Wolswinkel P, Ammerlaan A, Peters HF (1984) Phloem Unloading of Amino Acids at the Site of Attachment of Cuscuta europaea. Plant Physiol **75:** 13-20
- Wu LL, Mitchell JP, Cohn NS, Kaufman PB (1993a) Gibberellin (GA3) enhances cell wall invertase activity and mRNA levels in elongating dwarf pea (Pisum sativum) shoots. Int J Plant Sci 154: 280-289
- Wu LL, Song I, Kim D, Kaufman PB (1993b) Molecular basis of the increase in invertase activity elicited by gravistimulation of oat-shoot pulvini. J Plant Physiol 142: 179-183
- Wyse RE, Zamski E, Tomos AD (1986) Turgor Regulation of Sucrose Transport in Sugar Beet Taproot Tissue. Plant Physiol 81: 478-481
- Xu J, Avigne WT, McCarty DR, Koch KE (1996) A Similar Dichotomy of Sugar Modulation and Developmental Expression Affects Both Paths of Sucrose Metabolism: Evidence from a Maize Invertase Gene Family. Plant Cell 8: 1209-1220
- Yokota T, Sakai H, Okuno K, Yoneyama K, Takeuchi Y (1998) Alectrol and orobanchol, germination stimulants for Orobanche minor, from its host red clover. Phytochemistry 49: 1967-1973
- **Yoneyama K, Takeuchi Y, Yokota T** (2001) Production of clover broomrape seed germination stimulants by red clover root requires nitrate but is inhibited by phosphate and ammonium. Physiol Plant **112:** 25-30
- Zehhar N, Ingouff M, Bouya D, Fer A (2002) Possible involvement of gibberellins and ethylene in Orobanche ramosa germination. Weed Research 42: 464-469
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE (1998) Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. Plant Physiol **116**: 1573-1583
- Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, Koch KE (1999) Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. Plant Physiol 121: 599-608
- **Zhang D, Wang Y** (2002) Post-translational inhibitory regulation of acid invertase induced by fructose and glucose in developing apple fruit. Sci China C Life Sci **45**: 309-321
- Zhang XY, Wang XL, Wang XF, Xia GH, Pan QH, Fan RC, Wu FQ, Yu XC, Zhang DP (2006) A shift of Phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. Plant Physiol 142: 220-232

- **Zhelev N** (1987) The biological role of exogenic factors in broomrape germination. Rastenievudni Nauki **24:** 36-43
- Zhou WJ, Yoneyama K, Takeuchi Y, Iso S, Rungmekarat S, Chae SH, Sato D, Joel DM (2004) In vitro infection of host roots by differentiated calli of the parasitic plant Orobanche. J Exp Bot 55: 899-907
- **Zhou Y, Qu H, Dibley KE, Offler CE, Patrick JW** (2007) A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. Plant J **49**: 750-764
- Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (Solanum tuberosum L.). Plant J 7: 97-107
- Zrenner R, Schuler K, Sonnewald U (1996) Soluble acid invertase determines the hexoseto-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. Planta **198:** 246-252

Annexes

1. LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA:	acide aminé	MCBL :	microscopie confocale à
ABA :	acide abscissique		balayage laser
ADN :	acide désoxiribonucléique	MF:	masse fraîche
ADNc :	ADN complémentaire	MFS :	major facilitator superfamily
ADP:	adénosine-5'-diphosphate	MS :	masse sèche
AI:	acid invertase	NAD [P(H)]	: nicotinamide adénine
AIA :	acide indole-3-acétique		dinucléotide [phosphate (réduit)]
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique	NBT :	nitroblue tetrazolium
ANOVA :	analyse of variance	nKat :	nano katal
ARN :	acide ribonucléique	NTE :	NaCl, Tris, EDTA
ARNm :	ARN messager	pb :	paire de base
ASM :	acibenzolar-S-methyl	PBS :	phosphate buffered saline
ATP:	adénosine-5'-triphosphate	PCR:	polymerase chain reaction
BCIP:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl	PEG:	polyéthylène glycol
	phosphate	PMSF :	phénylméthylsulfonylfluoride
BET :	bromure d'éthidium	PPGP:	parasitic plant genome project
BIBS :	biopolymères, interactions, biologie	PVPP:	polyvinylpolypyrrolidone
	structurale	QTL :	quantitative trait loci
BLAST :	basic local alignment search tool	RACE-PCR	rapid amplification of cDNA
BSA :	bovine serum albumine		ends-PCR
BTH :	benzothiadiazole	RFOs :	raffinose-family
CaMV :	cauliflower mosaic virus		oligosaccharides
CC:	cellule compagne	rpm :	rotation par minute
CCD:	carotenoid cleavage dioxygenase	RT-PCR :	reverse transcriptase-PCR
CDS :	coding sequence	RT-qPCR :	reverse transcriptase-
CETIOM :	centre technique interprofessionnel		quantitative PCR
	des oléagineux métropolitains	S:	seconde
CF:	carboxifluorescéine	SAI:	soluble acid invertase
CKX :	cytokinine oxydase	SBP :	sucrose binding protein
CWI:	cell wall invertase	SE:	standard error
DNSA :	dinitro-salicylic acid	siRNA :	small interfering RNA
dNTP:	desoxyribonucleotide tri-phosphate	SNI:	soluble neutral invertase
DO:	densité optique	SNK :	student Newman Keuls method
DII:	dithiothreitol	SSC :	standard saline citrate
EDIA:	ethylene diamine tetraacetique	SuSy :	sucrose synthase
ESI :	expressed sequence tag		sucrose transporter
G: CED.	grossissement	Taq:	<i>Inermus aquaticus</i> polymerase
GFP:	green fluorescent protein		
HALC:	hymidité misting	IE: TED.	INS-EDIA Tris EDTA harata
HK:	numique relative	IED: TIDA.	Ins-EDIA-dorate
	Isopentenyi transferases	IIDA:	acide trilodo-benzoique
KDa:	Kiloualloli constante de Michaelie	UDP: UTD.	undine diphosphate
	low affinity high appoints		ultra violet
LANC : I C MS ·	liquid abromatography mass		vitassa maximala
LC-1113 :	spectrometry	V max	
MADD .	specialitati y	v/v •	volume/volume
WORK:	mannose-o-phosphate reductase		
2. LISTE DES TABLEAUX

Tableau	1: Composition du Cell Medium112
Tableau	2: Composition du Protomedium122
Tableau	3: Couples d'amorces utilisés pour la PCR en temps Réel136
Tableau	4: Couples d'amorces dégénérées utilisés pour identifier et cloner les ADNc d'intérêt
Tableau	5: Couples d'amorces utilisés pour cloner les ADNc d'intérêt en pleine longueur
Tableau	6: Amorces utilisées pour cloner les séquences promotrices d'ADNc d'intérêt
Tableau	7: Amorces utilisées en vue d'un clonage des <i>PrSUT</i> dans le pDR296138
Tableau	8: Amorces utilisées en vue d'un clonage des PrSUT-GFP dans le pDR296140
Tableau	9: Amorces utilisées en vue d'obtenir des sondes spécifiques d'ARNm d'intérêt pour l'hybridation <i>in situ</i>
Tableau	10: Caractéristiques des ADNc <i>PrSUT</i> et des protéines correspondantes164
Tableau	11: Taille des régions protéiques (cytoplasmiques) caractéristiques des PrSUT et de représentants des transporteurs de type SUT1, SUT2 et SUT4 d'A. <i>thaliana</i> 165
Tableau	12: Analyse <i>in silico</i> de prédiction de localisation des PrSUT170
Tableau	13: Caractéristiques des ADNc d'invertases de P. ramosa et des protéines correspondantes
Tableau	14: Analyse in silico de prédiction de localisation des invertases de P. ramosa
Tableau	15: Caractéristiques des ADNc SuSy de <i>P. ramosa</i> et des protéines correspondantes
Tableau	16: Analyse <i>in silico</i> de prédiction de localisation des SuSy de <i>P. ramosa</i>

3. LISTE DES FIGURES

Figure	1: Le colza, hôte privilégié de <i>Phelipanche ramosa</i> en France2
Figure	2: Illustrations de quelques types, classe et groupes de plantes parasites
Figure	3: Morphologie externe des graines (ornementation tégumentaire) de différentes espèces d'orobanches
Figure	4: Répartition à l'échelle mondiale de l'orobanche rameuse (<i>Phelipanche ramosa</i> (L.) pomel)
Figure	5: Recensement par le CETIOM des parcelles de colza et de chanvre infestées par l'orobanche rameuse en France (2008)12
Figure	6: Cycle de développement de <i>P. ramosa</i> 14
Figure	7: Structure chimique de trois strigolactones naturelles et d'un analogue de synthèse : le GR24
Figure	8: Types de connexions haustoriales entre une plante parasite et son hôte20
Figure	9: Relations sources / puits au sein d'une plante
Figure	10: Structure du phloème
Figure	11: Potentiel hydrique / Flux de masse
Figure	12: Charge du phloème en saccharose
Figure	13: Charge symplastique du phloème40
Figure	14: Transport de saccharose à l'échelle d'une cellule photosynthétique46
Figure	15: Schématisation du transport de saccharose à l'échelle d'une plante photosynthétique
Figure	16: Arbre phylogénétique de 62 séquences de transporteurs SUT (confirmés ou putatifs) accessibles dans les bases de données publiques
Figure	17: Modèles structuraux des différents types de transporteurs SUT56
Figure	18: Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse du saccharose
Figure	19: Localisation au sein d'une cellule puits des enzymes impliquées dans l'hydrolyse du saccharose
Figure	20: Structure tridimensionnelle de la CWI d'arabette (AtcwINV1), complexée à son substrat : le saccharose
Figure	21: Modèle de dégradation vacuolaire des SAI80
Figure	22: Localisations et fonctions des SuSy dans la cellule
Figure	23: Les SuSy dans le modèle de synthèse de la cellulose
Figure	24: Arbre phylogénétique de 54 séquences de SuSy (confirmées ou putatives) accessibles dans les bases de données publiques
Figure	25: Phosphorylation et modèle de régulation du turnover des SuSy90
Figure	26: L'orobanche, un puits surnuméraire pour son hôte92

Figure 27:	Différents types de contacts et voies d'accès potentielles aux solutés de l'hôte chez les plantes parasites
Figure 28:	Voie de biosynthèse du mannitol chez l'orobanche96
Figure 29:	Accumulation de mannitol et d'hexoses chez <i>P. ramosa</i>
Figure 30:	Évolution des activités invertases et saccharose synthétase dans différents organes de <i>P. ramosa</i> au cours de son développement sur tomate 100
Figure 31:	Coloration histochimique de l'activité invertase acide soluble (SAI) sur des coupes transversales de hampes florales de <i>P. ramosa</i> (stade V) 100
Figure 32:	Traçage du flux de sève phloémienne entre <i>B. napus</i> et <i>P. ramosa</i> par application de carboxyfluorescéine (CF) sur les feuilles de l'hôte
Figure 33:	Traçage du flux de sève phloémienne entre <i>B. napus</i> et des jeunes tubercules (stade III) de <i>P. ramosa</i> , 2 heures après application de CF sur l'hôte 154
Figure 34:	Traçage du flux de sève phloémienne entre <i>B. napus</i> et des tubercules âgés (stade III-IV) et des stades IV de <i>P. ramosa</i> , 2 heures après application de CF sur l'hôte
Figure 35:	Arbre phylogénétique des séquences PrSUT accompagnées de 62 autres séquences de transporteurs SUT (confirmés ou putatifs) d'après Sauer (2007) 164
Figure 36:	Prédiction des domaines transmembranaires des protéines PrSUT165
Figure 37:	Effets du saccharose sur le niveau d'expression des gènes <i>PrSUT</i> dans les graines préconditionnées de <i>P. ramosa</i>
Figure 38:	Expressions hétérologues chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> des constructions PrSUT-GFP
Figure 39:	Localisation subcellulaire des protéines de fusion PrSUT-GFP dans des protoplastes d'A. <i>thaliana</i>
Figure 40:	Niveau d'expression des gènes <i>PrSUT</i> dans différents organes de <i>P. ramosa</i> au cours de son développement sur tomate
Figure 41:	Expression tissulaire du gène PrSUT1 dans les bourgeons floraux de P. ramosa
Figure 42:	Représentation des différents modes de décharge phloémienne au sein de l'orobanche rameuse et modélisation théorique de l'implication des transporteurs SUT majeurs
Figure 43:	Arbre phylogénétique de séquences protéiques des trois types d'isoenzymes d'invertases incluant celles de <i>P. ramosa</i> (déduites des 4 ADNc pleine longueur identifiés)
Figure 44:	Effets du saccharose sur le niveau d'expression des gènes d'invertase dans les graines préconditionnées de <i>P. ramosa</i>
Figure 45:	Séquence protéique déduite de l'ORF <i>PrSai1</i> et séquences des peptides générés par digestion tryptique de l'isoforme SAI purifiée à partir d'une jeune tige stade IV
Figure 46:	Les invertases de <i>P. ramosa</i> au cours de son développement sur tomate188
Figure 47:	Corrélation entre le niveau d'accumulation du transcrit <i>PrSai1</i> et l'activité SAI au cours du développement de <i>P. ramosa</i> sur tomate 188

Figure 48:	Modélisation théorique de l'implication des invertases dans l'accumulation d'hexoses vacuolaires ou d'amidon dans les tissus puits de <i>P. ramosa</i> 192
Figure 49:	Arbre phylogénétique de séquences protéiques SuSy incluant celles de <i>P. ramosa</i>
Figure 50:	Effets du saccharose sur le niveau d'expression des gènes SuSy dans les graines préconditionnées de <i>P. ramosa</i>
Figure 51:	Les SuSy de P. ramosa au cours de son développement sur tomate198
Figure 52:	Expession tissulaire du gène PrSus1203
Figure 53:	Effets du saccharose et du mannitol sur les graines d'orobanches préconditionnées
Figure 54:	Immunolocalisation des SuSy dans les tubercules (stade III) de P. ramosa208
Figure 55:	Modélisation théorique de l'implication des SuSy dans la différentiation du xylème ou dans l'accumulation d'amidon dans les tissus puits de <i>P. ramosa</i>
Figure 56:	Modèle théorique de la décharge, du transport et du métabolisme du saccharose chez <i>P. ramosa</i>
Figure 57:	Niveaux d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des cytokinines dans les graines préconditionnées et germées de <i>P. ramosa</i>
Figure 58:	Expression des gènes impliqués dans la force de puits et activités invertasiques dans les graines préconditionnées et germées de <i>P. ramosa</i>
Figure 59:	Effets d'un traitement de la plante hôte (tomate) au TIBA sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de phytohormones de <i>P. ramosa</i>
Figure 60:	Effets d'un traitement de la plante hôte (tomate) au TIBA sur l'expression les gènes <i>PrSUT1</i> , <i>PrSai1</i> , <i>PrSus1</i> et <i>PrSus2</i> de <i>P. ramosa</i> 238
Figure 61:	Voies de biosynthèse des cytokinines
Figure 62:	Effets d'un traitement de la plante hôte (tomate) au TIBA sur la balance hormonale (auxine et cytokinines) de <i>P. ramosa</i>
Figure 63:	Effets d'un traitement de la plante hôte (tomate) au TIBA sur la morphologie des bourgeons caulinaires apicaux des tubercules de <i>P. ramosa</i>
Figure 64:	Caractéristiques biométriques du modèle <i>P. ramosa/B. napus</i> en fonction de la variété de colza hôte
Figure 65:	Effet de la variété de colza hôte sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des phytohormones (A) et de la force de puits (B) de <i>P. ramosa</i> 250
Figure 66:	Effet de la variété de colza hôte sur la balance hormonale (auxine et cytokinines) de <i>P. ramosa</i>
Figure 67:	Modèle hypothétique de la régulation de l'expression de <i>PrSUT1</i> dans les pathosystèmes <i>P. ramosa/B. napus</i>
Figure 68:	Recherches d'élément cis-régulateur associés à une régulation de la transcription par les phytohormones (auxine et cytokinines) au sein des promoteurs de <i>PrSus1</i> et <i>PrCKX</i>
Figure 69:	Activation de l'expression du gène <i>hmg2</i> chez le tabac infesté par <i>P. aegyptiaca</i>

4. EXEMPLE DE CLONAGE MOLÉCULAIRE



Exemple de la stratégie adoptée pour réaliser les constructions pDR296-PrSUT-GFP.

Les sites de restriction figurent en rouge. *AmpR*: gène de résistance à l'ampiciline du plasmide pGEM-T Easy; CDS: coding sequence; UTR: untranslated region.

Annexes





An overview of the carbon metabolism actors that condition the survival of the parasitic plant: *Phelipanche ramosa*



Caractérisation moléculaire et régulation de la force de puits de la plante parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel vis-à-vis du saccharose prélevé chez son hôte

Le mode de vie parasitaire de Phelipanche ramosa la rend responsable de ravages considérables. Son incapacité à réaliser la photosynthèse la rend entièrement dépendante vis-à-vis des photoassimilats de la plante hôte. Le développement de l'orobanche repose sur sa capacité à se connecter au phloème de l'hôte et à devenir un organe puits compétitif. Dans ce contexte, l'utilisation d'un traceur phloémien a permis de démontrer l'existence d'un continuum symplasmique à l'interface hôte-parasite et la nature majoritairement de type apoplasmique de la décharge phloémienne dans les différents tissus puits de P. ramosa. Les principaux acteurs impliqués dans le transport (SUT = sucrose transporter) et le métabolisme du saccharose (invertases et saccharose synthétases) ont été identifiés. Par des approches moléculaires, d'immunolocalisation et d'hybridation in situ, ces travaux ont précisé l'implication de certains de ces acteurs dans des processus majeurs, tels que le transport du saccharose à longue distance et sa décharge dans les organes puits (PrSUT1 et PrSUT3), la mise en réserve d'hexoses via une invertase acide vacuolaire (PrSAI1), la différentiation des trachéides et la synthèse d'amidon via des saccharose synthétases (PrSUS1 et PrSUS2, respectivement). D'autres marqueurs, tels que l'isopentényl transférase PrIPT et la cytokinine oxydase PrCKX, joueraient un rôle dans l'équilibre hormonal de l'orobanche et contribueraient à réguler sa force de puits. L'ensemble de ces gènes/protéines indispensables au développement de P. ramosa constitueraient ainsi de bonnes cibles pour valider l'efficacité d'une lutte biotechnologique contre les orobanches.

Mots clés: auxine, cytokinine, invertase, orobanche, plante parasite, saccharose synthéthase, transporteur de saccharose

Molecular characterization and regulation of sink strength of the parasitic plant *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel in regards to sucrose out taken from its host

As a consequence of its incapacity to carry out photosynthesis, Phelipanche ramosa turns out to be fully dependent on the photosynthates from the host plant and due to its obligatory parasitic lifestyle this plant is responsible for considerable devastations. The development of broomrape relies on its capacity to establish connection with the phloem of the host and to become a competitive sink organ. In this context, the use of a phloem tracer demonstrated the existence of a symplasmic continuum at the host-parasite interface and, that the phloem unloading in various sinks tissues of P. ramosa is mainly an apoplamic type. The main actors involve in transport (SUT = sucrose transporter) and sucrose metabolism (invertases and sucrose synthases) were identified. Using molecular approaches, immunolocalization, and in situ hybridization, we demonstrated the implication of some of these actors in major processes, such as the long-distance transport of sucrose and its unloading in sink organs (PrSUT1 and PrSUT3), hexose accumulation via a vacuolar acid invertase (PrSAI1), the tracheid differentiation and the starch synthesis via sucrose synthases (PrSUS1 and PrSUS2, respectively). Other markers, such as the isopenthenyl transferase PrIPT and the cytokinin oxidase PrCKX, would play a role in the hormonal balance of broomrape and would contribute to control its sink strength. All of these genes/proteins which are essential to the development of *P. ramosa* are then putative good targets in biotechnological strategies to control broomrapes.

Key words: auxin, cytokinin, invertase, broomrape, parasitic plant, sucrose synthase, sucrose transporter