

SOMMAIRE

Liste des abréviations	XI
Résumé	XIII
 I. INTRODUCTION GENERALE	 1
 II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	 9
 II.1. ASSIMILATION ET PARTITION DU CARBONE CHEZ LES POACEES ...	 12
II.1.1. Photoassimilation et mise en réserve du carbone: Accumulation des sucres non structuraux chez les Poacées	12
II.1.2. Métabolisme de l'amidon	15
II.1.3. Structure et métabolisme des fructanes chez les Poacées.....	20
II.1.4. Régulation du métabolisme des fructanes chez les Poacées.....	39
 II.2. SUCRES NON STRUCTURAUX ET ADAPTATIONS AUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX	 44
II.2.1. Résistance et acclimatation au froid	45
II.2.2. Résistance au stress hydrique	49
II.2.3. Résistance au stress oxydatif et à l'hypoxie	50
 II.3. SUCRES NON STRUCTURAUX ET ADAPTATION DES POACEES A L'HIVER AU QUEBEC: CAS DE LA FLEOLE	 51

VI

II.4. IMPORTANCE DES FRUCTANES CHEZ LES ESPECES FOURRAGERES	55
II.4.1. Fructanes et qualité du fourrage	56
II.4.2. Les fructanes pendant la conservation du fourrage	57
III. OBJECTIFS DE RECHERCHE	61
IV. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	67
V. RESULTATS	71
V.1. EFFECT OF PLANT MATURITY AND NITROGEN FERTILIZATION ON NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATE METABOLISM IN HARVESTABLE TISSUES OF TIMOTHY (<i>PHLEUM PRATENSE</i> L.).....	73
V.1.1. Introduction.....	75
V.1.2. Materials and Methods	78
V.1.3. Results.....	83
V.1.4. Discussion	86
V.1.5. Conclusion	92
V.1.6. Acknowledgements	93
Préambule à l'article 2	103
V.3. FRUCTAN AND NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATE METABOLISM IN HARVESTABLE TISSUES OF TIMOTHY DURING WILTING	105

V.2.1. Introduction	107
V.2.2. Materials and Methods	108
V.2.3. Results	112
V.2.4. Discussion	116
V.2.5. Acknowledgements	122
Préambule à l'article 3	129
 V.3. CLONING AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF TWO NOVEL FRUCTAN EXOHYDROLASES (1&6-FEH, FEH-INV) WITH INHERENT INVERTASE ACTIVITY IN TIMOTHY (<i>PHLEUM PRATENSE</i> L)	 131
V.3.1. Introduction	133
V.3.2. Materials and Methods	136
V.3.3. Resultats	141
V.3.4. Discussion	145
V.3.5. Conclusion	153
V.3.6. Acknowledgements	154
 VI. DISCUSSION GENERALE	 163
 VI.1. METABOLISME DES FRUCTANES DANS LES PARTIES AERIENNES DE LA FLEOLE PENDANT LA CROISSANCE	 167
 VI.1.1. Effet du niveau de fertilisation azotée sur la croissance et le métabolisme des sucres non structuraux	 167

VIII

VI.1.2. Effet du stade de développement sur les teneurs en fructanes	169
VI.2. METABOLISME DES FRUCTANES APRES FAUCHE DANS LES TISSUS RECOLTES	172
VI.2.1. Fluctuations des teneurs en sucres non structuraux pendant le fanage	173
VI.2.2. Activités enzymatiques et teneurs en sucres non structuraux pendant le fanage	174
VI.2.3. Fructanes et stress cellulaire pendant le fanage.....	176
VI.2.4. Valeur bromatologique du fourrage frais et conservés; lien avec les concentrations en fructanes	177
VI.3. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX GENES CODANT DES FEHs CHEZ LA FLEOLE DES PRÉS	179
VI.3.1. Recherche et identification de nouveaux gènes codant des FEHs	179
VI.3.2. Analyse fonctionnelle de deux nouvelles FEHs possédant une activité invertase	181
VI.3.3. FEHs à activité invertase ou invertases à activité FEH ?	182
VI.3.4. Rôles possibles et implications des « FEHs non spécifiques »	185
VII. PERSPECTIVES DE RECHERCHE	189
VII.1. FACTEURS AFFECTANT LES TENEURS EN FRUCTANES PENDANT LA CROISSANCE	191
VII.2. LES FRUCTANES ET L'ENSILAGE	192

VII.3. CARACTERISATION DE NOUVELLES FEHs CHEZ LA FLEOLE	
DES PRES	193
VII.4. REGULATION DE L'ACTIVITE FEH	194
VII.5. MARQUEURS MOLECULAIRES ET SELECTION VARIETALE.....	195
VII.6. IMPACTS ENVIRONNEMENTAUX	196
 VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 199

LISTE DES ABREVIATIONS

ADF	Acid detergent fiber
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'Ethidium
BFC	Bases des Feuilles en Croissance
BSA	Albumine sérique bovine
CLHP, HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytosine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
DP	Degré de polymérisation
DTT	Dithiothréitol
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
FEH	Fructane ExoHydrolase
FT	Fructosyltransférase
1-FFT	Fructane:Fructane 1-fructosylTransférase
6G-FFT	Fructane:Fructane 6G-fructosylTransférase
HPAEC-PAD	Système chromatographique d'échange d'anions haute pression couplée à un détecteur à ampérométrie pulsée
kDa	kiloDalton

XII

kV	kilovolt
MF	Matière fraîche
NADP⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH, H⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NDF	Neutral detergent fiber
nkatal	nanokatal (nanomoles par seconde)
NSC	Non-structural carbohydrates
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PR proteins	Pathogenesis related proteins
PVPP	Polyvinylpyrrolidone
QTL	Quantitative trait locus
RT	Reverse transcription (transcription inverse)
6-SFT	Saccharose:Fructane 6-fructosylTransférase
1-SST	Saccharose:Saccharose 1-fructosylTransférase
SNS	Sucres Non Structuraux
Tm	Température d'hybridation
U	Unité enzymatique
UTR	Untranslated region (région non traduite)

Résumé

Métabolisme des fructanes au cours du développement et après récolte chez la fléole des prés (*Phleum pratense* L.); identification et analyse fonctionnelle de deux gènes codant des fructanes exohydrolases (FEHs) à activité invertase. 2012. Ould-Ahmed Marouf (Thèse de l'Université de Caen Basse-Normandie et de l'Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue).

La fléole des prés (*Phleum pratense* L.) est une Poacée fourragère pérenne caractéristique des régions tempérées et froides, utilisée pour l'alimentation animale en pâturage ou sous forme de foin ou d'ensilage. Elle accumule ses réserves glucidiques principalement sous forme de fructanes, polymères solubles de fructose, qui participent à la valeur nutritive du fourrage et au processus de fermentation lors de l'ensilage. Les objectifs de cette thèse étaient i) d'étudier le métabolisme des fructanes chez cette espèce pendant la croissance dans le but d'évaluer le stade de fauche permettant d'obtenir des teneurs maximales en fructanes, en prenant en compte le niveau de fertilisation azotée, ii) d'étudier le métabolisme des fructanes après la fauche, pendant le fanage et iii) d'identifier et caractériser les enzymes de dégradation des fructanes (les fructane exohydrolases, FEHs). Les tissus récoltés lors de la fauche (sommet des parties aériennes) ont été analysés pour quatre stades de développement (stade végétatif, montaison, épiaison et anthèse) et deux niveaux de nutrition azotée (0,375 et 3,75 mM de NH_4NO_3), en conditions hydroponiques. Le métabolisme de ces sucres a également été suivi après fauche, pendant le fanage, pour les deux derniers stades. Les résultats montrent que l'accumulation des fructanes est maximale à l'anthèse. La diminution des teneurs en NH_4NO_3 n'a pas d'effet sur l'accumulation des fructanes alors qu'elle provoque une forte augmentation de la concentration en amidon dans les limbes. Cela suggère que les mécanismes d'interactions entre le métabolisme de l'amidon et de l'azote d'une part, et le métabolisme des fructanes et de l'azote d'autre part sont différents. Pendant le fanage (à la lumière ou à l'obscurité, à 20°C ou 15°C), les teneurs en sucres solubles sont assez stables pendant les 24 premières heures tandis que les teneurs en protéines et en amidon diminuent puis se stabilisent dès que la matière sèche dépasse le seuil des 40 %. L'activité d'initiation de la synthèse des fructanes (SST) décroît rapidement après la fauche alors que les activités FEH et invertase acide soluble restent élevées pendant les premières heures, indiquant le maintien du métabolisme cellulaire en début de fanage. Par ailleurs, une banque d'ADNc des tissus aériens de fléole a été réalisée et quatre nouveaux gènes codant potentiellement des FEHs ont été identifiés. Deux de ces FEHs, ont pu être fonctionnellement caractérisées et exprimées dans *Pichia pastoris*. Ces nouvelles enzymes (Pp1&6FEH1 et PpFEH-INV) sont capables d'hydrolyser les liens $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$ des fructanes mais également le saccharose. Ces FEHs non spécifiques, possédant une activité invertase, pourraient être impliquées dans une régulation fine des teneurs en fructanes et en saccharose en contribuant à une meilleure balance des flux de carbone entre les tissus aériens photosynthétiquement actifs et les tissus puits des parties inférieures.

Mots clés : Fléole, *Phleum pratense* L., fructanes, foin, fanage, stade de développement, fructane exohydrolase (FEH).

Fructan metabolism during development and wilting in timothy (*Phleum pratense* L.); identification and functional characterization of two genes coding for fructan exohydrolases (FEHs) with inherent invertase activity. 2012. Ould-Ahmed Marouf (Ph.D Thesis of « Université de Caen Basse-Normandie » and « Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue »).

Timothy (*Phleum pratense* L.) is an important grass forage used for pasture, hay, and silage in regions with cool and humid growth season. One of the factors affecting its nutritive value and the silage fermentation process is the concentration of nonstructural carbohydrates (NSC), which are mainly fructans, soluble polymers of fructose. The objectives of this thesis were i) to study fructan metabolism in timothy during growth to assess the stage of development with maximal fructan contents, taking into account the level of nitrogen fertilization, ii) to study the metabolism of fructans during wilting and iii) to identify and characterize plants enzymes involved in fructan breakdown (fructan exohydrolases, FEHs). Harvested tissues (shoot above 5cm) were analyzed at four stages of development (vegetative stage, stem elongation stage, heading and anthesis) and two levels of nitrogen fertilization (0.375 and 3.75 mm of NH_4NO_3), in hydroponic conditions. Sugar metabolism was followed during wilting, in tissues harvested at heading and anthesis. Our results show that the accumulation of fructans was maximal at anthesis. The decrease of NH_4NO_3 concentration had no effect on fructan accumulation while it caused a strong increase of starch concentration in leaves. These results suggest that the mechanisms of interaction between starch and nitrogen metabolisms on one hand, and fructans and nitrogen metabolisms on the other hand are different. During wilting (under light or darkness, at 20°C or 15°C), the contents in soluble sugars were rather stable during the first 24 hours whereas protein and starch concentrations decreased during the first hours and remained stable thereafter until the dry material content reached 40 %. The sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST) activity, which allows the initiation of fructan synthesis, decreased quickly after harvest while FEH and soluble acid invertase activities remained high during the first hours, indicating the preservation of cellular metabolism at the beginning of wilting. A cDNA library was built from mRNA timothy shoot above 10 cm and four new genes coding for putative FEHs were identified. Two of these genes were expressed in *Pichia pastoris* and functionally characterized. These new enzymes (Pp1&6FEH1 and PpFEH-INV) hydrolyze $\beta(2-1)$ and $\beta(2-6)$ linkages in fructans and also sucrose. These non specific FEHs, possessing an invertase activity, could be involved in fine regulation of fructan and sucrose contents by contributing to a better balance of carbon flows between the photosynthetically active shoot tissues and the sink tissues at the plant base.

Key words : Timothy, *Phleum pratense* L., fructans, hay, wilting, stage of development, fructan exohydrolase (FEH).

I. INTRODUCTION GENERALE

I. INTRODUCTION GENERALE

La domestication des plantes, et en particulier des Poacées (Graminées), est l'un des événements les plus importants dans le développement culturel humain pendant les 10 000 dernières années (Buckler *et al.*, 2001). Jusqu'à récemment, la sélection des caractères par des croisements appropriés avait pour objectif majeur l'amélioration des récoltes en arrivant à réunir chez une espèce (le blé, le maïs, le riz...) le maximum de gènes favorables. Ces objectifs changent en partie aujourd'hui, en raison des progrès dans le monde de la production agricole, mais aussi des impacts négatifs que certaines de ces pratiques ont sur l'environnement. De nouveaux défis apparaissent concernant la sélection et l'exploitation des Poacées céréalières et fourragères, notamment en ce qui concerne les enjeux liés à l'agriculture durable, à l'adaptation aux changements climatiques et à l'exploitation des différents usages (alimentaires ou autre) offerts par la biomasse végétale (Humphreys *et al.*, 2006).

A l'état végétatif, une Poacée (graminée) comprend quelques dizaines de talles, constituées chacune d'une tige réduite, portant les feuilles et les racines (Figure I.1). Les feuilles adultes s'emboîtent les unes dans les autres et se composent d'une

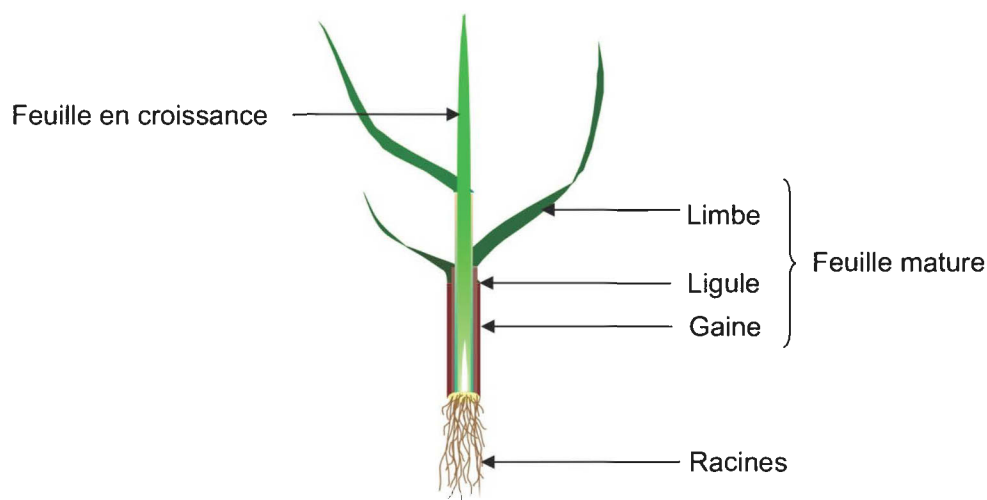
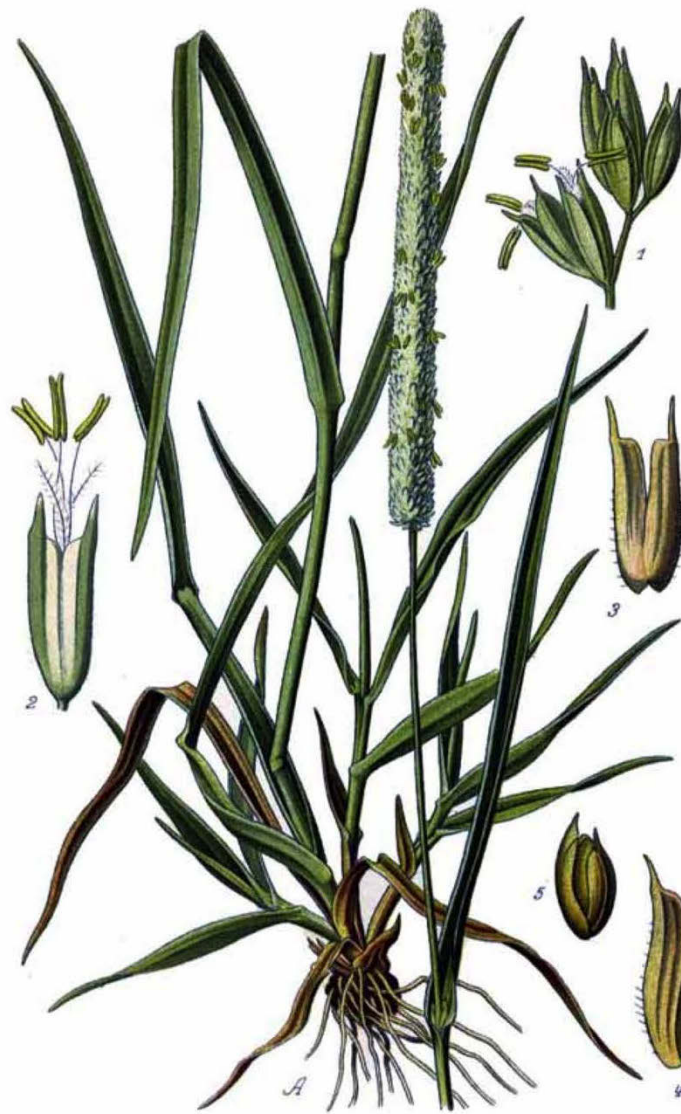


Figure I.1: Représentation schématique d'une talle de graminée.

gaine enveloppante et d'un limbe étalé séparés par une ligule. L'étude du métabolisme carboné chez ces espèces montre une grande complexité, tant l'allocation du carbone issu de la photosynthèse et sa régulation sont tributaires de nombreux facteurs. Chez les Poacées en régions tempérées - y compris en région nordique comme l'est canadien - la majorité des réserves est accumulée sous forme de fructanes qui constituent l'une des formes de stockage carboné chez les plantes à côté de l'amidon et du saccharose (Gallagher *et al.*, 2007). Les fructanes sont des sucres solubles constitués de polymères de fructose et synthétisés à partir du saccharose. À la différence de l'amidon, les fructanes et le saccharose sont hydrosolubles et constituent à ce titre une réserve facilement mobilisable en fonction des demandes pour la croissance et l'adaptation à un environnement donné. Ils interviennent aussi dans la tolérance aux stress abiotiques, froid et sécheresse en particulier (Gallagher *et al.*, 2007). Le rôle des fructanes dans les mécanismes de tolérance aux stress hydriques est lié entre autre à leur capacité à stabiliser les membranes lipidiques via des interactions avec les phospholipides (Vereyken *et al.*, 2003). De plus, les fructanes seraient impliqués dans des mécanismes de défense contre le stress oxydatif (Valluru and Van den Ende, 2008). Par ailleurs, les dommages annuels causés aux cultures pérennes par le froid et les maladies pourraient s'accroître dans les années à venir en raison des changements climatiques. La compréhension à l'échelle moléculaire des mécanismes d'adaptation et le choix des Poacées fourragères les mieux adaptées sont cruciaux dans ces conditions pour atténuer ces effets. La fléole des prés (*Phleum pratense* L.) (Figure I.2) pourrait constituer une graminée fourragère modèle dans ce domaine, en raison de l'adaptation de son métabolisme aux conditions tempérées et nordiques, et de son assez bonne valeur nutritive pour l'alimentation animale (Bernes *et al.*, 2008). Dans ces régions, le pâturage doit être complété par une récolte et un stockage des fourrages pour la saison hivernale. Ce stockage peut être réalisé sous forme de foin ou d'ensilage, qui est une bonne méthode de conservation des fourrages et de fléole en



Pl. 367. *Phléole des prés*. *Phleum pratense* L.

Figure I.2: Fléole des prés (*Phleum pratense* L.) (d'après A. Masclef - Atlas des plantes de France. 1891 (source URL: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:367_Phleum_pratense_L.jpg)

particulier (Clare, 1953). Au cours du processus d'ensilage, la fermentation, principalement réalisée par des bactéries lactiques, inhibe la croissance des autres micro-organismes (Müller et Lier, 1994). Les réserves en sucres solubles provenant de l'éclatement des cellules de la plante subissent une hydrolyse plus ou moins rapide

et sont utilisées dans le processus de fermentation conduisant à la production d'acide lactique qui joue le rôle de conservateur (Suzuki, 1993). Il est ainsi important de comprendre les mécanismes qui régissent l'accumulation et le devenir des réserves carbonées pendant la croissance, mais également après la fauche, au cours du séchage puis de l'ensilage des tissus récoltés, dans la mesure où ces mécanismes peuvent affecter sensiblement le contenu et la qualité de ces réserves.

Les fructanes constituent ainsi la majorité des réserves carbonées chez la fléole des prés (Suzuki, 1986). Au cours d'événements comme la repousse après défoliation (fauche, pâturage) ou pendant la formation des organes reproducteurs, les Poacées mobilisent rapidement leurs réserves pour maintenir la croissance foliaire (Prud'homme *et al.*, 1992), ou permettre le remplissage du grain (Pollock et Cairns, 1991). Les fructanes localisés à la base des parties aériennes sont alors hydrolysés par des enzymes, les fructanes exohydrolases (FEHs), qui libèrent du fructose à partir des extrémités des polymères. Le fructose ainsi libéré est utilisé pour la fourniture de squelettes carbonés, d'énergie ou pour la synthèse *de novo* de saccharose qui peut être transporté vers les autres tissus (Amiard *et al.*, 2003b). Le niveau de l'activité FEH est en général corrélé avec le processus de dégradation des fructanes (Simpson et Bonnett, 1993; De Roover *et al.*, 1999). Une augmentation de l'activité FEH est observée à la base des tissus aériens restés en place après coupe chez la fléole (Mino et Maeda, 1976). Cependant, le niveau de l'activité FEH dans les tissus situés au-dessus du niveau de coupe, récoltés lors d'une fauche et utilisés en foin ou ensilage (limbes, sommet des tiges), n'est pas connu. De même, il n'existe pas à notre connaissance d'information sur l'évolution de l'activité FEH au cours des premières heures d'entreposage permettant de connaître le rôle de ces enzymes dans le devenir des fructanes pendant l'ensilage. Un contenu élevé en fructanes favoriserait des conditions idéales d'ensilage. Par exemple, une teneur en sucres solubles d'environ 10% dans la matière sèche serait nécessaire pour assurer la fermentation complète d'un ensilage de Poacées à 30% de matière sèche (Leibensperger et Pitt, 1988). Les

sucres solubles constituent par ailleurs une partie importante de l'apport énergétique du fourrage, permettant une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote par l'animal réduisant l'utilisation de suppléments alimentaires coûteux fournis sous forme de grains (Hindrichsen *et al.*, 2006).

Dans ce contexte, les principaux objectifs de mon travail de thèse visaient à identifier et caractériser les enzymes responsables de la dégradation des fructanes (FEH) chez la fléole des prés et d'étudier la régulation de leurs activités, en rapport avec le contenu en fructanes, en analysant plus spécifiquement les variations au cours de la croissance, puis après la fauche. Ce travail a pour perspective agronomique une meilleure compréhension des mécanismes de mise en réserve et de mobilisation des sucres solubles, et des fructanes en particulier, de façon à améliorer la qualité du fourrage après récolte et à optimiser le processus d'ensilage et sa qualité chez la fléole des prés. Après une analyse bibliographique portant sur le métabolisme des fructanes et sur le rôle des sucres solubles dans la résistance aux stress environnementaux chez les végétaux supérieurs, les objectifs détaillés du travail de thèse sont présentés, puis les résultats sont exposés sous la forme de trois articles scientifiques suivis d'une discussion générale incluant les perspectives de recherche.

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Preamble

Au cours de l'évolution, la capacité de certains organismes photosynthétiques à fixer efficacement le carbone atmosphérique, et à le mettre en réserve, aurait conduit à la séparation phylogénétique et structurale des bryophytes et des végétaux supérieurs, par rapport aux cyanobactéries et aux algues vertes (Raven, 2000). On estime que 100 milliards de tonnes de CO₂ seraient fixées annuellement, par photoassimilation, par les plantes et les algues, pour être converties en glucides (Raven *et al.*, 1999). Les mécanismes de synthèse, de transport et de séquestration des photoassimilats chez les plantes ont conduit au développement de la notion d'organe « *source* » et d'organe « *puits* ». Les organes sources sont définis comme des producteurs et exportateurs net de photoassimilats et sont essentiellement représentés par les organes photosynthétiques comme les feuilles. A l'inverse, un organe puits est un consommateur ou importateur net de photoassimilats. Les tissus de la tige, les racines ainsi que les fruits en formation se comportent ainsi comme des puits. Néanmoins, un organe qui exerce à un moment donné de son développement la fonction de puits pourra passer à la fonction inverse à un autre stade de développement (Sonnewald et Willmitzer, 1992). L'allocation du carbone rend ainsi compte du devenir métabolique des photoassimilats et de leur distribution en fonction des besoins de la plante.

Les Poacées constituent environ 20% du couvert végétal de la planète et présentent une grande importance agronomique pour l'alimentation humaine et animale, d'où l'intérêt accordé au métabolisme des réserves carbonées chez ces espèces. Chez les Poacées en région tempérée, la majorité des réserves carbonées est accumulée sous forme de sucres solubles – facilement mobilisables – tel que le saccharose et des polymères de fructoses synthétisés à partir de ce dernier: les fructanes (Gallagher *et al.*, 2007). L'amidon, minoritaire chez ces espèces, est stocké

dans les plastes sous forme cristalline hautement insoluble (Nelson et Spollen, 1987; Pollock et Cairns, 1991). Ces trois formes de réserve – saccharose, fructanes, et amidon - constituent les principaux sucres non structuraux (SNS), par opposition aux sucres structuraux (cellulose et hémicellulose).

En régions tempérées et froides, la fléole des prés (*Phleum pratense* L.) est une graminée pérenne bien adaptée aux conditions climatiques et présentant une assez bonne qualité nutritive pour le bétail (Klebesadel, 1997; Ouellet *et al.*, 1998). Chez la fléole, les réserves carbonées, principalement sous forme de fructanes, sont stockées surtout à la base des parties aériennes, et interviennent dans la dynamique de repousse permettant de fournir des squelettes carbonés et de l'énergie après la défoliation (Mino et Maeda, 1976). Les conditions environnementales comme la photopériode, la température, la disponibilité en eau et la fertilisation azotée jouent sur l'accumulation des sucres non structuraux chez les Poacées (Pollock et Cairns, 1991) y compris la fléole des prés (Thorsteinsson *et al.*, 2002; Bertrand *et al.*, 2008). La compréhension de la régulation du métabolisme carboné, conduisant à l'accumulation des SNS et des fructanes en particulier, est essentielle pour améliorer la valeur nutritive du fourrage et la production de biomasse à partir de ces espèces.

II.1. ASSIMILATION ET PARTITION DU CARBONE CHEZ LES POACEES

II.1.1. Photoassimilation et mise en réserve du carbone: accumulation des sucres non structuraux chez les Poacées

Les plantes, dans des conditions de photopériode normales, sont soumises à un dilemme: la photosynthèse a lieu le jour, mais l'approvisionnement des tissus en photoassimilats doit être maintenu pendant la nuit. L'une des solutions à ce problème consiste à allouer une partie du carbone fixé à la mise en réserve dans les feuilles,

impliquant des mécanismes complexes de régulation (Zeeman *et al.*, 2007). La plupart des espèces stockent ainsi le carbone sous forme d'amidon et en moindre quantité sous forme de saccharose. Environ 15 % des végétaux supérieurs, soit environ 45 000 espèces, accumulent leurs réserves glucidiques principalement sous forme de fructanes (Tableau II.1; Hendry, 1993). Ces polymères de fructoses hydrosolubles ont été identifiés par Rose en 1804 chez *Inula helenium*, une dicotylédone de la famille des Astéracées (Pontis et Del Campillo, 1985). Chez les monocotylédones, les fructanes sont présents dans environ 15 000 espèces qui appartiennent à deux grandes familles: les Liliacées et les Poacées. Chez les Poacées des régions tempérées, comme l'orge (*Hordeum vulgare*), le blé (*Triticum aestivum*) ou la fléole des prés, peu d'amidon est accumulé. Pour ces espèces, ce sont les fructanes qui constituent la majorité des réserves (Greenfield *et al.*, 1974; Pollock et Cairns, 1991).

Tableau II.1: Distribution des fructanes chez les angiospermes (d'après Hendry, 1993).

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

La plupart des Poacées des régions tempérées à photosynthèse de type C3 (dont le premier produit formé suite à la fixation du CO₂ par la Rubisco est une

molécule à trois atomes de carbone: le 3-phosphoglycérate) accumulent des fructanes quand les concentrations en saccharose deviennent élevées (Figure II.1; Tableau II.2). Par opposition, les Poacées en C4 caractéristiques des régions tropicales comme le maïs (*Zea mays*), accumulent l'amidon (Chatterton *et al.*, 1989). Cependant, l'étude réalisée par Chatterton et ses collaborateurs (1989) sur l'analyse des sucres non structuraux chez 185 espèces de Poacées tropicales et tempérées cultivées sous deux régimes de température (10°/5°C et 25°/15°C ; jour/nuit) montre que certaines espèces en C3, d'origine gondwanique, n'accumulent pas de fructanes (espèces non laurasiennes des genres *Danthonia*, *Stipa*, *Oryzopsis* et *Phragmites*) même si elles sont soumises à des températures froides (10°/5°C ; jour/nuit). Une espèce en C3 (*Elymus tsukushiensis*) accumule autant de fructanes en régime 10°/5°C (139 mg g⁻¹ MS) qu'en régime 25°/15°C (123 mg g⁻¹ MS) alors que la moyenne pour le régime 25°/15°C est de 12 mg g⁻¹ MS pour l'ensemble des Poacées tempérées en C3 dans ces conditions (Tableau II.2 ; Chatterton *et al.*, 1989). Ces travaux montrent que les fructanes et l'amidon ne sont pas nécessairement des formes alternatives de stockage des sucres chez les Poacées et que l'accumulation de saccharose n'est pas toujours associée à une accumulation de fructanes.

Tableau II.2: Moyennes des teneurs en sucres non structuraux (mg g⁻¹ MS) dans les feuilles de 128 graminées tempérées et 57 graminées tropicales pour deux températures (10°/5°C et 25°/15°C; jour/nuit). La valeur entre parenthèse présente la moyenne des erreurs standards (d'après Chatterton *et al.*, 1989).

Type de graminée	Régime de températures	Sucres Non Structuraux	Saccharose	Glucose	Fructose	Fructanes	Amidon
Tempérée	10°C/5°C	312 ± 130	58 ± 38	29 ± 15	24 ± 19	115 ± 101	86 ± 39
	25°C/15°C	107 ± 51	23 ± 17	18 ± 9	14 ± 9	12 ± 15	41 ± 21
Tropicale	10°C/5°C	166 ± 74	66 ± 40	22 ± 17	14 ± 17	3 ± 6	68 ± 46
	25°C/15°C	92 ± 51	22 ± 19	13 ± 15	8 ± 15	4 ± 6	47 ± 24

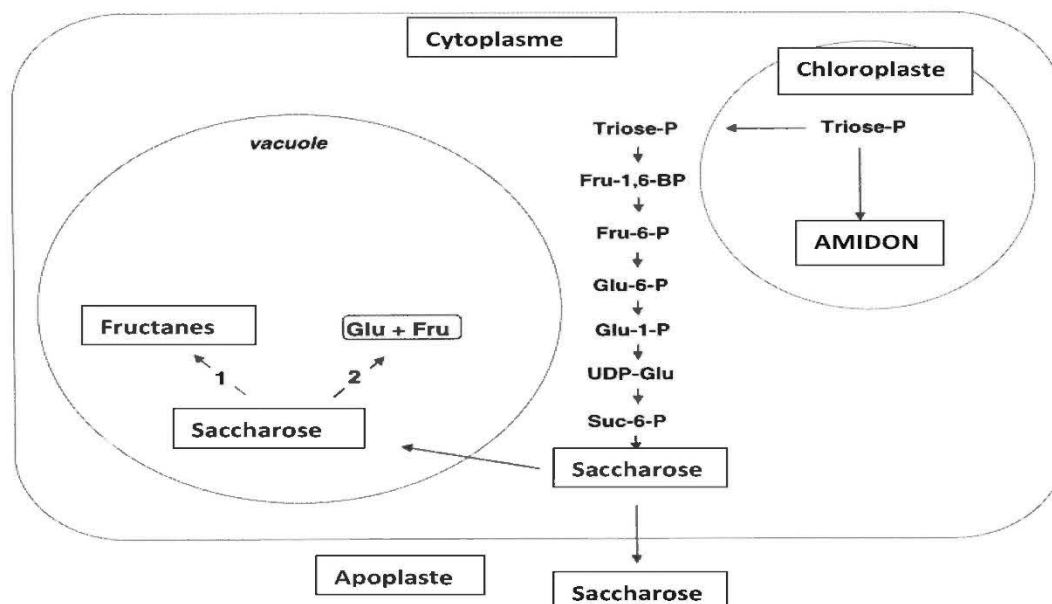


Figure II.1: Représentation simplifiée du métabolisme carboné primaire chez les Poacées accumulatrices de fructanes. Une activité photosynthétique élevée est associée à une hausse du transfert des trioses-phosphate (1^{er} produit de la photosynthèse) vers le cytoplasme, occasionnant une augmentation des intermédiaires métaboliques vers la synthèse du saccharose. Le saccharose est dirigé soit vers la vacuole (stockage de squelettes carbonés et d'énergie), soit vers l'apoplaste (pour le transport vers les tissus puits). Dans la vacuole, le saccharose peut être converti en fructanes par les fructosyltransférases (1) ou hydrolysé en glucose et fructose par les invertases (2) (Adapté de Vijn et Smeekens, 1999).

II.1.2. Métabolisme de l'amidon

a) Structure de l'amidon

L'amidon est un mélange de deux chaînes glucidiques: l'amylose et l'amylopectine. La proportion de ces deux types moléculaires varie selon l'espèce végétale. L'amylose est en général le constituant le moins abondant, c'est un polymère peu ramifié d'environ 100 à 1000 résidus de D-glucopyranose, enchaînés par des liaisons glucosidiques $\alpha(1-4)$. Comme l'amylose, l'amylopectine est un $\alpha(1-4)$ -

glucane, avec de nombreux branchements par des liens glucosidiques $\alpha(1-6)$ à des chaînes linéaires de résidus glucopyranosyles liés en $\alpha(1-4)$ (Buléon *et al.*, 1998). Ces ramifications interviennent en moyenne tous les 20 à 25 résidus, avec 5 à 6 % de branchement $\alpha(1-6)$ sur une chaîne principale, et contiennent environ 15 à 30 résidus liés en $\alpha(1-4)$ (Ball *et al.*, 1996). Les molécules d'amylopectine isolées des cellules végétales peuvent contenir quelques milliers d'unités de glucose. La molécule d'amidon présente ainsi un aspect arborescent, elle est synthétisée sous forme de grains d'amidon qui sont des structures partiellement cristallines, souvent transitoires, au niveau des chloroplastes et stockés à plus long terme dans les amyloplast (Buléon *et al.*, 1998).

b) Synthèse et dégradation de l'amidon

Une quarantaine d'enzymes interviennent dans le métabolisme de l'amidon. L'initiation de la synthèse et de la dégradation dépend du rythme circadien, de régulations enzymatiques post-traductionnelles et de l'état de phosphorylation de la molécule d'amidon (Orzechowski, 2008). L'intensité de biosynthèse dans les feuilles est régulée principalement par l'activité AGPase (Adenosine 5'-diphosphate glucose pyrophosphorylase) qui réagit avec l'ATP pour former l'ADP-Glucose, forme « activée » du glucose et précurseur direct de la synthèse de l'amidon. L'amidon synthase catalyse ensuite la formation des liaisons $\alpha(1-4)$ de l'amylose et l'amylopectine en voie d'élongation.

Les enzymes clefs dans la dégradation de l'amidon sont la β -amylase, l' α -amylase (ou isoamylase) et l'enzyme de débranchement. L' α -amylase, est une endo-glucosidase qui catalyse l'hydrolyse aléatoire des liaisons glucosidiques $\alpha(1-4)$ de l'amylose et de l'amylopectine. Les produits d'hydrolyse sont des oligoholosides de 6 à 7 résidus en moyenne avec libération d' α -D-glucosyl-(1-4)-D-glucose, ou maltose. La β -amylase est une exo-glucosidase qui catalyse l'hydrolyse de la liaison

glucosidique $\alpha(1-4)$ à partir des extrémités libres, non-réductrices, de l'amylopectine, et libère séquentiellement du maltose. Les liaisons $\alpha(1-6)$ de l'amylopectine ne sont pas reconnues par la β -amylase: l'hydrolyse s'arrête quand l'enzyme atteint les points de branchement. Ce produit d'hydrolyse partielle est appelée dextrine limite. L'action spécifique d'enzymes de débranchement - ou dextrinases - est alors requise pour ces liaisons (Zeeman *et al.*, 2007). Il existe des différences importantes au niveau du métabolisme entre les tissus hétérotrophes et autotrophes, comme par exemple la présence de complexes protéiques responsables de la dégradation et de la biosynthèse de l'amidon dans les chloroplastes. Chez *Arabidopsis thaliana*, le génome code trois α -amylases: AtAMY1, AtAMY2 et AtAMY3. Seule AtAMY3 possède un peptide signal N-terminal pour la localisation plastidiale. Le mutant d'excès d'amidon d'*Arabidopsis* *sex4*, est déficient pour la protéine AtAMY3. Les mutants n'exprimant plus AtAMY3 ont cependant le même métabolisme diurne pour l'amidon transitoire que le type sauvage. Ces résultats suggèrent qu'AtAMY3 n'est pas exigé pour la répartition d'amidon transitoire dans les feuilles et que le phénotype d'excès d'amidon *Sex4* n'est pas uniquement dû à un défaut de cette protéine (Yu *et al.*, 2005).

c) L'amidon chez les Poacées à fructanes

Chez les Poacées des zones tempérées, les concentrations en amidon sont relativement faibles par rapport à celles des autres sucres non structuraux comme les fructanes (Tableau II.2). Une étude des mécanismes de régulation de la synthèse de l'amidon dans les tissus photosynthétique d'une espèce accumulatrice de fructanes a été réalisée chez *Lolium temulentum* (Cairns *et al.*, 2002). Les teneurs en glucides non structuraux ont été diminuées dans les feuilles par un traitement combinant une faible illumination et une augmentation de la température à 20°C favorisant la croissance, la respiration, et la demande vers les tissus puits. L'excision et l'illumination de ces feuilles relancent l'accumulation de saccharose et d'amidon alors que la synthèse de

fructanes débute après un temps de latence de 8h, lorsque les concentrations de saccharose sont de l'ordre de 75 à 100 mg g⁻¹ MS. Lorsque l'accumulation de saccharose cesse avec le début de l'accumulation des fructanes, l'accumulation d'amidon s'arrête également. Il semblerait donc que ce n'est pas la production de photosynthétats qui limite l'accumulation d'amidon. Un traitement au cycloheximide – un inhibiteur de la synthèse protéique - empêche l'induction de synthèse des fructanes et aboutit à des concentrations élevées de saccharose, mais pas de retour à la synthèse de l'amidon. Par ailleurs, un apport de mannose aux limbes excisés inhibe significativement la synthèse du saccharose, vraisemblablement via la séquestration du phosphate sous forme de mannose-6-phosphate non métabolisable, et empêche simultanément l'accumulation d'amidon. Les auteurs suggèrent que cette faible capacité à accumuler l'amidon, communes aux espèces accumulatrices de fructanes, serait une explication possible à l'apparition de la capacité à synthétiser les fructanes chez ces espèces (Tableau II.3) (Cairns *et al.*, 2002).

Les relations entre l'accumulation des fructanes et de l'amidon chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne*) ont pu être génétiquement différenciées par analyse de QTL (*Quantitative Trait Loci*) (Turner *et al.*, 2008). Ces analyses indiquent que les QTL pour les teneurs en fructanes et en amidon ne se chevauchent pas. Les capacités des Poacées à accumuler l'amidon et les fructanes devraient donc être indépendamment sélectionnables.

Tableau II.3: Teneurs en sucres solubles et amidon dans les feuilles d'espèces accumulatrices de fructanes ou d'amidon (adapté de Cairn *et al.*, 2002).

SUCRES ACCUMULES	Espèces	Photo période (h)	Intensité PPFD $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Amidon mg g ⁻¹ MF	Sucres solubles mg g ⁻¹ MF	Amidon %	Références
FRUCTANES	<i>Lolium temulentum</i>	8	350	2.1	22	8.7	(Pollock et Lloyd, 1987) ^{1,2}
		8	300	2.6	24.4	9.6	(Cairns <i>et al.</i> , 2002) ²
		24	300	7.5	44.8	14.3	(Cairns <i>et al.</i> , 2002) ²
		8	400	8.5	10	45.9	(Perilleux et Bernier, 1997) ³
	<i>Lolium perenne</i>	nat	1400 max	5.3	45.1	10.5	(Cairns <i>et al.</i> , 2002) ²
	<i>Hordeum vulgare</i>	nat	nr	2.6	62.4	4.0	(Kingston-Smith <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Hordeum distichum</i>	16	720	12.4	38.2	24.5	(Farrar et Farrar, 1985) ⁴
	<i>Poa jemtlandica</i>	16	250	12.5	37.0	25.3	(Borland et Farrar, 1985) ³
	<i>Poa annua</i>	16	250	14.0	42.0	25.0	(Borland et Farrar, 1985) ³
	<i>Phleum pratense</i>	15	350	0.9	8.75*	9.3	(Bertrand <i>et al.</i> , 2008) ¹
		17	350	1.2	6.75	15.3	(Bertrand <i>et al.</i> , 2008) ¹
AMIDON	<i>Trifolium pratense</i>	16	500	61.6	7.8	88.8	(Jones, 1990)
		nat	1400 max	49.9	3.8	92.9	(Cairns <i>et al.</i> , 2002) ⁵
	<i>Medicago sativa</i>	7	640	23.4	nr	-	(Chatterton et Silvius, 1980) ³
	<i>Glycine max</i>	7	640	22.0	nr	-	(Chatterton et Silvius, 1980) ³
	<i>Pisum sativum</i>	0.4	600	nr	nr	-	(Smith <i>et al.</i> , 1990) ⁶
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	nat	nat, nr	nr	nr	-	(Sharkey <i>et al.</i> , 1985) ⁷
	<i>Nicotiana tabacum</i>	nat	nat, nr	37.5	3.0	92.6	(Abbott et Matheson, 1972) ²
	<i>Brassica napus</i>	nat	1400 max	21.7	9.1	70.5	(Cairns <i>et al.</i> , 2002) ⁵
	<i>Zea mays</i>	7	640	23.8	nr	-	(Chatterton et Silvius, 1980) ³
		0.5	650	nr	nr	-	(Lunn et Hatch, 1997) ⁶
		nat	1400 max	22.6	10.7	67.9	(Cairns <i>et al.</i> , 2002) ⁵
	<i>Clarkia xantiana</i>	0.2	1000	nr	nr	-	(Neuhaus <i>et al.</i> , 1989) ⁶
	<i>Digitaria decumbens</i>	7	640	36	nr	-	(Chatterton et Silvius, 1980) ³
	<i>Gossypium hirsutum</i>	8	710	35.0	nr	-	(Chang, 1979) ⁷
	<i>Beta vulgaris</i>	23	750	26.3	6.6	80.0	(Li <i>et al.</i> , 1992) ⁷
		7	640	15.4	nr	-	(Chatterton et Silvius, 1980) ³
	<i>Solanum tuberosum</i>	10	460	36.0	nr	-	(Lorenzen et Ewing, 1992)
	<i>Spinacea oleracea</i>	7	640	9.6	nr	-	(Chatterton et Silvius, 1980) ³
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (phenotype sauvage)	nat	1400 max	12.1	2.7	81.8	(Cairns <i>et al.</i> , 2002) ⁵
		12	200	13.5	nr	-	(Zeeman <i>et al.</i> , 1998)
		12	200	6.7	nr	-	(Lin <i>et al.</i> , 1988)
		12	61	5.0	nr	-	(Eimert <i>et al.</i> , 1995) ⁸

¹ Feuilles² Moyennes pour n=3, erreur sur la moyenne <15%³ Recalculé à partir de la matière sèche pour environ 80% d'eau.⁴ Recalculé par unité de surface pour 1 m²=139 g MF (monocotylédone)⁵ Moyennes pour n=3, erreur sur la moyenne <15%⁶ Pour un gramme (g) de MF=1,3 mg de chlorophylle.⁷ Recalculé par unité de surface pour 1 m²=240 g MF (dicotylédone)⁸ Recalculé pour 5000 lux. * : moyenne de trois températures se=0,56

Amidon % : proportion d'amidon par rapport aux glucides (amidon + sucres solubles)

nat: illumination naturelle

nr: Non rapporté.

II.1.3. Structure et métabolisme des fructanes chez les Poacées

a) Diversité des fructanes

Les fructanes sont des polymères de fructose construits à partir du saccharose qui sert d'amorce à l'initiation de la synthèse des polymères. Des enzymes spécifiques, les fructosyl-transférases (FT), permettent d'ajouter des résidus de fructose sur la molécule receveuse (saccharose ou résidu fructosyl-fructose de $DP \geq 3$) donnant ainsi différents DP (degrés de polymérisation). Les fructanes contiennent ainsi un résidu D-glucopyranosyl et n résidus D-fructofuranosyls. Les résidus sont liés entre eux par des liaisons O-glycosidiques en $\beta(2-1)$ ou en $\beta(2-6)$. Ces liaisons engagent toujours le carbone n°2 du fructosyl terminal qui porte la fonction réductrice puisque les fructanes, comme le saccharose, sont des sucres non réducteurs (Figures II.2 et II.3). Le terme générique « fructane » désigne tout composé dont la liaison fructosyl-fructose constitue la majorité des liens (Lewis, 1993). Les intermédiaires de synthèse des polymères sont des Fructo-OligoSaccharides (FOS) tels que:

- le 1-kestotriose : trisaccharide possédant un résidu fructosyl terminal lié par une liaison $\beta(2-1)$ au résidu fructose du saccharose;
- le 6-kestotriose: trisaccharide dont le carbone n°2 du résidu fructosyl terminal est lié au carbone n°6 du résidu fructosyl du saccharose formant ainsi une liaison $\beta(2-6)$;
- le 6G-kestotriose (ou néokestose) : trisaccharide possédant un résidu glucosyl interne, formé par l'addition d'un résidu fructosyl lié en $\beta(2-6)$ sur le résidu glucosyl du saccharose. C'est le seul fructane de DP 3 à posséder un glucose interne.

Les fructanes de la famille "inuline" sont synthétisés à partir du 1-kestotriose (plus petite molécule de la famille inuline) et leur glucose est en position terminale. Les liaisons entre les résidus fructosyls sont de type $\beta(2-1)$ et ces fructanes sont linéaires. Ce type de fructanes est principalement retrouvé chez les dicotylédones, plus particulièrement chez les Astéracées (Van Laere et Van den Ende, 2002). Les

fructanes de la famille inuline se retrouvent aussi chez de nombreuses monocotylédones (Ritsema et Smeekens, 2003b).

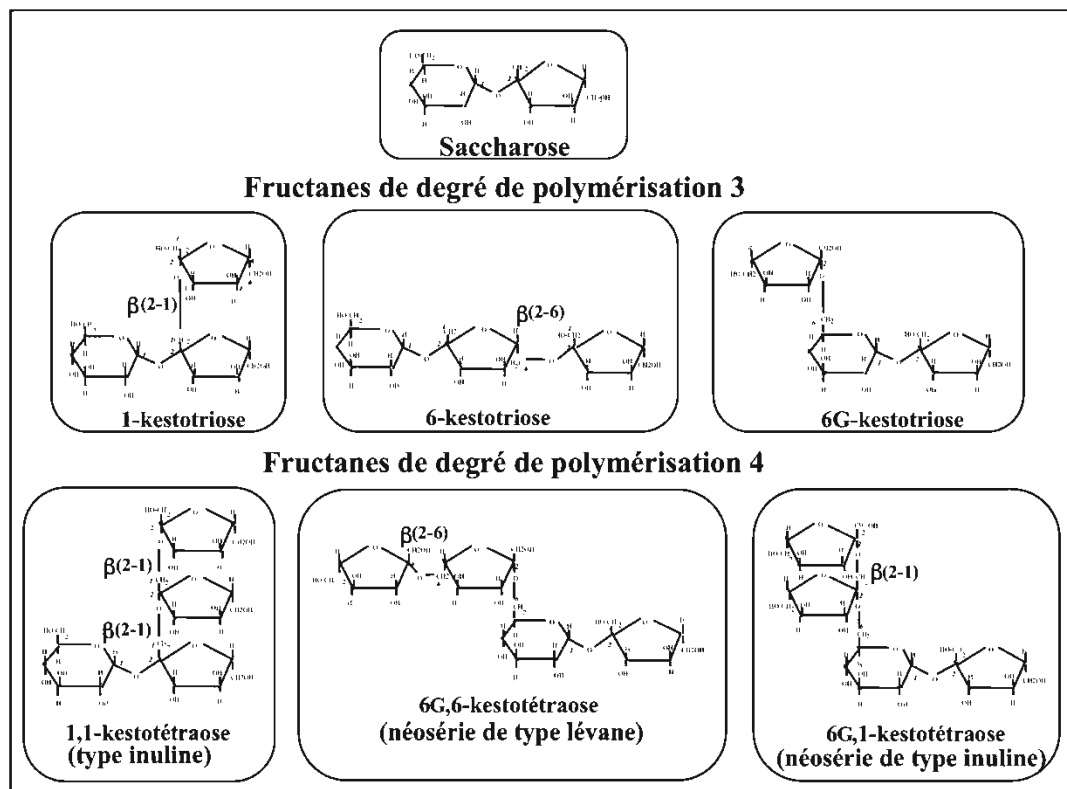


Figure II.2: Structure chimique du saccharose, des fructanes de degré de polymérisation 3 (DP3) et 4 (DP4) de *Lolium perenne*. Le nom des fructanes est indiqué en fonction de la nomenclature de Waterhouse et Chatterton (1993).

Les fructanes de type "lévane" ou "phléine" sont synthétisés à partir du 6-kestotriose et leur glucose est en position terminale. Les liaisons entre les résidus fructosyls sont de type $\beta(2-6)$ et ces fructanes sont linéaires. Les fructanes de type « lévane » sont rencontrés chez les bactéries avec des DP très élevés. Chez les Poacées, on les retrouve chez le dactyle (*Dactylis glomerata* ; Chatterton *et al.*, 1993) et la fléole des prés (*Phleum pratense* ; Cairns et Ashton, 1993), où ils représentent la majorité des fructanes.

Les fructanes de type "graminane" (polymères mixtes) sont synthétisés à partir du 1-kestotriose ou du 6-kestotriose et leur glucose est en position terminale. Les

liaisons entre les résidus fructosyls sont donc de type $\beta(2-1)$ et/ou $\beta(2-6)$ et ces fructanes possèdent de nombreux branchements. Le bifurcose, un tétra-saccharide formé par l'addition d'un résidu fructosyl sur le C₆ du fructose central du 1-kestotriose, est le composé intermédiaire dans la génération des branchements (Bancal *et al.*, 1991).

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

- Entre le préfixe et le suffixe se trouve la racine grecque correspondant au DP du fructane : les fructanes de DP3 sont des kestotrioses, les DP4 des kestotétraoses, les DP5 des kestopentaoses etc.....

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

La fonction réductrice portée par le carbone n°2 du premier fructosyle est toujours engagée dans la liaison avec le saccharose. Le fructosyle peut être lié au niveau du carbone n°1 ou du carbone n°6 du fructose de la molécule de saccharose ou au niveau du carbone n°6 du glucose dans la molécule de saccharose. Chacune des liaisons sera alors désignée respectivement par 1,6 ou 6,6-.

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

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

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

- Les liaisons engageant le fructose du saccharose sont citées en premier. Lorsque la liaison $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$ coexistent, la liaison $\beta(2-1)$ est notée en premier.

- Les différents numéros précédemment cités sont séparés par :

Une virgule lorsqu'ils concernent des liaisons sur différents résidus :

le 1,1-kestotétraose ; le 6,6-kestotétraose et le 6G,1-kestotétraose par exemple.

Le signe « & » lorsqu'ils concernent des liaisons sur le même résidu :

le 1&6-kestotétraose par exemple.

Figure II.3: Nomenclature des fructanes (d'après Waterhouse et Chatterton, 1993).

Les fructanes de type "néosérie" sont synthétisés à partir du 6G-kestotriose et leur glucose est en position interne. Les liaisons entre les résidus fructosyls peuvent être de type $\beta(2-1)$ ou $\beta(2-6)$ ce qui forme respectivement la néosérie inuline et la néosérie lévane. Les fructanes de type néosérie rassemblent les fructanes synthétisés à partir du 6G-kestotriose et leur glucose est interne. Ils sont généralement accumulés chez les Liliacées et certaines Poacées (*Lolium perenne* ; Pavis *et al.*, 2001).

La raison de la multiplicité de structures des fructanes est inconnue. Des travaux réalisés par Bonnett *et al.* (1997) et Chatterton et Harrison (1997) montrent que les liens $\beta(2-6)$ prédominent chez les poacées, mais les liaisons $\beta(2-1)$ sont également répertoriées chez de nombreux genres de cette famille (Tableau II.4). Il semble que ni la nature des liaisons, $\beta(2-1)$ ou $\beta(2-6)$, ni la présence ou l'absence

d'un résidu glucosyl interne ne puissent être retenues comme marqueur taxonomique pour différencier par exemple les Triticeae et les Poeae (deux sous familles de Poacées), étant donné que ces critères sont partagés par des espèces appartenant aux deux tribus (Bonnett *et al.*, 1997; Chatterton et Harrison, 1997).

Tableau II.4: Résumé des caractéristiques des fructanes présents dans la sous-famille des *Pooideae* (d'après Bonnett *et al.*, 1997).

Groupe	Tribu	Genre	Caractéristiques des fructanes
Triticodae	<i>Triticeae</i>	<i>Triticum, Secale, Hordeum, Elytrigia</i>	Mélange de liaisons $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$, points de branchements et résidu glucosyl terminal
	<i>Bromeae</i>	<i>Bromus</i>	Mélange de liaisons $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$, points de branchements et résidu glucosyl terminal
Poodae	<i>Aveneae</i>	Type 1 : <i>Avena, Lagurus</i>	Prédominance de liaisons $\beta(2-6)$, nombreuses molécules avec un résidu glucosyl interne
		Type 2 : <i>Phalaris, Holcus</i>	Prédominance de liaisons $\beta(2-6)$, avec un résidu glucosyl terminal
	<i>Poeae</i>	Type 1 : <i>Lolium</i>	Prédominance de liaisons $\beta(2-6)$, nombreuses molécules avec un résidu glucosyl interne
		Type 2 : <i>Dactylis, Puccinellia</i>	Prédominance de liaisons $\beta(2-6)$, avec un résidu glucosyl terminal
		Type 3 : <i>Poa ampla</i>	Liaisons $\beta(2-6)$, avec un résidu glucosyl terminal

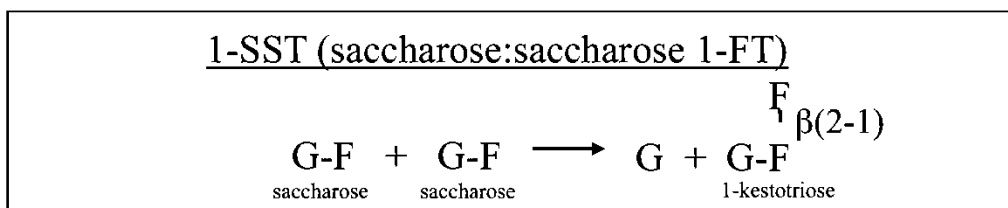


Figure II.4: Description de la réaction catalysée par la 1-SST. (G : glucose ; F : fructose).

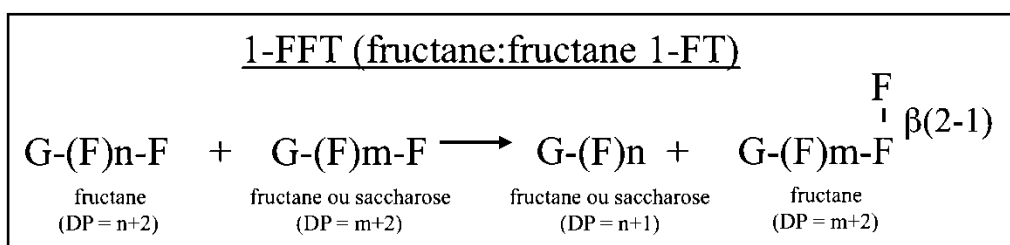


Figure II.5: Description de la réaction catalysée par la 1-FFT. (G : glucose; F : fructose).

b) Métabolisme des fructanes

i) Synthèse des fructanes : les FructosylTransférases (FTs)

Chez les dicotylédones, deux enzymes sont suffisantes pour la synthèse de l'inuline: la saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST) (EC 2.4.1.99) et la fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT) (EC 2.4.1.100) en accord avec le modèle d'Edelman et Jefford de 1968, confirmé par Koops et Jonker (1996) puis Van den Ende *et al.* (2002). La première enzyme, la 1-SST, catalyse de manière irréversible la synthèse du 1-kestotriose à partir de deux molécules de saccharose (Figure II.4). Le 1-kestotriose formé est utilisé comme substrat par la seconde enzyme, la 1-FFT, qui catalyse le transfert réversible d'un résidu fructosyl entre deux molécules de fructanes (Figure II.5). La 1-FFT permet ainsi l'allongement séquentiel des fructanes par addition de résidus fructosyls liés en $\beta(2-1)$ et aboutit à des

fructanes de types inuline chez les dicotylédones (Van den Ende *et al.*, 2002; Van den Ende *et al.*, 2006).

Le mécanisme de biosynthèse est plus compliqué chez les monocotylédones en raison de la coexistence de liaisons $\beta(2-6)$ et de liaisons $\beta(2-1)$, l'existence de structures linéaires et branchées et la présence de résidus glucosyls, internes ou terminaux, nécessitant la présence d'activités enzymatiques supplémentaires (Ritsema *et al.*, 2006). Comme chez les dicotylédones, la 1-SST est requise pour initier la synthèse mais au moins trois autres enzymes sont impliquées (Ritsema et Smeekens 2003b). L'activité 1-FFT est requise (comme chez les dicotylédones) et catalyse la synthèse des liaisons $\beta(2-1)$. La synthèse des lévanes comportant des liaisons $\beta(2-6)$ entre les résidus fructosyls qui sont aussi présents dans les motifs complexes des graminanes (liaisons mixtes) sont catalysés par l'action de la saccharose:fructane 6-fructosyltransférase (6-SFT ; EC 2.4.1.10). Cette enzyme réalise le transfert du résidu fructosyl du saccharose sur le résidu d'un autre saccharose et donne comme intermédiaire de synthèse le 6-kestotriose (Figure II.6). Elle allonge la chaîne par additions successives de résidus fructosyls liés en $\beta(2-6)$ (Duchateau *et al.*, 1995). La 6-SFT est une enzyme multifonctionnelle, dont l'activité dépend du substrat présent dans le milieu. En présence de saccharose, elle présente essentiellement une activité invertasique (environ à 80%) doublée d'une activité 6-SST (20%) qui conduit à la formation de 6-kestotriose. En présence simultanée de saccharose et de 1-kestotriose, l'activité invertasique disparaît, et l'enzyme agit essentiellement comme une 6-SFT utilisant le saccharose comme donneur de fructose pour le greffer sur le 1-kestotriose par une liaison $\beta(2-6)$ et former ainsi du bifurcose (1&6-kestotétraose ; Figure II.7) (Duchateau *et al.*, 1995; Sprenger *et al.*, 1995). Cette enzyme, comme la 1-SST, est à la fois une transférase et une invertase. La synthèse de fructanes possédant un résidu glucosyl interne, comme le néokestose, nécessite l'action d'une fructane:fructane 6G-fructosyltransférase (6G-FFT) (Shiomi, 1989). Cette dernière enzyme catalyse le transfert d'un résidu fructosyl du 1-kestotriose (donneur de fructosyl) sur le résidu

glucosyl d'une molécule de saccharose par une liaison $\beta(2-6)$. Les fructanes de la néosérie inuline peuvent être produits à partir du 6G-kestotriose par action de la 1-FFT ou à partir de l'inuline par action de la 6G-FFT. Ce mécanisme a été bien élucidé chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne*) (Lasseur *et al.*, 2009) et suggèrent l'intervention de 4 activités enzymatiques pour la synthèse des différents fructanes identifiés chez cette espèce : une 1-SST pour la synthèse de 1-kestotriose, une 1-FFT pour l'allongement des chaînes de fructose en $\beta(2-1)$, une 6G-FFT pour la production des fructanes de types néoséries et une 6-SFT pour la formation des liaisons $\beta(2-6)$ (Lasseur *et al.*, 2011). Les activités 6G-FFT and 1-FFT sont portées par une seule protéine récemment identifiée, la Lp6G-FFT/1-FFT (Lasseur *et al.*, 2006). Chez le pâturin (*Poa ampla*), espèce accumulatrice de lévanes, il est possible que la 6-SFT soit l'unique enzyme de synthèse des fructanes. L'enzyme présenterait alors une activité 6-SST en présence de saccharose formant ainsi du 6-kestotriose, et une activité 6-SFT en présence de saccharose et de lévanes permettant l'allongement des chaîne en $\beta(2-6)$ (Chatterton et Harrison, 1997).

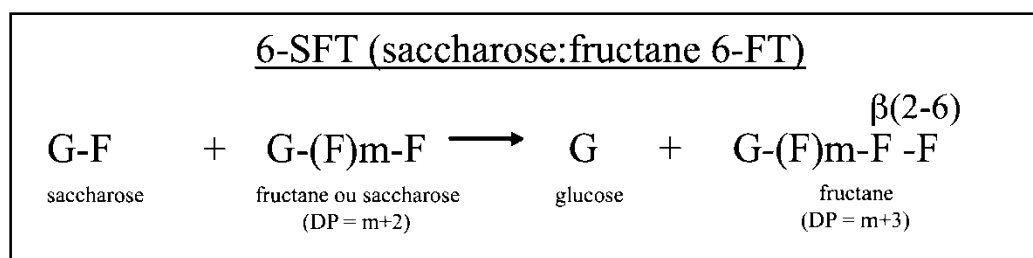


Figure II.6: Description de la réaction catalysée par la 6-SFT (saccharose:fructane 6-fructosyltransférase) chez les monocotylédones. (G : glucose; F : fructose).

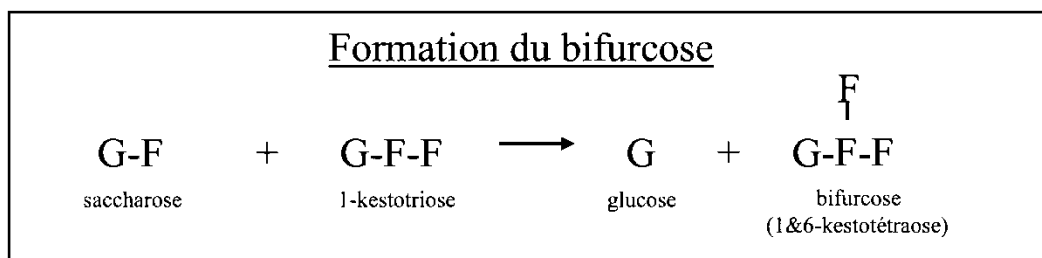


Figure II.7: Formation du plus petit fructane de type mixte (bifurcose = 1&6-kestotétraose) par action de la 6-SFT d'orge avec comme substrat du saccharose et du 1-kestotriose. (G : glucose; F : fructose).

En outre, l'existence supposée d'une activité «*Phléine Sucrase*» qui catalyserait la synthèse des fructanes de haut DP a été décrite chez la fléole (*Phleum pratense*) (Suzuki et Pollock, 1986) et mentionnée également chez le dactyle (Suzuki et Nass, 1988). Elle serait similaire aux lévanesucrases bactériennes et consisterait en un transfert direct et successif de résidus fructosyls du saccharose en $\beta(2-6)$ sur une molécule de fructane acceptrice, sans formation de fructanes de faibles DP intermédiaires. Elle reste cependant hypothétique d'autant plus qu'une première 6-SFT catalysant la synthèse de fructane de haut DP a été isolée récemment chez la fléole (Tamura *et al.*, 2009). Toutefois, ne disposant pas encore de protéines natives purifiées à l'homogénéité chez la fléole, il n'est pas possible de conclure quant aux nombres d'enzymes impliquées et à leurs fonctionnalités effectives *in vivo*. L'affinité des enzymes pour leur substrat semble constituer par ailleurs un facteur essentiel pouvant expliquer la diversité structurale rencontrée au sein des fructanes chez les différentes familles de Poacées (Tamura *et al.*, 2009; Lasseur *et al.*, 2011).

ii) Dégradation des fructanes : les Fructanes ExoHydrolases (FEHs)

Les enzymes responsables du catabolisme des fructanes chez les végétaux sont des Fructanes ExoHydrolase ou FEHs. Deux grands types de FEHs peuvent être distingués selon leur affinité pour les liaisons $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$ des chaînes de

fructanes : Les 1-FEHs et les 6-FEHs. Ces enzymes dégradent les fructanes en libérant séquentiellement les fructoses terminaux (Figure II.8; Simpson et Bonnett 1993; De Roover *et al.*, 1999; Lothier *et al.*, 2007).

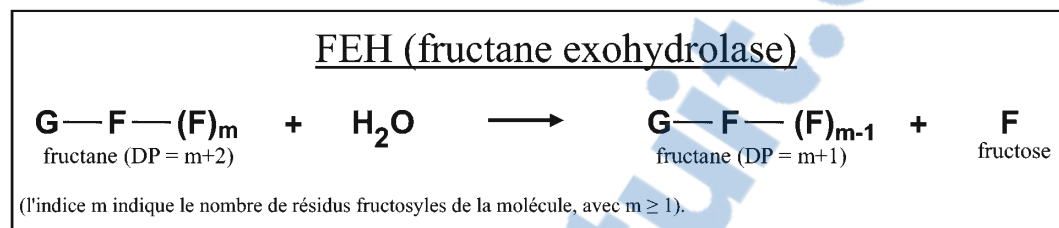


Figure II.8: Réaction enzymatique catalysée par l'activité fructane exohydrolase (FEH). (G : glucose; F : fructose).

Les isoformes qui hydrolysent préférentiellement les liaisons $\beta(2-1)$ sont appelées 1-FEH et ont été caractérisées notamment chez le blé (Bancal *et al.*, 1991), l'orge (Henson et Livingston, 1998), la chicorée (De Roover *et al.*, 1999), le topinambour (Marx *et al.*, 1997a), le ray-grass anglais (Lothier *et al.*, 2007), *Bromus pictus*, une Poacée de Patagonie tolérante au froid (Del Viso *et al.*, 2009b) et chez *Arctium lappa*, une Astéracée (Ueno *et al.*, 2011). Trois 1-FEH ont été purifiées et clonées chez le blé (1-FEHw1, w2 and w3) avec des propriétés enzymatiques qui peuvent varier légèrement envers leur substrat d'origine, les fructanes extraits des tiges de blé (Van den Ende *et al.*, 2003a; Van Riet *et al.*, 2008). De même, trois isoformes de 1-FEH ont été clonées chez la chicorée (1-FEH I; 1-FEH IIa et 1-FEH IIb; Van den Ende *et al.*, 2000; Van den Ende *et al.*, 2001).

Les 6-FEHs, qui hydrolysent préférentiellement les liaisons $\beta(2-6)$ ont été caractérisées, entre autre, chez l'orge (Henson et Livingston, 1996) et le blé (Van Riet *et al.*, 2006). Une première 6-FEH a été récemment caractérisée chez la fléole des prés où elle serait notamment induite, dans les « bulbes » situés à la base des tiges (*haplocorms*), après une défoliation (Tamura *et al.*, 2011).

Des isoformes hydrolysant aussi bien les liaisons $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$ (1&6-FEHs) ont été identifiées chez le dactyle (Yamamoto et Mino, 1985), le ray-grass *Lolium rigidum* (Bonnett et Simpson, 1995) et le blé (Kawakami *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis*, l'enzyme AtcwINV6 (*Arabidopsis thaliana* cell wall invertase 6) s'est avérée être une FEH qui hydrolyse aussi bien les liaisons $\beta(2-1)$ que les liaisons $\beta(2-6)$ (De Coninck *et al.*, 2005). Le blé possède également des 6-KEHs (6-Kestotriose ExoHydrolase). Ces enzymes sont non seulement spécifiques des liaisons $\beta(2-6)$ mais également d'un type de substrat : le 6-kestotriose, le plus petit fructane (DP3) de la famille lévane (Van den Ende *et al.*, 2005). De manière inattendue, des 6-FEH ont pu être purifiées à l'homogénéité chez des espèces non accumulatrices de fructanes comme la betterave à sucre (Van den Ende *et al.*, 2003b) et *Arabidopsis thaliana* citée précédemment. Il est suggéré que ces FEHs pourraient dégrader les lévanes exogènes provenant de bactéries pathogènes et donc assumer une fonction de défense (Van den Ende *et al.*, 2004).

A notre connaissance, une dizaine de FEHs ont été purifiées à l'homogénéité (Tableau II.5) et de nombreux gènes ont été clonés chez les dicotylédones et les monocotylédones, incluant des espèces non accumulatrices de fructanes (Tableau II.6).

Les FEHs présentent des caractéristiques communes, à savoir: un pH optimal situé entre 4,5 et 5,6 (Tableau II.5) et un optimum d'activité compris entre 25°C et 40°C. A côté des FEHs *sensu stricto*, qui hydrolysent spécifiquement les fructanes, certaines invertases vacuolaires ont la capacité d'hydrolyser non seulement le saccharose (activité invertase) mais également les fructanes (activité FEH) (Johnson *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2007). Cette activité FEH portée par une invertase pourrait avoir toute son importance dans les processus de mobilisation des réserves si elle s'additionne aux activités FEHs classiques. Ces enzymes, capables d'hydrolyser à la fois le substrat (saccharose) et les produits (fructanes) des FTs, ont probablement un rôle différent de celui des autres FEHs.

Tableau II.5: Quelques propriétés de FEHs purifiées à l'homogénéité (une seule bande révélée par coloration à l'argent après séparation par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide) ou partiellement pour la 6-FEH de blé (Van Riet *et al.*, 2006).

Activité principale	Source de l'enzyme	Nom	Facteur de purification	MM (kDa)	pH optimal	Références
1-FEH	<i>Cichorium intybus</i> (racines)	1-FEH I	643	68	5,0	Claessens <i>et al.</i> , 1990
	<i>Helianthus tuberosus</i> (tubercules)	1-FEH	41	79	5,2	Marx <i>et al.</i> , 1997a
	<i>Hordeum vulgare</i> (tiges)	1-FEH	-	33	-	Henson et Livingston, 1998
	<i>Cichorium intybus</i> (racines)	1-FEH IIa	70	64	5,0	De Roover <i>et al.</i> , 1999
	<i>Cichorium intybus</i> (racines)	1-FEH IIb	70	64	5,0	Van den Ende <i>et al.</i> , 2001
	<i>Triticum aestivum</i> (tiges)	1-FEHw1	90	70	4,5-5,5	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003a
	<i>Triticum aestivum</i> (tiges)	1-FEHw2	76	70	4,5-5,5	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003a
6-FEH	<i>Avena sativa</i> (feuilles)	6-FEH	-	43	4,5-5,0	Henson et Livingston, 1996
	<i>Lolium perenne</i> (chaumes)	6-FEH	10	69	5,1-5,6	Marx <i>et al.</i> , 1997b
	<i>Triticum aestivum</i> (chaumes)	6-FEHw1	-	72	-	Van den Ende <i>et al.</i> , 2005
	<i>Triticum aestivum</i> (épis)	6-FEH	-	70	-	Van Riet <i>et al.</i> , 2006
	<i>Arabidopsis thaliana</i> (feuilles)	AtcwINV3	-	72	-	De Coninck <i>et al.</i> , 2005
	<i>Beta vulgaris</i> (racines)	6-FEH	788	-	5,0-6,0	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003b

iii) Les FEHs: structure, fonctionnalité et phylogénie chez les Glycoside-Hydrolases (GH)

Les FEHs sont des protéines monomériques, contrairement aux invertases acides vacuolaires et aux FT végétales qui sont des hétérodimères. Elles appartiennent cependant toutes à la famille 32 des Glycosides Hydrolases (De Roover *et al.*, 1999; Van den Ende *et al.*, 2003a). La famille des Glycoside Hydrolases (GH) comprend des enzymes variées incluant les invertases, les hydrolases spécifiques aux sucres ainsi que des enzymes catalysant la synthèse de polysaccharides, d'oligosaccharides ou des glyco-conjugués. L'ensemble des éléments de cette

classification est régulièrement mise à jour et disponible sur le serveur URL: <http://www.cazy.org>. Le critère de regroupement commun des enzymes est une même structure tridimensionnelle globale (résolue ou prédite) et un mécanisme de catalyse analogue mais pas nécessairement la même spécificité de substrat. Par exemple, les enzymes actives sur le saccharose sont pour la plupart classées dans les familles 13, 31, 32, 68 et 70 des GH. Les enzymes spécifiques du transfert du fructose appartiennent aux familles GH32 et GH68. La famille GH32 regroupe ainsi les β -fructosidases de champignons et de levures (qui hydrolysent le saccharose et les fructanes) ainsi que les invertases pariétales et vacuolaires, les FTs et les FEH végétales. Les membres de la famille GH68 comprennent les invertases, les levanesucrases et les inulosucrases bactériennes (Pons *et al.*, 2000 ; Van den Ende *et al.*, 2009).

Les enzymes appartenant à la famille GH32 présentent deux domaines classiques dits N et C-terminaux aux extrémités. La structure cristalline de ces protéines montre que le domaine N-terminal présente une rare conformation en 5 hélices β avec un sillon en forme de poche centrale chargée négativement. Les modules des 5 feuillets sont disposés en ordre successif avec 5 repliements pseudo-symétriques autour de la poche centrale négative qui devient capable ainsi d'accepter une molécule de saccharose ou d'interagir avec un résidu fructosyl de la molécule de fructane (Meng et Fütterer, 2003). Le domaine C-terminal est constitué de repliements de feuillets β et l'ensemble est stabilisé par de multiples liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes, ainsi que des interactions faibles de type Van Der Waals. La région N-terminale, clivée au cours de la maturation de la protéine, comprend un peptide signal permettant l'entrée de la protéine dans le système endo-membranaire de sécrétion et un peptide signal impliqué dans son adressage vacuolaire. Les FEHs se présentent aussi sous forme d'une pré-enzyme avec un peptide signal de taille plus courte que celui des FTs végétales (Van den Ende *et al.*, 2006; Van Riet *et al.*, 2006).

Tableau II.6: Caractéristiques de certains ADNc de FEHs caractérisées dans un système hétérologue (complété à partir de De Coninck *et al.*, 2007).

Espèce	Nom Accession	pI prédit	MM estimée (kDa)	Longueur de l'ORF	Sites potentiels de glycosylation	Références
<i>Cichorium intybus</i>	1-FEH I AJ242538	6,5	60,5	568	10	Van den Ende <i>et al.</i> , 2000
	1-FEH IIa AJ295033	5,24	61	581	3	Van den Ende <i>et al.</i> , 2001
	1-FEH IIb AJ295034	5,24	61	581	3	Van den Ende <i>et al.</i> , 2001
<i>Triticum aestivum</i>	Ta1-FEHw1 AJ516025	4,79	61,2	597	4	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003a
	Ta1-FEHw2 AJ508387	4,78	61,2	596	4	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003a
	Ta1-FEHw3 AJ564996	4,88	61	596	4	Van Riet <i>et al.</i> , 2008
	6-FEH AM075205	6,5	65	590	5	Van Riet <i>et al.</i> , 2006
	6-KEHw1 AB089271	4,91	61	589	5	Van den Ende <i>et al.</i> , 2005
	6-KEHw2 AB089270	4,88	61	587	5	Van den Ende <i>et al.</i> , 2005
	6&1-FEHw1 AB089269	5,2	61	595	5	Kawakami <i>et al.</i> , 2005
<i>Campanula rapunculoides</i>	1-FEH AJ509808	5,1	61	578	1	Le Roy <i>et al.</i> , 2007b
<i>Beta vulgaris</i>	6-FEH AJ508534	5,0	62,9	606	9	Van den Ende <i>et al.</i> , 2003b
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtcwINV3= 6-FEH NM104385	5,52	67	595	4	De Coninck <i>et al.</i> , 2005
	AtcwINV6= 6&1-FEH NM121230	4,79	62	551	3	De Coninck <i>et al.</i> , 2005
<i>Lolium perenne</i>	1-FEHa DQ016297	5,22	65,4	584	4	Lothier <i>et al.</i> , 2007
<i>Arctium lappa</i>	AlEH1 = 1-FEH AB611034	4,86	65,7	581	3	Ueno <i>et al.</i> , 2011
<i>Vernonia herbaceae</i>	1-FEH AM231149	5,5	65,7	582	3	Ascga <i>et al.</i> , 2008
<i>Bromus pictus</i>	1-FEH GQ247882	5,5	67	602	3	Del Viso <i>et al.</i> , 2009b
<i>Phleum pratense</i>	Pp6-FEH1 AB583555	5,21	63,4	601	5	Tamura <i>et al.</i> , 2011

Les FEHs, tout comme les FTs, sont des glycoprotéines. Le nombre de sites potentiels de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) au niveau des séquences en acides aminés varie d'une protéine à l'autre. La glycosylation est confirmée par la liaison des FEHs (et des FTs) à la concanavoline A, une lectine qui reconnaît spécifiquement

les sucres des protéines glycosylées (Koops et Jonker 1996; De Roover *et al.*, 1999). Les motifs de N-glycosylation jouent un rôle important pour l'adressage vacuolaire, la stabilité de l'enzyme, sa conformation et sa spécificité d'activité (Ritsema et Smeekens, 2003b).

L'arbre phylogénétique des FTs, des FEHs et des invertases hydrolysant le saccharose montre que ces enzymes sont plus proches entre elles pour une même famille botanique que les enzymes catalysant les mêmes types de réactions dans des familles différentes. On observe ainsi que les FTs des monocotylédones ont davantage d'homologie avec les invertases des monocotylédones qu'avec toutes les FTs des dicotylédones. De même, les FEHs des monocotylédones sont plus proches des invertases pariétales des monocotylédones que des FEHs de dicotylédones (Ritsema et Smeekens, 2003b; Figure II.9). Selon Wei et Chatterton (2001), un gène ancestral codant une invertase se serait dupliqué avant la divergence entre monocotylédones et dicotylédones. L'un de ces gènes dupliqués aurait évolué donnant des invertases pariétales et FEHs et l'autre des invertases vacuolaires et FTs. Les fructanes seraient ainsi apparus par mutation des invertases en FTs, puis maintenus aux générations suivantes, suite à une pression de l'environnement conférant un avantage sélectif à ces plantes, par rapport aux plantes n'accumulant que l'amidon ou le saccharose. Les FEHs évoluant parallèlement à partir des invertases pariétales auraient fait également l'acquisition d'une séquence signal permettant leur adressage au niveau vacuolaire et un pI moins élevé, en adéquation avec leur compartiment de séquestration.

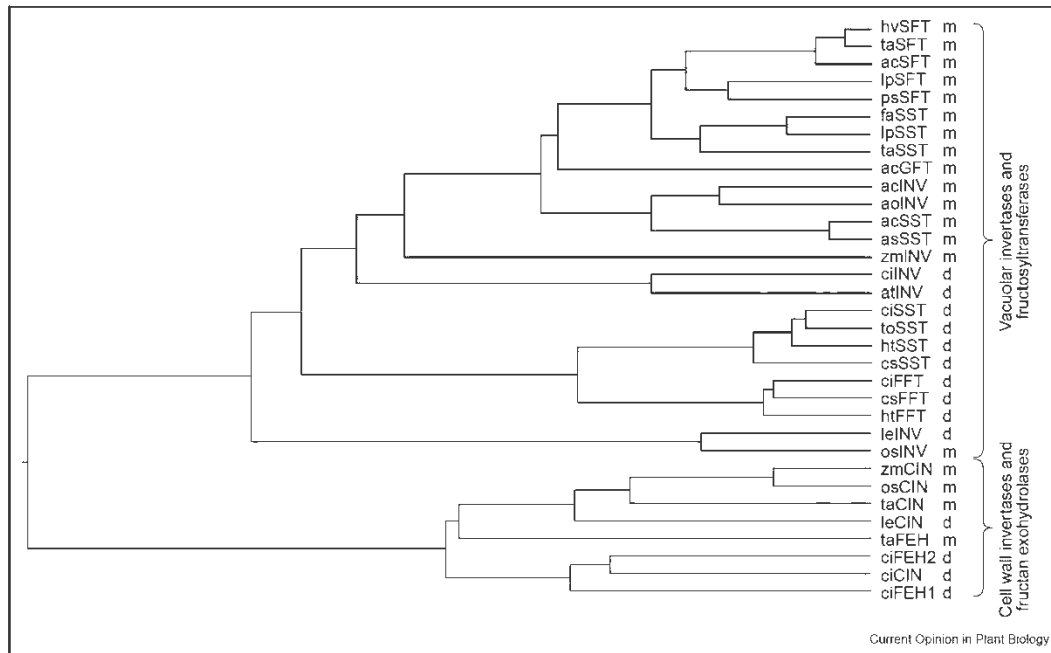


Figure II.9: Arbre phylogénétique de fructosyltransférases (FTs), fructane exohydrolases (FEHs), invertases vacuolaires (INV) et invertases partiétales (CIN) de monocotylédones (m) et dicotylédones (d). acGFT, *Alium cepa* 6G-FFT (Y07838); acINV, *Allium cepa* invertase (AJ006067); acSFT, *Agropyron cristatum* 6-SFT (AF211253); acSST, *Allium cepa* 1-SST (AJ006066); aoINV, *Asparagus officinalis* invertase (AF002656); asSST, *Allium sativum* 1-SST (AY098442); atINV, *Arabidopsis thaliana* invertase (AY142666); ciCIN, *Cichorium intybus* invertase pariétale (Y11124); ciFEH1, *Cichorium intybus* 1-FEH I (AJ242538); ciFEH2, *Cichorium intybus* 1-FEH II (AJ295033); ciFFT, *Cichorium intybus* 1-FFT (U84398); ciINV, *Cichorium intybus* invertase (AJ419971); ciSST, *Cichorium intybus* 1-SST (U81520); csFFT, *Cynara scolymus* 1-FFT (AJ000481); csSST, *Cynara scolymus* 1-SST (Y09662); faSST, *Festuca arundinaceae* 1-SST (AJ297369); htFFT, *Helianthus tuberosus* 1-FFT (AJ009756); htSST, *Helianthus tuberosus* 1-SST (AJ009757); hvSFT, *Hordeum vulgare* 6-SFT (X83233); leCIN, *Lycopersicon esculentum* invertase pariétale (AF506006); leINV, *Lycopersicon esculentum* invertase (D11350); lpSFT 6-SFT *Lolium perenne* (AF494041); lpSST, *Lolium perenne* 1-SST (AF492836); osCIN, *Oryza sativa* invertase pariétale (AB073749); osINV, *Oryza sativa* invertase (AF019113); psSFT, *Poa secunda* 6-SFT (AF192394); taCIN, *Triticum aestivum* invertase pariétale (AF030420); taFEH, *Triticum aestivum* FEH (AJ508387); taSFT, *Triticum aestivum* 6-SFT (AB029887); taSST, *Triticum aestivum* 1-SST (AB029888); toSST, *Taraxacum officinale* 1-SST (AJ250634); zmCIN, *Zea mays* invertase pariétale (U17695); zmiINV, *Zea mays* invertase (U16123) (d'après Ritsema et Smeekens, 2003a).

Il existe ainsi un motif β -fructosidase conservé au cours de l'évolution dont les acides aminés situés en aval détermineraient la spécificité de la réaction. Le motif β -fructosidase, comprend le motif NDPNG, présent chez toutes les invertases acides

ainsi que la séquence WECPD dont la proline serait caractéristique des FEHs (Sturm 1999). Le motif NDPNG, au même titre que le motif EC et le motif RDP, est présent chez les membres de la famille GH32. Le mécanisme général d'action proposé pour les enzymes des familles GH32 et GH68 est un mécanisme ping-pong qui se distingue par la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme (fructosyl-enzyme pour les FEHs) à partir duquel le résidu glycosyl (fructose) peut être transféré de manière préférentielle à l'eau (activité hydrolase) ou sur un autre accepteur (transfructosylation pour les FTs) avec un mécanisme moléculaire à rétention de configuration anomérique (Figure II.10) (Chambert *et al.*, 1974; Vergauwen *et al.*, 2003).

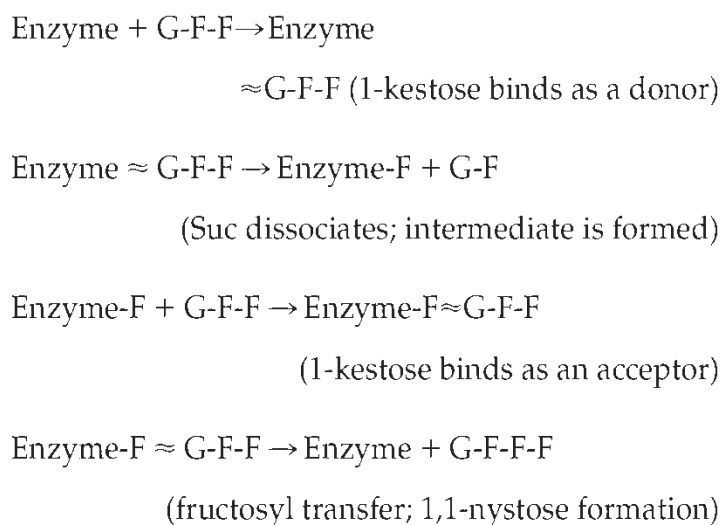


Figure II.10: Mécanisme ping-pong des fructosyltransférases (d'après Vergauwen *et al.*, 2003)

La poche centrale négative du site actif est en contact étroit avec les motifs conservés, β -fructosidase, (Figure II.11) qui interagiraient avec le carbone n°4 du résidu fructosyle de la molécule de saccharose et le carbone n°6 d'un résidu fructosyl de la molécule de fructane. Cela permet donc de supposer que l'aspartate (D) du motif β -fructosidase et le glutamate (E) du motif EC sont en position idéale pour

interagir avec les substrats que sont respectivement le saccharose et les fructanes.

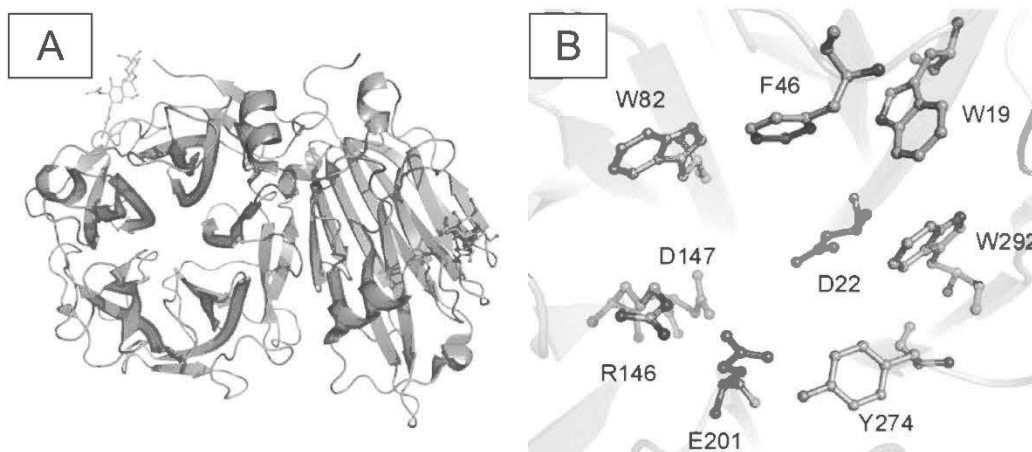


Figure II.11: Vue générale de la structure 3D (A) et positionnement du site actif (B) chez les GH32 (d'après Lammens *et al.*, 2009).

Ainsi, Reddy et Maley (1996) proposent que le mécanisme enzymatique conduisant à l'hydrolyse du saccharose implique d'une part, un acide aminé nucléophile qui attaque le saccharose et d'autre part, un acide aminé donneur de protons. Selon ce schéma, les résidus catalytiques nucléophile/base et donneur de protons sont respectivement l'aspartate (D) 41 et le glutamate (E) 241, confirmés sur l'invertase de levure (Reddy et Maley, 1990; 1996). La substitution de ce nucléophile dans l'invertase de levure (Reddy et Maley, 1990), ou chez la lévanesucrase de *Bacillus subtilis* (Meng et Fütterer, 2003) conduit respectivement à une inactivation ou à une réduction importante de la capacité à hydrolyser le saccharose ou les fructanes. Le donneur de protons pourrait être le glutamate (E) du motif **EC** selon les résultats obtenus chez la lévanesucrase de *Bacillus subtilis* où sa substitution par une alanine (A) abolit totalement l'activité de l'enzyme. Chez la lévanesucrase bactérienne, l'aspartate se lierait transitoirement de façon covalente au résidu fructosyl du saccharose avec libération de la molécule de glucose (Ortiz-Soto *et al.*, 2008). Le résidu fructosyl est ensuite transféré sur l'eau dans le cas d'une FEH, ou sur une

chaîne de polymère en élongation pour le cas des FTs. Les FT bactériennes peuvent également utiliser le raffinose comme donneur de fructose, et un troisième motif conservé, RDP déterminerait l'activité de polymérisation chez ces enzymes (Lammens *et al.*, 2009). En outre, une seule substitution de l'aspartate 239 chez *Arabidopsis* affecterait la spécificité de substrat en transformant une invertase en une 1-FEH chez cette espèce (Le Roy *et al.*, 2007a).

Malgré la présence de séquences signatures caractéristique des fructosidases, les acides aminés impliqués dans les réactions de transfructosylation déterminant la spécificité d'activité des FEHs, des invertases ou des FTs, ainsi que les mécanismes de régulation post-transcriptionnels ne sont pas encore bien élucidés. Il n'est donc pas possible de prédire avec certitude si un gène identifié comme codant une FEH putative (ou FEH-Like) présenterait l'activité présumée au niveau de la protéine traduite. C'est pourquoi, il est essentiel d'effectuer l'expression fonctionnelle des ADNc clonés une fois ces gènes identifiés.

c) Localisation tissulaire et subcellulaire des fructanes

Chez les Poacées tempérées, il n'existe pas d'organe de réserve proprement dit. Les fructanes s'accumulent pendant la phase végétative, surtout à la base des parties aériennes constituées des gaines des feuilles matures et de la base des feuilles en croissance (Pollock et Cairns, 1991). Cette zone est parfois formée de bulbes basaux ou *haplocorms* très riches en fructanes chez la fléole (Mino et Maeda, 1976). Dans les feuilles en croissance au niveau des zones de division, d'élongation et de maturation cellulaire, les fructanes ne sont pas répartis de façon homogène. Ils s'accumulent préférentiellement dans les cellules en élongation. Ce pool de fructanes servirait de stockage à court terme pour être utilisé dans l'élaboration de la paroi secondaire (Allard et Nelson, 1991). Dans ces zones de croissance du méristème foliaire des Poacées, la synthèse des fructanes aurait également pour fonction de

maintenir un gradient décroissant de ce dernier entre le phloème et les tissus en division et en élongation, permettant au déchargement du phloème de se poursuivre (Allard et Nelson 1991; Roth *et al.*, 1997).

L'accumulation de fructanes à la base des parties aériennes des Poacées est particulièrement importante pendant l'automne, lorsque la croissance est réduite alors que la capacité photosynthétique est encore élevée (White, 1973). Les fructanes accumulés à la base des tiges sont ensuite mobilisés lors de la reprise de croissance au printemps. Les fructanes sont également mis en réserve dans les tiges de blé et d'orge au cours du développement des fleurs pendant la phase reproductive et sont hydrolysés lors du remplissage du grain (Bonnett et Incoll, 1993; Schnyder, 1993).

Au niveau subcellulaire, des travaux de 1921 (cités par Pollock et Chatterton, 1988) rapportent la présence de sphérocristaux d'inuline précipités par l'éthanol au niveau de la vacuole. Cette localisation vacuolaire a été confirmée par des travaux postérieurs. En effet, chez l'orge, non seulement les fructanes mais aussi les activités 1-SST et FEH ont été localisées dans la vacuole (Wagner *et al.*, 1983; Wagner et Wiemken, 1986). Cependant, certains auteurs citent également une localisation apoplastique des fructanes. En effet, chez l'avoine, des fructanes ont été localisés au niveau de l'apoplaste et la présence d'activité FEH a été mise en évidence dans cette zone, après un durcissement au froid (Livingston et Henson 1998). Les fructanes une fois synthétisés dans les vacuoles seraient transportés *via* un système de vésicules de transport, conduisant à une localisation apoplastique (Valluru *et al.*, 2008). Il se pourrait que les enzymes (FEHs, FTs, invertases vacuolaires) soient compartimentées dans des vacuoles différentes, avec la coexistence dans certains tissus de vacuoles de stockage et de vacuoles de lyse (Swanson *et al.*, 1998). Ainsi, la 1-SST d'orge a un pH optimal différent de celui de l'invertase acide vacuolaire (Cairns et Gallagher, 2004; Nagaraj *et al.*, 2004) ce qui amènent les auteurs à proposer que le saccharose et les enzymes de synthèse des fructanes d'une part les invertases et les FEHs d'autre part soient séquestrées dans des vacuoles différentes. Ceci pourrait expliquer en partie

le fait que les activités d'hydrolyse et de synthèse sont souvent détectables de façon simultanée.

II.1.4. Régulation du métabolisme des fructanes chez les Poacées

a) Variations saisonnières et nycthémérales des teneurs en fructanes

Une étude réalisée sur 8 cultivars de fétuque montre que la différence de concentration de SNS entre le début et la fin de la journée augmente graduellement avec l'allongement de la photopériode pour la période de mai à août. Les concentrations en fructanes sont les plus hautes en juillet ($116 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$), mais celles du saccharose et de l'amidon sont plus élevées en mai (respectivement 79 et $53 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$) (Shewmaker *et al.*, 2006). Néanmoins, les concentrations en fructanes sont toujours plus élevées que celles de l'amidon. Les auteurs proposent ainsi d'effectuer la récolte entre midi et le coucher du soleil pour optimiser les concentrations en SNS dans les tissus récoltés.

b) Facteurs environnementaux

Les conditions d'illumination (Maleux et Van den Ende, 2007) ainsi que les concentrations en phosphate (Morcuende *et al.*, 2005), en nitrate (Morcuende *et al.*, 2004), les stress hydriques et thermiques (Livingston *et al.*, 2009) ou la défoliation (Gallagher *et al.*, 2007) influencent l'accumulation des fructanes.

La mobilisation des fructanes fait suite à une augmentation de l'activité FEH en réponse à la défoliation (Prud'homme *et al.*, 1992; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001), l'obscurité (Simpson et Bonnett 1993), l'acclimatation au froid ou à la sécheresse (Henson et Livingston, 1998; Van den Ende *et al.*, 2005; Sage et Kubien, 2007). Les mécanismes d'induction des FEHs sont cependant mal connus. Des signaux

hormonaux tels que les gibbérellines, (Morvan *et al.*, 1997) ou l'acide abscissique (ABA ; Yang *et al.*, 2004) seraient impliqués.

c) Rôle des sucres solubles

Les sucres chez les plantes, agissent comme substrat pour le métabolisme énergétique et la biosynthèse de glucides complexes, fournissant aux tissus les ressources nécessaires à leur développement. De plus, les sucres peuvent agir comme signaux métaboliques, ayant la capacité de réguler la croissance des plantes et leur développement en réponse aux stress biotiques ou abiotiques générés par l'environnement (Smeekens et Rook, 1997). Les systèmes de perception et transduction du signal sont différents pour les hexoses et le saccharose. La perception des hexoses peut dépendre de l'activité de phosphorylation des hexokinases (figure II.1) ou encore de mécanismes indépendants des hexokinases. Les cascades de transduction du signal hexose agissent de concert avec l'éthylène et les voies de transduction du signal de l'ABA (Smeekens, 2000). A côté des hexoses, d'autres sucres non structuraux tels que le saccharose, le tréhalose, le raffinose peuvent agir en tant que signaux.

Le saccharose jouerait ainsi un rôle clef dans la régulation de la synthèse des fructanes en tant que substrat et molécule signal induisant la transcription des FTs (Müller *et al.*, 2000). La diminution de la teneur en saccharose après défoliation conduit à l'augmentation de l'activité FEH chez le ray-grass (Lothier *et al.*, 2010). Cet effet serait lié à l'action signal du saccharose puisque l'augmentation de l'activité FEH après défoliation peut être partiellement inhibée par un apport d'analogues non métabolisables du saccharose. Les travaux de Lothier *et al.* (2010) montrent que la même hypothèse peut être formulée pour le glucose et le fructose. En effet, le 3-O-méthyl-glucose (absorbé par la plante, mais non phosphorylé par l'hexokinase) provoque une répression partielle de l'augmentation de l'activité FEH à la base des

feuilles en croissance après une défoliation, suggérant que le glucose agit en qualité de molécule signal dans ce tissu chez *Lolium perenne* (Lothier *et al.*, 2010). Par ailleurs, certaines FEHs sont fortement inhibées, *in vitro*, par des concentrations en saccharose comprises entre 10 et 20 mM (Marx *et al.*, 1997b; Henson et Livingston, 1998).

Les teneurs en saccharose s'avèrent donc être un élément important de la régulation de la synthèse et de la dégradation des fructanes chez les Poacées. Selon Housley et Pollock (1993), un des rôles majeurs du métabolisme des fructanes est de réguler la concentration cytosolique en saccharose. Cependant d'autres facteurs que le saccharose sont probablement impliqués dans la régulation de la synthèse des fructanes. Des faits expérimentaux montrent que synthèse des fructanes et teneurs en saccharose ne sont pas toujours corrélées. C'est le cas dans les limbes de plantes de ray-grass placées en illumination continue chez lesquels l'augmentation des teneurs en saccharose ainsi que l'augmentation du niveau des transcrits codant la 1-SST et la 6G-FFT n'est pas accompagnée d'une augmentation des activités FTs correspondantes (Lasseur *et al.*, 2006).

Au niveau transcriptionnel, la régulation de l'expression des gènes par le saccharose se fait via des éléments de réponses au saccharose (Sucrose-Responsive Element ou SURE), des éléments de réponse aux sucres (SRS pour Sugar Response Sequence) ou encore par des « carbohydrate metabolite signal responsive element » (CMSRE-1 et CMSRE-2). Ces séquences reconnues au niveau de l'ADN, permettent la fixation des facteurs de transcription correspondants, aboutissant à l'activation (*Enhancer*) ou l'inhibition (*Silencer*) de certains promoteurs des gènes intervenant dans le métabolisme glucidique (Smeekens 2000; Morikami *et al.*, 2005). Chez *Arabidopsis*, de fortes teneurs en saccharose induisent une régulation post-transcriptionnelle par répression de la traduction des ARNm impliquant des séquences nommées « Sucrose Control uORF » (SC-uORF) présentes dans la partie 5'-UTR de l'ARNm correspondant au gène ATB2 (Wiese *et al.*, 2004). Enfin, l'étude

des régulations post-traductionnelle montre que des sucres comme le glucose *via* le senseur AtHXK1 peuvent réguler la durée de vie de certaines protéines par activation du protéasome 26S (Moore *et al.*, 2003) et que l'activation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase impliquée dans la synthèse de l'amidon est contrôlée par le saccharose *via* la protéines SnRK1 (Tiessen *et al.*, 2003). Ainsi, l'induction des enzymes de synthèse et de dégradation des fructanes pourrait être tributaire de ces différents niveaux transcriptionnels, traductionnels et/ou post traductionnels.

d) Interaction du métabolisme des fructanes avec la nutrition azotée

La croissance des plantes et la production de biomasse exigent la coordination complexe des différentes sources de carbone (C) et d'azote (N) dans le métabolisme. L'équilibre du rapport C/N mène à des effets significatifs sur le développement des plantes par la modulation de l'architecture d'organe et des modifications importantes sur la biomasse du ratio [racines]/[parties aériennes] et ces processus engagent des signaux de transduction impliquant l'acide abscissique, notamment chez le blé (Foyer *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2007). Le métabolisme carboné produit non seulement des glucides, mais aussi des squelettes carbonés nécessaires à la synthèse d'acides aminés. Chez les plantes en C3, l'assimilation de l'azote par la voie de la glutamine (figure II.12) arrive simultanément avec la photorespiration (Mifflin et Habash 2002). La glutamine serait un bon marqueur de l'équilibre entre le statut carboné et l'assimilation azotée (Foyer *et al.*, 2003).

Chez les Poacées des zones tempérées, il a été démontré que lorsque l'alimentation azotée est limitante, le métabolisme carboné est orienté vers la synthèse de SNS et principalement de fructanes. Chez l'orge, on observe dans ces conditions une augmentation des teneurs en amidon de l'ordre de 200% et des teneurs en fructanes de 700% (Wang et Tillberg, 1996). Le déficit en N chez la fléole des prés aurait un effet positif sur la valeur nutritive du fourrage par augmentation des teneurs

en sucres structuraux et non structuraux (Bélanger et McQueen, 1998; Pelletier *et al.*, 2009). La comparaison des teneurs en fructanes et les teneurs en N total pourrait servir d'indicateur pendant le stress lié au déficit en nutriments, notamment pendant la croissance, chez le blé (McGrath *et al.*, 1997).

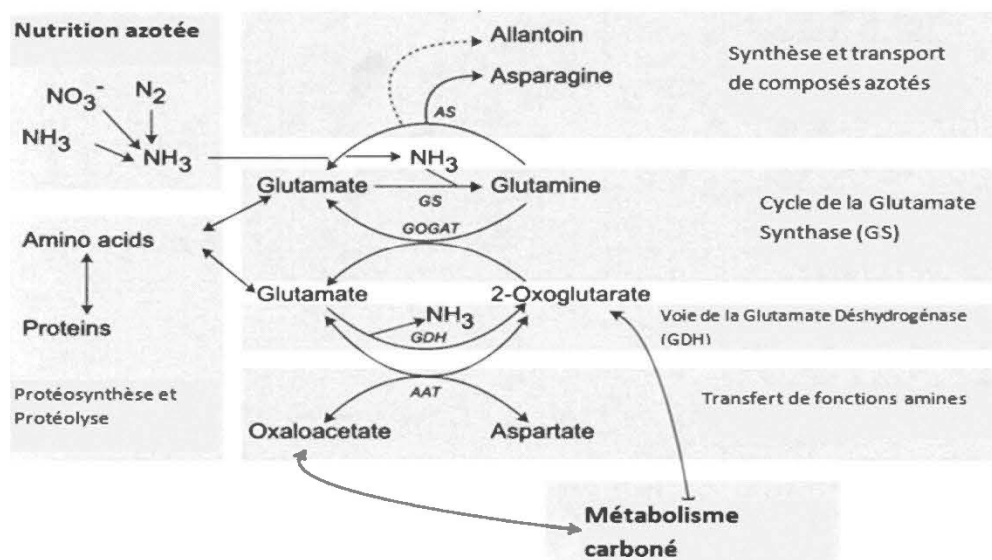


Figure II.12: Voies métaboliques importantes dans la balance des métabolismes C et N. AAT, aspartate amino transférase; AS, asparagine synthétase; GS, glutamine synthétase; GOGAT, glutamate synthase (d'après Mifflin et Habash, 2002).

L'analyse de feuilles d'orge excisées, alimentées en nitrate ou en glutamine, sous illumination, montre que le nitrate, mais pas la glutamine, diminue les teneurs en fructanes et leur activité de synthèse (FT) (Morcuende *et al.*, 2004). Le nitrate semble donc être un signal antagoniste du saccharose dans la mesure où celui-ci induit l'accumulation des fructanes et la transcription des FTs (Müller *et al.*, 2000). L'effet négatif du nitrate sur la synthèse des fructanes peut même annuler le rôle activateur de l'illumination continue qui est médiée par le saccharose (Morcuende *et al.*, 2004).

Si le nitrate est un bon candidat comme signal négatif de la synthèse des fructanes chez les Poacées tempérées (Morcuende *et al.*, 2004), l'ensemble des interactions nutritionnelles C/N et leurs impacts sur la physiologie et le développement restent à clarifier.

II.2. SUCRES NON STRUCTURAUX ET ADAPTATIONS AUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX

Après la défoliation d'une Poacée, les fructanes accumulés à la base des feuilles en croissance et dans les gaines sont hydrolysés et fournissent ainsi de l'énergie et des squelettes carbonés pour permettre la reprise de la croissance de la plante (Amiard *et al.*, 2003b). Ils fournissent par ailleurs une source rapide de carbone pour le métabolisme général (Pollock et Cairns, 1991), particulièrement dans les zones d'élongation foliaire, notamment chez le blé et la fléole (Spollen et Nelson, 1988). Si le rôle des fructanes comme réserve de carbone est bien établi, les mécanismes sélectifs qui ont conduit à leur accumulation chez les végétaux supérieurs en complément de l'amidon restent mal compris. Pour la majorité des auteurs, les fructanes seraient apparus suite à des mutations d'invertases en FTs. La synthèse de fructane a dû conférer un avantage sélectif aux « plantes à fructanes » par rapport à celles n'accumulant que le saccharose et l'amidon (Chatterton *et al.*, 1989; Pollock et Cairns, 1991). Ainsi, les fructanes ne seraient pas seulement une forme de réserve carbonée de plus. Plusieurs études récentes montrent que ces sucres solubles jouent un rôle de première importance dans la résistance au stress hydrique (sécheresse et froid) en protégeant les membranes cellulaires (Valluru et Van den Ende, 2008). La forte capacité de rétention d'eau, due aux nombreux groupements hydroxyles de ces molécules, permettrait une meilleure tolérance au stress hydrique (Serraj et Sinclair 2002; Livingston *et al.*, 2009). Par ailleurs, la présence d'enzymes de dégradation des fructanes (FEH) chez des plantes ne synthétisant pas les fructanes comme *A. thaliana*

suggère l'implication des fructanes dans des voies de signalisation (interactions plante/bactéries) induisant des mécanismes de défense permettant à la plante de se protéger (Van den Ende *et al.*, 2004).

II.2.1. Résistance et acclimatation au froid

Chez les plantes en régions tempérées, les fluctuations saisonnières de température induisent des équilibres d'une part entre la croissance, la dormance, et l'endurcissement des tissus et d'autre part entre l'assimilation et le stockage des réserves carbonées, qui constituent une caractéristique importante de l'adaptation à un environnement tempéré frais. « L'endurcissement » est un processus physiologique d'adaptation au gel caractérisé par une rigidification des membranes, des pertes d'eau au niveau cellulaire et une mobilisation des sucres solubles vers le collet et les racines (Eagles *et al.*, 1997). Un bon indicateur de la tolérance des plantes au froid dans ces conditions est le TL_{50} correspondant à la température en-deçà de laquelle la mortalité de la population est supérieure à 50% (Eagles *et al.*, 1997). Deux phases peuvent être distinguées dans les mécanismes de réponse des Poacées au froid; la première phase est dite « d'acclimatation » par exposition à des températures juste au-dessus du point de congélation, et une deuxième phase dite de « résistance » ou « d'endurcissement » pour des températures non létales en dessous du point de congélation (Trunova, 1965). Ainsi, on parle d'acclimatation au froid pour des températures généralement comprises entre 0 et 10°C, cette phase d'acclimatation étant associée à une accumulation de fructanes est généralement corrélée à la tolérance au froid (Pontis, 1989). En dessous de zéro, intervient la seconde phase d'adaptation au froid: il s'agit alors de résistance et d'endurcissement. Cette seconde phase est caractérisée par une chute des concentrations en fructanes de haut DP et une augmentation des teneurs en oligosaccharides, en monosaccharides et en saccharose chez le blé (Trunova, 1965). Pendant cette dernière phase, les oligofructanes seraient mobilisés vers les tissus puits

par voie apoplastique améliorant ainsi la résistance au gel (Livingston et Henson, 1998). Les fructanes sont directement impliqués dans cette résistance des plantes au froid. En tant que composés solubles ils abaissent le point de congélation intracellulaire permettant une intégrité des différentes organelles cellulaires et une activité métabolique de base (Livingston *et al.*, 2009). Les fructanes pourraient également participer à l'endurcissement des tissus par la stabilisation des systèmes membranaires par interaction avec les bicouches lipidiques pendant la phase de transition vers le froid (Gupta et Kaur, 2005). Un transport des fructanes vers l'apoplaste, via des vésicules d'exocytose vacuolaire permettrait de stabiliser et d'anticiper les phases de transitions lipidiques permettant la réparation des membranes cellulaires des tissus stressés, par interactions entre les fructanes et les molécules de phosphatidylcholine de la membrane plasmique (Valluru *et al.*, 2008). Les fructanes sont les seuls polysaccharides capables d'interagir ainsi avec la membrane plasmique comme le font les disaccharides (le tréhalose principalement) et les oligoraffinoses (RFO) (Valluru et Van den Ende, 2008). L'accumulation des fructanes peut être induite par exposition aux basses températures de la plante entière (Pollock, 1984) ou par refroidissement des racines et des zones de croissance foliaire accompagnés d'un éclaircissement continu (Smouter et Simpson, 1989). Chez le blé, l'adaptation aux températures gélives entraîne des changements physiologiques importants dont un mouvement de l'eau intracellulaire vers les espaces extracellulaires, une altération des organelles intracellulaires comme le Golgi, et l'apparition de nouvelles protéines probablement impliquées dans la résistance au froid (Herman *et al.*, 2006). Les fructanes interviendraient probablement au cours de cette phase pour faciliter la disponibilité en eau et la stabilisation des composantes de la membrane. Une étude réalisée sur le blé, les triticales et plusieurs cultivars de ray-grass montre que des fructanes de haut DP sont accumulés ainsi en relation avec la tolérance au gel (Suzuki et Nass, 1988).

Par ailleurs, la croissance dans les écosystèmes nordiques affecte la survie des Poacées pérennes non seulement par le froid mais aussi par l'hypoxie cellulaire due au recouvrement par la neige et par les maladies provoquées par des moisissures et des champignons adaptés à ces températures (Bélanger *et al.*, 2006; Figure II.13). L'accumulation de saccharose et de fructanes à ces températures favoriserait non seulement la survie à l'hiver mais aussi les mécanismes de défenses contre les attaques de pathogènes (Gaudet *et al.*, 1999).

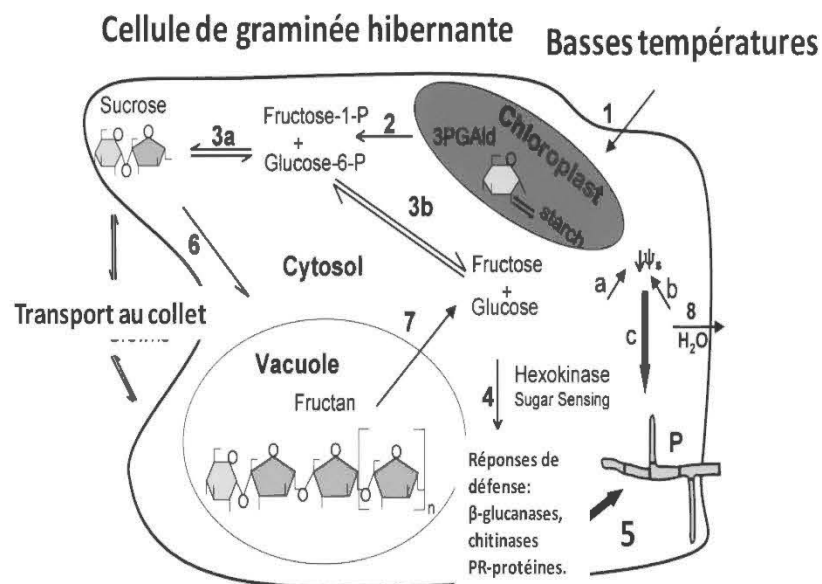


Figure II.13: Mécanismes de réponse au froid chez une Poacée hibernante. (1) Les basses températures induisent un ralentissement de croissance et l'accumulation de sucres simples. (2) Les monosaccharides phosphatés conduisent à la formation du saccharose (3a) et de monomères de sucre (3b), cette accumulation induit l'activation des hexokinases (4) qui activent par phosphorylation l'expression des gènes de réponses aux mécanismes de défense (5). L'accumulation du saccharose conduit à la synthèse des fructanes dans les vacuoles (6). L'excès de saccharose est transporté au collet (puits de carbone). Au cours de l'hiver, l'hydrolyse des fructanes (7) libère du fructose participant à l'accumulation de sucres simples. L'accumulation des sucres simples et les pertes d'eau (8) diminuent le potentiel osmotique (a,b). Ces effets combinés augmentent les réponses de défense et empêchent la croissance des champignons pathogènes (P) (D'après Gaudet *et al.*, 1999).

La modification par mutagenèse des voies métaboliques vers la formation du saccharose par une stratégie anti-sens ou une surexpression de la saccharose-phosphate-synthase en condition d'acclimatation au froid chez *Arabidopsis thaliana*, (Figure II.14) montre une corrélation directe entre l'accumulation des sucres solubles et la résistance au froid (Strand *et al.*, 2003). L'augmentation des teneurs en saccharose chez une espèce ne produisant pas de fructanes comme *Arabidopsis*, en condition d'acclimatation au froid suggère que l'augmentation des teneurs en saccharose, précurseur de synthèse des fructanes, serait un élément activateur conduisant à l'accumulation des fructanes en réponse au froid chez les Poacées accumulatrices de fructanes.

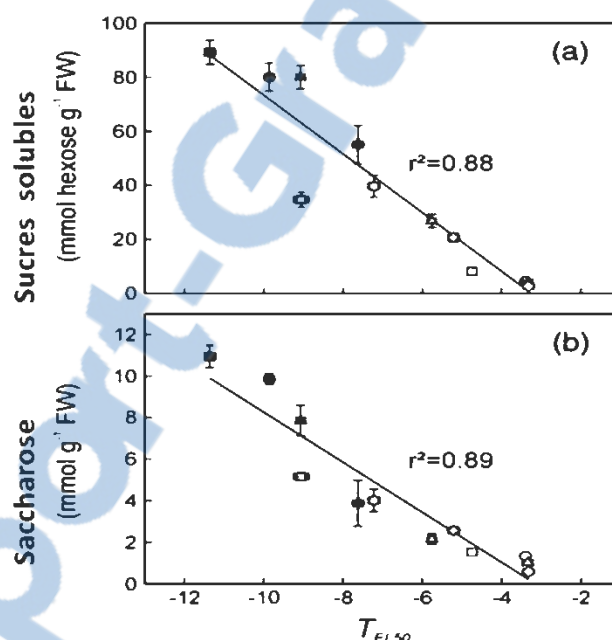


Figure II.14: Corrélation entre l'augmentation des sucres solubles (a), le contenu en saccharose (b) et la tolérance au froid (T_{FL50}) pour un phénotype sauvage et des mutant transgéniques d'*Arabidopsis*. Les ronds représentent le phénotype sauvage, les carrés le mutant surexprimant la saccharose-phosphate-synthase, les triangles les mutants anti-sens saccharose-phosphate-synthase et les losanges les mutants anti-sens fructose-1,6-biphosphatase. Blanc: feuilles contrôle, Gris : feuilles après 10 jours à 5°C, et noir: feuilles en croissance à 5°C. Les valeurs sont en mmoles par gramme de matière fraîche (FW). L'acclimatation au froid est toujours associée à une augmentation de la teneur en sucres solubles et en saccharose. La surexpression du saccharose favorise cette tendance (carrés noirs) et diminue la mortalité (d'après Strand *et al.*, 2003).

II.2.2. Résistance au stress hydrique

Une observation commune dans les processus de déshydratation chez les plantes est l'accumulation d'osmolytes tel que la proline, le mannitol, le saccharose ou les fructanes (Bray, 1997). A la différence de l'amidon, les sucres solubles, principalement le saccharose mais aussi les fructanes jouent un rôle important dans l'ajustement du potentiel osmotique lors d'un stress hydrique comme le montrent des études réalisées chez le dactyle et la chicorée (Volaire et Lelièvre, 1997; De Roover *et al.*, 2000). L'accumulation de saccharose pendant le stress hydrique est également observée chez *Craterostigma plantagineum*. La déshydratation et la dessiccation induisent la conversion du 2-octulose, un sucre à huit carbones, en saccharose qui serait osmotiquement plus actif du point de vue structural (Bianchi *et al.*, 1991). L'accumulation du saccharose en condition de stress hydrique est corrélée à l'augmentation de l'expression des gènes de la saccharose synthase et de la saccharose-phosphate synthase, ces deux enzymes étant considérées comme les plus importantes dans la régulation de la synthèse du saccharose (Pelah *et al.*, 1997).

Les fructanes sont d'un point de vue osmotique moins actifs que le saccharose, en raison de la longueur des polymères, mais ils pourraient s'accumuler à de plus hautes concentrations améliorant ainsi les capacités de résistance de la plante au déficit hydrique (Bray, 1997). Les fructanes représenteraient ainsi à la fois une forme de stockage du carbone à durée de vie plus ou moins longue dans ces conditions et une adaptation aux conditions environnementales. La forte capacité de rétention d'eau due au nombreux groupement hydroxyles libres des résidus fructosyles faciliterait les interactions avec les protéines et lipides membranaires tout en piégeant les molécules d'eau (Levitt 1980; Serraj et Sinclair, 2002). Le maintien du potentiel osmotique résultant de l'accumulation de solutés et la rétention d'eau qui s'ensuit, contribuerait ainsi de manière significative au maintien des fonctions

cellulaires pendant la phase végétative et l'expansion des tissus pendant la phase reproductive chez l'orge (Roth *et al.*, 1997) et la campanule (*Campanula rapunculoides*) (Vergauwen *et al.*, 2000).

Cependant, les modifications des teneurs en sucres solubles pendant la durée du déficit hydrique, examinées chez la fétuque néo-zélandaise (*Festuca novae-zelandiae*) montrent une prépondérance du rôle du saccharose dans la tolérance au stress hydrique (Clark *et al.*, 2004). Les concentrations en fructanes diminuent sur la durée du déficit, tandis que le contenu en saccharose augmente dans les tissus jusqu'à $200 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF dans les feuilles, après 49 jours. 24 heures après réhydratation, l'activité mitotique dans les régions du méristème apical était associée à une augmentation des teneurs en fructanes de faible DP, d'inuline et de fructanes de type néosérie. La corrélation négative entre les fructanes et le contenu en saccharose, indiquerait une interconversion selon le contenu hydrique suggérant que chez cette espèce, les fructanes serviraient comme pool de glucides à la reprise, tandis que le saccharose stabiliserait les régions du méristème pendant les déficits extrêmes en eau (Clark *et al.*, 2004).

II.2.3. Résistance au stress oxydatif et à l'hypoxie

Tous les organismes qui respirent sont confrontés à un dilemme, car l'oxygène qui leur permet de vivre est aussi toxique, générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS; anion superoxyde O_2^- , radical hydroxyl $\text{OH}^\cdot$, etc). Ils ne peuvent survivre qu'en vertu de mécanismes de défenses élaborés (Fridovich, 1975). Les plantes ont développé de nombreux systèmes de détoxification impliquant des molécules et des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, peroxydase, etc) pour réduire au minimum les effets cytotoxiques des ROS. Récemment, il a été suggéré et démontré que les sucro-oligosaccharides (SOS), comprenant les fructanes et les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs), jouent un rôle important

dans la physiologie du stress oxydatif (Van den Ende et Valluru, 2009). De plus, les sucres comme le glucose, le saccharose et le fructose, du fait de leur position centrale dans le métabolisme carboné, peuvent réguler l'émission de ROS par leur effet de contrôle sur l'activité photosynthétique et la synthèse des acides gras, toutes deux génératrices de radicaux libres. Un certain niveau d'accumulation des sucres solubles serait corrélé à une baisse de l'activité cytotoxique des ROS (Couée *et al.*, 2006).

Les fructanes joueraient également un rôle dans les phénomènes d'hypoxie cellulaire suite à une privation en O₂ causée par exemple par un couvert nivéal. Chez le blé, en condition d'hypoxie, on observe une accumulation importante de fructanes (17 fois le témoin) de haut DP et de SNS dans les racines et les tiges qui permettrait une phase d'ajustement métabolique des flux de carbone entre la respiration tissulaire et la transition vers la fermentation due à l'hypoxie cellulaire (Albrecht *et al.*, 2004). En condition d'hypoxie (pour des concentration en O₂ ≤ 2%), les concentrations en saccharose, fructose, glucose et fructanes augmentent chez la fléole tandis que les teneurs de tous les sucres solubles diminuent chez le dactyle, le trèfle et la luzerne (Bertrand *et al.*, 2003). La réponse au traitement « hypoxie » semble ainsi être plus accentuée chez la fléole grâce au maintien d'un contenu élevé en glucides permettant sans doute la survie hivernale et la reprise de la croissance au printemps.

II.3. SUCRES NON STRUCTURAUX ET ADAPTATION DES POACEES A L'HIVER AU QUEBEC : CAS DE LA FLEOLE

La fléole des prés est une graminée fourragère pérenne hexaploïde (2n=42), d'origine eurasiennne et introduite en Amérique du nord au 17^{ème} siècle. Elle est bien adaptée aux conditions climatiques des régions tempérées nordiques. Le cultivar *Climax* est le plus répandu au Canada (Piper et Bort, 1915; Klebesadel, 1997).

Chez la fléole, les sucres non structuraux sont très riches en fructanes de haut DP. Ils participent à la valeur nutritive du fourrage et sont très utiles pour

l'optimisation de certains procédés fermentaires de conservation du fourrage comme l'ensilage (Clare, 1953; Winters *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 2005). Les fructanes chez la fléole sont de type phléine avec une majorité de liaisons $\beta(2-6)$. Une étude de Cairns et collaborateurs (1999) rapporte des DP supérieurs à 50 et la présence de structures linéaires non branchées. Les limbes de fléole contiennent jusqu'à 30% de la matière sèche en sucres solubles, en conditions d'acclimatation au froid (Smith, 1968). Le mode de polymérisation des fructanes chez la fléole a été décrit une première fois par Suzuki et Pollock (1986). La synthèse a été obtenue à partir d'une préparation de « phléine sucrase » de tiges de fléole qui catalyse la synthèse de polymères de haut DP, ces fructanes ayant une masse moléculaire moyenne de 34 000 Dalton. Cette synthèse se fait vraisemblablement selon un mécanisme analogue à celui des lévanesucrases bactériennes (Suzuki et Pollock 1986). Le fait que les intermédiaires de synthèse (oligosaccharides) généralement associés à l'élongation des polymères ne sont pas ou peu accumulés confirmerait cette hypothèse (Cairns et Ashton, 1993). Une première FT polymérisant les liaisons $\beta(2-6)$ avec de haut DP vient d'être clonée et caractérisée chez la fléole (Tamura *et al.*, 2009). Dans les travaux de Chatterton *et al.* (1989) sur 128 Poacées tempérées les valeurs en SNS chez la fléole ne sont pas plus élevées que chez d'autres Poacées, mais sa tolérance au gel et à l'hypoxie due au recouvrement de la neige, sa résistance au froid, en font une espèce intéressante pour l'est canadien et le moyen nord québécois (Bertrand *et al.*, 2003; Bélanger *et al.*, 2006).

La fléole résiste bien à l'hiver, possède une assez bonne qualité nutritive pour l'alimentation des ovins et bovins et elle est très répandue au Québec (Seoane *et al.*, 1981; Bélanger *et al.*, 2002). Cependant, comme pour beaucoup de Poacées fourragères, le climat rigoureux de l'hiver entraîne des diminutions de rendement et des dommages dus à l'hypoxie, au froid et au gel des sols (Bélanger *et al.*, 2006). La diminution de la photopériode en hiver et la chute des températures entraîne une diminution des teneurs en photoassimilats et un durcissement des tiges qui

s'atténue plus ou moins avec l'allongement de la photopériode (Eagles *et al.*, 1997). La fléole des prés peut tolérer ainsi des températures hivernales de l'ordre de -30°C (Paquin, 1984). En outre, la fléole montre une grande résistance par rapport à l'hypoxie tissulaire pendant l'hiver due probablement en partie à une meilleure gestion des réserves carbonées et à un faible taux de fermentation des sucres comparativement aux autres espèces fourragères.

Cette grande tolérance de la fléole à l'hypoxie hivernale serait due à un évitement de la privation en oxygène par le maintien d'un métabolisme bas pendant l'hiver et une utilisation efficiente des glucides, notamment les fructanes (Bertrand *et al.*, 2003). La fléole des prés présente ainsi une meilleure croissance relative des épis, une plus haute teneur en SNS et un faible taux de production d'éthanol par fermentation (tableau II.7).

Tableau II.7: Croissance relative, SNS et éthanol produit après 100 jours de traitement d'hypoxie chez espèces de graminées fourragères et une légumineuse. Croissance relative et SNS totaux sont obtenus par division des valeurs pour les plantes en hypoxie par rapport à celles en conditions atmosphériques normales (d'après Bélanger *et al.*, 2006).

	Fléole des prés	Dactyle	Luzerne	Trèfle rouge
Regain relatif de la tige	0,69	0,49	0,30	0,04
Concentration relative en SNS totaux	1,24	0,95	0,46	0,62
Éthanol (mg g ⁻¹ MS)	3,07	11,04	10,41	14,28

Par ailleurs, le mode de gestion des pratiques fourragères par les dates de récolte affecte sensiblement la survie hivernale des espèces fourragères par la disponibilité des glucides. Ainsi, les coupes à un stade précoce (« floraison » pour les légumineuses ou début « épiaison » pour les Poacées) donnent généralement un fourrage de bonne qualité, mais un faible rendement, tandis que les coupes tardives

donnent un rendement élevé mais une faible qualité de fourrage. Ce paramètre affecte généralement la pérennité des espèces fourragères comme le dactyle (Drapeau, 1999). Il semble cependant que la régie des coupes a un impact limité sur la survie de la fléole à l'hiver (McRae, 1987). L'endurcissement et la résistance au gel chez la fléole s'accompagne également d'un haut contenu en proline qui pourrait être induit par conversion de sucres solubles en cet acide aminé qui intervient dans la résistance au froid (Paquin et Saint-Pierre, 1980).

L'amidon, du fait de sa structure et de son caractère hautement insoluble, n'intervient pas dans les mécanismes de tolérance au gel et de survie à l'hiver (Paquin, 1985). L'ensemble des mécanismes d'adaptation impliqués dans l'acclimatation et la résistance au gel de la fléole peuvent être imputables, au moins en partie, aux sucres solubles que sont les fructanes et le saccharose (Strand *et al.*, 2003; Gallagher *et al.*, 2007; Livingston *et al.*, 2009). Comme expliqué précédemment (section II.2.1), ces sucres peuvent remplir différents rôles dans la tolérance au gel, en abaissant le point de congélation du cytoplasme (Livingston *et al.*, 2009), en servant de substrat énergétique pour la survie à l'hiver (Livingston et Henson, 1998) et en stabilisant les systèmes membranaires (Hinch *et al.*, 2000). Ils peuvent également stimuler la synthèse des acides aminés impliqués dans la résistance au froid comme la proline (Knipp et Honermeier 2006), favoriser les mécanismes de défense contre les attaques de pathogènes (Gaudet *et al.*, 1999; Van den Ende *et al.*, 2004), et permettre une meilleure adaptation du métabolisme pendant les phases d'hypoxie hivernale (Bertrand *et al.*, 2003). L'augmentation des teneurs en fructanes et autres glucides solubles pourrait ainsi affecter positivement l'adaptation de la fléole des prés à son milieu. Par exemple, chez un ray-grass ou un riz transgénique l'augmentation ou l'acquisition des capacités à synthétiser et accumuler des fructanes s'accompagne d'une augmentation de la tolérance au gel au niveau cellulaire (Hisano *et al.*, 2004; Kawakami *et al.*, 2008).

L'étude de deux cultivars de fléole (Vega et Climax) montre que l'augmentation des teneurs en SNS totaux est liée à l'accumulation de fructanes pour des températures de 10/5°C (jour/nuit) (Thorsteinsson *et al.*, 2002). Les diminutions de température sont ainsi supposées inciter un rééquilibrage des glucides entre les tissus sources et les tissus puits, avec une augmentation des DP des fructanes (de 12 à 80), sans qu'il y ait de différence qualitative des fructanes entre les deux cultivars (Thorsteinsson *et al.*, 2002). L'hydrolyse des fructanes après coupe chez la fléole est liée à une augmentation de l'activité FEH (avec un pH optimal de 5.5) qui peut être retardée par un traitement à l'ABA (Mino *et al.*, 1979). Une première 6-FEH dégradant les fructanes de la fléole a été identifiée récemment (Tamura *et al.*, 2011).

II.4. IMPORTANCE DES FRUCTANES CHEZ LES ESPECES FOURRAGERES

Aujourd'hui, les changements climatiques, l'évolution démographique, et l'impact négatif de certaines pratiques agricoles et industrielles sur l'environnement créent de nouveaux défis en agriculture. De nouvelles opportunités apparaissent également concernant l'exploitation des Poacées fourragères et céréalières avec, entre autre, la possibilité de réduire les effets anthropiques sur l'environnement et l'utilisation de nouvelles formes d'énergies offerte par la biomasse en substitution des énergies fossiles (Humphreys *et al.*, 2006). En outre, l'amélioration de la production fourragère pour l'alimentation animale ainsi que les bonnes pratiques de conservation du fourrage sous forme de foin ou d'ensilage sont en constante évolution. Ainsi, une meilleure compréhension des facteurs conduisant à l'accumulation et la mobilisation des fructanes chez les Poacées, pourraient offrir de nouvelles perspectives intéressantes dans ce domaine.

II.4.1. Fructanes et qualité du fourrage

Seulement un quart des protéines du fourrage pour l'alimentation des ruminants est converti en lait ou en viande. Le reste est excrété par l'animal et peut constituer un facteur de pollution environnementale. L'amélioration de l'énergie disponible dans l'alimentation animale peut affecter l'efficacité de digestion dans le rumen, réduisant ainsi les pertes azotées et la méthanisation (Sniffen *et al.* 1992; Hindrichsen *et al.*, 2006; Dijkstra *et al.*, 2007). Un haut contenu en fructanes peut fournir l'énergie nécessaire. L'amidon quant à lui est un composant minoritaire des sucres totaux chez les Poacées tempérées, mais reste utile parce qu'il persiste pendant les processus de conservation du fourrage comme l'ensilage. Les Poacées fourragères montrent par ailleurs des variations génétiques considérables au niveau du contenu en sucres non structuraux (Chatterton *et al.*, 1989). Les sucres structuraux contenus dans les fibres ADF et NDF (fibres solubles respectivement dans un détergent acide et neutre et composées principalement de cellulose, d'hémicellulose, et de lignine) ainsi que les sucres non structuraux totaux – principalement les fructanes – participent à la qualité du fourrage. La teneur en sucres non structuraux est ainsi bien corrélée à la formation d'acides gras volatiles dans le rumen (Murphy *et al.*, 1982). Ces derniers sont très importants lors de la première phase de lactation chez les ovins (Mele *et al.*, 2005). Les ruminants préfèrent ainsi généralement l'herbe coupée en fin de journée car plus riche en sucres solubles (Burritt *et al.*, 2005). L'augmentation des teneurs en sucres solubles chez des cultivars améliorés de raygrass anglais est ainsi associée à une efficacité accrue d'utilisation de l'herbe dans le rumen et une augmentation de la production laitière (Miller *et al.*, 2001). En outre, il existe des variations saisonnières importantes en sucres non structuraux, de l'automne à l'hiver, qui influent grandement sur la qualité de la production bovine (Machado *et al.*, 2005). Certains auteurs ont essayé de modéliser les effets des facteurs tels que la température, la photopériode ou la disponibilité en eau pour simuler le contenu en sucres chez les

Poacées fourragères et optimiser ainsi les dates de récoltes (Wulfes *et al.*, 1999). Il s'avère cependant que si les fluctuations à court terme peuvent être prédites dans des conditions maîtrisées, les teneurs restent dépendantes de l'espèce végétale, de la nutrition azotée et des changements climatiques.

Une bonne adéquation entre la date de récolte et le contenu en sucre chez la fléole des prés pourrait ainsi améliorer positivement le gain en poids chez les ruminants (Bernes *et al.*, 2008). L'évaluation nutritionnelle de plusieurs cultivars de fléoles montre un bon impact d'utilisation pour l'alimentation des ovins (Seoane *et al.*, 1981) ainsi qu'une assez bonne valeur nutritive comparativement aux légumineuses comme la luzerne (Seoane et Gervais, 1982). La fléole et la luzerne auraient des effets similaires sur le gain en masse et la production de lait (Orozco-Hernandez *et al.*, 1997). Certains travaux ont permis d'estimer l'énergie nette métabolisable chez la fléole des prés (Ouellet *et al.*, 1998). Ces différentes équations tiennent essentiellement compte de la teneur en ADF correspondant à une digestibilité donnée pour estimer la valeur nutritive du fourrage. Cependant, la digestibilité varie avec la maturité de la plante, les conditions de croissance, l'espèce, les cultivars étudiés et le temps de rétention dans le rumen (Weiss, 1998; Nousiainen *et al.*, 2003).

Les teneurs en fructanes seraient corrélées positivement à la digestibilité du fourrage et permettraient une meilleure digestibilité dans le rumen (Humphreys, 1989). En outre, le métabolisme fermentaire des bactéries et protozoaires du rumen est peu pris en compte dans ces modèles (Dijkstra *et al.*, 2007). Ces microorganismes dégradent les sucres disponibles en acides gras volatiles et en sucres simples permettant une meilleure efficacité d'utilisation des nutriments pour l'animal (Firkins *et al.*, 2006). L'apport des sucres solubles, y compris les fructanes permettrait dans ces conditions d'améliorer la lactation et le gain en poids chez l'animal (Miller *et al.*, 2001; Abrahamse *et al.*, 2008).

Une maximisation du contenu en sucres solubles chez la fléole, de par sa bonne adaptation aux conditions climatiques tempérée à froides (Klebesadel, 1997)

devrait permettre ainsi d'améliorer l'apport énergétique nécessaire pour une bonne production animale en tenant cependant compte de facteurs comme les intrants azotés et l'âge des prairies. Il semble en effet que la valeur nutritive du fourrage augmente tandis que les rendements diminuent avec l'âge de la prairie; les teneurs en fructanes fluctuant également au cours du développement de la fléole (Bélanger *et al.*, 2008; Nordheim-Viken et Volden, 2009; Østrem *et al.*, 2011).

II.4.2. Les fructanes pendant la conservation du fourrage

Le fourrage conservé dans des conditions d'humidité importantes est considéré comme de l'ensilage, tandis que l'herbe conservée après une période de séchage plus ou moins longue est considérée comme du foin. La technique de conservation par ensilage est très utilisée en raison de la limitation de la période de paissance par l'hiver en région froide (Hassanat *et al.*, 2006; Martineau *et al.*, 2006) ainsi que comme apport supplémentaire en complément du grain pour l'alimentation animale. Les différentes méthodes de conservation du fourrage impactent considérablement la qualité nutritive du fourrage avec des répercussions sur la qualité de la production animale. Le séchage par fanage (*wilting*) de l'herbe, qui consiste à l'étaler une fois qu'elle est coupée, est une technique également utilisée. Durant la période de fanage, les teneurs en protéines chutent et la teneur en matière sèche augmente (Kemble et Macpherson, 1954; Savoie, 1988; Martineau *et al.*, 2006). Le fanage de l'herbe est supposé aboutir à un foin de bonne qualité, l'augmentation rapide de la teneur en matière sèche réduisant les pertes en nutriments pendant cette période (Petit et Tremblay, 1992; Repetto *et al.*, 2005). Cette technique est aussi très utilisée pour maîtriser les teneurs en eau du fourrage avant l'ensilage et elle est de plus en plus adoptée en Amérique et Europe occidentale. Peu d'information sont cependant disponibles sur le devenir des sucres solubles et des fructanes en particulier pendant la période de fanage.

L'ensilage, méthode de conservation du fourrage par voie humide, utilise la fermentation des sucres de la plante par des bactéries lactiques épiphytes pour préserver le fourrage. Le processus de fermentation utilise en premier les sucres solubles (glucose, fructose) du fourrage car facilement disponibles. Il faut environ 10% de sucres solubles pour assurer la fermentation complète d'un ensilage de Poacées à 30% de MS ou d'un ensilage de légumineuses à 40% de MS (Leibensperger et Pitt, 1988). Les fructanes représentent une source importante de sucres fermentescibles à conditions d'être rapidement dégradés (Merry *et al.*, 1995). La fermentation dépend non seulement de la disponibilité des sucres pour la fermentation lactique bactérienne et son efficacité, mais aussi de la rapidité d'exclusion de l'air (anaérobiose) évitant la dégradation des sucres par les enzymes de la plante elle-même. Les dates de récolte influent grandement sur la qualité de l'ensilage et son contenu énergétique chez les ruminants. Il semble aussi que l'ensilage en première coupe favorise mieux le gain en poids que la deuxième (Bernes *et al.*, 2008). L'incorporation d'additifs comme la pulpe de betterave augmente la digestibilité de l'ensilage de fléole, mais a relativement peu d'effet sur la fermentation ou la stabilité aérobie (Cummins *et al.*, 2007). Les fructanes représentent une proportion importante de sucres solubles permettant d'assurer une bonne fermentation. Par contre, ces polymères de fructose doivent être hydrolysés en sucres simples avant d'être fermentés puisque seulement 2 à 5% des bactéries lactiques sont capables d'hydrolyser les fructanes (Müller et Steller, 1995). L'utilisation d'un inoculant lactique capable d'hydrolyser les fructanes permettrait un démarrage plus rapide et une meilleure fermentation (Merry *et al.*, 1995; Winters *et al.*, 1998). Un haut contenu en sucres solubles favoriserait de plus la production d'acide lactique par les lactobacilles, au détriment des spores butyriques, ces dernières affectant négativement les conditions de conservation (Julien *et al.*, 2008). Le contenu en fructanes varie sensiblement en fonction des cultivars, du stade de croissance au moment de la fauche ainsi que des conditions d'entreposage, ces paramètres affectant

la disponibilité des sucres pour la fermentation (Kaiser *et al.*, 1997). D'autres travaux (Müller *et al.*, 2007) suggèrent que la conservation sur de longues durées du fourrage influence plusieurs variables de fermentation qui dépendent elles-mêmes de la quantité de sucres au départ. Le coefficient de corrélation le plus fort jouant sur la longueur de la période de conservation étant la concentration en lactate suivie par le pH.

Les fructanes dans la plante représentent ainsi une portion importante des sucres solubles qui peuvent être fermentés pour assurer une bonne conservation du fourrage (Smith, 1968; Suzuki, 1993; Müller et Lier, 1994). Dans ces conditions, la maximisation du contenu en fructanes chez des cultivars de fléole pourrait améliorer sensiblement la qualité des ensilages (Clare, 1953; Winters *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 2005).

III. OBJECTIFS DE RECHERCHE

Les objectifs spécifiques de mes travaux de recherches visaient à:

- Déterminer la voie de dégradation des fructanes dans les tissus aériens de la plante concernés par la fauche (limbes foliaires et tiges entourées par les gaines foliaires) chez la fléole des prés, une Poacée fourragère largement utilisée en Amérique du nord, Scandinavie et dans une moindre mesure en Europe de l'ouest et au Japon.
- Etudier la régulation du métabolisme des fructanes chez la fléole des prés, conduisant à l'accumulation ou à la dégradation des fructanes pendant la croissance, dans le but d'évaluer le stade de fauche permettant d'obtenir des teneurs maximales en fructanes, en prenant en compte le niveau de fertilisation azotée.
- Evaluer les pertes en sucres solubles et en fructanes en particulier pendant les premières heures de fanage avant l'ensilage.

Pour se faire, ce travail a été divisé en trois parties.

La première partie a consisté à suivre et quantifier pour quatre stades de croissance (stade végétatif, montaison, épiaison et anthèse) et deux niveaux de fertilisation azotée (0,375 et 3,75 mM de NH_4NO_3) les teneurs en sucres solubles (fructanes, saccharose, glucose, fructose) et amidon, les activités enzymatiques de dégradation des fructanes (FEH), et du saccharose (invertase acide soluble) ainsi qu'une des activités de synthèse (SST) des fructanes. Les teneurs en composés azotés (protéines solubles, acides aminés, nitrate, ammonium et azote total) ont également été suivies. Les résultats obtenus pour cette partie sont rédigés sous forme d'une publication scientifique correspondant au premier chapitre de la partie « Résultats » qui s'intitule : « *Effect of plant maturity and nitrogen fertilization on non-structural carbohydrate metabolism in harvestable tissues of timothy (Phleum pratense L.)* ».

La seconde partie a consisté à suivre le métabolisme des sucres solubles pendant 24 heures dans les tissus fauchés, pour des récoltes effectuées à deux stades (épiaison et anthèse). Cette partie s'inscrit dans des objectifs plus larges d'associer une bonne régie (gestion adéquate des dates de récoltes) de la fléole des prés à une bonne maîtrise des paramètres de conservation du fourrage pour une optimisation de sa valeur nutritive tout en s'assurant d'une bonne qualité de conservation sous forme d'ensilage. L'un des facteurs important pour la qualité du produit ensilé étant les conditions de fanage avant la mise en silo, les tissus fauchés ont été exposés soit à la lumière, soit à l'obscurité pour simuler les andains au champ de jour et de nuit, dans des conditions de températures moyennes de 20°C au stade anthèse et de 20 ou 15°C au stade épiaison. Les résultats obtenus pour cette partie sont rédigés sous forme d'une publication scientifique correspondant au deuxième chapitre de la partie « Résultats » qui s'intitule : « *Fructan and non-structural carbohydrate metabolism in harvestable tissues of timothy during wilting* ».

La troisième partie de mes travaux a consisté à rechercher les mécanismes moléculaires à l'origine de la mobilisation des fructanes après la fauche, dans les tissus récoltés. Ce travail a été réalisé en deux étapes.

La première étape a consisté en l'identification de gènes impliqués dans l'utilisation des fructanes (FEH) chez la fléole des prés dans les tissus aériens récoltés après fauche. En effet, en se référant à la Poacée la plus étudiée dans ce domaine, le blé (qui possède au moins 7 gènes codant des FEHs), nous pouvons nous attendre à plusieurs gènes codant des protéines différentes chez la fléole. Une première FEH, impliquée dans la mobilisation des fructanes après coupe au niveau du renflement basal (*haplocorms*) a été récemment identifiée chez cette espèce (Tamura *et al.*, 2011). En utilisant une sonde homologue correspondant à cette première FEH de fléole (gracieusement fournie par Midori Yoshida) et d'une sonde hétérologue préparée à partir d'une FEH de ray-grass anglais (Lothier *et al.*, 2007), nous avons pu

cribler une banque d'ADNc préparée à partir des ARNm extraits des tissus fauchés, et cloner des nouveaux gènes codant potentiellement des FEHs impliquées dans la mobilisation des fructanes dans les tissus fauchés.

La seconde étape a consisté à caractériser les propriétés enzymatiques des protéines codées par les gènes clonés. En effet, en raison de la similitude entre les fructosyltransférase (FTs), les invertases et les FEHs, qui appartiennent toutes à la même famille (Glycosides Hydrolases 32), il n'est pas possible de prédire avec certitude la fonctionnalité des gènes identifiés. Pour les enzymes glycosylées, l'expression hétérologue dans la levure *Pichia pastoris* est un outil précieux permettant de définir les caractéristiques enzymatiques et biochimiques des produits de gènes clonés. Les résultats de cette partie correspondent au troisième chapitre présenté dans la partie « Résultats » qui s'intitule : « *Cloning and functional analysis of two novel fructan exohydrolases (1&6-FEH, FEH-INV) with inherent invertase activity in timothy (Phleum pratense L)* ».

Ainsi, les travaux réalisés devraient permettre d'apporter des éléments de réponse aux problématiques relatives à la qualité du fourrage pendant la croissance, au moment de la fauche et pendant le fanage, à savoir :

- Quel est le rythme d'accumulation des fructanes pendant la croissance et quel serait le stade de fauche idéal pour une accumulation maximale des fructanes ?
- Dans quelle mesure les conditions de fanage affectent-elles les teneurs en sucres solubles après fauche et quelles sont les conditions de fanage idéales ?
- Quels sont les gènes impliqués dans la mobilisation des fructanes dans les tissus récoltés ?
- Les FEHs constituent-elles des marqueurs pertinents permettant une sélection variétale ultérieure en vue d'optimiser la mobilisation des fructanes en début d'ensilage chez la fléole des prés ?

IV. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

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

La rédaction de trois articles correspondant aux trois chapitres des résultats:

- Effect of plant maturity and nitrogen fertilization on non-structural carbohydrate metabolism in harvestable tissues of timothy (*Phleum pratense* L.). OULD-AHMED M., DECAU ML, MORVAN-BERTRAND A, PRUD'HOMME MP, LAFRENIERE C, DROUIN P.
- Fructan and non-structural carbohydrate metabolism in harvestable tissues of timothy during wilting. OULD-AHMED M, DECAU ML, MORVAN-BERTRAND A, PRUD'HOMME MP, LAFRENIERE C, DROUIN P.
- Cloning and functional analysis of two novel fructan exohydrolases (1&6-FEH, FEH-INV) with inherent invertase activity in timothy (*Phleum pratense* L). OULD-AHMED M, MORVAN-BERTRAND A, YOSHIDA M, LAFRENIERE C, DROUIN P, PRUD'HOMME MP.

Un quatrième article est en préparation et porte sur la régulation du métabolisme des fructanes chez la fléole, au cours de la repousse après coupe.

Un rapport de synthèse sur les fructanes chez les graminées fourragères:

- Les sucres non structuraux chez les graminées en régions tempérées: potentiel et perspectives agronomiques au Québec, Marouf OULD-AHMED, synthèse environnementale V.20 N°14, 102 p. 2009 Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue.

Deux communications orales en France et au Canada:

- Recherche de gènes FEHs-like chez la fléole des prés. Rencontre annuelle du centre SEVE, 23 et 24 avril 2009 Wendake, Québec, Canada.
- Regulation of fructan metabolism in harvestable tissues for forage in timothy (*Phleum pratense* L.) during its development and identification of new fructan exohydrolase (FEH) genes. 7th IFS (International Fructan Symposium), Saint-Jean-Le-Thomas, France, 2-6 juillet 2012

Deux posters présentés en France et en Norvège:

- Fructan regulation in Timothy (*Phleum pratense* L.): identification of new Fructan Exo-Hydrolase genes Journée de l'école doctorale, Normandie de

Biologie Intégrative, santé, environnement EdNBISE Rouen, 23 Mars 2012, France.

- Fructan regulation in Timothy (*Phleum pratense* L.): identification of new Fructan Exo-Hydrolase genes. XXIV SPPS (Scandinavian Plant Physiology Society) Congress, 21-25 August 2011, Stavanger, Norway.

L'auteur (M. Ould-Ahmed) a contribué de façon significative à la conception des études. Il a réalisé l'ensemble des échantillonnages et la majorité des analyses. Il a produit la première version de chacun des articles.

V. RESULTATS

V.1. EFFECT OF PLANT MATURITY AND NITROGEN FERTILIZATION ON NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATE METABOLISM IN HARVESTABLE TISSUES OF TIMOTHY (*PHLEUM PRATENSE* L.)

Marouf Ould-Ahmed^{1,2,3}, Marie-Laure Decau^{1,2}, Annette Morvan-Bertrand^{1,2}, Marie-Pascale Prud'homme^{1,2}, Carole Lafrenière³, Pascal Drouin³

¹Université de Caen Basse-Normandie, UMR 950 EVA (ou Ecophysiologie Végétale & Agronomie, nutritions NCS), F-14032 Caen, France

²INRA, UMR 950 EVA, F-14032 Caen, France

³Unité de recherche et de développement en agroalimentaire, Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, 445 Boulevard de l'Université, Rouyn-Noranda, Québec, Canada J9X 5E4

Abstract

Timothy (*Phleum pratense* L.) is an important grass forage used for pasture, hay, and silage in regions with cool and humid growth season. One of the factors affecting the nutritive value of this grass is the concentration of non-structural carbohydrates (NSC), which are mainly fructans. Factors that affect plant growth and metabolism, such as harvest management and N fertilization influence NSC concentrations. To provide a basis for better understanding of NSC concentrations in timothy, effect of maturity stages (vegetative, stem elongation, heading and anthesis) and N fertilization levels (0.375 and 3.75 mM NH₄NO₃) on NSC metabolism in forage tissues (leaf blades and stems surrounded by leaf sheaths) were investigated. Fructan concentrations increased in leaf blades between heading and anthesis stage despite the low sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST) activity level. Fructan exohydrolase (FEH) activity remained stable at a low level during the growth. From a nutritive point of view, anthesis would be the optimal maturity stage to harvest regarding NSC accumulation and dry matter production. Unexpectedly, increasing N fertilization altered neither fructan nor sucrose concentrations. Unlike fructan metabolism, starch metabolism had a high sensibility to N treatment as starch concentrations in leaf blades tripled under low N fertilization concentration. Thus, even if starch remained at a very low level, not significant regarding the nutritive value, our data indicate a much higher sensitivity of starch metabolism to nitrogen fertilization compared to the one of fructan, suggesting different regulatory mechanisms between fructan-N and starch-N metabolism interactions.

Keywords: timothy, grass forage, stage of development, nitrogen fertilization, fructan, starch

Abbreviation: NSC, non-structural carbohydrate; WSC, water soluble carbohydrate; SST, sucrose:sucrose fructosyltransferase; FEH, fructan exohydrolase; PCA, principal component analysis

V.1.1. Introduction

In higher plants, carbon accumulates primarily as starch, sucrose, and fructans, depending on species, plant organ and environmental conditions. Approximately 45,000 plant species (~15% of flowering plants) use fructans as their main storage carbohydrate (Hendry 1993). Prominent families for fructan accumulation are Poaceae (e.g. grasses and cereals), Liliaceae and Asteraceae. Fructans are major components of the non-structural carbohydrates (NSC) in temperate forage grasses and starch accounts for only a small proportion of the NSC in mature leaves of fructan-grasses (Chatterton *et al.*, 1989). Thus, water soluble carbohydrates (WSC) like sucrose and fructans, are the primary carbon reserves in vegetative tissues of forage grasses in temperate latitude and constitute the agronomically important fraction of NSC. Indeed, their concentration is correlated with nutritional quality of ruminant feed. Fructans contribute to the palatability (Mayland *et al.*, 2000) and digestibility of grasses when fed to animals (Miller *et al.*, 2001) as well as to the fermentation quality of silage (Winters *et al.*, 1998). Timothy (*Phleum pratense* L.) is an important forage grass used for pasture, hay and silage in regions with cool and humid growth season in Canada, US, Japan and Europe (Bélanger *et al.*, 2001). Compared to perennial ryegrass, the most important forage grass in Europe, timothy is more winter-hardy but less tolerant to frequent defoliation (Höglind *et al.*, 2001). In northern latitudes, timothy is cut two to three times per year, with the objective of achieving a high total annual yield with a good feeding value. Timothy matures very rapidly, especially during primary growth (Fageberg, 1988) and due to the short spring and intensive growing season in northern latitudes; the timing of harvest has a major impact on the nutritive value (Deinum *et al.*, 1981; Rinne and Nykänen 2000; Bernes *et al.*, 2008; Bertrand *et al.*, 2008; Pelletier *et al.*, 2009).

In general, the nutritive value of a forage crop is a function of its component (mainly leaves and stems) and their proportion in the biomass (Jefferson, 2005). The leaf to total weight of harvestable biomass ratio or the leaf to stem ratio are used to describe changes in the components of plant biomass having nutritive value implications. Thus, one of the most important factors affecting nutritive value of silage is the maturity of the herbage (Bélanger *et al.*, 2001). In grasses, NSC content varies during the different growth cycles. There is some discrepancy in the seasonal patterns described in the published literature. Highest water soluble carbohydrate and/or fructan contents are reported for winter, or spring/early summer or late summer growth (Gallagher *et al.*, 2007 and references therein). These authors suggest that differences are probably accounted for by variation in climatic conditions and indicate that environmental factors can have profound effect on pattern of fructan and WSC accumulation. Accordingly, Nordheim-Viken and Volden (2009) in Norway observed an increase, a decrease or no changes in timothy total non-structural carbohydrates with stage of plant development, depending on year, growing cycle and location. A decrease of WSC with stage of maturity (from stem elongation to early flowering) was reported for timothy grown in Sweden (Bernes *et al.*, 2008) or in Eastern Canada (Tremblay *et al.*, 2005). Timothy was harvested in June at both locations. Similar results were observed for a mixture of timothy and meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) grown in Finland (Rinne *et al.*, 1997, 1999) while Pelletier *et al.* (2009) reported that fructan levels in leaves and stems of timothy grown in northern Ontario in Canada, were very low in June at heading and reached very high value in July at anthesis. In wheat, fructan levels in stem increased during heading and anthesis and then generally decreased during grain filling (Wardlaw and Willenbrink, 1994).

Agronomic studies have been conducted on the effects of fertilizers on timothy forage productivity and nutritive value (Tremblay *et al.*, 2005; Nordenheim-Viken and Volden, 2009; Pelletier *et al.*, 2009). In general, nitrogen applied at low to moderate

rates is expected to increase carbohydrate reserves while high nitrogen fertilization is supposed to decrease them (White 1973; Foyer *et al.*, 2003). In wheat, McGrath *et al.* (1997) showed an inverse relationship between fructans and N concentrations in contrasted wheat varieties. Similarly, Valluru *et al.* (2011) showed that one percent increase in leaf N concentration resulted in 28% lower WSC in wheat stem. Nitrate acts as a negative signal, rapidly decreasing fructan accumulation together with a reduction of fructosyltransferase (FTs, enzymes responsible for fructan synthesis) amounts in barley (Wang and Tillberg, 1996; Wang *et al.*, 2000; Morcuende *et al.*, 2004) and wheat (Shiomi *et al.*, 2006; Ruuska *et al.*, 2008). However, in timothy, the effects of N fertilization on NSC content, in particular fructans, is not well understood and is the subject of conflicting reports. Indeed, in a field study, Pelletier *et al.* (2009) showed that nitrogen fertilization (30 to 110 kg N ha⁻¹ as NH₄NO₃) did not affect timothy forage carbohydrate levels (NSC and fructan concentrations), but slightly increased DM yield. On the contrary Tremblay *et al.* (2005) and Nordheim-Viken and Volden (2009) observed that higher rates of N fertilizer application decreased WSC concentrations. The effects of N fertilization on carbohydrate reserves on timothy are thus complex and variable.

Consequently, factors that affect metabolism, such as maturity stage and N fertilization, are also likely to affect timothy forage NSC content. A better understanding of fructan metabolism and regulation during growth may provide opportunities to improve non-structural carbohydrate *via* enhancement in tissues and then increase NSC in grazing stand, hay and silage. In perennial ryegrass leaf, fructans can account for up to 30% of dry matter, with strong daily and seasonal variations as a complex function of several environmental factors (Gallagher *et al.*, 2007). To provide a basis for better understanding of fructan metabolism in timothy, the objective of this paper is to determine how fructan metabolism regulation is affected by N fertilization and stage of development in leaf blades and stems surrounded by leaf sheaths of timothy. Four growth stages (vegetative, stem

elongation, heading and anthesis) and two N fertilization concentration (0.375 and 3.75 mM NH_4NO_3) were studied. Particular attention was given to WSC, including fructan metabolism, in relation to nitrogen components in tissues.

V.1.2. Materials and methods

Plant materials

Seeds of timothy (*Phleum pratense* L. cv. Alliance) were germinated on perlite in demineralized water for 1 week in the greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to plastic tanks. Plants were maintained by 2 x 4 cm (height x diameter) foam cylinder (three plants in each foam cylinder) adapted on the top of a 25 x 4.5 cm plastic cylinder. The plastic tanks (27 cm height x 35 cm length x 27 cm width receiving 30 L of nutrient solution) contained ten plastic cylinders (30 plants in each tank). Nutrient solution was aerated continuously and replaced every week. Plants were grown under hydroponic conditions between 5 to 8 weeks in a greenhouse with a photoperiod of 16 h of natural light supplemented by a photosynthetic photon flux density of $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Phyto tubes, Claude, GTE, Puteaux, France). The average photosynthetic active radiation intensity was $270 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during the growing period. The thermoperiod was 20°C during the day and 15°C during the night.

The nutrient solutions contained 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.50 mM MgSO_4 , 1.25 mM KCl, 0.2 mM EDTA-2[NaFe], $14 \mu\text{M}$ H_3BO_3 , $0.7 \mu\text{M}$ CuSO_4 , $0.7 \mu\text{M}$ MnSO_4 , $0.7 \mu\text{M}$ Na_2MoO_4 , $3 \mu\text{M}$ ZnSO_4 and $0.1 \mu\text{M}$ CoCl_2 , with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and NH_4NO_3 as sources of N with final concentrations of 3.75 mM or 0.375 mM. Each 30 L plastic box contained 30 plants per 100 cm^2 and once weekly, they received 27 L of fresh nutrient solution, which corresponds to 280 or 28 kg N ha^{-1} on a weekly basis. Plant tissues were harvested in the morning at 09:00 at 5-cm height from the crown for each stage of development which was determined accordingly to the scale of Zadoks and Board

(1974) modified by Simon and Park (1983): vegetative stage (23-29 days after sowing), stem elongation (35-39), heading (51-59) and anthesis (61-69) (Figure V.1.1). Stems (surrounded by leaf sheaths at the lower part) and leaf blades were separated, weighed, frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C , freeze-dried and ground for further analysis.

Extraction of soluble compounds

For extraction of soluble compounds (carbohydrates, amino acids, nitrate, and ammonium) content, 50 mg of freeze dried plant tissue, ground to a fine powder, were placed in a 14 mL polypropylene round-bottom tube with 2 mL of 80 % ethanol (v/v). The tube contents were mixed and incubated for 15 min at 80°C . After ethanol extraction, the sample was centrifuged at 10000 g for 10 min. The supernatant was preserved and 2 mL of water were added to the pellet. The tube contents were mixed and incubated 15 min at 60°C . After this first aqueous extraction, the sample was centrifuged at 10000 g for 10 min. The supernatant was preserved and pooled to the ethanol supernatant and the aqueous extraction was repeated once with the pellet. The three supernatants were finally pooled, evaporated to dryness under vacuum and the residue was dissolved in 0.5 mL water and constituted the soluble extract.

WSC and starch analysis

For WSC analysis, aliquots of soluble extract (100 μL) were passed through mini-columns (Mobicols from MoBITec, Göttingen, Germany) packed from bottom to top, with 150 μL of DOWEX 50WX8 hydrogen form 200-400 mesh (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 80 μL of polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and 250 μL of Dowex 1X8 200-400 mesh (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) transformed in formate form to remove pigments and charged compounds. Fructans, sucrose, glucose and fructose were analysed by HPLC on a cation exchange column (Sugar-PAK, 300 X 6.5 mm, Millipore Waters, Milford, MA) eluted at 0.5

mL min⁻¹ and 85 °C with 0.1 mM Ca-EDTA in water and quantified using a refractive index detector (2410 Differential Refractometer, Millipore Waters, Milford, MA). Quantification of each sugar (fructans, sucrose, glucose, fructose) was calculated by comparison of peak areas from an external standard containing inulin, sucrose, glucose and fructose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The pellet residue was analysed for starch using the Total Starch enzymatic kit (Megazyme International, County Wicklow, Ireland). Briefly, after gelatinization at 100°C starch was digested first with thermal stable α -amylase and then with amyloglucosidase. Residual glucose was determined spectrophotometrically using glucose oxidase, peroxidase, and 4-aminoantipyrine. Weight of free glucose was converted to anhydroglucose using a multiplication factor of 162/180.

Measurement of FEH, SST and soluble acid invertase activities

Enzyme activities were performed on frozen samples stored at -80°C. Plant tissue (1 g FW) was ground in 1 mL in 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 5.5) at 4°C containing 5 mM dithiothreitol. The homogenate was centrifuged at 20000 g for 10 min. The supernatant constituted the enzymatic crude extract. An aliquot of the crude extract was desalted on Sephadex G50 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), which also removed sucrose from the extract. This extract constituted the desalted enzymatic extract. Removal of sucrose is of particular importance for assay of FEH activity because inhibition of *in vitro* FEH activity by sucrose has been reported for a range of species including perennial ryegrass (Lothier *et al.* 2007). The assay mixture consisted of 50 μ L of enzyme extract and 50 μ L of substrate. For measurement of FEH activity, high-molecular-weight fructan (8 mg mL⁻¹) extracted from timothy according to the method of Morvan *et al.* (1997) was used as substrate. Fructose released from enzymatic activity of FEH was measured on three replicates by mixing 20 μ L of assay mixture and 148 μ L of imidazole buffer (206 mM imidazole, 10 mM MgCl₂, 0.4 mg mL⁻¹ bovin serum albumin, 1.45 mM ATP, 0.81 mM NADP, pH 7.5)

in wells of microplate. Two μL of a mixture of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) (51 U mL^{-1} of hexokinase and 25.5 U mL^{-1} of glucose-6-phosphate dehydrogenase diluted in 3.2 M ammonium sulphate) were added. After 45 min at room temperature, the release of NADPH and H^+ , which correspond to the initial level of glucose, was determined by measuring absorbance at 340 nm (A2). Then, $2 \mu\text{L}$ of 105 U mL^{-1} of phosphoglucose isomerase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) diluted in 3.2 M ammonium sulfate were added. After 45 min at room temperature, the total releases of NADPH and H^+ , which correspond to the initial level of glucose and fructose, was determined by measuring absorbance at 340 nm (A3). Fructose level (mmole L^{-1}) was determined by using the equation of the linear fructose standard curve (0.5 to 4 mM), $(\text{A3}-\text{A2}) = k [\text{fructose in mM}]$. FEH activity was defined as the amount of fructose released from high-molecular-weight fructan solution per unit of time per gram of fresh tissue.

For sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST) and soluble acid invertase activity assays, $100 \mu\text{L}$ of 100 mM sucrose were used as substrate and added to $100 \mu\text{L}$ of extract. Triplicate samples were run together with duplicate enzyme blanks (no substrate). After incubation at 30°C for 4 h, $100 \mu\text{L}$ of mannitol as internal standard (1 g L^{-1}) were added to the assay mixture and the reaction was stopped by boiling for 5 min. The samples were stored at -20°C until dessalting with ion exchange resins as described above for WSC analysis. The kestotrioses (1- and 6-kestotriose eluted together) produced by the SST activity and fructose produced by soluble acid invertase activity were measured by HPLC under the conditions defined above for WSC analysis.

N compound analysis (soluble proteins, amino acids, nitrate, ammonium)

Aliquots of the soluble extract were used to determine amino acids, nitrate and ammonium concentrations. Total amino acids were quantified by spectrophotometry at 570 nm using the ninhydrin assay (80 mg SnCl_2 in 50 mL of 200 mM citrate buffer,

pH 5.0, mixed with 2 g ninhydrin in 50 mL dimethyl sulfoxide). Nitrate and ammonium analysis were performed by ion chromatography using a DIONEX ICS 3000 system (Dionex, Sunnyvale, CA). Soluble proteins were analyzed in the desalted enzyme extract after protein–dye binding (Bradford 1976) using bovin serum albumin as standard.

Total N was quantified on freeze-dried and ground samples with a C/N analyser linked to a mass spectrometer (IRMS, Roboprep CN and mass spectrometer, PDZ Europa scientific Ltd, Crewe, UK).

Statistics

The experiment utilized a fully factorial randomized block design with two factors, the stage of development (four levels) and the N fertilization levels (two levels). A total of eight treatment combinations were obtained (4 x 2) with three biological replicates (three plants for each condition) (n = 24). Statistical analyses were performed using R (R Development Core Team, 2007). Data normality and variance homogeneity were verified using the Shapiro-Wilk's test (99%) and Bartlett's test (99%), respectively. Raw data were transformed (logarithmic transformation) when needed. Data presented in Figures V.1.2, V.1.3, V.1.5 and V.1.6 were subjected to analysis of variance (two-way ANOVA). For stage of development where an overall difference was significant ($P \leq 0.05$), means were compared using Tukey's test. When there was an interaction of effects between the two factors (stage of development x N fertilization level), a Tukey's test was used for comparison between the eight conditions (4 stages of development x 2 fertilization levels) and differences between means ($P \leq 0.05$) were indicated by different letters above each bar. Pearson coefficients were calculated to assess correlation between different variables (Table V.1.1). Principal component analysis (PCA; Figure V.1.4) was performed with the FactoMineR package of R software.

V.1.3. Results

Dry matter production and growth development

At vegetative stage, only leaf blades were harvested while both stem and leaf blades were harvested during the three following stages of development (Figure V.1.1), leaf blades and stems (including leaf sheaths), were collected above 5 cm (Figure V.1.2). Leaf blade and stem fresh weight (Figure V.1.2A and B) and dry matter (DM) content (Figure V.1.2C and D) were affected by the stage of development but not by the N fertilization level. Leaf biomass increased from vegetative to elongation stage while stem biomass increased from elongation stage to heading (Figure V.1.2A and B). The DM content increased between heading and anthesis for both tissues (Figure V.1.2C and D). The decrease of leaf-to-stem ratio showed an inversion of biomass from leaves to stems during the development (Figure V.1.2E and F) mainly due to the increase of stem biomass (Figure V.1.2B). The leaf-to-stem ratio (DM) was lower for low N grown plants (Figure V.1.2F).

Non-structural carbohydrate (NSC) contents

Carbohydrate levels were measured in leaf blades and stem tissues at each stage of development. In leaf blades, NSC level was affected by the stage of development but not by the N fertilization level and reached 150 mg g⁻¹ DM at anthesis (Figure V.1.3A). In stems, NSC level was affected neither by the stage of development, nor by the N fertilization level (Figure V.1.3B) and was in average 106 mg g⁻¹ DM. Fructans were the major NSC components (Figure V.1.3C and D), constituting between 49 and 82 % of the NSC. Fructans concentration varied between 57 and 117 mg g⁻¹ DM. As NSC, fructan level in leaf blades was affected by the stage of development but not by the N fertilization level and reached 114 mg g⁻¹ DM at anthesis (Figure V.1.3C). In stems, fructan concentration was affected neither by the stage of development, nor by the N fertilization level and was in average 76 mg g⁻¹

DM (Figure V.1.2D). Sucrose, the precursor of fructan synthesis, appeared to be the second most important carbohydrate, constituting from 8 to 29% of NSC. Sucrose concentration was affected neither by stage of development, nor by the N fertilization level, in both tissues (Figure V.1.3E-F). It was in average 20.9 mg g^{-1} DM in leaf blades (Figure V.1.2E) and 14.9 mg g^{-1} DM in stems (Figure V.1.2F). Hexose (glucose and fructose) constituted from 4.5 to 27.3 % of NSC. Contrary to fructans and sucrose, N fertilization level had a significant effect on both glucose and fructose concentrations in leaf blades. Hexose concentrations in these tissues were higher in high N grown plants (Figure V.1.3G and I). Glucose concentration was stable in leaf blades throughout development while it decreased after stem elongation stage in stems (Figure V.1.3G and H). Fructose concentration was slightly affected by the stage of development in both tissues and reached the maximal level at elongation stage in leaf blades and was maximal during stem elongation stage in stems (Figure V.1.3 I-F and H-J, respectively).

Starch concentrations were always low (less than 15 mg g^{-1} DM; constituting in average 4.7 % of NSC). Conversely to soluble sugars, starch content of both leaf blades and stems always induced a significant interaction between the stage of development and N fertilization level (Figure V.1.2K and L). Thus, starch content was either increased or decreased by high N fertilization, depending of the stage of development. In leaf blades, starch concentration at heading and anthesis was higher in plants grown with low N fertilization, but was not affect by N treatment at vegetative and stem elongation stage. In stems, starch concentration was strongly affected by stage of development and decreased from stem elongation to anthesis (Figure V.1.3L). In this tissue, starch content was higher in plants grown with high N fertilization at stem elongation stage and was not affect by N treatment at heading and anthesis.

According to the Pearson correlation coefficient matrix made with data from all stages, tissues and fertilization levels (Table V.1.1) it appears that fructan

concentration was correlated with sucrose ($P \leq 0.05$) and fructose ($P \leq 0.01$) concentration, while starch content was correlated with sucrose levels only ($P \leq 0.01$). Moreover, sucrose and fructose concentration were highly significantly correlated ($P \leq 0.001$). Glucose level had no correlation with any of the other carbohydrates measured in this study.

Principal component analysis (PCA) was performed to assess how variations of the five carbohydrates that constitute NSC levels are spatially related to stage of development, N fertilization level and tissue (Figure V.1.4A and B). The analysis showed that the physiological parameter of greater significance for separation of the two tissues was starch level and that heading and anthesis are the most contrasted stages according to NSC levels. Subsequently, the individual data for leaf blades and stems for each treatment were collected separately and analysed by PCA (Figure V.1.4C). The large angle observed between starch and fructans in leaf blades and stems with high or low levels of nitrogen confirmed that these two variables are not correlated. All variables are attached to the positive part of the first axis (first component), and in each tissue and treatments. This first axis gave a good representation of the relation between the mono- and disaccharides, and the corresponding polymeric molecules (fructans and starch).

Enzyme activities (FEH, soluble acid invertase and SST)

In both tissues, FEH activity was not altered by the stage of development and was higher for high N than low N fertilization level (Figure V.1.5A and B). Similarly, physiological metabolism of vacuolar sucrose breakdown (soluble acid invertase) and initiation of fructan synthesis (sucrose:sucrose fructosyltransferase; SST) in leaf blade were not affected by the stage of development and were higher with the high N fertilization level (Figure V.1.5C and E). In stems, there was a significant interaction between stage of development and N fertilization level, in their effects on invertase and SST activities (Figure V.1.5D and F). Thus, soluble acid invertase activity

decreased from stem elongation stage to anthesis in high N fertilized plants while it only decreased between heading and anthesis in low N fertilized plants (Figure V.1.5D). SST activity was highest at stem elongation stage for high N fertilized plants while it was highest at heading for low N fertilized plants (Figure V.1.5F). Globally, the main enzyme activity changes were the decrease of both invertase and SST activities in stems between heading and anthesis, while FEH activity remained stable.

N compounds

Total N concentrations were strongly affected by the N treatment, being much lower for both tissues of low N fertilized plants (Figure V.1.6A and B), with total N concentration decreasing between heading and anthesis in leaf blades. Soluble protein concentrations decreased between vegetative and stem elongation stages in leaf blades while it did not change significantly in stems (Figure V.1.6C and D). No significant variation was observed for soluble protein concentrations from both tissues between the two N fertilization levels. On the opposite, amino acid and nitrate concentrations were strongly affected by the N treatment, being much lower in low N fertilized plants in both tissues (Figure V.1.6E-H). Nitrate concentration decreased continuously during development of the leaf blades while it remained stable in stems (Figure V.1.6G and H). Ammonium concentrations were always very low and were significantly altered neither by N treatment nor by the stage of development. Thus, the N components mostly altered by N treatment and the stages of development were amino acids and nitrate.

V.1.4. Discussion

Timothy is an important forage grasses in the northern temperate regions (Bélanger *et al.*, 2001), but metabolic aspects of the nutritive values were seldom studied. In order to improve the role of fertilization and harvesting management on

energy provided for animal nutrition, fructan, the principal NSC, metabolism in relation with N fertilization was analysed in a greenhouse experience.

Time-course of carbohydrate content during growth development

The shift between the leaf-to-stem biomass ratios during growth could have an impact on carbohydrates concentrations because a smaller leaf mass compare to stem weight can limit photosynthetate accumulation and thus WSC concentration in stems. However, the base of stems was surrounded by dark green leaf sheaths, which could contribute to shoot photosynthetic activity (Borland and Farrar, 1985). Despite the decrease of leaf-to-stem ratio (Figure V.1.2), an increase of WSC level was observed between heading and anthesis in leaf blades (Figure V.1.3). Similarly, Pelletier *et al.* (2009) observed that timothy had higher fructan, sucrose, and fructose concentrations but lower glucose concentration when harvested at anthesis compared with heading. Indeed, concentration of high degree of polymerization fructans in forage was close to 0 at heading and increased to 65 mg g⁻¹ DM at anthesis (Pelletier *et al.*, 2009). In the present study, fructan level in leaf blades was already high, around 60 mg g⁻¹ DM, at vegetative stage. It remained at this level until heading and increased afterwards to reach in average 110 mg g⁻¹ DM at anthesis. NSC increased from 80 at heading to 140 mg g⁻¹ DM at anthesis. Tremblay *et al.* (2005), observed a similar increase of WSC levels between stem elongation to early flowering but with lower values (from ~20 to 80 mg g⁻¹ DM depending of N fertilization rates). They also observed a high inter-annual variation of WSC levels, which doubled for the same developmental stage between two consecutive years, indicating a high effect of climate conditions on WSC. Indeed, Thorsteinsson *et al.* (2002) have shown a high effect of day/night temperature on fructan levels in leaves of timothy. In Nordheim-Viken *et al.* (2009), the high NSC levels (between 216 to 320 mg g⁻¹ DM) could be due to local environmental conditions in Norway (temperature and longer photoperiod) or to an overestimation of the NSC concentration since it was calculated following subtraction

(dry matter minus crude proteins, neutral detergent fibres and crude fat). Tremblay *et al.* (2005) suggested that these discrepancies on the effect of the developmental stage on WSC concentration among studies might be due to variation in the level of N nutrition, growth rates and level of irradiance.

PCA analysis shows relations between sucrose, fructose and fructan accumulation as well as an important variability of sugar levels between the two late stages of development, heading and anthesis (Figure V.1.4). The model of Pollock *et al.* (2003) proposed that in photosynthetic cells of grass leaves high sucrose content induces fructan synthesis to maintain sucrose concentration below threshold for down-regulation of photosynthesis. Thus, carbon is stored as fructan when supply exceeds demand. In the transport pathway cells (parenchymatous bundle sheath), the need to maintain sucrose concentration below threshold to preserve downhill gradient between mesophyll and vasculature led also to store the excess of carbon in the form of fructans (Pollock 1984; Pollock *et al.*, 2003). Present results showed that sucrose concentration, the donor of fructose for fructan accumulation, is correlated with fructan ($r=0.32$; $P\leq 0.05$) and fructose ($r=0.52$; $P\leq 0.001$) concentration in leaves during development (Table V.1.1). Chatterton *et al.* (1989) also found a similar correlation between sucrose and fructan concentration across cool-season grasses grown at 15-25°C. FEH activity remained stable during the growth at a rather low level (not exceeding 1 nmol s⁻¹ g⁻¹ FW). Substantial FEH activity during fructan accumulation could be linked to fructan trimming (modification of mean degree of polymerization) as observed in wheat (Bancal and Triboï, 1993; Van den Ende *et al.*, 2003a) rather than to net fructan hydrolysis. Most probably, FEH activity would have continued to increase after anthesis to allow the breakdown of fructans during grain filling. Indeed, fructan concentration decreased in wheat culm during grain filling (McGrath *et al.*, 1997) due to an increase of FEH activity (Willenbrink *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2004).

Although fructan is the main form in which carbohydrate is stored in timothy, small amounts of starch have been detected in leaf blades and stem (Figure V.1.3). Starch levels decreased in leaf blades and stems during development of plants supplied with high N fertilization. In stems, this decrease occurred mainly between stem elongation and heading. These results are in accordance with those of Scofield *et al.* (2009), who observed that starch accumulation occurred earlier than WSC accumulation, from before heading to after anthesis, and was quickly re-utilised. They suggested that starch accumulates before tissues have developed sufficient storage capacity and/or biosynthetic activity for the subsequent large fructan storage. Then, as the NSC storage capacity of tissues and fructosyltransferase activities increased, accumulated starch may be remobilized and converted to fructans (Scofield *et al.*, 2009). However, in leaf blades of timothy grown under low N fertilization, starch accumulation continued until heading, in parallel with fructan storage (Figure V.1.3), indicating a complex interaction between starch and fructan metabolism involving N metabolism.

N fertilization effects on growth and N metabolism

In the present study, increasing N fertilization rate by a factor of ten did not significantly increase the dry matter yield (Figure V.1.2), indicating that N supplied weekly at 0.375 mM NH_4NO_3 was equal or above plant requirements in order to reach maximum shoot growth. Thus, in the present growth conditions, total N levels in shoot under low N fertilization (around 25 and 10 mg g⁻¹ DM in leaf blades and stems, respectively, Figure V.1.6) may exceed optimal N concentration (Bélanger and Richards 1997). Moreover, results showed that, in plants supplied with 3.75 mM NH_4NO_3 , the excess N was partly in the form of nitrate and amino-acid. Similarly, MacLeod and MacLeod (1974) reported that, in heavily fertilized timothy, $\text{NO}_3\text{-N}$ and non-protein N represented up to 0.2% and 0.8% of DM, respectively.

C and N interaction

Fructan synthesis has been shown to be induced by N deficiency in barley (Wang and Tillberg, 1996; Wang *et al.*, 2000), wheat (Ruuska *et al.*, 2008), and perennial ryegrass (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). Unexpectedly, decreasing N fertilization rates altered neither fructan nor sucrose concentrations in the present growth conditions (Figure V.1.3). In timothy, fructan response to N treatment is subjected to conflicting reports. In field conditions, Tremblay *et al.* (2005) and Okamoto *et al.* (2011, cited by Ashikaga *et al.*, 2012) observed that lower rates of N fertilizer application increased the concentration of WSC, particularly at stem elongation and early heading stages. The same effects were observed by Nordheim-Viken and Volden (2009). By contrast, Pelletier *et al.* (2009) reported that N fertilization did not affect forage carbohydrate concentrations. Similarly, Ashikaga *et al.* (2012) observed that increasing N fertilization rates did not largely decrease the WSC content of three timothy genotypes. They suggest that this conflicting result compared to those of Tremblay *et al.* (2005) and Okamoto *et al.* (2011, cited by Ashikaga *et al.*, 2012) comes from the N rates used in these studies which cover higher ranges than those used in their study (Ashikaga *et al.*, 2012) and in Pelletier *et al.* (2009). Pelletier *et al.* (2009) suggested that, in their conditions, N nutrition was not strongly limiting since it altered only slightly dry matter yield. Similarly, in the present study the two levels of N fertilization (0.375 mM and 3.75 mM) had no effect on fructan synthesis since they did not lead to growth difference during the development (Figure V.1.2). In addition, Nordheim-Viken and Volden (2009) suggest that the contradictory results from N fertilization on forage composition might be caused by interaction between N fertilization and environmental factors like temperature, light and water availability. Contradictory results could also be due to differences between soil N content, which is not always measured in field studies. High levels of nitrate in shoot are supposed to decrease fructan synthesis. Indeed, Morcuende *et al.* (2004) showed that nitrate acts as a negative signal for

fructosyltransferase expression and fructan synthesis in excised leaves of barley treated with 10 mM nitrate. However, in this study, high nitrate levels did not decrease fructan content and SST activity, possibly because nitrate concentration in cells was not high enough to inhibit fructosyltransferase expression. Despite the absence of effect of N fertilization level on fructan content, there was a negative correlation between total N content and fructan content in leaf blades ($r = -0.65$; $P = 0.006$; data not shown) and stems ($r = -0.60$; $P = 0.0184$; data not shown). Similarly, Mc Grath *et al.* (1997) established, using near infrared spectroscopy (NIR) of wheat stems collected from healthy, normally developing crops, an inverse relationship between total N and fructan concentrations. Valluru *et al.* (2011) calculated that one percent increase in leaf N concentration results in 28% lower concentration of WSC in wheat stem, indicating that N tissue concentration was an important selective force driving WSC.

Unlike fructan metabolism, starch metabolism showed a high sensibility to the N treatment applied since level in leaf blades tripled at heading and anthesis when N fertilization was low. This effect of N fertilization on starch content is in accordance with the observation of Scheible *et al.* (1997), who reported a repression of starch accumulation by a supply of 12 mM nitrate in the nutrient solution. This decrease of starch synthesis was mainly attributed to the repression of ADP-glucose pyrophosphorylase expression. Ruuska *et al.* (2008) also identified several genes as potential regulators of carbon storage in wheat stems. Concerning starch metabolism, they showed that the level of transcripts of several enzymes (a putative glucose-6-phosphate/phosphate translocator, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase, a number of protein or sugar kinases associated with carbon storage regulation in starch-accumulating plants) was higher in low N wheat than in high N wheat (Ruuska *et al.*, 2008). However, conversely with our data, they observed that, in their experimental conditions, the magnitude of the differences between low and high N was less important for the starch metabolism genes than for

the fructan metabolism genes, indicating that in wheat stem, fructan metabolism is more sensitive to N fertilization than starch metabolism. Scofield *et al.* (2009) showed that for wheat plants grown in low-nitrogen conditions, the major accumulation and decrease of starch occurred temporally independently to accumulation and decrease of WSC, suggesting a different functional role for starch as well as a differential regulatory network. Indeed, using a set of differentially expressed genes as input in a chemical–protein network analyses, McIntyre *et al.* (2011) demonstrated a linkage between starch and N metabolism via pyridoxal phosphate while the level of WSC appeared to be mostly connected to the assimilation of nitrogen into amino acids in field-grown wheat. In the present study, the higher sensitivity of starch metabolism compare to that of fructan could be explained by such differential regulation network and /or by a higher threshold of sensitivity for fructan than for starch metabolism in response to N availability.

V.1.6. Conclusion

Proportion of the different carbohydrate components in non-structural carbohydrate contents in leaf blades and stems of timothy, are influenced by stage of development and to a lesser extent by N nutrition. For forage nutritive value optimization, anthesis would be the optimal stage to harvest regarding NSC accumulation and dry matter production. However, timothy harvested at this stage of development is likely to have lower digestibility due to higher fiber concentration (Pelletier *et al.*, 2008; Nordheim-Viken and Volden, 2009).

The two N fertilization rates, 0.375 and 3.75 mM NH_4NO_3 , had no effect on the accumulation of WSC during development of timothy, probably due to non-limiting N nutrition. Even if starch remained at a very low level, not relevant considering animal nutritive value of timothy, starch metabolism presented a much higher sensitivity than fructan metabolism to N fertilization level, suggesting different

regulatory mechanisms and/or thresholds between fructan-N and starch-N metabolism interactions.

V.1.7. Acknowledgements

The technical assistance of colleagues of the UMR INRA Université de Caen Basse-Normandie EVA for growing plants, biochemical and statistical analysis was greatly appreciated. The authors are thankful to Yves Castonguay, Agriculture and Agri-food Canada, Laval University, for helpful comments. This research was supported by funding from the ‘Développement Économique Canada - Regional Strategic Initiative #400020439’ and by funding from INRA and Université de Caen Basse-Normandie (France).

Table V.1.1: Pearson correlation coefficient matrix between the non-structural carbohydrate concentration (mg g DM⁻¹) in stems and leaf blades harvested above 5 cm during development of timothy fertilized with 3.75 mM (N) or 0.375 mM (N/10) NH₄NO₃ (n=41). Pearson correlation coefficients (r) are reported (ns: non-significant; *: P ≤ 0.05, **: P ≤ 0.01, ***: P ≤ 0.001).

	Fructans	Sucrose	Glucose	Fructose	Starch
Fructans	r = 1				
Sucrose	r = 0.32 *	r = 1			
Glucose	r = 0.15 ns	r = 0.15ns	r = 1		
Fructose	r = 0.42**	r = 0.52 ***	r = 0.22ns	r = 1	
Starch	r = -0.16 ns	r = 0.45 **	r = -0.19ns	r = -0.05ns	r = 1

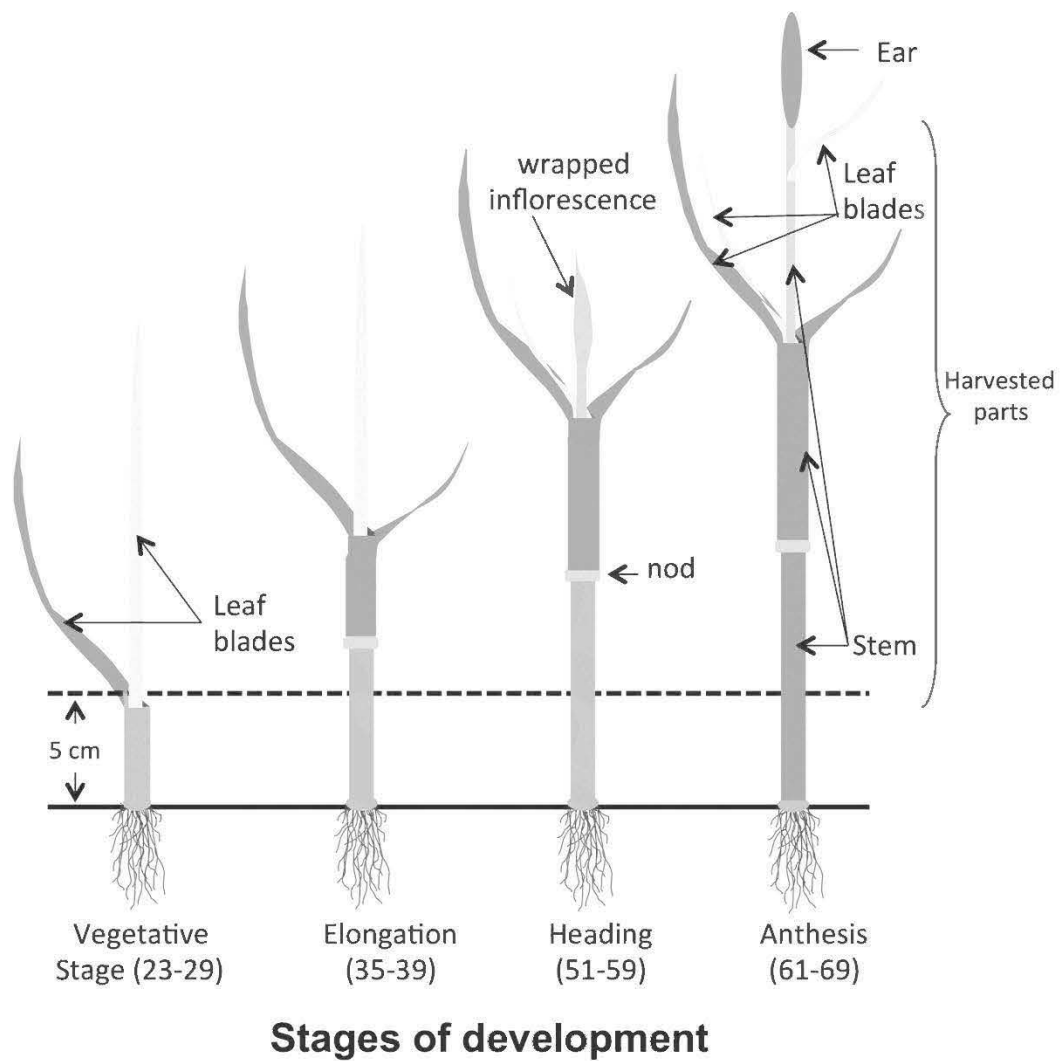


Figure V.1.1: Schematic representation of timothy tiller at the different stages of growth. The tissues above 5 cm from the ground level (stems and leaf blades) were harvest at vegetative, elongation, heading and anthesis stages according to the scale of Zadok and Board (1974) modified by Simon and Park (1983).

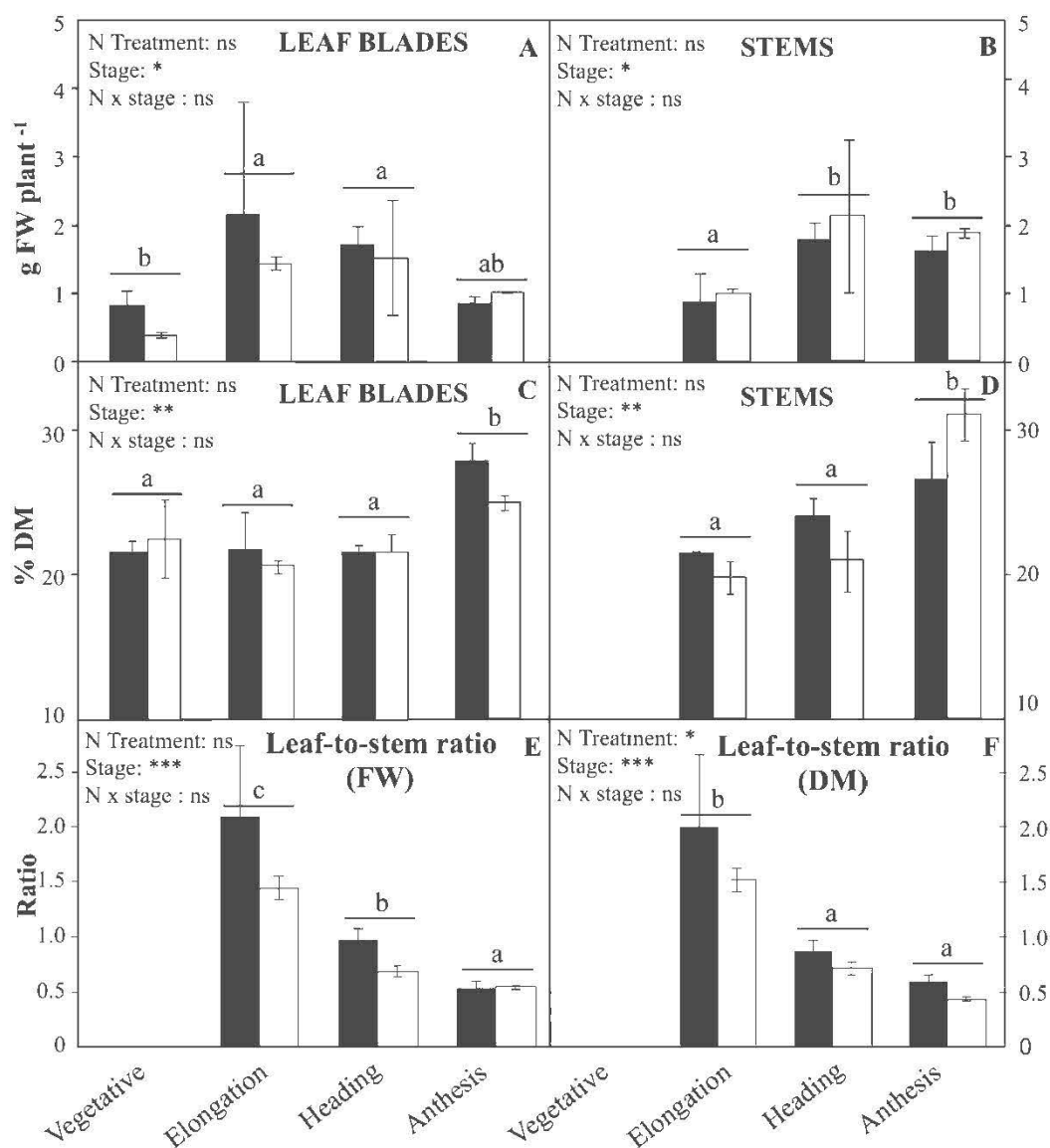


Figure V.1.2: Fresh weight (A-B, FW in g plant⁻¹), dry matter content (C-D, % DM in g DM 100 g⁻¹ FW) of leaf blades and stems (surrounded by leaf sheaths) and leaf-to-stem ratio (E-F, FW and DM) in tissues harvested above 5 cm during development of timothy fertilized with 3.75 mM (black) or 0.375 mM (white) NH_4NO_3 . Values are means of three biological replicates $\pm$ standard error (SE). Different superscript letters indicate difference between stages within N fertilization level with $P \leq 0.05$ (Tukey's test). For each tissue, N treatment and stage effects as well as N treatment x stage interactions are reported (ns: non-significant; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

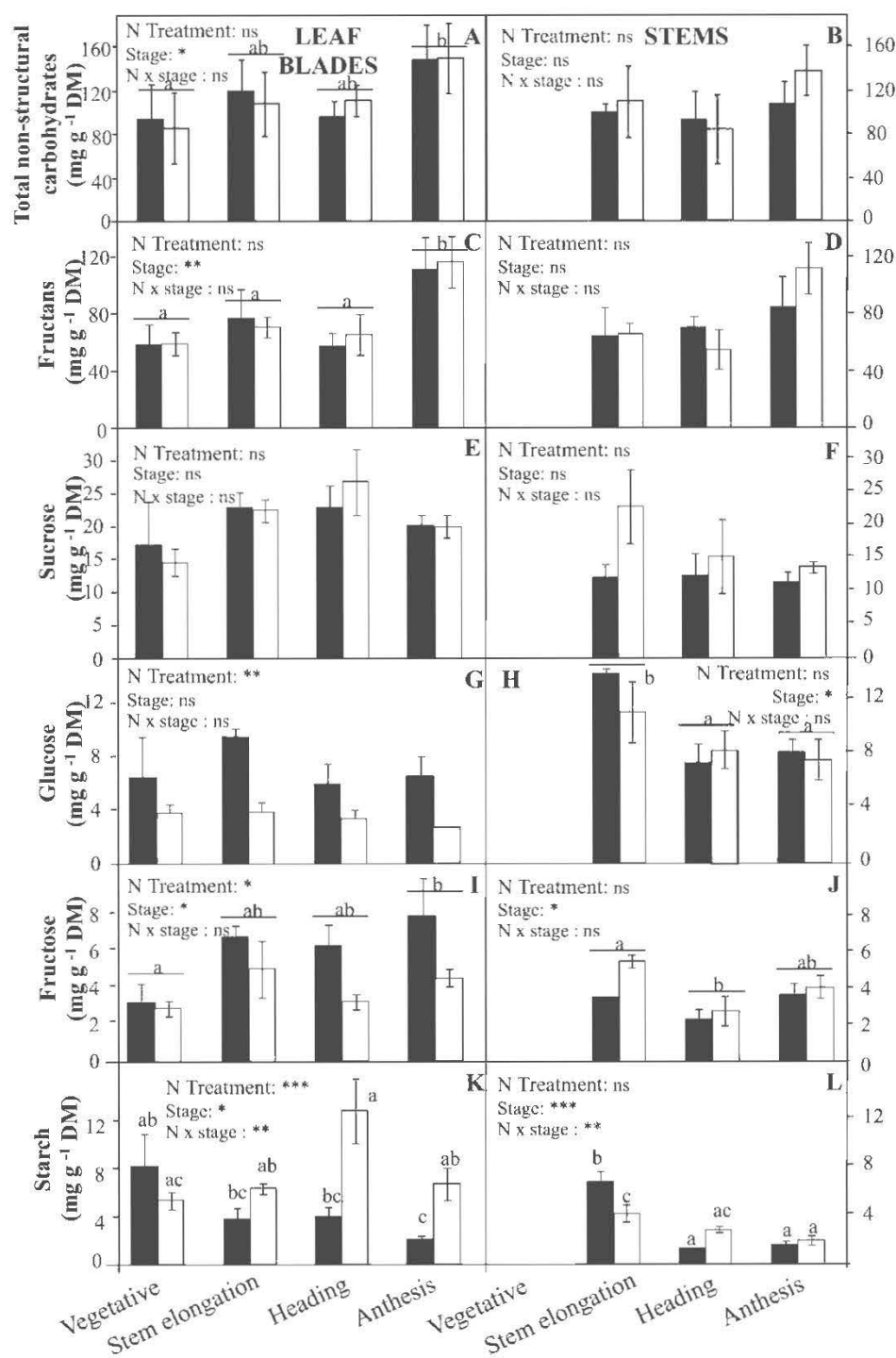


Figure V.1.3: Total non-structural carbohydrates (A-B), fructans (C-D), sucrose (E-F), glucose (G-H), fructose (I-J) and starch (K-L) concentrations (mg g⁻¹ DM) in leaf blades and stems (surrounded by leaf sheaths) harvested above 5 cm during development of timothy fertilized with 3.75 mM (black) or 0.375 mM (white) NH_4NO_3 . Values are means of three biological replicates $\pm$ standard error (SE). Different superscript letters indicate difference between stages within N fertilization level with $P \leq 0.05$ (Tukey's test). For each tissue, N treatment and stage effects as well as N treatment x stage interactions are reported (ns: non-significant; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

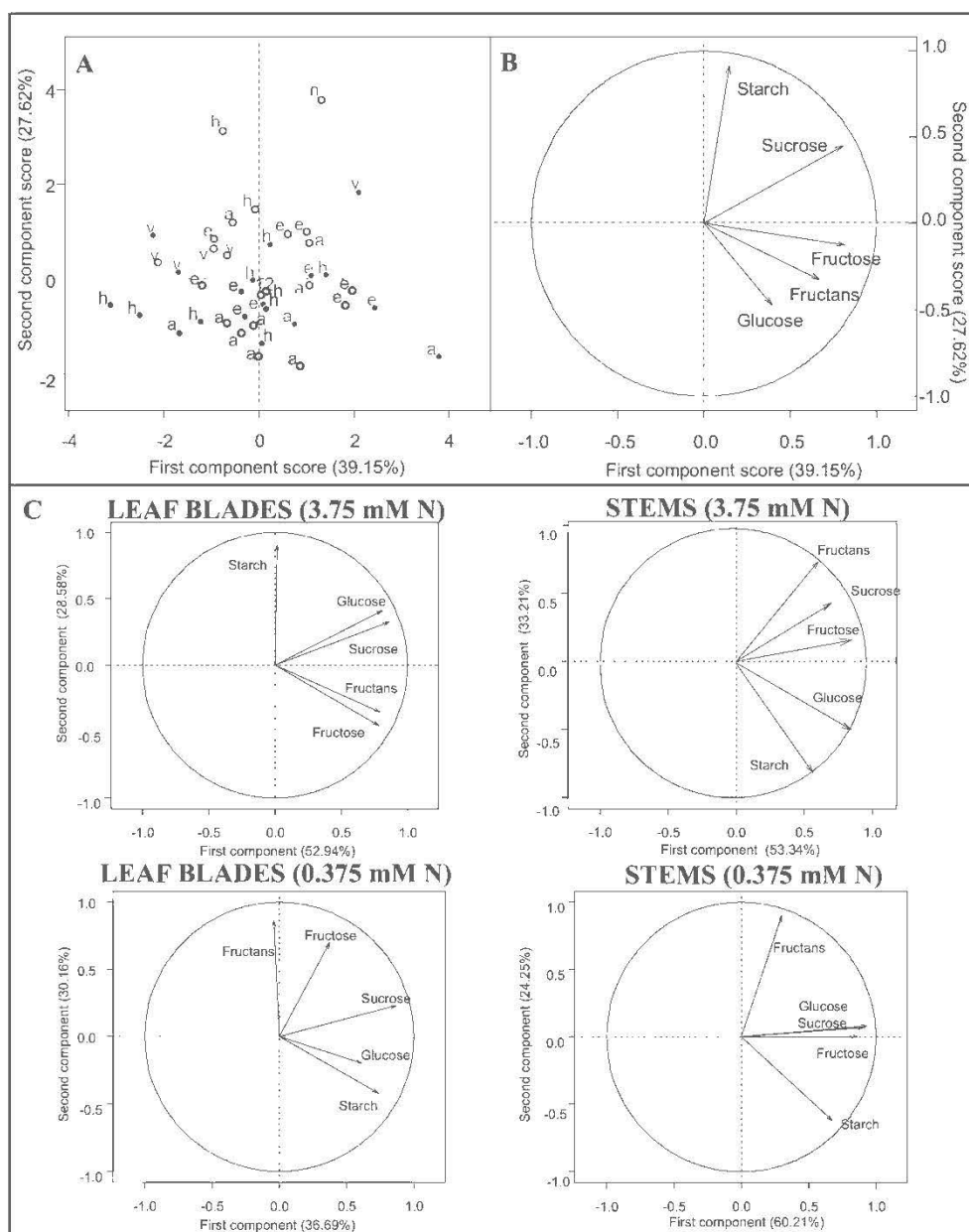


Figure V.1.4: (A) Principal component analysis (PCA) of 5 variables, non-structural carbohydrate concentration (mg g⁻¹ DW) in stems (red) and leaf blades (green) harvested above 5 cm during development of timothy fertilized with 3.75 mM (disk) or 0.375 mM (ring) NH_4NO_3 , in the two first principal components of the PCA (n=41; the first component explained 39.15% and the second 27.62% of the variance) for the four stages of development (v: vegetative, e: elongation, h: heading, a: anthesis). (B) Correlation circle and associated vectors of variables calculated in the two first principal components of the PCA (n=41). (C) Correlation circle and associated vectors of the same variables in each tissues and each N fertilization treatment separately (n=8, 9 or 12).

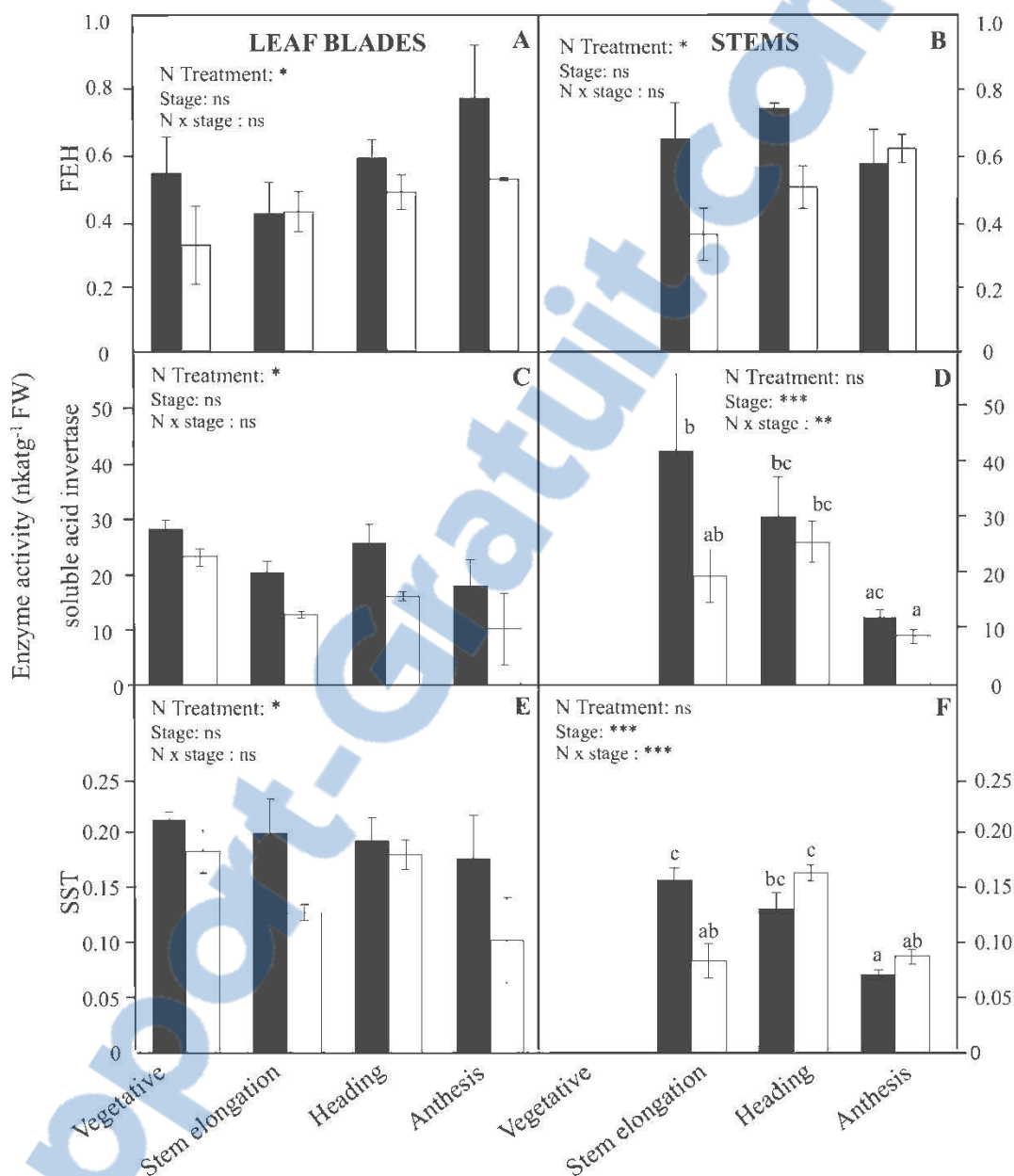


Figure V.1.5: FEH (A-B), SST (C-D) and soluble acid invertase (E-F) activities ($\text{nkcat g}^{-1} \text{FW}$) in leaf blades and stems (surrounded by leaf sheaths) harvested above 5 cm during development of timothy fertilized with 3.75 mM (black) or 0.375 mM (white) NH_4NO_3 . Values are means of three biological replicates $\pm$ standard error (SE). Different superscript letters indicate difference between stages within N fertilization level with $P < 0.05$ (Tukey's test). For each tissue, N treatment and stage effects as well as N treatment x stage interactions are reported (ns: non-significant; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

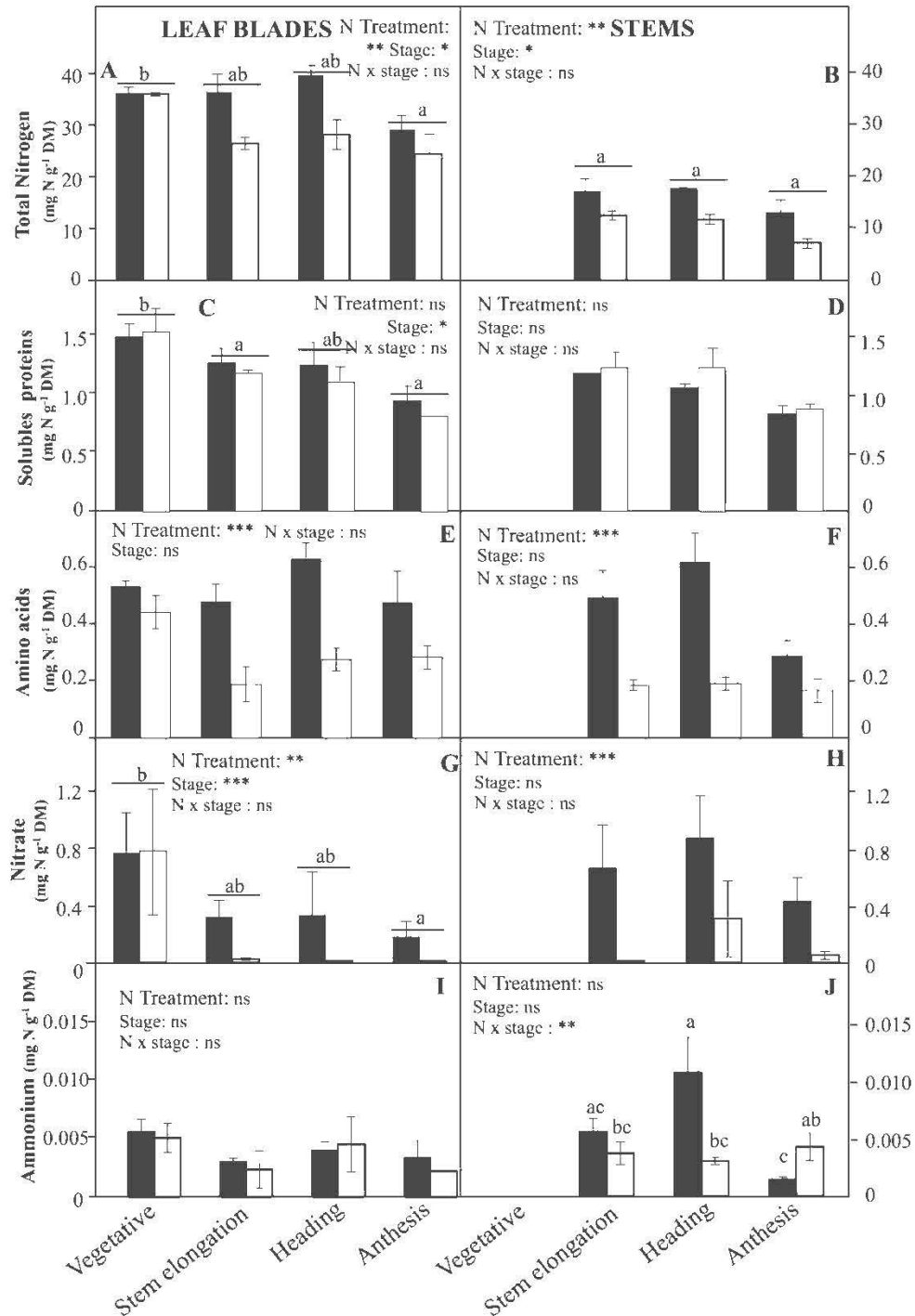


Figure V.1.6: Total nitrogen (A-B), soluble protein (C-D), amino acids (E-F), nitrate (G-H) and ammonium (I-J) in $\text{mg N g}^{-1} \text{ DM}$ in leaf blades and stems (surrounded by leaf sheaths) harvested above 5 cm during development of timothy fertilized with 3.75 mM (black) or 0.375 mM (white) NH_4NO_3 . Values are means of three biological replicates $\pm$ standard error (SE). Different superscript letters indicate difference between stages within N fertilization level with $P < 0.05$ (Tukey's test). For each tissue, N treatment and stage effects as well as N treatment x stage interactions are reported (ns: non-significant; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Préambule à l'article 2

Cette étude montre que les concentrations en fructanes augmentent dans les tissus foliaires et les tiges au cours du développement. Parallèlement, la diminution de l'activité invertase acide soluble dans les tiges permet sans doute d'optimiser la disponibilité du substrat (saccharose) pour la synthèse de fructanes et expliquerait l'accumulation des fructanes malgré une activité sucrose:sucrose fructosyltransférase (SST) relativement basse. L'activité fructane exohydrolase (FEH), faible en comparaison de celle de l'invertase, reste stable pendant la croissance, ce qui est en concordance avec l'augmentation des teneurs en fructanes pendant la même période. Du point de vue de la valeur nutritive du fourrage, le stade anthèse serait le stade de maturité optimal pour la récolte, au regard de l'accumulation en sucres solubles et de la production de matière sèche. La variation de la fertilisation azotée entre 3,75 et 0,375 mM NH_4NO_3 ne modifie pas cette tendance. Contrairement au métabolisme des fructanes, le métabolisme de l'amidon montre une sensibilité importante au traitement azoté, les teneurs en amidon triplant dans les limbes pour les concentrations faibles en N. Même si les teneurs en amidon restent faibles et donc n'influent sans doute pas sur la valeur nutritive du fourrage, les données indiquent une sensibilité beaucoup plus haute du métabolisme de l'amidon à la fertilisation azotée comparée à celui des fructanes pendant la croissance, suggérant des mécanismes de régulation répondant à des seuils différents vis-à-vis du nitrate.

Les deux derniers stades (épiaison et anthèse) caractérisés par des accumulations importantes en fructanes et sucres solubles pourraient intéresser l'alimentation animale. Le temps de paissance étant souvent limité en raison des conditions climatiques, se pose alors la question de la conservation du fourrage sous forme de foin ou d'ensilage. Pour l'ensilage, la teneur en eau doit se situer entre 50 et 70%, selon le type de silo, favorisant une bonne fermentation lactique et, idéalement, la plante devrait contenir une bonne proportion de sucres solubles (environ 10 % de la

matière sèche). Pour le foin, les teneurs en eau sont moins importantes, inférieure à 20%. De plus, le séchage du fourrage par fanage (ou « *wilting* ») après la coupe et avant la mise en balle sous forme de foin ou d'ensilage, est généralement requis. En effet, le fanage de l'herbe de façon plus ou moins importante a pour effet d'augmenter la matière sèche des fourrages ce qui permet une meilleure conservation des nutriments (Petit and Tremblay 1992; Repetto *et al.*, 2005).

Le chapitre suivant se propose donc d'explorer le devenir des fructanes, et le métabolisme des sucres non structuraux, pendant les 24 premières heures de fanage après une fauche réalisée au stade épiaison ou anthèse.

V.2. FRUCTAN AND NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATE METABOLISM IN HARVESTABLE TISSUES OF TIMOTHY DURING WILTING

Marouf Ould-Ahmed^{1,2,3}, Marie-Laure Decau^{1,2}, Annette Morvan-Bertrand^{1,2}, Marie-Pascale Prud'homme^{1,2}, Carole Lafrenière³, Pascal Drouin³

¹Université de Caen Basse-Normandie, UMR 950 EVA (ou Ecophysiologie Végétale & Agronomie, nutritions NCS), F-14032 Caen, France

²INRA, UMR 950 EVA, F-14032 Caen, France

³Unité de recherche et de développement en agroalimentaire, Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, 445 Boulevard de l'Université, Rouyn-Noranda, Québec, Canada J9X 5E4

Abstract

Timothy (*Phleum pratense* L.) is an important grass forage used for pasture, hay and silage in regions with cool and humid growth season. The present study investigated the metabolism of non-structural carbohydrates, including fructan and starch, and the metabolism of soluble proteins in timothy plants harvested at two maturity stages (heading and anthesis) and wilted under controlled conditions for 24 h at two temperatures (15°C, 20°C) and two light regimes (darkness, light). Soluble protein and starch concentrations declined in plant tissues concomitantly to dry matter increase. Transient increase of amino acid contents suggest that the protein content decrease was due to proteolysis during wilting. Sucrose and fructose contents increased in timothy plant tissues wilted in light while it remained stable in plants wilted in darkness, either at 15°C or 20°C. Concomitantly, fructan content tended to increase transiently or remained stable depending on wilting conditions. Consequently, unlike soluble proteins and starch, fructan content was not correlated to the DM concentration. The preservation of fructans in wilting tissues at the beginning of the drying process might be the result of plant response to drought stress. Besides fructans, which could help to stabilize membranes, sucrose and fructose can provide osmoticum to mediate osmotic adjustment. SST activity generally decreased as an immediate response to cutting and wilting at 20°C in both light regimes. Unlike SST activity, FEH and soluble acid invertase activities were well preserved during the first 12 hours of wilting at 20°C suggesting that corresponding proteins are less susceptible to proteolysis than SST and/or are produced *de novo*. The fact that these enzymes activities are still active after several hours of wilting suggests that they might facilitate the fermentation process at the

beginning of ensiling by supplying fructose from fructans and hexoses from sucrose to the fermentive bacteria.

Keywords: timothy, grass forage, wilting, fructan, starch, soluble proteins, enzyme activity.

Abreviation: NSC, non-structural carbohydrate; WSC, water soluble carbohydrate; SST, sucrose:sucrose fructosyltransferase; FEH, fructan exohydrolase.

V.2.1. Introduction

Non-structural carbohydrates (NSC) in forage represent an important source of energy that is readily available for the rumen bacteria (Murphy *et al.*, 1982). They also contribute to the palatability (Mayland *et al.*, 2000) and digestibility of grasses when fed to animals (Miller *et al.*, 2001) as well as to the fermentation quality of silage (Winters *et al.*, 1998). Their content in forage is variable notably because of the species, the cultivars, climatic conditions during growth and fertilization level (Chatterton *et al.*, 1989; Suzuki, 1993; Gallagher *et al.*, 2007). In many countries, forage must be harvested and stored in order to feed animals during adverse conditions principally during winter times in temperate regions. Forages are conserved as hay (dry form) or as silage (humid form) and wilting is often used before ensiling in order to ensure a good quality.

Fructans are major components of the NSC stored in temperate forage grasses (Chatterton *et al.*, 1989) and represent an important portion of soluble sugars in plant that can be fermented during ensiling (Merry *et al.*, 1995; Winters *et al.*, 1998). Timothy (*Phleum pratense* L.) is one of the most important cool-season grasses grown in cold-winter regions of North America, Europe, and Japan. The quality of timothy silage is influenced by the maturity of forage and by ensiling treatment (Kunelius and Suzuki, 1977; Tremblay *et al.*, 2005). However much more work on the nutrient content preservation, in particular NSC and proteins, of wilted timothy crops needs to be done. Early-cut timothy haylage (harvested from stem elongation to flowering stages) had good nutritional properties due to high proteins content when wilted (23-30h) and stored for two months in bales (Ragnarsson and Lindberg, 2008) but no information is available on NSC and proteins changes during the wilting period. It is well known that there are large differences between the protein and WSC composition of leaves and stems; which have nutritive value implications (Bélanger and McQueen, 1998). These differences, togetherwith the fact that leaves dry more

rapidly than stems and that there is a decrease in leaf-to-stem ratio during development (Ould-Ahmed *et al.*, article 1, chapitre V.1) may influence the chemical changes in NSC and protein contents occurring in both plant components throughout the wilting period.

Therefore, this study was undertaken in timothy i) to determine the effects of plant maturity (heading and anthesis) on NSC and protein conservation during wilting, ii) to compare the effects of wilting conditions (light or darkness, temperature) on NSC and protein contents and iii) to assess the interaction between NSC, DM, fructan synthesizing and degrading activities as well as invertase activity during wilting.

V.2.2. Material and Methods

Plant materials

Seeds of timothy (*Phleum pratense* L. cv. Alliance) were germinated on perlite in demineralized water for 1 week in the greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to plastic tanks. Plants were maintained by 2 x 4 cm (height x diameter) foam cylinder (three plants in each foam cylinder) adapted on the top of a 25 x 4.5 cm plastic cylinder. The plastic tanks (27 cm height x 35 cm length x 27 cm width receiving 30 L of nutrient solution) contained ten plastic cylinders (30 plants in each tank). Nutrient solution was aerated continuously and replaced every week. Plants were grown under hydroponic conditions during 5 to 8 weeks in a greenhouse with a photoperiod of 16 h of natural light supplemented with a photosynthetic photon flux density of 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Phytotubes, Claude, GTE, Puteaux, France). The average photosynthetic active radiation (PAR) intensity was 270 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during the growing period. The thermoperiod was 20°C during the day and 15°C during the night. The nutrient solutions contained 3.75 mM NH_4NO_3 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.50 mM MgSO_4 , 1.25 mM KCl , 0.2 mM EDTA-

2[NaFe], 14 μM H_3BO_3 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM MnSO_4 , 0.7 μM Na_2MoO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.1 μM CoCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Each 30 L plastic box contained 30 plants for 100 cm^2 surface and once weekly, they received 27 L of fresh nutrient solution. Plant tissues were harvested in the morning at 09:00 to a 5-cm height at heading (51-59) and anthesis (61-69) stage accordingly to the scale of Zadoks and Board (1974) modified by Simon and Park (1983). Harvested tissues were divided in 15 sets (three biological replicate for each of the five sampling time) and placed on Whatman paper in a growth chamber at 20°C, under a PAR intensity of 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ or in the dark, with 80% relative humidity to wilt. Plant tissues harvested at heading stage were also placed at 15°C in the dark. The five experimental conditions (heading stage in light or darkness at 20°C, heading stage in darkness at 15°C, anthesis in light or darkness at 20°C) were conducted separately at different time which therefore induced differences between starting materials. Tissues were sampled after 0, 3, 6 12 and 24 hours of wilting. Stems (surrounded by leaf sheaths) and leaf blades were divided, weighed, frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C, freeze-dried and ground for further analysis.

Analysis of carbohydrates and amino acids

For extraction of carbohydrates and amino acids, 50 mg of freeze dried plant tissue, ground to a fine powder, were placed in a 14 mL polypropylene round-bottom tube with 2 mL of 80 % ethanol (v/v). The tube contents were mixed and incubated for 15 min at 80 °C. After ethanol extraction, the sample was centrifuged at 10000 g for 10 min. The supernatant was preserved and 2 mL of water were added to the pellet. The tube contents were mixed and incubated 15 min at 60 °C. After this first aqueous extraction, the sample was centrifuged at 10000 g for 10 min. The supernatant was preserved and pooled to the ethanol supernatant and the aqueous extraction was repeated once with the pellet. The three supernatants were finally

pooled, evaporated to dryness under vacuum and the residue was dissolved in 0.5 mL water and constituted the soluble extract.

For WSC analysis, aliquots of soluble extract (100 μ L) were passed through mini-columns (Mobicols from MoBITec, Göttingen, Germany) packed from bottom to top, with 150 μ L of DOWEX 50WX8 hydrogen form 200-400 mesh (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 80 μ L of polyvinylpolypyrrolidone (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and 250 μ L of Dowex 1X8 200-400 mesh (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) transformed in formate form to remove pigments and charged compounds. Fructans, sucrose, glucose and fructose were analysed by HPLC equipped with a refractive index detector (2410 Differential Refractometer, Millipore Waters, Milford, MA) on a cation exchange column (Sugar-PAK, 300 X 6.5 mm, Millipore Waters, Milford, MA) eluted at 0.5 mL min⁻¹ and 85 °C with 0.1 mM Ca-EDTA in water. The pellet residue was analysed for starch using the Total Starch enzymatic kit (Megazyme International, County Wicklow, Ireland). Briefly, after gelatinization at 100°C starch was digested first with thermal stable α -amylase and then with amyloglucosidase. Released glucose units were determined spectrophotometrically using glucose oxidase, peroxidase, and 4-aminoantipyrine. Weight of free glucose was converted to anhydroglucose using a multiplication factor of 162/180. Total amino acids were quantified by spectrophotometry at 570 nm using the ninhydrin assay (80 mg SnCl₂ in 50 mL of 200 mM citrate buffer, pH 5.0, mixed with 2 g ninhydrin in 50 mL dimethyl sulfoxide).

Analysis of soluble proteins, FEH, SST and soluble acid invertase activities

Enzyme activities were performed on frozen samples stored at -80°C. Plant tissue (1 g FW) was ground at a ratio of 1 mL in 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 5.5) at 4°C containing 5 mM dithiothreitol. The homogenate was centrifuged at 20000 g for 10 min. The supernatant constituted the enzymatic crude extract. An aliquot of the crude extract was desalted on Sephadex G50 (Sigma-Aldrich, St. Louis,

USA), which also removed sucrose from the extract. The sucrose removal is of particular importance for assay of FEH activity because inhibition of *in vitro* FEH activity by sucrose has been reported for a range of species including perennial ryegrass (Lothier *et al.*, 2007). This extract constituted the desalted enzymatic extract. Soluble proteins were analyzed in this desalted enzyme extract after protein–dye binding (Bradford 1976) using bovin serum albumin as standard.

For enzyme activity determination, the assay mixture consisted of 50 μL of enzyme extract and 50 μL of substrate. For measurement of FEH activity, high-molecular-weight fructan (8 mg mL^{-1}) extracted from timothy according to the method of Morvan *et al.* (1997) was used as substrate. Fructose released from enzymatic activity of FEH was measured on three replicates by mixing 20 μL of assay mixture and 148 μL of imidazole buffer (206 mM imidazole, 10 mM MgCl_2 , 0.4 mg mL^{-1} bovin serum albumin, 1.45 mM ATP, 0.81 mM NADP, pH 7.5) in wells of microplate. Two μL of a mixture of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) (51 U mL^{-1} of hexokinase and 25.5 U mL^{-1} of glucose-6-phosphate dehydrogenase diluted in 3.2 M ammonium sulphate) were added. After 45 min at room temperature, the releases of NADPH and H^+ , which correspond to the initial level of glucose, was determined by measuring absorbance at 340 nm (A2). Then, 2 μL of 105 U mL^{-1} of phosphoglucose isomerase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) diluted in 3.2 M ammonium sulfate were added. After 45 min at room temperature, the total releases of NADPH and H^+ , which correspond to the initial level of glucose and fructose, was determined by measuring absorbance at 340 nm (A3). Fructose level (mmole L^{-1}) was determined by using the equation of the linear fructose standard curve (0.5 to 4 mM), $(\text{A3}-\text{A2}) = k [\text{fructose in mM}]$. FEH activity was defined as the amount of fructose released from high-molecular-weight fructan solution per unit of time per gram of fresh tissue.

For sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST) and soluble acid invertase activity assays, 100 mM sucrose was used as substrate. Triplicate samples were run

together with duplicate enzyme blanks (no substrate). After incubation at 30°C for 4 h, 100 µl of mannitol (1 g L⁻¹) was added to the assay mixture and the reaction was stopped by boiling for 5 min. The samples were stored at -20 °C until dessalting with ion exchange resins as described above for WSC analysis. The kestotriose produced by the SST activity and fructose produced by soluble acid invertase activity were measured by HPLC under the conditions defined above for WSC analysis.

Statistics

Three biological replicates were sampled at each sampling time for each stage of development and each wilting condition. The resulting variation in measurements were expressed as the mean $\pm$ SE for $n=3$. Statistical analyses were performed using R (R Development Core Team, 2007). After verifying that variance was homogenous (Bartlett test, 99%) and residuals distributed normally (Shapiro-Wilk test, 99%), the effect of wilting duration (for a same stage of development and a same wilting condition) was analysed by one-way ANOVA ($n=15$). When an overall difference was significant ($P \leq 0.05$), means were compared using Tukey's test. Linear correlations between DM content and soluble proteins, fructans and starch concentrations were tested for significance using Pearson's correlation coefficients on raw data and on logarithmic transformed data.

V.2.3. Results

DM content and water content

Changes in DM and water contents (mg g⁻¹ FW) in tissues of timothy plants harvested at heading or anthesis stage and wilted over 24 h in light or in darkness at two temperatures, are shown in Figure 1. Significant effects of the wilting duration are reported in Table V.2.1. DM increased during wilting time at 20°C in leaf blades and stems of plants harvested at heading and anthesis. DM content on time zero was

comprised between 203 and 299 mg g⁻¹ FW and increased up to 455 and 849 mg g⁻¹ FW over 24 h of wilting depending on tissue and on plant maturity (Figure V.2.1A-D).

DM increase was more important and significant in light than in darkness, especially in tissues sampled from plants at anthesis. Throughout the course of the experiment, DM increased from 224 to 849 mg g⁻¹ FW in leaf blades and from 252 to 621 mg g⁻¹ FW in stems versus 205 to 659 mg g⁻¹ FW and 203 to 455 mg g⁻¹ FW in light and darkness conditions, respectively. Leaf blades were more susceptible to DM increase than stems. There was a low but significant DM increase when tissues were wilted at 15°C in darkness, from 239 to 310 mg g⁻¹ FW in leaf blades and from 239 to 328 mg g⁻¹ FW in stems.

Soluble protein and amino-acid content

Soluble protein content (mg g⁻¹ DM) declined 1.6- to 4.2-fold in plant tissues during the first 12 h of wilting at 20°C (Figure V.2.2A-B-E-F). Inverse trend was observed for amino acid content which increased in leaf blades and stems of plants sampled at heading stage (Figure V.2.2C-D) and in leaf blades in light at anthesis (Figure V.2.2G). The residual soluble protein concentration after 24 h of wilting was generally close to 1 mg N g⁻¹ DM.

Soluble protein content in both tissues was not significantly affected by wilting for 24 h in darkness at 15°C (Figure V.2.2A-B), while amino acid content increased slightly (Figure V.2.2C-D).

Non-structural carbohydrate content

Fructans represented approximately 80% of the WSC (fructans, sucrose, glucose and fructose) at the time of wilting (Figure V.2.3), so that changes in WSC concentration during wilting broadly reflected changes in fructan concentration (mg g⁻¹ DM). Interestingly and unlike soluble protein content, fructan and WSC contents

were not drastically affected by the wilting process (Figure V.2.3A-H). They remained stable, slightly decreased or even slightly increased depending on tissues, plant maturity and wilting conditions. The only significant modification of WSC concentration corresponds to an increase in leaf blade harvested at anthesis during the first 12 hours of storage under light (Table V.2.1, Figure V.2.3C), which is due to an increase of sucrose (Figure V.2.3K) and fructose (Figure V.2.3S) concentrations. After 24 h of wilting at 20°C in light or darkness, the residual fructan concentration was comprised between 44 to 57 mg g⁻¹ DM in leaf blades and 65 to 111 mg g⁻¹ DM in stems. In stem, fructan concentration was higher at anthesis (86 ± 27 mg g⁻¹ DM) than at heading (66 ± 4 mg g⁻¹ DM) (F -value = 12.0; $P = 0.0008$).

The concentration of fructans and sucrose in leaf blades and stems wilted in darkness (Figure V.2.3E-L) remained generally stable except for fructan concentration in leaf blades harvested at anthesis ($P = 0.092$) and for sucrose concentration in stems harvested at heading stage and wilted at 20°C ($P = 0.065$) which tended to increase. Fructan concentration remained stable in tissues wilted in light except for leaf blades harvested at anthesis ($P = 0.075$) where it tended to increase. In tissues wilted in light, sucrose concentration generally increased ($P \leq 0.05$; Figure V.2.3K-L) or tended to increase ($P = 0.093$; Figure V.2.3I) except for stems harvested at heading stage where it remained stable.

Glucose concentration remained stable throughout the wilting period or tended to decrease during the first 12 h in leaf blades of plants sampled at heading stage and wilted at 20°C in light ($P = 0.096$; Figure V.2.3M). Unlike glucose, fructose content increased in stems wilted at 20°C in darkness at heading stage and in both tissues harvested at anthesis and wilted in light (Table V.2.1, Figure V.2.3 R-S-T) or tended to increase in stems harvested at heading stage and wilted at 15°C in darkness ($P = 0.061$) and in stems harvested at anthesis wilted in darkness ($P = 0.075$). It only declined in leaf blades of plants harvested at heading stage and wilted for 3 h to 12 h in light (Figure V.2.3Q). The residual glucose and fructose concentration after 24 h of

wilting was comprised between 2.1 and 10 mg g⁻¹ DM and was higher in stems than in leaf blades ($P \leq 0.0001$ for glucose and $P \leq 0.05$ for fructose).

Starch content was low, representing less than 8 mg g⁻¹ DM in leaf blades and stems of plants harvested at heading and anthesis stage (Figure V.2.3U-X). During wilting, starch content either remained stable or decreased in both tissues harvested at anthesis and wilted at 20°C in darkness (Figure V.2.3 W and X). It did not drop below 2 mg g⁻¹ DM throughout the course of the experiment.

Soluble protein and starch concentrations were negatively correlated to the DM concentration (Figure V.2.4A and C). The correlations were more significant when logarithmic transformation was applied to the data (Figure V.2.4A' and C'). Conversely, fructans (and WSC by extension) concentration was not correlated to the DM concentration, either by using raw data or logarithmic transformed data (Figure V.2.4B and B').

Fructan and sucrose metabolizing activities

Fructan synthesizing activity (sucrose:sucrose fructosyltransferase, SST), fructan degrading activity (fructan exohydrolase, FEH) and sucrose degrading activity (soluble acid invertase) were followed in leaf and stem tissues during wilting (Figure V.2.5). In general, enzyme activities are much more affected by wilting time than WSC concentrations (Table V.2.1).

In wilted conditions with almost no water loss (darkness at 15°C), SST activity remained stable throughout the course of the experiment (Figure V.2.5A-B). It also remained stable in stems of plants sampled at heading stage and wilted in darkness at 20°C (Figure V.2.5A-B). In the other wilting conditions, SST activity declined up to 4.4-fold in leaf blades or in stems and reached values comprised between 0.05 and 0.39 nkat g⁻¹ DM (Figure V.2.5A-D).

Unlike SST activity, FEH activity increased during the first hours of wilting in leaf blades and stems of plants sampled at heading and wilted in light at 20°C (Figure

V.2.5 E-F). In leaf blades of plants sampled at heading stage and wilted in darkness at 20°C, FEH remained stable during the first 6 hours and then decrease (Figure V.2.5E). Conversely, it increased between 6 and 12 hours after the beginning of wilting in stems of plant sampled at anthesis and stored in darkness (Figure V.2.5H). In the other wilting conditions, FEH activity did not vary significantly over the wilting period. In all conditions, FEH activity did not drop below 0.47 nkat g⁻¹ DM. FEH activity could still be detected in plant tissues after 24 hours of wilting with generally higher activities in tissues harvested at heading stage than at anthesis.

Soluble acid invertase activity was about 100-fold higher than SST or FEH activities. It remained stable in leaf blades or increased in stems of plants harvested at heading stage and wilted at 20°C over the first hours of the experiment and declined afterwards (Figure V.2.5I-J). In plants harvested at anthesis, soluble acid invertase activity remained low and even decreased in leaf blades wilted in darkness and in stem wilted in light (Figure V.2.5K-L). Interestingly, 12 h and even 24 h after wilting, fructan and sucrose metabolizing activities were still measurable in timothy leaf blades and stems of plants harvested at heading or at anthesis stage.

V.2.4. Discussion

Effect of plant maturity and wilting conditions on non-structural carbohydrates and proteins conservation

When plants are cut for hay, haylage or silage, they remain metabolically active and enzymes continue to function as long as plant cells are alive. The dominant actions of the plant enzymes during wilting are proteolysis and respiration (Muck *et al.* 2003). In the present study, and in line with current knowledge, soluble protein concentrations declined in plant tissues concomitantly to dry matter increase. Transient increase of amino acid contents in shoots of plants harvested at heading stage suggest that soluble protein content decrease was due to proteolysis during

wilting. Proteolysis was clearly linked to water loss since it did not occur in tissues that were wilted in darkness at 15°C and that did not lose a high amount of water during 24 h. When occurring, proteolysis ceased above 50% DM. However, as wilting conditions (primarily the interaction of time and moisture concentration) affect the amount of proteolysis during wilting, proteolysis might cease at lower DM (Brady, 1960; Muck, 1987; Owens *et al.*, 1999). Soluble protein content was negatively correlated to DM and the fact that the linear correlation was more significant with logarithmic transformed data indicates that proteolysis rates during wilting decrease with increasing DM concentration, as already suggested by Muck *et al.* (2003).

Plant respiration causes the most significant metabolic loss during the wilting process (Moser, 1995), leading to sugar content depletion. In perennial ryegrass, sugar concentration decreased at a rate of $9 \pm 6 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM d}^{-1}$ during wilting (Spoelstra and Hindle, 1989). In timothy, respiratory substrates (glucose and starch) decreased at a similar rate in plant tissues that were wilted in light or in darkness at 15°C or 20°C. Various factors have been found to affect respiration during wilting. The magnitude of C loss depends on the original DM concentration and metabolic activity of the cut plant tissues, the rapidity and duration of the wilting process, the time of cutting, the richness in WSC and the temperature (Rucker and Knabe, 1977; Honing, 1980). According to McGechan (1990), plant respiration continues until it is stopped by low water concentration of the forage ($\leq 300 \text{ g kg}^{-1} \text{ FW}$). In the present study, DM content also seems to influence plant respiration. In leaves and stems of plants harvested at anthesis and wilted in darkness at 20°C, starch content stopped to decline when DM content became higher than $300 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$ while it tended to decline ($P = 0.078$) throughout the wilting period in leaves of plants wilted in darkness at 15°C when DM content was below $300 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$.

Clark *et al.* (1997) reported that a limited amount of photosynthesis may occur after cutting. Accordingly, when timothy plant tissues were wilted in light, sucrose

content increased during 12 hours in leaves and over the 24 hours in stems of plants harvested at anthesis. Concomitantly fructan content also tended to increase during the first 12 h of wilting in leaves. These results strongly suggest that fructans can accumulate in wilting tissues, depending on light and temperature regimes. Consequently, unlike soluble proteins and starch, fructan content was not correlated to the DM concentration.

Timothy plants were cut at 5 cm above the crown and allowed to wilt under controlled conditions before being dissected into leaves and stems. Preservation of fructans in wilting tissues at the beginning of the drying process might be the result of plant response to drought stress. Indeed, fructan content and its metabolism have been shown to be closely related to water-stress tolerance caused by drought or frost (Tognetti *et al.*, 1990; Livingston and Henson 1998; Yoshida *et al.*, 1998; Volaire *et al.*, 1998; De Roover *et al.*, 2000; Amiard *et al.*, 2003a). It is noteworthy that timothy is used as a forage plant in temperate grasslands with severe winters due to its superior hardiness compared to other crops (Tamura and Yamada, 2007). Transgenic approaches demonstrated that there is a causal relationship between fructan accumulation and water stress tolerance (Pilon Smits *et al.*, 1995, 1999; Li *et al.*, 2007; Kawakami *et al.*, 2008). Using liposomes, numerous *in vitro* studies have shown that fructans act as membrane protectors by interacting with lipid headgroups (Demel *et al.*, 1998; Vereyken *et al.*, 2001, 2003; Hinchey *et al.*, 2002, 2007). The relationship between fructan structures and membrane stabilization under water stress is not fully understood yet. In a recent review, Valluru and Van den Ende (2008) hypothesized that a mixture of both high and low DP fructans might provide optimum membrane protection. *In vivo*, fructans can also act as membrane protectors by forming an amorphous carbohydrate glass participating then to the vitrification mechanisms (Oliver *et al.*, 2002). Besides fructans, fructose can accumulate during the wilting process, more especially in timothy plants harvested at anthesis. Together with sucrose, fructose can provide osmoticum to mediate osmotic adjustment.

Depending on wilting conditions, the present study demonstrated that fructan content in leaves and stems did not vary significantly. Clearly, evolution of fructan content is difficult to predict in wilted tissues since it can be the consequence of different abiotic stress responses that might individually lead to opposite results. As outlined above, accumulation of fructans occurred as a response to drought. But in order to wilt, plants are also cut and C sink retrieval (roots and crowns) could either lead to fructan accumulation or fructan depletion depending on light regime. Indeed, a model commonly used to study fructan metabolism in monocot species including timothy (Cairns *et al.*, 1999) consist of excised leaves placed with the cut ends in water either in darkness to follow fructan depletion or in continuous light to induce fructan accumulation. In line with these patterns, fructans are expected to accumulate in tissues wilted in light conditions. Present study showed that it was not always the case, however. C loss through respiration probably also interfere with magnitude depending on various factors.

Effect of plant maturity and wilting conditions on WSC enzyme activities

Together with proteolysis, respiration and photosynthesis, non-structural carbohydrate metabolism is active in wilting tissues at the beginning of the process. Fructans are fructose-based polymers synthesized from sucrose by fructosyltransferases (FTs) and degraded by fructan exohydrolases (FEHs). As outlined above, fructan content did not decline during the first hours of wilting but remained stable or even tended to increase. Knowing that the fructan pool-size in plants is determined by the coordinated regulation between FT and FEH activities (Van den Ende *et al.*, 2003a; Lothier *et al.*, 2007), the two activities were followed during wilting. In timothy, one synthesis enzyme was cloned and characterized, a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) with a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase activity (1-SST) able to produce the whole set of fructans found in adult plants of timothy (Tamura *et al.*, 2009). Several degrading enzymes were also

recently cloned and functionally characterized (Tamura *et al.*, 2011; Ould Ahmed *et al.*, article 3, chapter V.3). Synthesis of 1-kestotriose and 6-kestotriose (SST activity) as well as fructose production from timothy fructans (FEH activity) were measured in leaves and stems of timothy plants allowed to wilt.

SST activity generally decreased in leaves and stems as an immediate response to cutting and wilting at 20°C in both light regimes. In barley leaves, Obenland *et al.* (1991) showed that SST was continuously subjected to proteolysis so that its activity required *de novo* synthesis of the enzyme. Decline in SST activity in timothy could be explained by proteolysis with no *de novo* protein production. Fructan content accumulation observed in leaf blades of plants harvested at anthesis and wilted at 20°C in light or darkness cannot be attributed to SST activity increase. Residual SST activity might either be sufficient or another fructan synthesizing activity operates in different enzymatic conditions such as the phlein sucrose described by Suzuki and Pollock (1986) in dark-grown seedlings of timothy. Indeed, this enzyme presents different characteristics than FTs (optimum pH at 7, higher affinity to sucrose and possibly a different subcellular localization). Corresponding gene(s) have not been cloned and physiological role(s) of the enzyme are not yet understood.

Unlike SST activity, FEH and soluble acid invertase activities were well preserved during the first 12 hours of wilting at 20°C. They remained stable or generally declined thereafter but never reach null values, so that after 24 h of wilting, both activities could still be detected in plant tissues with highest FEH activity in tissues harvested at heading stage. FEH regulation and more generally fructan metabolic genes regulation are far from being understood (Valluru and Van den Ende, 2008, and references therein). Present results suggest that FEH enzymes are less susceptible to proteolysis than SST activity and/or that FEH enzymes are produced *de novo*. In line with this hypothesis and despite proteolysis conditions, transcripts of *Pp6-FEH1* increased in stubble or haplocorms of timothy as a response to defoliation,

followed by an increase in 6-FEH activity and the degradation of fructans to ensure regrowth (Tamura *et al.*, 2011). Here, increase or stability in FEH activity at the beginning of the drying process did not lead to significant fructan content decline. However, this FEH pattern might be of physiological relevance for wilting tissues to degrade some high molecular weight fructans to lower molecular weight fructans in order to ensure optimum membrane protection and might then be part of the drought resistance process (Valluru and Van den Ende, 2008).

Consequences for ensiling and animal feeding

After harvesting and before ensiling, grass is generally wilted for various durations of time to reach a DM content of 250-500 g kg⁻¹ in order to stop undesirable metabolic processes that alters the nutritive value, enhance silage fermentative quality and restrict soluble nutrient loss during ensiling (McDonald *et al.*, 1991). However, by analyzing carbohydrate metabolism in wilting tissues, the present study demonstrated for the first time that some hydrolytic enzyme activities were well preserved despite a proteolysis context. The present study also highlighted the complexity of sugar metabolism and regulation that take place in wilting tissues depending on plant maturity and wilting conditions including temperature and light regimes. Interestingly, it showed that fructan content could be preserved, possibly in response to drought stress, and even increased in light condition. Unexpectedly, fructan (FEH) and sucrose (soluble acid invertase) degrading enzyme activities were still high after 6 or 12 h of wilting when DM content had reached between 300 and 550 g kg⁻¹ still favorable to proteolysis. If these enzymes activities are still active at the beginning of ensiling, they might facilitate the fermentation process by supplying fructose from fructans and hexoses from sucrose to the fermentive bacteria. Indeed, experiments with sterile perennial ryegrass strongly suggested that the rate of fructan degradation is largely the product of both plant and microbial FEH activity (Merry *et al.*, 1995).

The effects of wilting on intake of silage and animal performance were first reported to be curvilinear with no benefits when DM content was above 250 g kg⁻¹ (Rook and Gill, 1990) and then, by using a much wider data set, to be linearly related to DM concentration (between 180 and 630 g kg⁻¹) and to drying rate (Wright *et al.*, 2000). Underlying mechanisms are not fully understood. If it turns out that FEH and soluble acid invertase activities benefit to further process and finally to animal growth and performance, they should then be taken into consideration to select optimum wilting conditions. However, further investigations are needed in order to relate preservation of hydrolytic activities in wilted tissues, carbohydrate content and composition in wilted tissues, quality of fermentation at the beginning of ensiling, preservation of carbohydrates and proteins at the end of ensiling (Conaghan *et al.*, 2011), voluntary intake and animal performance.

V.2.5. Acknowledgements

The technical assistances of colleagues of the UMR INRA Université de Caen Basse-Normandie EVA for growing plants, biochemical and statistical analysis are greatly appreciated. The authors are thankful to Yves Castonguay, Agriculture and Agri-food Canada, Laval University, for helpful comments. This research was supported by funding from the 'Développement Économique Canada - Regional Strategic Initiative #400020439' and by funding from INRA and Université de Caen Basse-Normandie (France).

Table V.2.1: Effect of wilting duration (ANOVA F-value, n=15) on composition and enzyme activity characteristics of leaf blades (Blades) and of stems and sheaths (Stems) tissues of timothy for each stage of development (heading and anthesis) and each wilting conditions (Light 20°C, Darkness 20°C and Darkness 15°C).

		Heading						Anthesis			
		Light 20°C		Darkness 20°C		Darkness 15°C		Light 20°C		Darkness 20°C	
		Blades	Stems	Blades	Stems	Blades	Stems	Blades	Stems	Blades	Stems
DM ^a		F 81.21 ***	F -10.96 **	F -25.35 ***	F -10.1 **	F -5.56 *	F -3.73 *	F -50.87 ***	F -10.24 **	F 9.47 **	F -4.32 *
Nitrogen compounds	Soluble proteins	F -28.65 ***	F -3.54 ns	F -26.27 ***	F -6.75 *	F -2.99 ns	F -1.41 ns	F -16.69 ***	F -19.40 ***	F -6.55 **	F -7.92 **
	Amino acids	F -7.08 **	F -6.79 **	F -1.78 ns	F -1.01 ns	F -13.79 ***	F -4.19 *	F -4.54 *	F -1.69 ns	F -4.33 *	F -1.79 ns
NSC ^b	WSC ^c	F -1.52 ns	F -1.57 ns	F -0.52 ns	F -1.68 ns	F -0.82 ns	F -1.37 ns	F -4.25 *	F -0.34 ns	F -2.63 ns	F -1.16 ns
	Fructans	F 1.19 ns	F 1.92 ns	F 0.31 ns	F 1.46 ns	F 1.66 ns	F 1.78 ns	F 2.95 ns	F 0.16 ns	F 2.71 ns	F 0.87 ns
	Sucrose	F -2.67 ns	F -0.48 ns	F -1.19 ns	F -3.14 ns	F -1.57 ns	F -1.47 ns	F -5.06 *	F -3.73 *	F -1.05 ns	F -1.48 ns
	Glucose	F -4.60 *	F -2.74 ns	F -7.73 **	F -1.57 ns	F -1.24 ns	F -0.08 ns	F -1.87 ns	F -0.25 ns	F -0.23 ns	F -0.58 ns
	Fructose	F -8.52 **	F -1.19 ns	F -1.67 ns	F -4.52 *	F -0.57 ns	F -3.21 ns	F -3.43 ns	F -4.00 *	F -1.62 ns	F -2.96 ns
	Starch	F 0.32 ns	F 3.16 ns	F 0.63 ns	F 4.93 *	F 3.54 ns	F 2.90 ns	F 0.53 ns	F 0.72 ns	F 6.40 *	F 6.04 *
Enzyme activities	SST ^d	F -4.27 *	F -7.54 *	F -26.56 ***	F -0.21 ns	F -0.21 ns	F -10.41 **	F -4.23 *	F -5.16 *	F -7.90 **	F -5.83 *
	FEH ^e	F -6.83 **	F -5.39 *	F -23.38 ***	F -1.21 ns	F -2.04 ns	F -1.84 ns	F -2.51 ns	F -2.72 ns	F -1.65 ns	F -12.0 ***
	INV ^f	F -22.13 ***	F -6.92 **	F -14.63 ***	F -3.55 *	F -2.31 ns	F -0.41 ns	F -1.21 ns	F -3.51 *	F -6.59 **	F -0.62 ns

^a DM, dry matter content

^b NSC, non-structural carbohydrates

^c WSC, water-soluble carbohydrates

^d SST, sucrose:sucrose fructosyltransferase activity.

^e FEH, fructan exohydrolase activity

^f INV, acid soluble invertase activity

ns, non-significant

* P≤0.05

** P≤0.01

*** P≤0.001

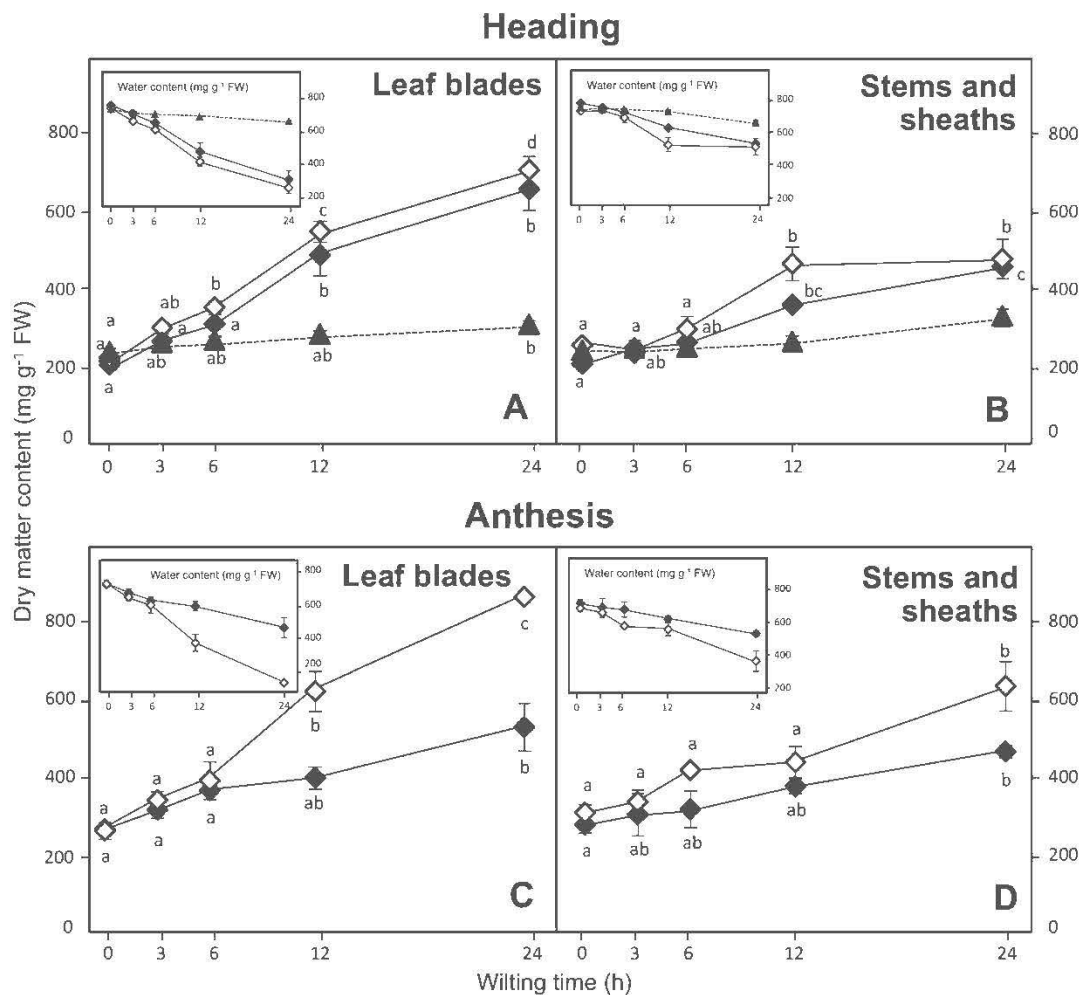


Figure V.2.1: Changes in dry matter content (mg g^{-1} FW) in leaf blades (A, C) and stems (sheaths included) (B, D) of timothy during wilting. Tissues were excised from 5 cm above the crown at heading (A, B) or anthesis (C, D) and stored in light at 20°C (white diamond, solid line), in darkness at 20°C (black diamond, solid line) or in darkness at 15°C (black triangle, dotted line) before being separated for further analysis. Values are means of three biological replicates. Bars represent standard errors (SE) when larger than symbol size. Different superscript letters indicate difference between wilting time within storage condition with $P \leq 0.05$ (Tukey's test).

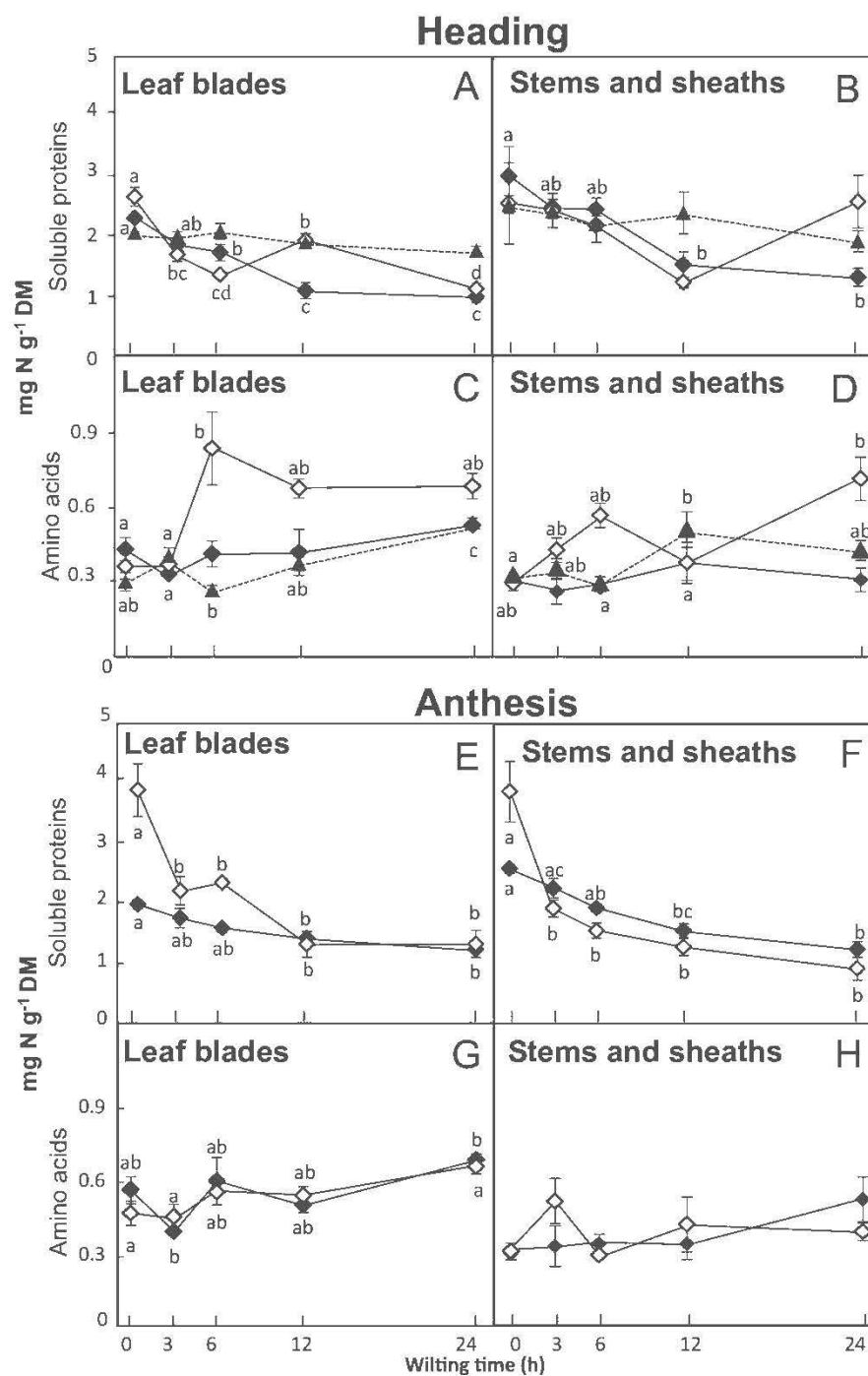


Figure V.2.2: Changes in soluble proteins and amino acids levels ($\text{mg N g}^{-1} \text{DM}$) in leaf blades (A-C-E-G) and stems (sheaths included) (B-D-F-H) of timothy during wilting. Tissues were excised from 5 cm above the crown at heading (A-B-C-D) or anthesis (E-F-G-H) and stored in light at 20°C (white diamond, solid line), in darkness at 20°C (black diamond, solid line), or in darkness at 15°C (black triangle, dotted line) before being separated for further analysis. Values are means of three biological replicates. Bars represent standard errors (SE) when larger than symbol size. Different superscript letters indicate difference between wilting time within storage condition with $P \leq 0.05$ (Tukey's test).

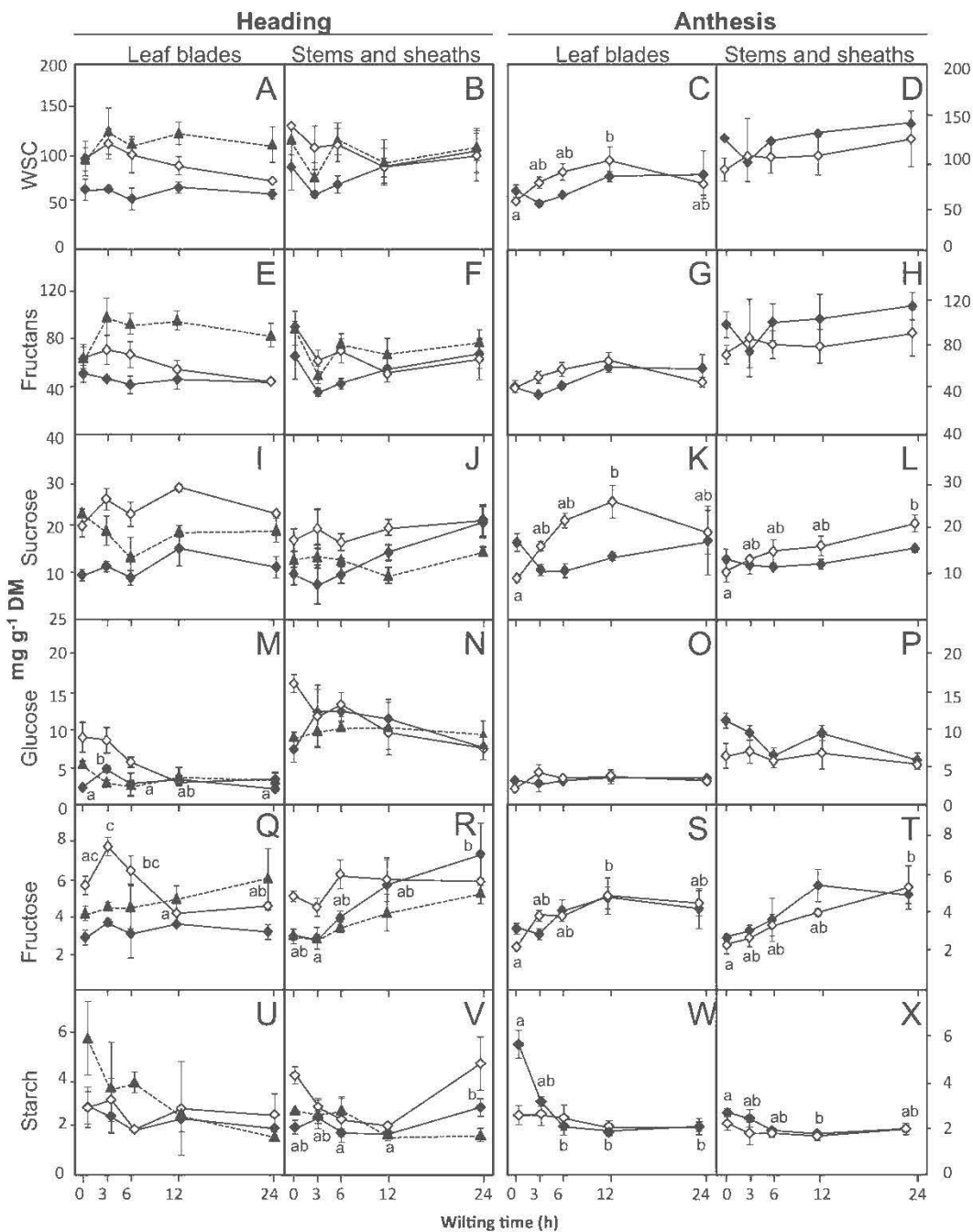


Figure V.2.3: Changes in WSC (sum of fructans, sucrose, glucose and fructose; A-B-C-D), fructans (E-F-G-H), sucrose (I-J-K-L), glucose (M-N-O-P), fructose (Q-R-S-T) and starch (U-Y-W-X) levels (mg g⁻¹ DM) in leaf blades and stems of timothy during wilting. Tissues were excised from 5 cm above the crown at heading or anthesis and stored in light at 20°C (white diamond, solid line), in darkness at 20°C (black diamond, solid line), or in darkness at 15°C (black triangle, dotted line) before being separated for further analysis. Values are means of three biological replicates. Bars represent standard errors (SE) when larger than symbol size. Different superscript letters indicate difference between wilting time within storage condition with $P \leq 0.05$ (Tukey's test).

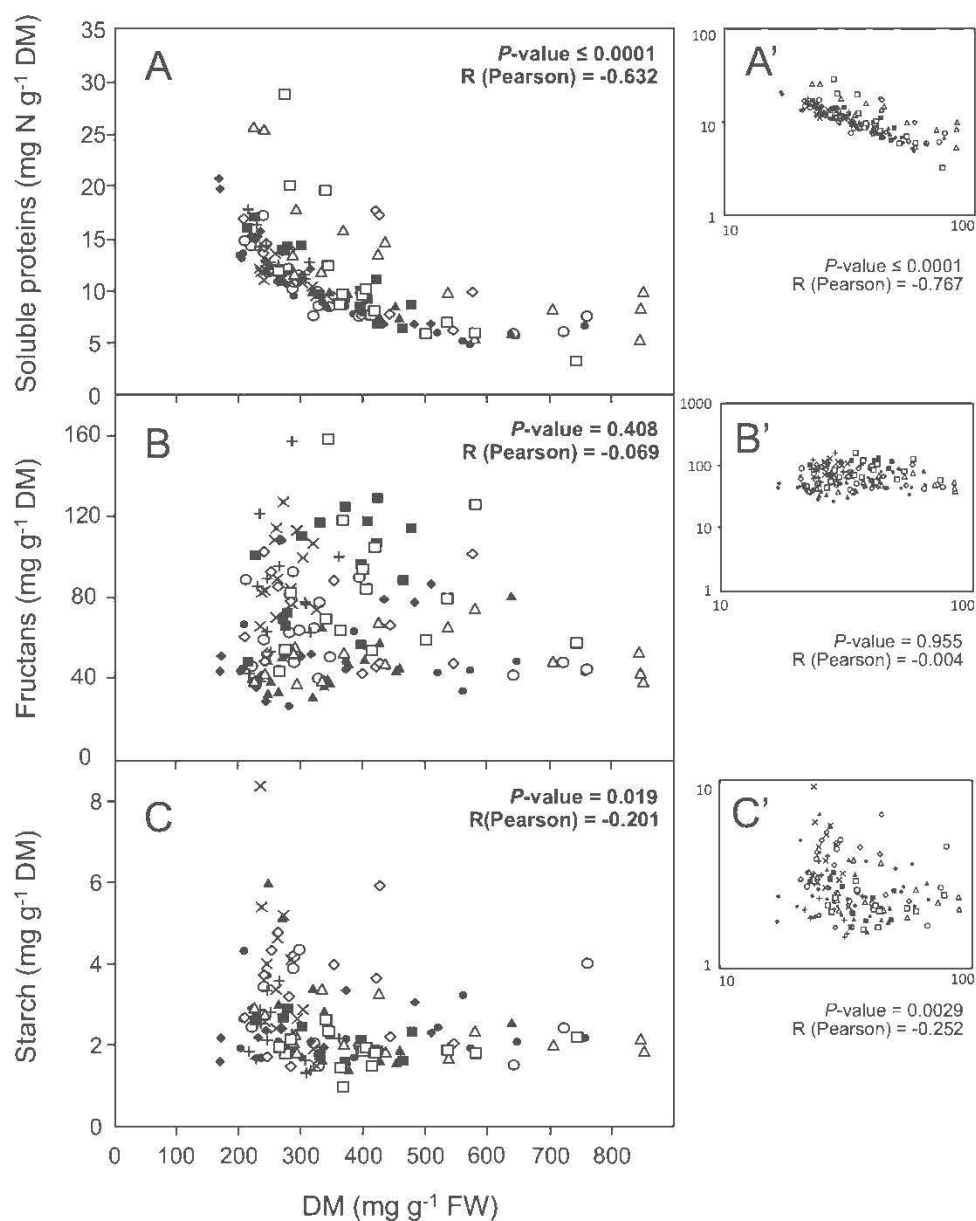


Figure V.2.4: Soluble proteins (A), fructans (B) and starch (C) concentration (mg g⁻¹ DM) in leaf blades and stems (sheaths included) of timothy expressed as a function of DM (mg g⁻¹ FW); and the same data presented with logarithmic scales (A', B', C'). Heading light 20°C leaf blades (○) and stems (◇), Heading darkness 20°C leaf blades (●) and stems (◆), Heading darkness 15°C leaf blades (x) and stems (+), Anthesis light 20°C leaf blades (Δ) and stems (□), Anthesis darkness 20°C leaf blades (▲) and stems (■). Corresponding correlation data (Pearson's R and P-value) are given for raw data and logarithmic transformed data (n=150).

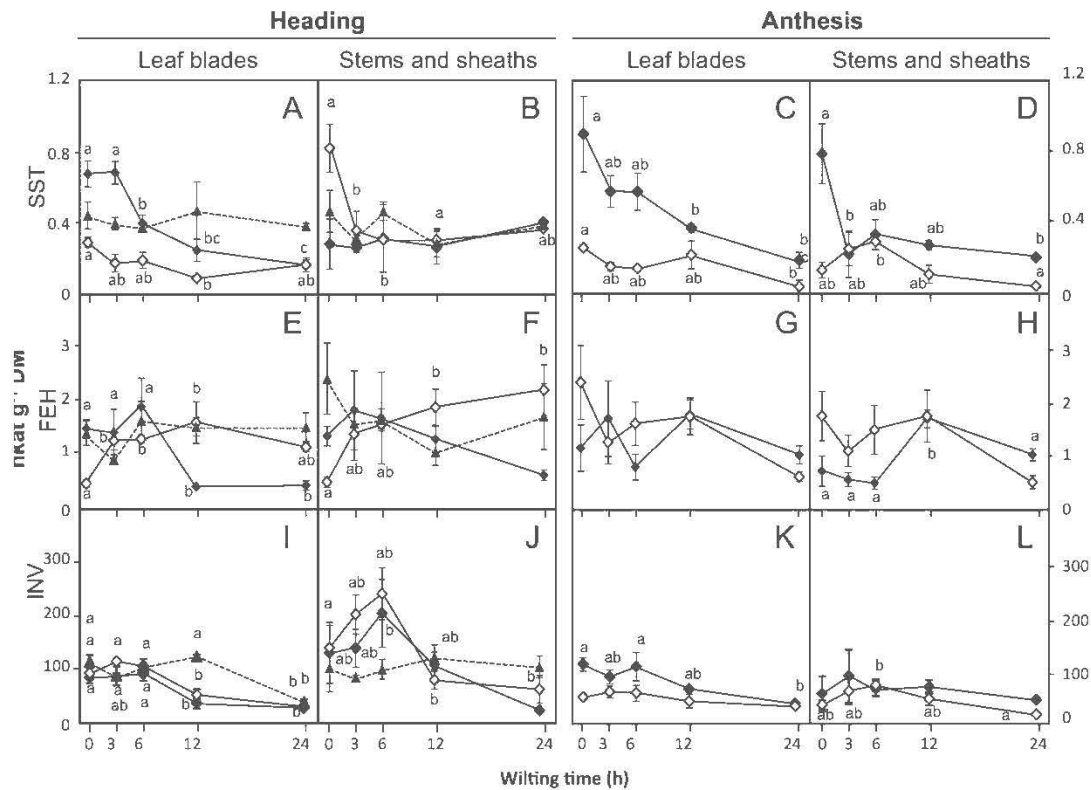


Figure V.2.5: Changes in sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST) (A-D), fructan-exohydrolase (FEH) (E-H) and soluble acid invertase (INV) (I-L) activities (nkat g⁻¹ DM) in leaf blades and stems (sheaths included) of timothy during wilting. Tissues were excised from 5 cm above the crown at heading or anthesis and stored in light at 20°C (white diamond, solid line), in darkness at 20°C (black diamond, solid line), or in darkness at 15°C (black triangle, dotted line) before being separated for further analysis. Values are means of three biological replicates. Bars represent standard errors (SE) when larger than symbol size. Different superscript letters indicate difference between wilting time within storage condition with $P \leq 0.05$ (Tukey's test).

Préambule à l'article 3

Pour l'agriculteur, la production de foin et d'ensilage sont les seules options permettant de conserver le fourrage sur de longues périodes de temps. Selon le type d'entreposage utilisé, un fanage plus ou moins important est nécessaire.

Nos résultats montrent que les pertes en eau augmentent pendant les 24 premières heures de fanaison et plus rapidement dans les limbes foliaires que dans les tiges quelles que soient les conditions de température ou de lumière utilisées. Le séchage est également plus rapide à la lumière qu'à l'obscurité. Le fanage à l'obscurité à 15°C diminue deux fois moins les pertes d'eau qu'à 20°C. Cependant, les variations observées pour la matière sèche ne sont pas toujours accompagnées par une différence dans l'évolution des concentrations en sucres non structuraux. L'évolution des teneurs en matière sèche et des concentrations en sucres soluble varie selon l'exposition à la lumière ou à l'obscurité des tissus. Les concentrations en amidon sont plus affectées que celles des fructanes. Après la coupe et pendant les 24 premières heures de fanage, les fructanes ne sont effectivement pas dégradés. Leur concentration demeure stable malgré le maintien de l'activité FEH. Étonnamment, l'activité SST et l'activité invertase acide soluble augmentent de manière transitoire pendant les premières heures après la récolte indiquant que le métabolisme des glucides reste actif pendant cette période. En outre et tel qu'observé par d'autres auteurs, la protéolyse est importante et peut s'accompagner d'une augmentation des concentrations en acides aminés.

Le maintien de l'activité FEH après coupe, notamment en condition d'illumination, suggère que l'activité d'hydrolyse pourrait se maintenir pendant plusieurs heures après la fauche. Merry et ses collaborateurs (1995) ont montré que la dégradation des fructanes chez le ray-grass, stérilisé puis mis en ensilage, ne pouvait être due à l'activité des bactéries épiphytes sur la plante. L'identification de gènes

codant des FEHs impliquées dans la dégradation des fructanes dans les parties aériennes contribuera à une meilleure connaissance de la régulation du métabolisme des fructanes après la coupe, pendant le fanage avant la mise en silo. Le chapitre suivant porte ainsi sur l'identification et la caractérisation de nouvelles FEHs chez la fléole des prés.

V.3. CLONING AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF TWO NOVEL FRUCTAN EXOHYDROLASES (1&6-FEH, FEH-INV) WITH INHERENT INVERTASE ACTIVITY IN TIMOTHY (*PHLEUM PRATENSE* L).

Marouf Ould-Ahmed^{1,2,3}, Annette Morvan-Bertrand^{1,2}, Midori Yoshida⁴, Carole Lafrenière³, Pascal Drouin³, Marie-Pascale Prud'homme^{1,2}

¹Université de Caen Basse-Normandie, UMR 950 EVA (ou Ecophysiologie Végétale & Agronomie, nutritions NCS), F-14032 Caen, France

²INRA, UMR 950 EVA, F-14032 Caen, France

³Unité de recherche et de développement en agroalimentaire, Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, 445 Boulevard de l'Université, Rouyn-Noranda, Québec, Canada J9X 5E4

⁴National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Hitsujigaoka, Sapporo, 062-8555, Japan

Abstract

Fructans are $\beta(2-1)$ and $\beta(2-6)$ linked soluble polymers of fructose synthesized from sucrose. They represent short- and long-term carbohydrate reserves and are associated with abiotic and biotic stress tolerance in graminean species. They are mobilized via fructan exohydrolases (FEHs). We report here the cloning and functional analysis of two novel and unique FEHs from timothy. Timothy is a forage plant tolerant to cold temperatures, either grazed or conserved as silage. A major factor in the success of ensilage is the ability to breakdown fructans. By building and screening a timothy cDNA library, two cDNAs, named *Pp1&6-FEH1* and *PpFEH-INV1* were cloned. The *Pp1&6-FEH1* and *PpFEH-INV1* deduced proteins have low iso-electric points (6.1 and 4.8, respectively) and group together with plant FEHs and cell wall invertases. Functional characterization of the recombinant proteins in *Pichia pastoris* showed that *Pp1&6-FEH1* had a clear FEH activity preference towards 1-kestotriose but a significant activity towards levan while *PpFEH-INV1* had the capacity to degrade both $\beta(2-1)$ and $\beta(2-6)$ linkages. Unlike all FEHs described so far, *PpFEH-INV1* had also a high invertase activity, convincingly demonstrating that the enzyme is a β -fructosidase rather than a strict FEH. Highest expression of *Pp1&6-FEH* and *PpFEH-INV1* occurred concomitantly to the highest sucrose decline and to water deficit in wilting tissues. *Pp1&6-FEH1* is expected to play a crucial role in reserve

mobilization together with Pp6-FEH1 (Tamura *et al.*, 2011) whereas PpFEH-INV1 would rather be involved in biotic and abiotic stress resistance and/or represent a facilitating enzyme that promotes plant-endophyte interactions.

Keywords: timothy, grass forage, FEH, invertase, wilting, fructan, enzyme activity.

Abbreviation: INV, invertase; SST, sucrose :sucrose fructosyltransferase; FEH, fructan exohydrolase; FT, fructosyltransferase.

V.3.1. Introduction

Compared to starch and sucrose, fructans, which are fructose-based oligomers and polymers with generally one glucose residue, are less familiar carbohydrates, occurring in 15% of flowering species that mainly belong to the Asteraceae, Campanulaceae, Boraginaceae (dicots), Poaceae and Lilaceae (monocots) (Hendry, 1993). The structure of fructans is species-specific, varying in glycosidic linkages, occurrence of branching and molecular size range (Bonnett *et al.*, 1997). Levan-type fructans with $\beta(2-6)$ linkages, neo-type fructans with either $\beta(2-1)$ (neo-inulin type) or $\beta(2-6)$ (neo-levan type) linkages and graminan-type fructans with mixed linkages predominate in monocot families (Vijn and Smeekens, 1999) while dicot species were believed until recently (Van den Ende *et al.*, 2011) to exclusively store inulin-type fructans consisting of linear $\beta(2-1)$ -linked fructofuranosyl units.

In addition to having a role as reserve carbohydrates, fructans are related to plant abiotic stress tolerance, in particular to frost (Livingston and Henson, 1998; Yoshida *et al.*, 1998; Del Viso *et al.*, 2009a; Dionne *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2009) and drought (Spollen and Nelson, 1994; Volaire and Lelievre, 1997; De Roover *et al.*, 2000; Amiard *et al.*, 2003a; Clark *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2011). Studies on transgenic plants expressing fructan biosynthetic genes (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Konstantinova *et al.*, 2002; Hisano *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Kawakami *et al.*, 2008; Del Viso *et al.*, 2011) suggest that the enhanced tolerance of these plants is associated with the presence of fructans. The mechanisms proposed for fructan involvement in this tolerance include vitrification of the medium, membrane stabilization by direct interaction of fructans with membrane lipids (Vereyken *et al.*, 2001; Hinch *et al.*, 2000, 2002, 2007), reactive oxygen scavenging or stimulation of antioxidative defense mechanisms (Van den Ende and Valluru, 2009; Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2012; Stoyanova *et al.*, 2010). Over the past decade, fructans have gained importance as healthy food ingredients (Ritsema and Smeekens, 2003a). They

represent excellent prebiotics, selectively promoting beneficial colon bacteria like *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* (Roberfroid *et al.*, 1998, 2010; Sonnenburg *et al.*, 2010).

Fructans are water soluble carbohydrates synthesized from sucrose by the action of different fructosyltransferases (FTs) and degraded by several more or less specific fructan exohydrolases (FEHs). All plant enzymes involved in fructan synthesis and breakdown belong to the glycoside hydrolase family 32 (GH32; <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>). They transfer fructose from a donor to an acceptor substrate and each enzyme has generally a preferred or a unique substrate for donor (fructan, sucrose) and acceptor (fructan, sucrose or water). All are glycoproteins highly homologous to invertases. Based on analysis of the phylogenetic relationships of amino acid sequences and on structure-function studies, it is proposed that fructan synthesizing enzymes are derived from vacuolar invertase ancestors (Sprenger *et al.*, 1995; Ritsema *et al.*, 2006; Schroeven *et al.*, 2008) and that fructan degrading enzymes have evolved from cell wall invertase ancestors (Van den Ende *et al.*, 2000; Le Roy *et al.*, 2007a; Le Roy *et al.*, 2008) by a few mutational changes. Fructans are believed to be mainly stored in the vacuole (Wagner *et al.*, 1983; Wiemken *et al.*, 1986; Darwen and John, 1989) but this is probably not their exclusive localization since they have also been reported in phloem sap (Wang and Nobel, 1998) and apoplast (Livingston and Henson, 1998; Van den Ende *et al.*, 2005).

Unlike in bacteria or fungi, where both exo- and endo-type fructan hydrolases occur (Banguela and Hernandez, 2006) plants apparently only contain FEHs releasing terminal fructose units. Several types of FEH activity can be distinguished depending mainly on the linkage but also on the fructan on which they act. In wheat, which predominantly accumulates graminan type fructans composed of a mixture of $\beta(2-1)$ - and $\beta(2-6)$ -linked compounds, 6-FEH (Van Riet *et al.*, 2006), 1-FEH (1-FEH w1 and w2, Van den Ende *et al.*, 2003a; 1-FEH w3, Van Riet *et al.*, 2008), 6&1-FEH (6&1-FEH w1 and w2, Kawakami *et al.*, 2005), and 6-KEH (6-KEH w1 and w2, Van den

Ende *et al.*, 2005) have been identified. They hydrolyze $\beta(2,1)$, $\beta(2,6)$, both fructosyl linkages and 6-kestotriose, respectively. In contrast to microbial exo-hydrolases that can degrade sucrose and fructans (termed therefore β -fructosidases), all plant FEHs purified to date are unable to degrade significant amounts of sucrose.

In fructan accumulating plants, FEHs are associated with a diverse set of physiological functions such as hydrolyzing fructan reserves when energy and carbon skeleton are needed (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001; Van den Ende *et al.*, 2001; Asega and Carvahlo, 2004), increasing osmotic potential that drives the flower expansion (Bieleski, 1993; Vergauwen *et al.*, 2000; Le Roy *et al.*, 2007b) or cell elongation (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001), increasing oligofructan concentration under stress (Van den Ende and Van Laere, 1996; Yang *et al.*, 2004) contributing to frost or drought tolerance (Livingston *et al.*, 2009, and refs therein). In perennial grasses, FEHs are implicated in the fast mobilization of fructans immediately after defoliation (Yamamoto and Mino, 1985; Morvan-Bertrand *et al.*, 2001; Tamura *et al.*, 2011) in order to deliver carbon to the leaf growing cells (Amiard *et al.*, 2003b). FEHs could also play a role in the trimming of fructans during synthesis, controlling the length of the $\beta(2-1)$ fructosyl chains (Bancal *et al.*, 1992; Van den Ende *et al.*, 2003b; Lothier *et al.*, 2007). In non-fructan accumulating plants, 6-FEHs have been characterized from *Arabidopsis thaliana* (De Coninck *et al.*, 2005) and sugar beet (*Beta vulgaris* L.) (Van den Ende *et al.*, 2003b) for which a role in pathogen defense and plant signalling have been proposed (Van den Ende *et al.*, 2004).

Timothy (*Phleum pratense* L.) is a major forage grass, either grazed or conserved as silage, in temperate areas that have severe winters. It predominantly accumulates simple $\beta(2-6)$ -linked fructans, levans, with high degrees of polymerization (DPs, up to 90) (Suzuki, 1968; Cairns *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2009). Fructans represent the main storage carbon compounds in leaves, stems and haplocorms. They also provide an important source of fermentable substrate during ensiling (Merry *et al.*, 1995; Winters *et al.*, 1998) and for grazing animals improving

their milk and meat productivity (Miller *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Preservation of forage crops by ensilage relies on the rapid fermentation of glucose and fructose by lactic acid bacteria naturally found on the herbage (Mc Donald *et al.*, 1991). The role of fructans in silage preservation is therefore subjected to their breakdown into their constituent fructose and glucose molecules by either plant or microbial fructan and sucrose degrading enzymes. However, very few epiphytic lactic acid bacteria strains isolated from temperate grasses possess fructan hydrolase activity (Müller and Lier, 1994; Winters *et al.*, 1998), highlighting the potential for fructan degrading strains as silage inoculants (Merry *et al.*, 1995; Winters *et al.*, 1998) or for plant FEHs in order to improve the silage fermentation process. Recently, a 6-FEH cDNA has been identified in timothy (Tamura *et al.*, 2011). The enzyme has a preference for $\beta(2-6)$ -linked fructans with high DP and has been reported to play a major role in the degradation of fructans stored in stubble or haplocorms for regrowth after defoliation. However, since 1-kestotriose also accumulates in significant amount in timothy (Cairns *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2009) complete breakdown of fructan chains required the combined action of $\beta(2-1)$ and $\beta(2-6)$ hydrolyzing activities. In this context, it is of interest to characterize the full set of FEHs in this economically important species, in order to assess their corresponding and specific functions.

This paper describes the cloning and functional analysis of two novel and unique FEHs from timothy with both $\beta(2-1)$ and $\beta(2-6)$ hydrolyzing activities and with inherent invertase activity. To the best of our knowledge, this is the first report of plant FEHs able to degrade significant amount of sucrose.

V.3.2. Materials and methods

Plant materials

Timothy (*Phleum pratense* L. cv. Alliance) plants were grown under hydroponic conditions for nine weeks in a greenhouse with a photoperiod of 16 h of

natural light supplemented by a photosynthetic photon flux density of 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Phytotubes, Claude, GTE, Puteaux, France). The average photosynthetic active radiation intensity was 270 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ during the growing period. The thermoperiod was 20°C (day) and 15°C (night). The nutrient solutions contained 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.50 mM MgSO_4 , 1.25 mM KCl , 0.2 mM EDTA-2[NaFe] , 14 μM H_3BO_3 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM MnSO_4 , 0.7 μM Na_2Mo_4 , 3 μM ZnSO_4 and 0.1 μM CoCl_2 , with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and 3.75 mM NH_4NO_3 . Each 30 L plastic box contained 30 plants per 100 cm^2 and once weekly, they received 27 L of fresh nutrient solution.

Plant tissues were harvested at 5 cm above the crown for each stage of development which was determined accordingly to the scale of Zadoks and Board (1974) modified by Simon and Park (1983): vegetative stage (23-29 days after sowing), stem elongation (35-39), heading (51-59) and anthesis (61-69). Harvested plants were divided in 15 sets (three biological replicates for each of the five sampling times) and placed on Whatman paper in a growth chamber at 15°C or 20°C, under a PAR intensity of 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ or in the dark, with 80% relative humidity (Ould Ahmed *et al.*, article 2, chapter V.2). Tissues were sampled after 0, 6, 12 and 24 hours of wilting. Stems (surrounded by leaf sheaths) and leaf blades were divided, weighed, frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C, freeze-dried and ground for further analysis.

Cloning of FEH cDNAs

Stems and leaves of timothy plants (harvestable tissue for forage, composed by leaf sheaths, leaf blades and stems) harvested 10 cm above the ground level was ground in liquid nitrogen. Powder obtained was used to purify poly (A+) RNA with Dynabeads oligo (dT)25 kit (Dynal, France) following manufacturer's recommendation. Double stranded cDNA was synthesized from poly (A+) RNA and

a cDNA library was constructed using a Lambda-Zap cDNA library kit and the Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene, France).

The cDNA library was screened with an heterologous probe (691 pb) obtained by RT-PCR product using the primers Lp6FEH1forward 5'-TGC CTA CCA CTC CCA GTC T-3' and Lp6FEH1reverse 5'-ACT TGT CAG AAT AAT CCA CAC-3' from Lp6-FEHa (EU219846) on *Lolium perenne* mRNA and two homologous probes containing the conserved motif of FEH in GH32 family VECPD and the KLEAWE region (989 and 1007 pb). Timothy specific probes were obtained by primers pair (probes1: 5'-GGA GTG CCT GGA TTT CTT C-3' and 5'-CAT GCT CCA TGC CCT TAG C-3'; probes2: 5'-GTC GAG TGC CCG GAC CTG TT-3' and 5'-AGC TCC CAC GCC TCC AGC T-3') from Pp6FEH1 (AB583555) Tamura *et al.* (2011). The probes were labeled with [α -³²P] dCTP by using random priming method with NEBlot kit (Biolabs, France). Membranes were hybridized overnight at 42°C and washed twice in 2 SSC, SDS 0.5% (w/v), for 15 min at room temperature, then rinsed two times in the same buffer at 56°C. After three rounds of purification, positives clones were excised and recircularised in a pBluescript vector (Stratagene, USA). The nucleotide sequences of both strands of the inserts were performed by Biofidal (France). Multiple sequence alignments and phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method, using the CLUSTALW program of Mobyle (<http://mobyle.pasteur.fr>) and Drawtree (<http://phylogeny.fr>).

Heterologous expression in Pichia pastoris

The isolated cDNA was expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* (EasySelect Pichia Expression kit, Invitrogen) after cloning into the secretory expression vector pPICZ α B (*Pp1&6-FEH1*) and PICZ α C (*PpFEH-INV1*). The DNA sequence corresponding to the putative mature protein region in pBluescript was amplified in SOLRTM Strain and the amplification product was digested with SmaI and KpnI for both sequences, and ligated respectively into pPICZ α B and pPICZ α C

behind the a-factor signal sequence in Pml1sites (generating a blunt extremities cohesive with Sma1 sites) and KPN1. The *P. pastoris* strain X-33 was transformed by electroporation using 10 µg of PmeI-linearized construct, and transformants were selected on YPDS/Zeocin plates. A 3-ml preculture medium (BMGY, pH 6.0) was inoculated with freshly prepared single colonies and cultured for 2 d at 30°C with vigorous shaking (200 rpm). The cells were collected by centrifugation, resuspended in 20 ml of inoculation medium (BMMY, pH 6.0), and incubated at 30°C with shaking at 200 rpm. Methanol (400 µl) was added to the culture medium every day. After 5 d of induction, the culture was centrifuged and the resulting supernatant medium was recovered and tested for enzyme activity.

Production and functional characterization of the recombinant enzymes

Sodium azide 0.02% (w/v) was added to all buffers to prevent some bacterial growth. Proteins were diluted in 50 mM Na-acetate buffer pH 5.0 and incubated at 30 °C with substrates for different time intervals up to 6 h. 6-Kestotriose was purified from a mixture of 6-kestotriose, 1-kestotriose and 6G-kestotriose in relative proportions of 5:1:1, generous gift from Dr Iizuka (Iizuka *et al.*, 1993). 6-Kestotriose purification was performed by collection after HPLC with refractometric index detector (Waters, Milford MA, USA) and a C18-pyramid HPLC column (Macherey-Nagel) eluted with water at 0.5 mL min⁻¹. Commercial products of 1-kestotriose (TCI Europe, Zwijndrecht, Belgique), 1,1-kestotetraose (Megazyme, Wicklow, Ireland.), inulin (from *Cichorium intybus*; Sigma-Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France) and levan (from *Erwinia herbicola*; Sigma-Aldrich Chemie, Saint-Quentin Fallavier, France) were used. Timothy high-molecular-weight fructans (phlein) were prepared as described by Morvan *et al.* (1997). Briefly, fructans were extracted from stems and leaves of 8-week old plants of timothy. Fructans were extracted first with boiling 80% ethanol (4 mg g⁻¹ FW) for 1 h and then with boiling water (5 mg g⁻¹ FW) for 1 h. Both extracts were combined and the volume was reduced by rotary

evaporation. The resulting concentrated extract was depigmented by an overnight contact with polyvinylpolypyrrolidone followed by centrifugation. Fructans contained in the supernatant were then separated from sucrose, glucose and fructose by passage through a gel filtration column (Sephadex G25). The remaining charged material was removed by passage through cation-exchange and anion-exchange resins (Amberlite IR120 and IRA 416, in the hydrogen and formate forms, respectively). Enzyme amounts and/or incubation times were adjusted to result in the linear production of fructose during the incubation period. For pH optimal determination, 0.5 M sodium citrate buffer (pH 3.4, 4.0, 4.6, 5.2) and 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 5.8, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0) were used.

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

RNA isolation and real-time qPCR analysis

RNA was isolated from leaf tissues using the RNeasy plant mini kit (Qiagen, France) coupled to a DNase treatment (Qiagen, France). RNA was quantified using a RNA BioPhotometer (Eppendorf, Germany) and visualized after electrophoresis on agarose gels 1.5% (w/v). One µg aliquot was used to generate cDNA with the i-script cDNA synthesis kit (Biorad, France). The cDNA was diluted 1:100 with water and 4 µl was used as a template for real time qPCR analysis. The gene-specific primers used were the 6-SFT primers previously described by Tamura *et al.* (2009) and three gene-specific primers for timothy FEHs obtained by the cDNA library. For Pp1&6-FEH1 (forward 5'-ACG CGT CCA AGT CAT TCT TC-3' and reverse 5'-GCT TCT TCC TCA GCG TCT TG-3'), and PpFEH-INV1 (forward 5'-ATG GCC AGT TGA AGA GGT TG-3' and reverse 5'-TCA AAA GGC TCG GCG GCG-3'). As a marker for constitutive expression GAPDH specific sequence was amplified with GAPDHs

(5'-CAT CAC CAT TGT CTC CAA CG-3') and GAPDHs (5'-AAC CTT CAA CGA TGC CAA AC-3') primers and factor alpha 4 (eIF4A-2) specific primers (forward: 5'-GTG GAC TGG CTC ACT GAC AA-3' and reverse: 5'-TCA ATA CCA CGA GCA AGC AG-3'). PCR reactions were performed in a total volume of 15 µl, 500 nM for each primers and 10 µl of iQ SYBR Green supermix (BIO-RAD, France) on a Chromo 4 System (BIO-RAD, France). The qPCR programme included a preliminary step of 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 40 s. All the qPCR results were confirmed by three independent reactions from RNA of the same bulk of plants. Expression levels produced by qPCR were expressed as a ratio relative to the control point, which was set to 1. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the dissociation curves after qPCR reactions using the Chromo 4 System and by sequencing the qPCR product that confirms that the correct amplicons was produced from each pair of primers.

V.3.3. Results

Cloning of candidate FEH cDNAs from timothy

A cDNA library derived from harvestable tissues of timothy (leaf sheaths, leaf blades and stems) was built and screened with an heterologous probe corresponding to a partial cDNA coding a 6-FEH in *L. perenne* (EU219846) and with homologous probes representing partial cDNAs of Pp6-FEH1 (Tamura *et al.*, 2011). This screening strategy identified four full-length cDNAs with similarity to FEH cDNAs. Two of these clones were further analyzed and designated *Pp1&6-FEH1* and *PpFEH-INV1* (see below). *Pp1&6-FEH1* and *PpFEH-INV1* had 1899 and 2151 bases which included an open reading frame (ORF) of 1704 and 1746 bases, respectively. They were deduced to encode 568 and 582 amino acids, containing the three conserved amino acid motifs (NDPNG, RDP, EC) that are suggested to be essential for the β -fructosidase activity (Verhaest *et al.*, 2005) (Figure V.3.1). As reported for most FTs

and FEHs in plants, the ORFs start with a signal sequence that probably guides the proteins into the secretory pathway. Based on sequence comparison with other Poacea FEHs and FTs and to signal peptide prediction Softwares (SignalP 4.0), the mature protein is predicted to start at amino acid residue 26 for Pp1&6-FEH1 and at amino acid residue 20 for PpFEH-INV1 (Figure V.3.1). Consequently, the predicted molecular weight of the mature proteins will be 62.4 and 65.0 kDa, respectively, without considering the probable glycosylations (Table V.3.1). Indeed, the amino acid sequence contains 5 (Pp1&6-FEH1) or 7 (PpFEH-INV1) N-glycosylation (N-X-S/T) sites. The putative mature proteins were predicted to have a pI of 6.1 for Pp1&6-FEH1 and a pI of 4.8 for PpFEH-INV1. The amino acid corresponding to aspartic acid 239 in *Arabidopsis* cwINV1, which is important for binding and hydrolysis of sucrose (Le Roy *et al.*, 2007a), was substituted by valine (260 from the first methionine) in Pp1&6-FEH1 but was present (273 from the first methionine) in PpFEH-INV1. An isoleucine (125) in Pp1&6-FEH1 and a glycine (138) in PpFEH-INV1 were located at the position corresponding to the serine 101 in *Cichorium intybus* 1-FEH IIa that is related to strong inhibitory binding of sucrose (Verhaest *et al.*, 2007; Le Roy *et al.*, 2008).

A phylogenetic comparison of the amino sequences of cell wall invertases and FEHs from a range of species is presented in Figure V.3.2. As already outlined (Van den Ende *et al.*, 2003a), distinct groups can be discerned. The first group (I) contains monocotyledonous basic and neutral cell-wall invertases. The second group (II) contains dicotyledonous basic cell wall invertases. The third group (III) contains dicotyledonous basic cell wall invertases and the two 6-FEHs identified in non-fructan plants previously annotated cell wall invertases (Van den Ende *et al.*, 2003b; De Coninck *et al.*, 2005). The fourth group (IV) contains dicotyledonous FEHs. The fifth group (V) contains monocotyledonous FEHs and acid enzymes termed cell wall invertases until further characterization. Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 belong to group V. Pp1&6-FEH1 is a member of a subgroup that includes wheat 6-FEH (Van

Riet *et al.*, 2006) and timothy 6-FEH (Tamura *et al.*, 2011) while PpFEH-INV1 belongs to another subgroup that contains almost exclusively monocotyledonous FEHs. The predicted amino sequence of Pp1&6-FEH1 showed highest identity to Pp6-FEH1 (75%) of timothy (Tamura *et al.*, 2011) and the predicted amino sequence of PpFEH-INV1 presented highest identity (70%) to wheat 6&1-FEHw1 (Kawakami *et al.*, 2005).

Characterization of the Pp1&6-FEH and of the PpFEH-INV recombinant proteins

cDNAs containing the predicted mature protein sequence (Figure V.3.1) were heterologously expressed in *Pichia pastoris*.

The pH optimum of the recombinant Pp1&6-FEH1 was 5.2 and the temperature optimum was 30°C. At 4°C the activity of the recombinant Pp1&6-FEH1 was 4% of the optimum (data not shown). For the recombinant PpFEH-INV1, the pH optimum was between 5.8 and 6.5 and the temperature optimum was 25°C. At 4°C the activity of the recombinant PpFEH-INV1 was 20% of the optimum (data not shown).

In order to characterize the enzymatic properties of the recombinant proteins, substrate specificities were investigated using several types of fructans (Table V.3.2). Phlein, extracted from timothy, was mainly composed of levan-type fructans together with small amounts of 1-kestotriose. Levan from *Erwinia herbicola* corresponds to pure levan-type fructans with linearly $\beta(2-6)$ -linked fructofuranosyl units with a small amounts of $\beta(2-1)$ branches (about once per 20 residues, Blake *et al.*, 1982).

Of the fructan tested, Pp1&6-FEH1 most efficiently hydrolyzed 1-kestotriose with a relative activity three times higher than for 1,1-kestotetraose and five times greater than for bacterial levan or phlein from timothy. The activity against levan and phlein must be mainly due to hydrolysis of $\beta(2-6)$ rather than $\beta(2-1)$ linkages that are present in very low amounts in these substrates (Blake *et al.*, 1982). None or very low activities could be detected towards inulin or 6-kestotriose. Hydrolase activity for

sucrose was low but non-negligible, being close to the one for phlein. The recombinant protein has thus a clear preference for the low DP $\beta(2-1)$ -linked fructans. As it can also act in a significant way on high DP $\beta(2-6)$ -linked fructans, it was further designated as Pp1&6-FEH1.

PpFEH-INV1 most efficiently hydrolyzed phlein, but with a relative activity which was only two times higher than for levan, 6-kestotriose or 1,1-kestotetraose and three times greater than for 1-kestotriose. PpFEH-INV1 less efficiently hydrolyzed inulin. Its relative hydrolyzing activity towards sucrose was remarkably high since it was only 1.2 times lower than for phlein and higher than for the other fructans tested. Because of the low specificity of the enzyme for the tested substrates and because of its high activity towards sucrose, the corresponding protein was named PpFEH-INV1.

Analysis of Pp1&6-FEH and of PpFEH-INV transcripts in tissues of timothy at different growth stages and submitted to wilting

The expression of the mRNA that codes for Pp1&6-FEH1 and for PpFEH-INV1 was measured using real-time PCR in tissues of timothy plants harvested at early stem elongating stage (Figure V.3.3). Expression of Pp1&6-FEH1 is maximal in stems. Transcripts are also found in leaf blades, leaf sheaths and haplocorms. Minor expression occurred in elongating leaf bases. Roots gave no signal. Expression of PpFEH-INV1 was detected in all tissues tested. It was maximal in stems, leaf sheaths and haplocorms. Minor expression was found in roots.

Expression pattern of Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 was also followed during wilting of leaf blades and stems surrounded by leaf sheaths, collected from plants at heading or anthesis stages (Figure V.3.4). Plants were cut at 5 cm above the crown and allowed to wilt under different controlled conditions (light or darkness, at 15°C or 20°C) before being dissected into leaves and stems, as described by Ould Ahmed *et al.* (article 2; chapitre V.2). FEH activity reported on Figure V.3.4

comprises total FEH activity which is a mixture of the different isoforms present in timothy, including Pp6-FEH1, Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1. Most generally, transcripts of Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 did not vary significantly (Figure V.3.4 B, G, H, I) or decreased more or less rapidly after the onset of wilting (Figure V.3.4 A, B, G, H), depending on tissues, maturity and wilting environmental conditions. Unexpectedly, they increased transiently when excised plants harvested at heading stage were allowed to wilt in darkness (Figure V.3.4 C, D, E, F). The effect was higher at 15°C than at 20°C. Indeed, PpFEH-INV1 transcript level increased 5- to 7-fold at 15°C (Figure V.3.4 E, F) and only 2- to 3.5-fold at 20°C (Figure V.3.4 C, D). Increase occurred first in stems and second in leaf blades in contrast to Pp1&6-FEH1 transcript level that increased concomitantly in both tissues (Figure V.3.4 E, F).

V.3.4. Discussion

Generally, Poacea species synthesize a complex mixture of $\beta(2,1)$ and $\beta(2,6)$ linked fructans with high proportion of $\beta(2,6)$ linked fructans (Chatterton *et al.*, 1990; Cairns and Ashton, 1993). In *Phleum pratense*, levan-type fructans predominate together with significant amounts of 1-kestotriose (Cairns *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2009). Consequently, in this species as in other Poacea, different FEH types are needed to efficiently degrade such mixture. A 6-FEH has been recently characterized (Tamura *et al.*, 2011) and in this study, we present the cloning of two novel FEHs, 1&6-FEH and FEH-INV.

Molecular and phylogenetic analysis of Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1

Both deduced protein sequences contain the three conserved motifs ND_{45,60}PNG, FRD_{171,185}P and MW/VE_{226,239}CPD of Glycosylase Hydrolase Family 32. Asp_{45,60} probably acts as nucleophile, Glc_{226,239} as proton donor and Asp_{171,185}

as transition-state stabilizer (Lammens *et al.*, 2009). The fifth residue in the catalytic cysteine motif (MW/VECPD) is a proline (P) that is specific to almost all cell wall invertases (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998; Goetz and Roitsch, 1999) and FEHs (Van den Ende *et al.*, 2001). Accordingly, phylogenetic analysis of amino acid sequences indicated that Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 showed a closer evolutionary relationship to cell wall invertases than to vacuolar invertases. Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 showed highest similarity to timothy Pp6-FEH1 and wheat 6&1-FEH w1, respectively, and were classified with other Poacea FEHs and cell wall invertases. Absence of D/R or D/K couple in Pp1&6-FEH1 and presence of deletions in this area in PpFEH-INV1 strongly suggest that both enzymes are FEHs and not invertases (Lasseur *et al.*, 2009).

Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 have unique substrate specificities

Plant and microbial FEHs belong to family 32 of glycosyl hydrolases. Depending on the linkage type that is hydrolyzed, 1-FEH or inulinase ($\beta(2-1)$ linkages), 6-FEH or levanase ($\beta(2-6)$ linkages) and 6&1-FEH ($\beta(2-6)$ and $\beta(2-1)$ linkages with a preference for $\beta(2-6)$ linkages) can be distinguished. The recombinant Pp1&6-FEH1 showed a higher specific activity for $\beta(2-1)$ -linked fructans than for $\beta(2,6)$ -linked ones. As its activity against levan and phlein was only 5-fold less than for 1-kestotriose, the preferred substrate, the enzyme was termed 1&6-FEH, and not 1-KEH or 6&1-FEH. Therefore, besides 6&1-FEH already described in wheat (Kawakami *et al.*, 2005) and in *Arabidopsis* (De Coninck *et al.*, 2005), 1&6-FEH also occurred. Almost no activity could be detected towards high DP inulin or towards low DP levan (6-kestotriose). It can be concluded that this enzyme has unique properties among all GH32 members so far characterized. The enzyme is able to degrade both $\beta(2-1)$ and $\beta(2-6)$ linkages but prefers $\beta(2-1)$ linkages and the enzyme has a clear preference for 1-kestotriose. The preference of Pp1&6-FEH1 for 1-kestotriose and for high DP $\beta(2-6)$ -linked fructans as substrates are consistent with

the fact that timothy mainly accumulates $\beta(2-6)$ -linked fructans together with 1-kestotriose (Cairns *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2009).

Remarkable difference in substrate specificity has already been reported for $\beta(2-6)$ -linked fructans by wheat 6-KEHs and 6&1-FEH (Van den Ende *et al.*, 2005; Kawakami *et al.*, 2005) which have a preference for certain small oligomers as substrate, 6-kestotriose and bifurcose, respectively while timothy 6-FEH has a clear preference for high DP levan (Tamura *et al.*, 2011). The motifs or amino acids responsible for the DP preference of 6-FEHs are not elucidated yet. In 1-FEH, it has been reported that the presence or absence of a glycosyl chain in the cleft between the N- and C- terminal domains is important for the binding of high-DP inulins. Introduction of a glycosyl chain into *Cichorium intybus* 1-FEH IIa prevents inulin binding and degradation (Le Roy *et al.*, 2007c). Interestingly, the three FEHs characterized so far in timothy have a glycosylation site in the cleft region (Figure V.3.1, 321-323 from the first methionine in Pp1&6-FEH1) and no or low activity towards high-DP inulins.

Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 encode FEH with invertase activity

In contrast with microbial FEHs that can degrade fructans and sucrose as well, almost all plant FEHs characterized up to now seem to be unifunctional enzymes, only degrading fructans but not sucrose (De Coninck *et al.*, 2007). However, the occurrence of non-negligible invertase activity was recently demonstrated for the Pp6-FEH1 in timothy, representing 2 to 15% of that against levan at 10 and 100 mM sucrose, respectively (Tamura *et al.*, 2011). Interestingly, the recombinant Pp1&6-FEH1 also displayed invertase activity which was even higher than that of Pp6-FEH1 since it represented 16% of the activity against 1-kestotriose when sucrose was provided at only 4 mM. Moreover, we report here for the first time that a FEH, termed PpFEH-INV1, was capable of efficiently splitting sucrose at a lower rate than its preferred substrate (phlein) but at a higher rate than inulin-type fructans and 6-

kestotriose. Clearly, this enzyme should be classified with the unspecific β -fructofuranosidases, together with the microbial FEHs that show activity against both fructans and sucrose and probably also with the plant vacuolar invertases that have important intrinsic FEH activities (Johnson *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2007). The occurrence of such unspecific β -fructofuranosidases in plants have been suggested by Simpson and Bonnett (1993) but never proven until the characterization of this FEH-INV in timothy.

Amongst plant FEHs identified so far, many, but not all, are inhibited by sucrose, either strongly or weakly (Van den Ende *et al.*, 2009). Site directed mutagenesis in cell wall invertase (AtcwINV1) and FEH (Ci1-FEH IIa), protein crystallization and use of inhibitors nicely demonstrated that sucrose can bind in the inhibitor or substrate configuration, depending on specific amino acids present in the vicinity of the active site (Verhaest *et al.*, 2007). The binding of sucrose in the inhibitory configuration in chicory 1-FEH IIa is determined by the specific orientation of a single amino acid Trp82 of the highly conserved WSGSAT motif, being itself influenced by Ser101. Replacement of Trp82 or Ser101 by a leucine resulted in the loss of sucrose inhibition (Verhaest *et al.*, 2007) and by the gain of invertase activity (Le Roy *et al.*, 2008) although in a rather inefficient way. The authors proposed a relationship between sucrose inhibition and amino acid composition. FEHs with a small amino acid, such as glycine or serine, at the site corresponding to Ser101 (in Ci1-FEH IIa) were strongly inhibited by sucrose, whereas those with a hydrophobic amino acid, such as valine, leucine or isoleucine as in Pp6-FEH1 (Tamura *et al.*, 2011) were weakly inhibited by sucrose (Verhaest *et al.*, 2007). Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 degrade sucrose more efficiently than Pp6-FEH1. Consequently, it is expected that sucrose binds in substrate configuration rather than in inhibitor configuration. Like Pp6-FEH1, Pp1&6-FEH1 is characterized by the presence of isoleucine at the Ser101 position. However, difference in sucrose degrading capacity between Pp6-FEH1 and Pp1&6-FEH1 should be explained by

other necessary amino acid(s) to stabilize sucrose in the substrate configuration. Asp239 in AtcwINV1 has been identified as a critical amino acid for binding and stabilizing sucrose (Le Roy *et al.*, 2007a; Van den Ende *et al.*, 2009). In all known FEHs, however, including the three FEHs of timothy, such an acidic residue is absent (Pp6-FEH1 and Pp1&6-FEH1) or present but flanked by a single or double deletions (PpFEH-INV1). Other necessary amino acid(s) are also required to account for the high invertase activity of PpFEH-INV1 and then counteract the presence of Trp82 and Ser101 homologues (Trp119, Gly138 from the first methionine). Altogether, this suggests that still some other amino acid(s) might play a crucial role in the optimal binding and hydrolysis of sucrose. Further research is therefore needed to decipher the structure–function relationship of the glycoside family 32 members.

PpFEH-INV1: a premature FEH corresponding to an evolutionary intermediate ancestor?

Close relationships at the biochemical, molecular and structural levels are found between fructan biosynthesizing and degrading enzymes on the one hand, and invertases on the other. All plant fructan enzymes probably evolved from invertases by relatively few mutational changes. Most likely, FTs derived from vacuolar invertases (Vijn and Smeekens, 1999) and FEHs evolved from cell wall invertases (Van den Ende *et al.*, 2000). Only a few amino acids determine the difference in substrate specificity between FEHs and invertases. It has been speculated that plant FEHs and invertases were derived from an ancestral β -fructofuranosidase type of enzyme, as still present in microorganisms today (Le Roy *et al.*, 2007b; Le Roy *et al.*, 2008). PpFEH-INV behaved as a typical β -fructofuranosidase, showing activities against both fructans and sucrose. Van den Ende *et al.* (2011) postulated that *Pachysandra terminalis* 6-SST/6-SFT characterized by many side activities (invertase, FEH, 1-SST) probably represent a premature or evolutionary young FT. Similarly, we speculate that PpFEH-INV1 could correspond to an evolutionary

intermediate, still containing high invertase activity, between cell wall invertase and strict FEH.

Subsequently, the different enzymatic properties of wheat 6-FEH, Pp6-FEH1, Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1, despite their high similarity in amino acid sequence, support the prediction that introduction of a limited number of mutations in the common ancestor might have diversified the function of FEHs.

Transcriptional regulation of Pp1&6-FEH and PpFEH-INV1

Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 transcript levels have been measured in excised wilting tissues that underwent water loss under light or darkness at 15°C or 20°C. Consequently, wilting tissues might sense and respond, at least transiently, to different signals such as wounding, water deficit and light conditions through direct or indirect effect via carbohydrate content, amongst others.

Transcription regulation of FEHs is far from being understood and remained fragmentary. According to present knowledge, it seems that it depends on FEHs themselves, being related or not to their specific functions. For instance, transcripts of Pp6-FEH1 increased as a response to defoliation in the stubble and haplocorms from timothy (Tamura *et al.*, 2011) while those of Lp1-FEHa (Lothier *et al.*, 2007) and Lp6-FEHa (unpublished results) decreased in stubble from ryegrass. In chicory roots, 1-FEH I and 1-FEH II are regulated in a different way. For both FEHs, cold was an essential trigger (Van den Ende *et al.*, 2000; Van den Ende *et al.*, 2001; Michiels *et al.*, 2004) but 1-FEH I might also be induced by a sudden drop of photosynthate (Van den Ende *et al.*, 2001). In *Bromus pictus*, a graminean species native from Patagonia which grows under extreme drought and cold temperature conditions, transcript level of Bp1-FEHa did not vary, increased or even decreased along with cold treatment depending on the sections of mature leaves (Del Viso *et al.*, 2009b). In wheat, 1-FEH w1, w2 and w3 expression increased as a response to water stress and 1-FEHw3 was more susceptible than 1-FEHw1 and 1-FEHw2 (Zhang *et al.*, 2009). The present

study shows that the highest Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 transcripts increase occurred concomitantly to the highest decline of sucrose content in the tissues under drought conditions that were still compatible with alive metabolism (Ould Ahmed *et al.*, article 2, chapter V.2). Water loss and/or sucrose drop could then be the triggers for Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 induction.

Only one report has been published so far on FEH promoter characterization by transient expression assay and deletion analysis (Michiels *et al.*, 2004). Of further interest, besides cold responsive elements, Ci1-FEH IIa also contain motifs found for hormones (auxin, abscissic acid, ethylene, gibberellin, salicylic acid), light, sucrose and glucose-starvation response, suggesting complex signal sensing and transduction network. Future studies of the transcriptional analysis of *FEH* genes including identification of inducing factors and cis-acting elements in their promoters, should help to elucidate the mechanisms of FEHs transcriptional regulation.

Putative roles of Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1

One of the functions ascribed to FEHs in grass species is fructan hydrolysis whenever energy and carbon skeleton are needed (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001; Willenbrink *et al.*, 1998). Pp1&6-FEH1 differed from the recently cloned Pp6-FEH1 (Tamura *et al.*, 2011) in that it did not degrade low DP levan (6-kestotriose) but had a clear preference for 1-kestotriose and higher invertase activity. Both enzymes displayed then complementary substrate selectivities and could act in concert to perform the complete breakdown of native fructans into fructose and glucose, in a more efficient way than if they were working separately. Based on current knowledge, Pp1&6-FEH1 is expected to be located in vacuoles together with fructans and Pp6-FEH1. However, alternative roles for Pp1&6-FEH1 such as the ones discussed below for PpFEH-INV1 cannot be excluded.

Although it is generally accepted that fructans and fructan metabolizing enzymes occur in the vacuoles (Wagner *et al.*, 1983; Wiemken *et al.*, 1986), fructans

and fructan-degrading activity has also been found outside the vacuole in the apoplast (Livingston and Henson, 1998; Van den Ende *et al.*, 2005). The high homology of PpFEH-INV1 with wheat 6-KEH (67%) probably localized in the apoplast (Van den Ende *et al.*, 2005) and with wheat 6&1-FEHw1 (70%) probably involved in fructan content modulation in crowns during the cold season (Kawakami *et al.*, 2005), together with the fact that PpFEH-INV1 is not competitively inhibited by sucrose as for sugar beet and *Arabidopsis* apoplastic 6-FEHs (Van den Ende *et al.*, 2003b; De Coninck *et al.*, 2005) might point to an apoplastic localization of PpFEH-INV1. PpFEH-INV1 could then fulfil defence related-function, allowing plant pathogen recognition by degrading exogenous levans formed by bacterial plant pathogens.

Contrary to pathogenetic bacteria, endophytic species occupy internal tissues of plants without causing damage to their hosts. Several endophytic bacteria synthesize levan or inulin from plant sucrose by the action of extracellular levansucrase or inulosucrase releasing glucose used as a source of energy by bacteria (Hernandez *et al.*, 2000; Banguela and Hernandez, 2006). The occurrence of a fructan synthesizing enzyme rather than an invertase enzyme led the authors to suggest that levan could play a key role in plant-endophyte interaction. Plant FEH-INV such as the one described here could favour and stabilize this interaction by controlling fructan production in the slime through FEH activity in order to degrade microbial fructans and through invertase activity to prevent fructan formation from sucrose. PpFEH-INV1 would then act as a defence related enzyme and/or as a facilitating enzyme that promotes plant fructan-producing endophyte interactions.

A more straightforward function for apoplastic FEH-INV1 is the degradation of endogenous but extracellular fructans such the ones that could accumulate in cold hardened haplocorms of timothy (Yoshida *et al.*, 1998) during winter if timothy behaved similarly to oat (Livingston and Henson, 1998) or wheat (Van den Ende *et al.*, 2005). Interestingly, second phase hardening of winter oat increased both FEH and invertase activities in the apoplast (Livingston and Henson, 1998). The

recombinant protein of FEH-INV1 performs well under low temperature (20% of its maximum at 4°C). Together or not with other low pI apoplastic strict FEHs, PpFEH-INV1 is able to degrade sucrose, $\beta(2,1)$ and $\beta(2,6)$ -linkages, might then control apoplastic sucrose and fructan concentrations, structural composition and DP contributing to increased cold and frost tolerance most likely by stabilizing the plasma membrane (Livingston *et al.*, 2009).

Putative functions of PpFEH-INV1 could be corroborated by investigating the resistance to bacterial infection, the improvement of endophytic interactions and the tolerance to low temperatures of plants overexpressing timothy FEH-INV. If FEH-INV proves to be important for the stabilization of plant-endophyte interactions it might be very useful in transgenic or varietal selection approaches to increase the content of corresponding enzyme in stems and leaves in order to increase the efficiency of the silage process, taking advantages i) of the multifunctionality of the plant enzyme and ii) of the bacterial fructan degrading enzyme in order to improve plant fructan degradation.

V.3.5. Conclusion

Conclusively, cloning and heterologous expression revealed the presence of two unique FEH types of enzyme, 1&6-FEH and FEH-INV, in leaf tissues of timothy, which probably fulfil crucial roles in reserve mobilization, modulation of fructan content and DP under biotic and abiotic stress or under positive biotic interactions. The localization of 1&6-FEH and FEH-INV and more generally of all FEHs so far characterized should be further investigated to better understand the physiological role of FEHs in fructan and non-fructan accumulating plants.

V.3.6. Acknowledgements

The technical assistance of Camille Soulard from the UMR INRA Université de Caen Basse-Normandie EVA was greatly appreciated. This research was supported by funding from the ‘Développement Economique Canada – Regional Strategic Initiative #400020439’ and by funding from INRA and Université de Caen Basse-Normandie (France).

Table V.3.1: cDNA-deduced amino acid sequence analysis of Pp1&6-FEH1, PpFEH-INV1 and Pp6-FEH1.

	Pp1&6-FEH1	PpFEH-INV1	Pp6-FEH1 ^a
Amino acid number	568	582	601
Estimated molecular weight (kDa)	62.4	65.0	63.4
Estimated isoelectric point (pI)	6.14	4.83	4.83
Putative N-glycosylation site	5	7	6
Peptide signal cleavage	25 - 26	20 – 21	26 - 27

^aTamura *et al.*, 2011

Table V.3.2: Substrate specificity of recombinant Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 expressed in *P. pastoris*. Activities are shown as the value relative to activity with the preferred substrate 1-kestotriose for Pp1&6-FEH1 and phlein for PpFEH-INV1.

Substrate	Linkage form	DP	Relative activity (%)	
			Pp1&6-FEH1	PpFEH-INV1
Inulin (<i>Cichorium. intybus</i>) ^b	β(2,1)	28 ^a	<<1	19
1,1-Kestotetraose	β(2,1)	4	31	50
1-Kestotriose	β(2,1)	3	100	34
Levan (<i>Erwinia herbicola</i>) ^c	mainly β(2,6)	<100,000 ^a	23	62
6-Kestotriose	β(2,6)	3	<<1	55
Phlein (<i>Phleum pratense</i>)	mainly β(2,6)	20 ^a	21	100
Sucrose		2	16	84

^a Mean DP

^b Biggs and Hancock, 1998

^c Blake *et al.*, 1982

Pp6-FEH1	-----MAGHRLAVCAAVAVHLCLLSPSSALRWLSDPKADSTSTTHGCSFR	48
Pp1&6-FEH1	-----MAGLRLAGVAFYLCLLCLS-----CESSAQNGGYR	31
PpFEH-INV1	-----MARAWAFVLLALFYVCSNGERSFLSTRDPAAADSDSSIVSRRYR	46
DcCW-INV1	MGVTIRNRNYDHCSLPFLQSLAILLVTTTLHNGVEAFHEIHYNLQSVGAENVKQVHR	60
Pp6-FEH1	TAYHFOPTENWQNDPNCPMYYNGKYHFFYQYNPFEGATWGNCLSWGHVSVDLVNMSALD	108
Pp1&6-FEH1	TAYHFRFAKNWQNDPNCPMYHNGLYHFFYQYNFEGAGWGICNLWGHVSVDLVNWKALN	91
PpFEH-INV1	TGYHFFQPKNWINDPNCPMYYNGIYHFFYQYNPNGLWLG---DIWGHVSVDLVNWAILE	104
DcCW-INV1	TGYHFFQPKQNWINDPNCPMYYKGVYHFFYQYNPKGAVWG---NIVWAHSVTDLINWTPLE	118
Pp6-FEH1	NAMDPCSSFDINGVWSSGATILPDGTGVFLYTGIDA---DNNQVQNVAFPKNASDPLLE	165
Pp1&6-FEH1	TALDPCSPFDANGCWSSGATILPDGRPVMLYTGIDA---ANNQVQNIAPFKNASDPLLE	148
PpFEH-INV1	PALEKUSPDILGCWTGSATILPGNVPIIYTGCDK---DDRQVQNIAPFKNASDPLLE	161
DcCW-INV1	PAIFPSPKPFDKYGCSSGATILPGNKPVIYTGIVEGPPKVVQVQNYAIPANLSDDPLRK	178
Pp6-FEH1	WVKPSYNPVIPLPDIVHDNFRDSTAWRGADGLWRVAVSAKFKTSGAGTTLIYKSKDFR	224
Pp1&6-FEH1	WVKPSYNPVIPLPEDVEHDNFRDSTAWRGDGLWRVAVAAKNTSVGATLIYKSKDFR	207
PpFEH-INV1	WIKAGSNPVLPVCPGFNEQHFRDSTGWICPDCLWRALCAEVNRYSAAVLYKSEDFL	220
DcCW-INV1	WIKPDNNPLVV-ANNGENATAFRDSTAWLDKSGHWKMLVGSKRNR-IGIAYLYRSKDFI	236
Pp6-FEH1	SWERNAEPLYESWVAGMVECPDLFPVAEPGAENGLDFASANGAGVRYVLKQSVMETLSUY	284
Pp1&6-FEH1	LWERNAAPLYESLAAGMVECPDLFPVADPGAENGLDCLPS-HVAARHVLKLSLVATLDY	266
PpFEH-INV1	NWTRVDHPLYSSNTSNMVECPDFFAVLP-GNNGELDLAAIPTGAKHVLKVSLDQ---CDK	277
DcCW-INV1	KWTKAKHPLHSQANTCMVECPDFFPVSLKGLNG---LQTSVIGESVKHVLKVSLDLRYLY	294
Pp6-FEH1	YVVGRYDDASDNFPAEDAAGDNCRTWQRFDYGHVYASKSFYDAGKKRRVLWSWANESD	344
Pp1&6-FEH1	YVVGRYDDTKD--CFALPAGADNDCRTWRRLDYGHVYASKSFYDARKNRRVLWSWANESD	324
PpFEH-INV1	YMLGVYDLERD---AFEPDAVLDDRRLLWKIDYGCYASKSFYDARKNRRVLWSWANESD	334
DcCW-INV1	YTVGTYLTDKD---RYIPDNTSVCGWAGRLRYDYNFYASKTFYDPSKNRRILWGWANESD	361
Pp6-FEH1	PEPNYIARGWSGVQTVPRKIWLSDGKQLLQWPIEIESLRKNRVGLLG-AEVNAGGMNE	403
Pp1&6-FEH1	PEADYVARGWSGVQTVPRKIWLSDGKQLLQWPIEIEIKLRKKRVGLLG-AKVNAGGMNE	383
PpFEH-INV1	SEADDVAKGWAGIYAMARTIWLNDGKQLLQWPFVEEVESLRRNEINHQG-LELNKGDLFE	393
DcCW-INV1	STAHDVAKGWAGIQLPRTLWLDPGSKQLMCWPIDEELETLRGSKVKFSRKQDLKSGILVE	411
Pp6-FEH1	IGVAGAQAQDVEVVFEPALHAEN-LDCNQLLDPQRLCGEKASVQGGVGPFGLLVLAS	462
Pp1&6-FEH1	IGVAGSQADVEVVFQIPALEGAEN-LDPNGLLDPQRLCGEKASVQGGVGPFGLLVLAS	442
PpFEH-INV1	INGVITSQAQVEIDFELTSUDAAEPFDPWLLDPQKQCFACASVHGGIGPFCIVVLAS	453
DcCW-INV1	VKGITAAQAQDVEVTFSEKSLAKREFDPKWLLEYDAEKICSLKGSTVQGGVGPFGLLVLAS	471
Pp6-FEH1	SDLQEHTSVFFRFRVFDGKYKVLMTCLRRSTTRADVKKPPYGGFVDIDIEKTRISLRT	522
Pp1&6-FEH1	CDMQEHTSVFFRFRVKLDCYKVLMTCLTRSTTRADVKKPSYGAQVDIDIEKTRISLRT	502
PpFEH-INV1	GDMKEHTDVHFRVYKSEQKYMILMCSDLGRSSLRPLGYTPAYGGFFEDLEKEKISLRT	513
DcCW-INV1	EKLEEXTVFFRFRVFKQNTHKVLMCSDATRSSLKEGLYRPSFAGFVDVLDLATDKKISLRS	531
Pp6-FEH1	LIDHSVVESYGGGCRTVITARAYPEHAQTCSSHLYMFNNGTGVVKSLEAWELKATV	582
Pp1&6-FEH1	LVDHSVVESFGGGRTCTITARYPEHVMSSNNHLYMFNNGTCAVKVSKLEAWELATATV	562
PpFEH-INV1	LIDRSVVESFGGGRLCITARYVPVALLDDGGTHIYAFNNGSTTVRVPELKAWMASAQR	573
DcCW-INV1	LIDNSVVESFGAKKCTCISRVYPTLAVYEN-AHLYVFNNGSETITVENLDAWSMKKPLR	590
Pp6-FEH1	NVAGGGLAMVGSARGGEVY	
Pp1&6-FEH1	NIAGTG-----	
PpFEH-INV1	NVQKAWSD-----	
DcCW-INV1	MN-----	

Figure V.3.1: Alignment of the amino acid sequences of FEHs from *Phleum pratense*. Comparison of the deduced amino acid sequences of Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 with Pp6-FEH1 (AB583555) and with DcCW-INV1 (M58362). The three boxed regions indicate conserved motifs that are crucial for β -fructosidase catalysis in family 32. The three carboxylic acids implicated are in bold. The amino acids homologous to Trp82 of chicory 1-FEH IIa are indicated by ▼. The amino acids homologous to Ser101 of chicory 1-FEH IIa are indicated by ▽. The first § shows the amino acids homologous to Asp239 of AtcwINV1, the second § indicates R in DcCW-INV1, both representing the D/R couple when it exists. The putative glycosylation sites are underlined. ↴ indicates the site of the glycosyl chain blocking the cleft region between the two subdomains. The arrows show the predicted N-terminus of the mature proteins. Consensus line: asterisk (*), colons (:) and periods (.) indicate identical residues, conserved substitutions and semi-conserved substitutions, respectively.

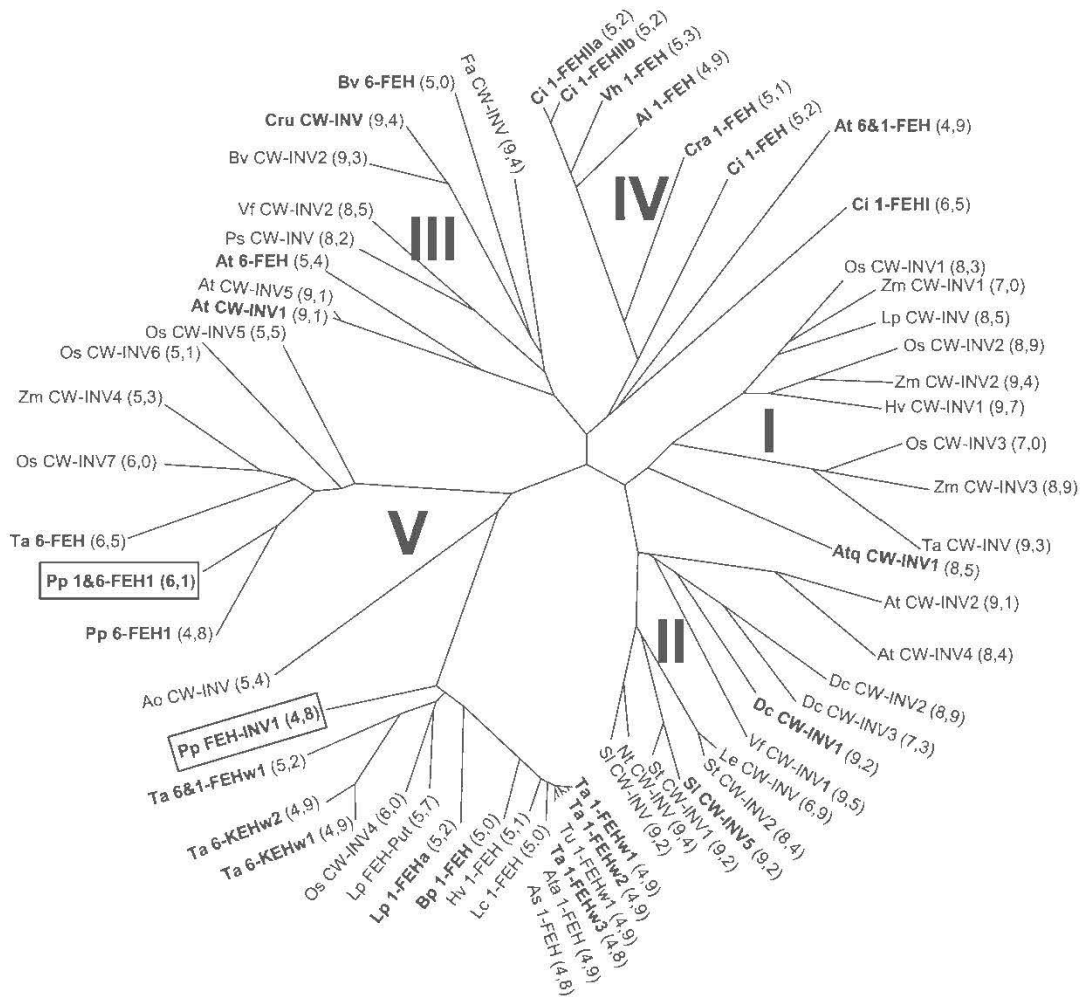


Figure V.3.2: Phylogenetic tree of FEHs and cell wall invertases (CW-INV) of plants based on predicted amino acid sequences (ClustalW/Drawtree). The two new Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 are boxed. Isoelectric points are presented in parentheses. cDNAs from which the functionality is proven by purification of the enzyme or heterologous expression are indicated in bold. Five groups can be discerned. First group (I): *Oryza sativa* CW-INV1 (AY578158); *Zea mays* CW-INV1 (AF050129); *Lolium perenne* CW-INV (DQ073969); *Oryza sativa* CW-INV2 (AY578159); *Zea mays* CW-INV2 (AF050128); *Hordeum vulgare* CW-INV1 (AJ534447); *Oryza sativa* CW-INV3 (AY578160); *Zea mays* CW-INV3 (AF043346); *Triticum aestivum* CW-INV (AF030420); *Agave tequilana* CW-INV1 (JN790057). Second group (II): *Arabidopsis thaliana* CW-INV2 (U11033); *Arabidopsis thaliana* CW-INV4 (AB049617); *Daucus carota* CW-INV2 (Q39692); *Daucus carota* CW-INV3 (Q39693); *Daucus carota* CW-INV1 (M58362); *Vicia faba* CW-INV1 (Z35162); *Lycopersicon esculentum* CW-INV (AF506006); *Solanum tuberosum* CW-INV2 (CAB76674); *Solanum lycopersicum* CW-INV5 (AJ272304); *Solanum tuberosum* CW-INV1 (Q9M4K8); *Nicotiana tabacum* CW-INV (X81834); *Solanum lycopersicum* CW-INV (Q8LRN7). Third group (III): *Fragaria ananassa* CW-INV (AF000521); *Beta vulgaris* 6-FEH (AJ508534); *Chenopodium rubrum* CW-INV (X81792); *Beta vulgaris* CW-INV2 (AJ277458); *Vicia faba* CW-INV2 (Z35163); *Pisum sativum* CW-INV (AF063246); *Arabidopsis thaliana* 6-FEH (AB029310); *Arabidopsis thaliana* CW-INV5 (AP001307); *Arabidopsis thaliana* CW-INV1 (X74514). Fourth group (IV): *Cichorium intybus* 1-FEHIIa (AJ295033); *Cichorium intybus* 1-FEHIIb (AJ295034); *Vernonia herbacea* 1-FEH (AM231149); *Arctium lappa* 1-FEH (AB611034); *Campanula rapunculoides* 1-FEH (AJ509808); *Cichorium intybus* 1-FEH (Y11124); *Arabidopsis thaliana* 6&1-FEH (AY060553); *Cichorium intybus* 1-FEH1 (AJ242538). Fifth group (V): *Oryza sativa* CW-INV5 (AY578162); *Oryza sativa* CW-INV6 (AY578163); *Zea mays* CW-INV4 (AF043347); *Oryza sativa* CW-INV7 (AY578164); *Triticum aestivum* 6-FEH (AM075205); *Phleum pratense* 1&6-FEH; *Phleum pratense* 6-FEH1 (AB583555); *Asparagus officinalis* CW-INV (AB244731); *Phleum pratense* FEH-INV1; *Triticum aestivum* 6&1-FEHw1 (AB089269); *Triticum aestivum* 6-KEHw2 (AB089270); *Triticum aestivum* 6-KEHw1 (AB089271); *Oryza sativa* CW-INV4 (AY578161); *Lolium perenne* FEH-Put (DQ073968); *Lolium perenne* 1-FEHa (DQ016297); *Bromus pictus* 1-FEH (GQ247882); *Hordeum vulgare* 1-FEH (AJ605333); *Leymus chinensis* 1-FEH (FJ178114); *Aegilops speltoides* 1-FEH (FJ184993); *Aegilops tauschii* 1-FEH (FJ184994); *Triticum aestivum* 1-FEHw3 (AJ564996); *Triticum uratum* 1-FEHw1 (FJ178114); *Triticum aestivum* 1-FEHw2 (AJ508387); *Triticum aestivum* 1-FEHw1 (AJ516025).

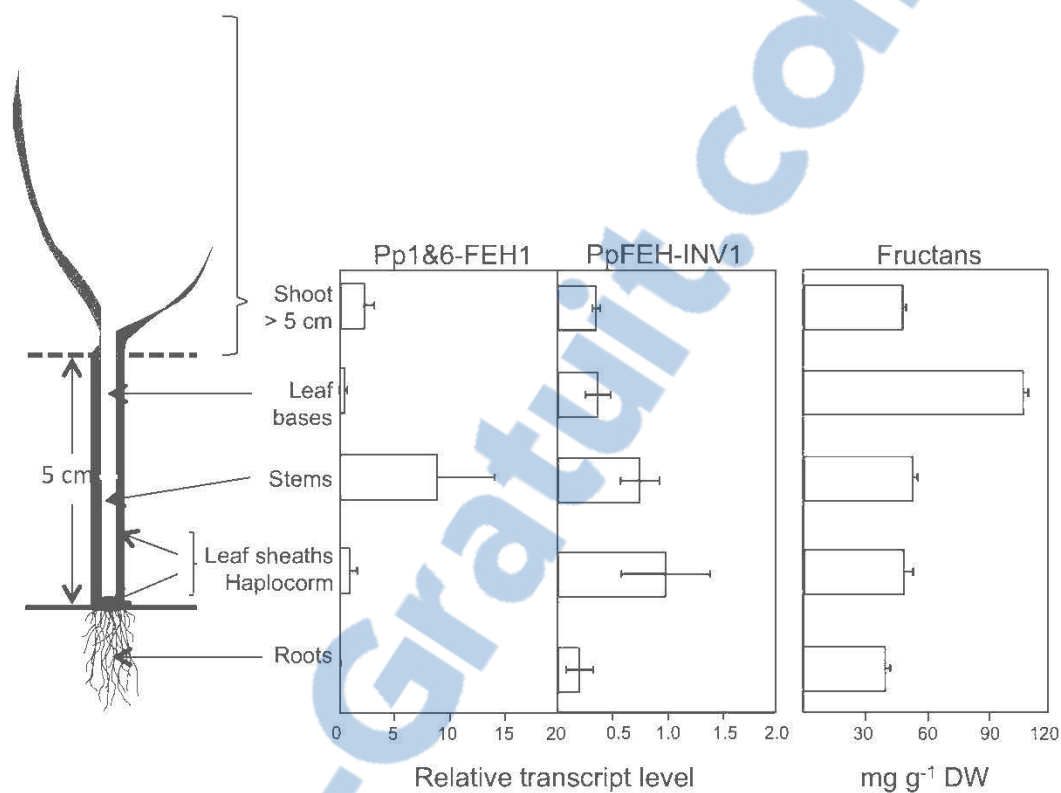


Figure V.3.3: Fructan content (mg g⁻¹ DM) and relative transcript level of Pp1&6-FEH1 and PpFEH-INV1 in tissues of timothy plants harvested at early stem elongating stage. Values are means of three biological replicates $\pm$ standard error (SE).

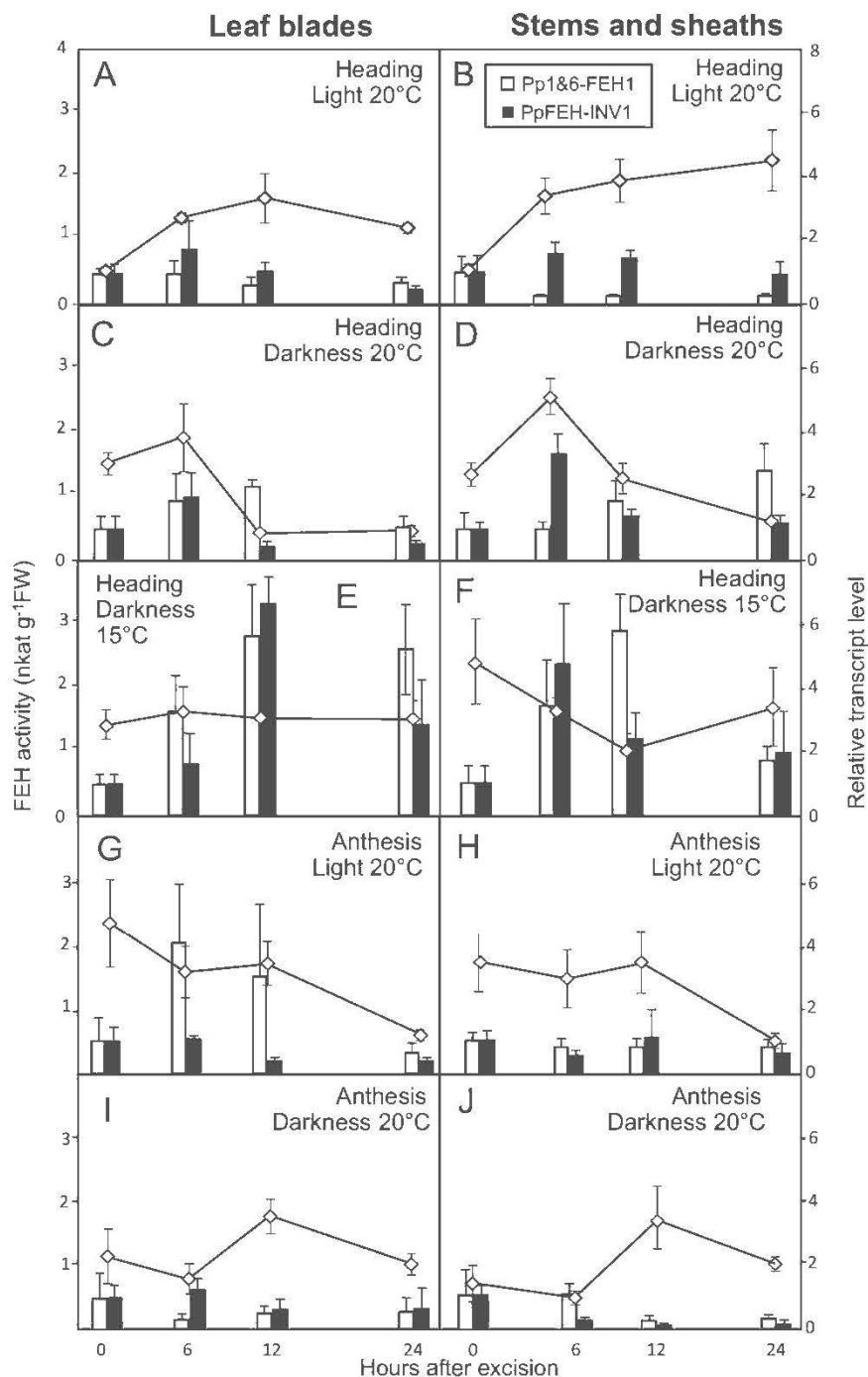


Figure V.3.4: Changes in relative transcript level of Pp1&6-FEH1 (white) and PpFEH-INV1 (black) in leaf blades (A-C-E-G-I) and stems (B-D-F-H-J) of timothy. Tissues were excised from 5 cm above the crown at heading (A to F) or anthesis (G to J) and stored in light at 20°C (A-B-G-H), in darkness at 20°C (C-D-I-J), or in darkness at 15°C (E-F) before being dissected into leaf blades and stems which were surrounded by leaf sheaths. Changes in fructan exohydrolase (FEH) activity (nkat g⁻¹ FW) are also indicated (white diamond, solid line) (Article 2, chapitre V.2). Values are means of three biological replicates $\pm$ standard error (SE).

VI. DISCUSSION GENERALE

VI. DISCUSSION GENERALE

L'optimisation des teneurs en sucres non structuraux, dont la grande majorité est constituée par les fructanes chez les Poacées tempérées prairiales, peut être considérée comme une option intéressante en agronomie permettant d'améliorer la valeur nutritive du fourrage pour l'alimentation animale. De plus, les fructanes interviennent dans les capacités de résistance de ces plantes aux stress abiotiques générés par l'environnement pouvant ainsi améliorer la survie à l'hiver et les rendements des récoltes, notamment dans le contexte des changements climatiques. Les écosystèmes prairiaux peuvent participer par ailleurs de façon importante à la séquestration du carbone atmosphérique et peuvent être valorisés d'un point de vue agronomique, biotechnologique, ou pour la production d'agrocarburants.

La fléole des prés (*Phleum pratense* L.) apparaît comme une bonne « espèce candidate » dans ce contexte, en raison de son métabolisme adapté aux régions tempérées et froides, de son appétence pour l'animal et sa bonne valeur nutritive, en conditions de pâture, de foin, ou d'ensilage. La fléole tolère ainsi des températures hivernales jusqu'aux environs de -30°C (Paquin, 1984). En outre, la fléole des prés montre une grande résistance par rapport à l'hypoxie tissulaire pendant l'hiver, due sans doute à une meilleure gestion des réserves carbonées et à un faible taux de fermentation des sucres par rapport aux autres espèces fourragères (Bertrand *et al.* 2003). Parmi 17 Poacées tempérées et 13 tropicales testées par Ojima et Isawa en 1968, *Agrostis alba* L. et *Phleum pratense* L. sont les seules espèces à contenir plus de 6 % de fructanes à des températures (de juin à septembre) relativement élevées (cité par Chatterton *et al.*, 1989). La fléole des prés possède par ailleurs une bonne capacité de résistance au stress compétitif généré par la présence d'autres espèces comme le ray-grass au cours de la croissance végétative, ainsi qu'une assez bonne capacité de repousse après défoliation et de stockage des réserves dans ces conditions (Cheplick et Chui, 2001). Elle semble également avoir un impact positif sur la survie à l'hiver d'autres espèces fourragères comme le trèfle rouge (Belzile, 1987).

La fléole est une espèce allogame, à fécondation croisée, dont la floraison fait intervenir des phénomènes de compétition pollinique (Gallais et Ricroch, 2006) entraînant des difficultés pour la sélection de cultivars améliorés stables au cours des générations suivantes, ces aspects favorisant le brassage génétique. En outre, la température est un facteur déterminant, influençant les teneurs en sucres solubles, même pour des cultivars riches en fructanes, comme *Vega* adapté aux conditions nordiques en Europe par rapport à *Climax* répandu dans les régions tempérées d'Amérique du nord (Thorsteinsson *et al.*, 2002). D'autres cultivars comme *Champ*, *Engmo* ou *Grindstad* souvent évoqués dans la littérature sont sélectionnés selon un fort ratio limbes/tige favorisant la digestibilité, ainsi que pour leurs teneurs en fibres ou en protéines (Østrem *et al.*, 2011). Le cultivar *Alliance* étudié ici est généralement recommandé pour son bon rendement dans l'est canadien. Cependant, et quel que soit le cultivar, les teneurs en fructanes restent tributaires, entre autres facteurs, du stade de maturité de la plante, de la fertilisation azotée et d'une bonne gestion des coupes permettant d'optimiser les rendements sur l'année.

Le mode de gestion des pratiques fourragères par les dates de récolte peut modifier sensiblement la survie hivernale des espèces fourragères en relation avec la disponibilité des sucres. Il est de même bien connu que les coupes à un stade précoce (« floraison » pour les légumineuses ou « début épiaison » pour les Poacées) donnent généralement un fourrage de bonne qualité, mais un faible rendement, tandis que les coupes tardives donnent un rendement élevé, mais une faible qualité de fourrage (Savoie et Tremblay, 1998).

La mobilisation des fructanes suite à une défoliation, par fauche ou pâturage, a été bien étudiée dans les tissus qui restent en place après la fauche (chaumes) provoquant une augmentation de l'activité FEH et la libération de fructose, favorisant la repousse (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001; Tamura *et al.*, 2011). Au contraire, peu d'informations sont disponibles à ce jour sur le devenir des fructanes ainsi que sur le rôle des enzymes de la plante dans le métabolisme des sucres solubles dans les tissus

aériens après la fauche, pendant le fanage, avant la conservation sous forme de foin ou d'ensilage.

VI.1. METABOLISME DES FRUCTANES DANS LES PARTIES AERIENNES DE LA FLEOLE PENDANT LA CROISSANCE

Le premier chapitre des résultats de cette thèse (Chapitre V.1) sur le suivi du métabolisme pendant les stades de croissance étudiés (stade végétatif, montaison, épiaison et anthèse) dans les tissus aériens correspondant à ceux qui sont récoltés après fauche (tiges gainées et feuilles), apporte de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre l'accumulation des principaux sucres non structuraux, et particulièrement des fructanes, chez la fléole pendant son développement.

VI.1.1. Effet du niveau de fertilisation azotée sur la croissance et le métabolisme des sucres non structuraux

Si le rôle du nitrate sur le métabolisme des fructanes est bien établi chez certaines Poacées, pendant la croissance, et particulièrement chez l'espèce modèle que constitue le blé, il reste l'objet de diverses interprétations selon les concentrations et conditions de cultures chez la fléole des prés.

Dans les tiges de blé, il a été montré que 1% d'augmentation des teneurs en N aboutit à 28% de diminution des teneurs en sucres solubles, suggérant que le contenu en N constitue une force sélective importante drainant les teneurs en sucres solubles chez cette espèce (Valluru *et al.*, 2011). Des concentrations en nitrate supérieures à 10 mM ont un effet négatif sur l'accumulation des fructanes et l'activité FT dans les feuilles excisées d'orge (Morcuende *et al.*, 2004). Chez la fléole, Pelletier et collaborateurs (2009) rapportent qu'en conditions de champs, une variation de la fertilisation azotée entre 30 à 110 kg d'azote par ha (NH_4NO_3) n'affecte pas les

teneurs en sucres non structuraux totaux mais augmente légèrement le taux de matière sèche. Au contraire, Tremblay *et al.*, (2005) montrent que les concentrations en sucres chutent avec l'augmentation de la fertilisation azotée (de 60 à 180 kg d'azote par ha) tandis que les concentrations en nitrate augmentent dans les tissus. Ces variations peuvent également toucher les concentrations en fibres non solubles et en protéines, et d'autres auteurs comme Nordheim-Viken et Volden (2009) les expliquent par la variabilité des facteurs climatiques comme la température, les radiations globales ou la disponibilité en eau. Il s'avère cependant intéressant de noter qu'il doit exister un seuil, fluctuant selon l'espèce, en dessous duquel le niveau de fertilisation azotée n'affecte plus les teneurs en sucres solubles. Nous avons ainsi choisi de comparer l'effet de deux concentrations en azote (3,75 mM et 0,375 mM NH_4NO_3) sur les teneurs en sucres non structuraux pendant la croissance.

Nos résultats montrent que l'augmentation de la concentration en NH_4NO_3 dans la solution nutritive de 0,375 mM à 3,75 mM n'a aucun effet sur l'accumulation des sucres solubles, et des fructanes en particulier, pendant le développement chez la fléole. Le contenu en amidon est plus sensible que celui en fructanes à la diminution des concentrations en azote dans nos conditions de culture en hydroponie. On observe par ailleurs une augmentation des teneurs en acides aminés pour le niveau de fertilisation 3,75 mM NH_4NO_3 par rapport au niveau 0,375 mM NH_4NO_3 pouvant sans doute s'expliquer par une redistribution des flux azotés et des squelettes carbonés quand un excédent de N est disponible. Nous n'avons par ailleurs pas observé de variation phénotypique au niveau des tissus aériens, ni de variation statistiquement significative de la masse de matière fraîche ou sèche produite en réponse à la modification de la fertilisation azotée. Bélanger et Richard (1997) ont utilisé le concept du ratio « N/Nopt », qui correspond au ratio de la concentration en N dans les tissus sur la concentration optimale en N (Nopt : concentration en azote requise pour une croissance maximale des tissus aériens), pour détecter les situations de carence en azote chez la fléole. Dans notre étude, les teneurs en N sont

effectivement supérieures à la concentration optimale en N, de l'ordre de 25 et 10 mg g⁻¹ MS (dans les limbes et tiges respectivement) si bien que les plantes ne sont pas en situation de carence, même avec le niveau faible de fertilisation azotée. Même si les teneurs en amidon restent faibles par rapport au total des sucres non structuraux et donc peu susceptibles d'influer sur la valeur nutritive du fourrage, nos données indiquent une sensibilité beaucoup plus forte du métabolisme de l'amidon vis-à-vis de la fertilisation azotée, comparé à celui des fructanes. Cela suggère que les mécanismes de régulation et/ou d'interaction entre le métabolisme de l'amidon et celui de l'azote d'une part ; et le métabolisme des fructanes et celui de l'azote d'autre part sont différents.

VI.1.2. Effet du stade de développement sur les teneurs en fructanes

L'un des facteurs les plus importants jouant sur les teneurs en sucres solubles dans les tissus récoltés est le stade de développement au moment de la fauche. Les concentrations en sucres solubles dans les tissus récoltés affectent ainsi la qualité du fourrage et les processus de conservation en aval que sont le fanage et l'ensilage. Ces teneurs sont également affectées par les variations climatiques (saisonnières) de l'hiver au printemps. Chez le blé, l'accumulation des sucres solubles dans les tiges précède généralement le remplissage du grain. On observe aussi une augmentation des teneurs en fructanes dans les tiges de blé et d'orge pendant la croissance, avec des teneurs maximales à l'anthèse. Les fructanes sont ensuite mobilisés accompagnant le gain en poids du grain (Schnyder, 1993; Van den Ende *et al.*, 2003a). Chez les Poacées fourragères, l'évolution des teneurs en sucres solubles pendant la maturation est très variable, les stades avancés résultant généralement d'une augmentation de la matière sèche avec des variations importantes des teneurs en sucres solubles (Bélanger et Richards, 1997; Bélanger et McQueen, 1998). Les résultats présentés dans le chapitre V.1 chez la fléole montrent que la nature et la quantité des sucres

solubles varient avec le stade de croissance pour atteindre des teneurs maximales au stade anthèse parallèlement à une inversion du ratio limbe/tige au cours du développement. Les teneurs en fructanes augmentent ainsi de manière significative entre l'épiaison et l'anthèse, sans effet du niveau de la fertilisation azotée. L'activité FEH est stable pendant la croissance, mais il n'est pas interdit de penser qu'elle augmente aux stades post-anthèse permettant la mobilisation des réserves, comme cela est bien établi chez le blé pendant le remplissage du grain (McGrath *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été rapportés chez le blé pour lequel l'activité 1-FEH augmente de manière importante quelques jours après l'anthèse, tandis que les teneurs en fructose libéré sur la même période suivent une tendance de type gaussien avec des valeurs maximale 10 à 12 jours après l'anthèse (Van den Ende *et al.*, 2003a). Sur la même période une forte induction de l'expression de 1-FEHs (1-FEHw1, 1-FEHw2 et surtout 1-FEHw3) est observée (Zhang *et al.*, 2008). Les auteurs de cette étude proposent d'utiliser les gènes codant ces enzymes comme nouveaux marqueurs de référence pour la sélection de nouvelles variétés plus efficaces dans l'utilisation de leurs réserves pour un meilleur rendement en grains (Zhang *et al.*, 2008).

Chez la fléole, Pelletier *et al.* (2009) observent que les teneurs en fructanes de haut DP dans le fourrage sont quasi nulles en début d'épiaison et atteignent environ 65 mg g⁻¹ MS en anthèse. Dans notre cas, les teneurs en fructanes (faibles et hauts DP confondus) étaient importantes dès la fin du stade végétatif aux environs de 60 mg g⁻¹ de MS, restant autour de ces valeurs jusqu'en épiaison pour augmenter par la suite atteignant des valeurs maximales de l'ordre de 140 mg g⁻¹ de MS en anthèse. Tremblay *et al.* (2005) observent des augmentations similaires des concentrations en fructanes chez la fléole, de la montaison à la floraison de 20 à 80 mg g⁻¹ de MS selon le niveau de fertilisation azotée. Ils notent également de grandes variations inter-annuelles des teneurs en sucres solubles qui peuvent doubler pour le même stade de croissance sur deux années consécutives indiquant un impact majeur des conditions climatiques. En effet, une étude de Thorsteinsson *et al.* (2002) montre également un

effet important du régime des températures jour/nuit sur la concentration en fructanes dans les limbes de la fléole. Les auteurs imputent les variations des teneurs en sucres solubles à l'effet de l'N mais aussi au taux de croissance foliaire, à l'intensité des radiations efficaces pour la photosynthèse et à la disponibilité en eau.

Dans notre étude, les teneurs en saccharose et en fructanes dans les parties aériennes fauchées sont élevées dès le stade végétatif, suggérant que dans nos conditions de culture la synthèse de photoassimilats excède la demande dès le début du développement. En effet, la synthèse des fructanes dans les tissus photosynthétiques a lieu dès que les concentrations en saccharose atteignent un certain seuil (Pollock *et al.*, 2003). L'activation de la synthèse des fructanes permettrait ainsi de maintenir les teneurs en saccharose en dessous d'un seuil permettant la continuité d'une activité photosynthétique efficace active dans les cellules sources des limbes et des gaines foliaires. Il en va de même dans les tissus conducteurs du mésophylle où la régulation des teneurs en saccharose via la synthèse de fructanes contribue à maintenir un gradient permettant le chargement du phloème et le transport du saccharose vers les tissus puits. De plus, le saccharose serait perçu comme une molécule signal induisant la transcription des gènes de FT et aboutissant à la synthèse des fructanes (Müller *et al.*, 2000; Nagaraj *et al.*, 2004). La production des fructanes aux stades avancés serait ainsi dépendante des teneurs en saccharose aux stades précoces. Nos résultats permettent d'observer une corrélation positive entre les concentrations en fructanes et en saccharose ($r=0,32$; $p\leq 0,05$), tout comme observé par Chatterton *et al.* (1989). Les teneurs en fructanes sont cependant corrélées de manière plus importante avec les teneurs en fructose ($r=0,52$; $p\leq 0,001$).

Une étude récente comparant l'effet des stades de développement chez la fléole par rapport au ray-grass anglais montre que le mode d'accumulation des teneurs en sucres non structuraux diffère chez ces deux espèces et qu'il est fortement affecté par le stade de développement (Østrem *et al.*, 2011). La fléole, plus résistante à l'endurcissement hivernal, accumule assez tôt les fructanes et en quantités plus

importantes (d'octobre à avril) avec des teneurs maximales en mars de 150 à 200 mg.g⁻¹ de MS selon le cultivar ou la précocité du semis. Chez le ray-grass anglais, moins tolérant à l'hiver et plus résistant à la défoliation, elles sont de l'ordre de 150 mg.g⁻¹ de MS au même stade (Østrem *et al.*, 2011).

Les importantes variations saisonnières des teneurs en sucres solubles observées de l'automne à l'hiver puis au printemps, influencent grandement la production bovine (Machado *et al.*, 2005). Certains auteurs ont essayé de modéliser les effets des facteurs tels que la température, la photopériode ou la disponibilité en eau pour simuler le contenu en sucres chez les Poacées fourragères et optimiser ainsi les dates de récoltes (Wulfes *et al.*, 1999). Il s'avère cependant que si les fluctuations à court terme peuvent être prédites dans des conditions maîtrisées, les teneurs restent fortement dépendantes de l'espèce végétale, des intrants azotés et des conditions environnementales.

VI.2. METABOLISME DES FRUCTANES APRES FAUCHE DANS LES TISSUS RECOLTES

Il est maintenant bien admis que les différentes méthodes de conservation du fourrage affectent sa qualité nutritive avec des répercussions sur la production animale (Dawson *et al.*, 1999; Abrahamse *et al.*, 2008; Pelletier *et al.* 2010). Le séchage du foin par fanage affecte aussi les teneurs en sucres solubles et en protéines, notamment chez l'avoine et le ray-grass (Spoelstra et Hindle, 1989; Rebolé *et al.*, 1996). Le fanage (*wilting*) est généralement très utile avant la mise en balle ou en silos; il est surtout caractérisé par une chute rapide des teneurs en protéines, ainsi qu'une augmentation de la matière sèche (Kemble et Macpherson, 1954; Savoie, 1988; Martineau *et al.*, 2006). Peu d'informations sont cependant disponibles dans la littérature sur les fluctuations des concentrations et le métabolisme des sucres non structuraux pendant cette période, en particulier chez la fléole des prés.

VI.2.1. Fluctuations des teneurs en sucres non structuraux pendant le fanage

Le fanage permet d'augmenter la teneur en matière sèche ce qui assure une bonne conservation des fourrages sous forme de foin. L'augmentation rapide de la teneur en matière sèche est nécessaire pour réduire les pertes en nutriments à condition que le fanage ne dure pas trop longtemps car dans ce cas, il peut produire l'effet inverse (Petit et Tremblay 1992; Repetto *et al.*, 2005). Il est maintenant bien établi que les principales voies métaboliques qui sont actives pendant cette période sont la respiration tissulaire et la protéolyse (Muck *et al.*, 2003). Comme attendu, nos résultats montrent qu'une protéolyse se produit pendant les premières heures et conduit à une diminution de la teneur en protéines solubles (mesurées par la méthode de Bradford) corrélée négativement avec l'augmentation de la matière sèche ($R = -0,632$). De manière surprenante, les concentrations en fructanes et en saccharose ne semblent pas trop affectées par le fanage puisqu'elles restent stables voire même augmentent sensiblement dans les tissus quand la fauche a lieu au stade anthèse. Les concentrations résiduelles en fructanes après 24 heures de fanage sont comprises entre 44 et 57 mg g⁻¹ MS dans les limbes et entre 65 et 111 mg g⁻¹ MS dans les tiges. Elles sont plus importantes lorsque la fauche est réalisée à l'anthèse que lorsqu'elle est réalisée à l'épiaison (respectivement 86 ± 27 mg g⁻¹ MS et 66 ± 4 mg g⁻¹ MS ; F -value = 12,0; $P = 0,0008$). A l'inverse des concentrations en glucose qui ont tendance à se stabiliser ou à décroître, notamment au stade épiaison dans les limbes placés à 20°C, les concentrations en fructose ont tendance à augmenter dans les tiges et feuilles pendant la période de fanage. Les concentrations résiduelles de ces deux sucres après 24 heures de fanage sont de l'ordre de 2 à 10 mg g⁻¹ MS respectivement et elles sont plus importantes dans les tiges que dans les feuilles ($P \leq 0,0001$ pour le glucose et $P \leq 0,05$ pour fructose).

VI.2.2. Activités enzymatiques et teneurs en sucres non structuraux pendant le fanage

Les activités enzymatiques montrent de manière générale une plus grande sensibilité au fanage que les concentrations en sucres solubles, les protéines étant sans doute affectées par la protéolyse globale. L'activité FEH, assez stable, augmente pendant les premières heures de fanage, notamment dans les tissus fauchés à l'épiaison et placés à 20°C, ainsi que dans les tissus fauchés à l'anthèse. A l'inverse de l'activité SST qui décroît rapidement, l'activité FEH varie peu sur la période de fanage. L'activité invertase acide soluble, environ 100 fois plus élevée que les enzymes du métabolisme des fructanes, reste stable lors des premières heures de fanage puis décline dans tous les tissus, à l'exception des tiges placées à l'obscurité à 15°C chez lesquelles l'activité invertase augmente en début de fanage. La relative stabilité de l'activité FEH pendant le fanage pourrait elle-même s'expliquer par une meilleure résistance à la protéolyse des protéines correspondantes, qui pourrait s'expliquer par leur structure monomérique très stable. En effet, *a contrario* des FTs ayant évolué à partir des invertases vacuolaires qui sont généralement des hétérodimères, toutes les FEHs rapportées à ce jour sont des enzymes monomérique (De Coninck *et al.*, 2007). De même, il est possible que le substrat des FEHs, les fructanes, riches en résidus hydroxyles capables de piéger les molécules d'eau, protègent l'enzyme par la présence de nombreuses liaisons hydrogènes.

Le maintien de la respiration tissulaire serait responsable de la majorité des pertes métaboliques conduisant à une diminution des teneurs en sucres solubles (Muck *et al.*, 2003). Cette dégradation des sucres solubles pourrait être compensée en début de fanage par une production de photoassimilats puisque la photosynthèse peut se maintenir, pendant quelques heures dans les tissus exposés à la lumière (Muck *et al.*, 2003). Chez le ray-grass anglais, les concentrations en sucres solubles diminuent

pendant le fanage de 9 à 6 mg g⁻¹ MS par jour (Spoelstra et Hindle, 1989). Des résultats similaires sont rapportés chez l'avoine sur une période de séchage de 5 à 7 jours où le fanage conduit à une diminution des teneurs totales en sucres non structuraux de 24,8 à 21,3%, selon l'année. Cette réduction est plus prononcée dans les limbes (22,3 à 12, 2%) que dans les tiges gainées (30,2 à 23,9%) (Rebolé *et al.*, 1996). La respiration tissulaire peut se poursuivre jusqu'à ce qu'elle soit bloquée par une baisse drastique des concentrations en eau (≤ 300 g kg⁻¹ matière fraîche) (McGechan, 1990). Cela pourrait être également le cas dans notre étude, quand le contenu en amidon dans les limbes arrête de décroître (à la lumière ou à l'obscurité à 20°C) au moment où la matière sèche atteint des concentrations de l'ordre de 300 mg g⁻¹ MF. Par ailleurs, plusieurs enzymes de dégradation des fructanes ont été récemment clonées et caractérisées chez la fléole des prés (Tamura *et al.*, 2011; Ould Ahmed *et al.*, chapitre V.3). Le suivi de l'expression de deux de ces gènes après la fauche montre que le niveau des transcrits augmente au cours des premières heures d'entreposage lorsque les tissus sont récoltés au stade épiaison. L'activité SST suivie pendant le fanage a tendance à diminuer dans les feuilles et les tiges sans doute comme réponse immédiate à la fauche. Dans les feuilles d'orge, Obenland *et al.* (1991) ont montré que la SST est continuellement soumise à la protéolyse et que le maintien de son activité exige la synthèse *de novo* de l'enzyme. La baisse de l'activité SST dans les tissus en fenaison pourrait donc s'expliquer par une protéolyse intense. La stabilité des concentrations en fructanes, en particulier dans les tissus récoltés au stade anthèse, ne peut être attribuée à un maintien de l'activité SST et serait due, au moins pendant les premières heures, à la réponse des tissus au stress engendré par la fauche et aux pertes en eaux qui limiteraient l'activité des FEHs.

VI.2.3. Fructanes et stress cellulaire pendant le fanage

Une observation commune dans les mécanismes de déshydratation chez les plantes est l'accumulation d'osmolytes, hydro-rétenteurs, tels que certains acides aminés, le saccharose ou les fructanes (Bray, 1997). Il n'est pas impossible que ces mécanismes soient mis en place après le stress engendré par la fauche dans les tissus aériens et par l'augmentation rapide de la teneur en matière sèche. A l'inverse des teneurs en protéines et en amidon, qui chutent de manière négativement corrélées à l'augmentation de la matière sèche, les teneurs en fructanes restent globalement stables. La préservation des fructanes en début de fanage pourrait être associée à la réponse de la plante au stress hydrique. En effet les fructanes s'accumulent chez les plantes soumises à la sécheresse ou au gel (Volaire et Lelièvre, 1997; Livingston et Henson, 1998; Gaudet *et al.*, 1999; Amiard *et al.*, 2003a). Valluru et Van den Ende (2008) formulent l'hypothèse que les fructanes de faibles DP pourraient protéger *in vivo* les membranes cellulaires par association avec les phospholipides de la membrane plasmique. Une autre étude montre également que les fructanes et le saccharose sont accumulés pendant un stress hydrique sévère chez la fétuque (Clark *et al.*, 2004). D'un autre point de vue, le maintien des concentrations en fructanes dans les parties aériennes en début de fanage pourrait résulter de la séparation entre les tissus source de carbone (les tissus récoltés) et les tissus puits de carbone que sont les racines et la base des parties aériennes. En effet, le modèle généralement utilisé pour l'étude du métabolisme des fructanes chez les monocotylédones est celui des feuilles excisées placées dans l'eau permettant d'induire le métabolisme des fructanes à la lumière (Cairns et Ashton, 1993). Au regard de ces expériences, les fructanes devraient avoir tendance à s'accumuler en conditions d'illumination pendant le fanage. Notre étude montre que cela n'est pas toujours le cas et suggère que les pertes en carbone dépendraient plutôt du maintien de la respiration tissulaire en fonction des conditions de fanage (éclairage, température, humidité relative).

VI.2.4. Valeur bromatologique du fourrage frais et conservés; lien avec les concentrations en fructanes

Les sucres non structuraux – principalement les fructanes – jouent un rôle important dans la qualité du fourrage au côté des autres sucres liés aux parois qui correspondent aux fibres dites ADF et NDF (respectivement « Acid Detergent fibers » et « Neutral Detergent Fiber »), qui interviennent aussi dans la digestibilité. Les teneurs en sucres non structuraux sont ainsi bien corrélées à la formation d'acides gras volatiles dans le rumen (Murphy *et al.*, 1982) notamment pendant les premières phases de lactation chez les ovins (Mele *et al.* 2005). Les ruminants préfèrent généralement l'herbe coupée en fin de journée, pour sa haute palatabilité, ayant accumulé des teneurs maximales en sucres solubles (Burritt *et al.*, 2005). De même, l'augmentation des teneurs en sucres solubles chez des cultivars améliorés de ray-grass anglais sont bien associées à une efficacité accrue d'utilisation de l'herbe dans le rumen et à une augmentation de la production laitière (Miller *et al.*, 2001). Les fructanes peuvent constituer par ailleurs un apport d'énergie substantielle nécessaire pour une utilisation efficiente de l'azote ingéré, réduisant ainsi les pertes azotées et les émissions de méthane par l'animal.

Plusieurs facteurs affectent les teneurs en sucres chez la plante et subséquemment la valeur nutritive du fourrage, pendant sa conservation sous forme de foin ou d'ensilage, et en aval la productivité animale. Ces facteurs peuvent être classés en facteur pré-récolte et facteurs post-récolte selon la terminologie utilisée par Buxton et Muck (2003). Les facteurs pré-récolte concernent les intrants azotés, la fertilité des sols, le stade de développement et le régime des coupes (« harvest management ») auxquels peuvent s'ajouter les facteurs environnementaux comme la température, les radiations efficaces pour la photosynthèse, la disponibilité en eau, ainsi que la présence ou non, d'insectes ravageurs ou de champignons nuisibles qui

affectent le métabolisme des plantes. Les facteurs post-récolte concernent la fauche, le fanage, l'andainage et l'entreposage sous forme de foin ou d'ensilage (Buxton et Muck, 2003). Les conditions d'ensoleillement pendant le fanage permettant une poursuite momentanée de la photosynthèse peuvent affecter les concentrations des métabolites respiratoires comme le glucose et l'amidon. A l'inverse, une humidité importante pendant le fanage, due aux précipitations, peut occasionner des pertes de nutriments et l'apparition de moisissures lors des étapes ultérieures.

Au vu de nos résultats et de ceux d'autres travaux cités en la matière (notamment Kemble et MacPherson, 1954; Spoelstra *et al.*, 1989; Obenland *et al.*, 1991; Rebolé *et al.*, 1996), il semble que le fanage réalisé à des températures voisines de 20°C, puisse avoir un impact positif sur les teneurs en sucres solubles ainsi que sur la stabilisation des teneurs en protéines et en amidon dès que la matière sèche dépasse le seuil des 40 %, sans doute par arrêt de la respiration tissulaire, et ceci pendant les 24 premières heures après la fauche. Il n'est cependant pas impossible que des hydrolyses enzymatiques puissent se poursuivre au-delà de cette période (comme le suggèrent les activités FEH détectées 24h après la fauche). De l'hydrolyse spontanée, due à un regain d'humidité, peut également occasionner des pertes en sucres solubles pendant le fanage (phénomène de réhumectation durant la nuit, apparition de rosée, etc). Ainsi, Rebolé *et al.*, (1996) observent des pertes en sucres non structuraux, de 21 à 30% entre l'herbe fraîche et le foin chez l'avoine (après 5 à 7 jours de fanage).

Merry *et al.* (1995) observent une hydrolyse des fructanes dans les tissus stérilisés et mis en silos expérimentaux. L'activité d'hydrolyse, au moins pendant les premières 48 heures peut être ainsi imputable aux enzymes de la plante (Merry *et al.*, 1995). Winters *et al.* (1998) observent cependant que la dégradation des fructanes est plus fortes dans les silos traités par des inoculants bactériens possédant une capacité à dégrader les fructanes de la plante que dans ceux qui ne le sont pas ce qui conduit à une fermentation plus efficace des sucres solubles par les bactéries lactiques. Pendant le processus d'ensilage, les fructanes doivent être rapidement dégradés pour permettre

une fermentation bactérienne efficace nécessaire à la conservation du fourrage mais il doit en rester suffisamment dans les tissus pour contribuer significativement à leur valeur nutritive. Conaghan *et al.* (2011) proposent ainsi l'utilisation de cultivars améliorés, riches en sucres solubles pour améliorer d'une part le processus d'ensilage et d'autre part la qualité nutritive du fourrage. L'identification de nouvelles enzymes de dégradation des fructanes, et leur utilisation comme marqueurs de sélection chez la fléole des prés pourrait constituer une autre voie d'amélioration permettant d'obtenir de nouveaux cultivars avec des FEHs plus efficaces pour assurer une mobilisation rapide des fructanes en début d'ensilage.

VI.3. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX GENES CODANT DES FEHs CHEZ LA FLEOLE DES PRES.

VI.3.1. Recherche et identification de nouveaux gènes codant des FEHs

La teneur en fructanes dans la plante est déterminée par l'action concertée des activités de synthèse (FTs) et d'hydrolyse (FEHs). Une première enzyme de synthèse a été clonée et caractérisée chez la fléole, il s'agit d'une sucrose:fructane 6-fructosyltransférase (6-SFT) possédant une activité sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase (1-SST) capable de produire des fructanes de haut DP (≥ 40) (Tamura *et al.*, 2009). Une première FEH a aussi été récemment clonée chez cette espèce à partir de tissus du collet et caractérisée fonctionnellement. Il s'agit d'une 6-FEH (Tamura *et al.*, 2011). La présente étude a permis d'identifier de nouvelles FEHs, actives dans les parties aériennes récoltées grâce à une approche génomique pour la recherche de nouveaux gènes. Les gènes identifiés ont ensuite été exprimés dans un système eucaryote adéquat pour leur caractérisation fonctionnelle.

La stratégie utilisée a consisté à construire une banque d'ADNc à partir d'ARN poly-A extraits de tiges et de limbes de fléole prélevés 5 cm au-dessus du collet. Le criblage a été réalisé grâce à différentes sondes homologues (fragments obtenus par RT-PCR chez la fléole) ou hétérologues (Lp1-FEHa de ray-grass). Quatre gènes différents codant des FEHs putatives ont ainsi été obtenus. Ces gènes possèdent les caractéristiques de la famille 32 des glycosides hydrolases à laquelle appartiennent les FEHs et les invertases pariétales, avec la présence des motifs caractéristiques de l'activité β -fructosidase (NDPNG, FRDP et WECPD). Les séquences présentent par ailleurs de fortes homologues avec celles des FEHs de Poacées connues, notamment celles de FEHs de blé (Ta6-FEH AM75205 et Ta6-FEH AB089271) et celle de la FEH de fléole identifiée par Tamura *et al.* (2011; Pp 6FEH1 AB 58355). Trois de ces séquences ont pu être clonées avec succès dans un système d'expression hétérologue, à savoir la levure *Pichia pastoris*, et deux ont pu être fonctionnellement caractérisées à ce jour. Les résultats sont présentés au chapitre 3 des résultats de cette thèse.

En effet, après le défi que constituent l'identification et le clonage de ces gènes, une autre difficulté réside dans le choix d'un système d'expression adéquat permettant de synthétiser l'enzyme dans des conditions proches de celles qui existent *in planta*. Les systèmes d'expression eucaryotes généralement retenus dans la littérature sont les cellules d'insectes, les cellules de hamster chinois (lignée *CHO*), les protoplastes de tabac ou les levures. Certaines présentent des désavantages comme celui de posséder une activité invertase endogène pouvant interférer avec les mesures d'activité de la protéine recombinante, d'exprimer de manière transitoire le produit du gène, ou de ne pas produire la protéine en quantité importante. La levure méthylotrophe *Pichia pastoris* a l'avantage de ne pas posséder d'invertase, de ne pas contenir de fructanes à l'état sauvage et de pouvoir sécréter des quantités importantes de protéines dans le milieu de culture. En outre, les motifs de N-glycosylation chez la levure sont assez proches des végétaux. Il peut arriver cependant que la protéine recombinante ne présente pas exactement les mêmes propriétés que la protéine native

(Cereghino et Cregg, 2000) mais ce système d'expression hétérologue est utilisé avec succès pour l'expression fonctionnelle des FEHs (Van den Ende *et al.*, 2003b).

VI.3.2. Analyse fonctionnelle de deux nouvelles FEHs possédant une activité invertase

Deux FEHs ont pu ainsi être fonctionnellement caractérisées grâce à leur expression dans *Pichia pastoris*. Les clones correspondants (Pp1&6-FEH1 et PpFEH-INV1) codent des protéines possédant respectivement 568 et 582 acides aminés, avec 5 et 7 sites de glycosylation et des points isoélectriques estimés respectivement à 6,14 et 4,83. Ils possèdent tous les deux des séquences correspondant à un peptide signal de sécrétion. Les trois acides aminés (NDPNG, FRDP et WECPD) forment la triade catalytique caractéristique de la famille 32 des glycosides hydrolases (Lammens *et al.*, 2009). Les séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques présentent 77% et 50% d'identité avec la première FEH précédemment identifiée par Tamura *et al.* (2011), la Pp6-FEH1. L'analyse phylogénétique montre que les gènes appartiennent à deux sous-groupes: Pp1&6-FEH1 est proche de Pp6-FEH1, Ta6-FEH et de plusieurs invertases pariétales tandis que PpFEH-INV1 appartient au sous-groupe qui inclut la majorité des FEHs de monocotylédones.

La protéine recombinante produite à partir du premier clone présente une forte activité d'hydrolyse pour le 1-kestotriose (substrat préférentiel) ainsi qu'une activité importante d'hydrolyse des lévanes d'*Erwinia herbicola*, longs polymères à liaison $\beta(2-6)$, et des phléines (fructanes extraits chez la fléole possédant une majorité de liaisons $\beta(2-6)$). C'est la raison pour laquelle la FEH correspondante a été nommée Pp1&6-FEH1. La protéine possède aussi une activité non négligeable d'hydrolyse du saccharose. La protéine recombinante produite à partir du second clone présente une forte activité d'hydrolyse des phléines (substrat préférentiel). De manière surprenante la protéine produite a aussi une activité invertasique importante qui représente

environ 80% de celle obtenue en présence de phléine. La protéine a donc été nommée Pp6-FEH-INV1, en raison de son importante activité d'hydrolyse du saccharose. Ces deux FEHs de fléole sont ainsi les premières FEHs végétales identifiées à posséder une activité invertase importante chez une espèce accumulatrice de fructanes. Une autre enzyme du même type a été identifiée chez *Lolium perenne* mais les résultats ne sont pas publiés (Lothier Jérémy, communication personnelle).

VI.3.3. FEHs à activité invertase ou invertases à activité FEH ?

Les FEHs présentent des caractéristiques communes, à savoir un pH optimal situé entre 4,5 et 5,6, une température optimale comprise entre 25°C et 40°C et pour la plupart d'entre elles une inhibition plus ou moins forte par le saccharose (Simpson et Bonnett, 1993; De Coninck *et al.*, 2007).

Certaines invertases vacuolaires sont capables d'hydrolyser non seulement le saccharose, mais également les fructanes. Chez *Lolium perenne* la LpFT2 est une invertase vacuolaire capable d'hydrolyser, en plus du saccharose, le 1-kestotriose, le 1,1-kestotétraose et le 1,1,1-kestopentaose en libérant du glucose et du fructose (Johnson *et al.*, 2003). Il en est de même chez le riz, une espèce qui n'accumule pas de fructanes, où deux invertases vacuolaires montrent également une activité FEH (Ji *et al.*, 2007). Inversement sur six invertases d'*Arabidopsis*, deux (AtcwINV3 et AtcwINV6) sont en fait des FEHs *sensu stricto* et n'hydrolysent pas le saccharose (De Coninck *et al.*, 2007). Il en est de même de toutes les FEHs identifiées à ce jour qui sont incapables d'hydrolyser le saccharose (Simpson et Bonnett 1993; Lammens *et al.*, 2009). Le saccharose est par ailleurs reconnu comme inhibiteur compétitif de l'activité FEH chez plusieurs espèces (Van den Ende *et al.*, 2001; 2003a) et interviendrait également dans les voies de signalisation réprimant l'activité FEH chez *Lolium perenne* (Lothier *et al.*, 2007; 2010). La résolution de la structure tridimensionnelle de l'invertase pariétale d'*Arabidopsis* apporte de nouveaux

éléments de réponse sur la distinction entre FEH et invertase (Lammens *et al.*, 2009). En effet, une seule substitution sur l'acide aspartique 239, par mutagenèse dirigée, transforme l'invertase pariétale 1 d'*Arabidopsis* (AtcwINV1) en une 1-FEH dégradant préférentiellement le 1-kestotriose suggérant qu'une mutation des invertases pariétales serait à l'origine de leur inaptitude à dégrader le saccharose, aboutissant aux FEHs. L'absence ou la présence de cet acide aminé favorisant les interactions hydrophobes au niveau du site actif s'avère ainsi importante pour la fixation et l'hydrolyse du saccharose. La PpFEH-INV1 possède bien l'asparagine dans la région 239, lui conférant probablement l'activité invertase observée. Cet acide aminé est remplacé par une valine chez Pp1&6FEH1 et par une méthionine chez la première FEH de fléole (Tamura *et al.*, 2011). Si la présence de l'asparagine chez PpFEH-INV1 explique l'activité d'hydrolyse du saccharose, son absence chez Pp1&6FEH1 n'explique pas l'activité invertase observée (environ 40% quand elle est rapportée à celle du 1-kestotriose, son substrat préférentiel). La valine, substituant l'asparagine chez Pp1&6FEH, possède cependant un groupement isopropyle apolaire, qui pourrait favoriser les interactions hydrophobes au niveau du site actif.

Simpson et Bonnett dans leur revue de 1993 sur les FEHs d'herbacées, citant Avigad et Bauer (1966), rapportent la possibilité d'existence de « non specific β -fructofuranosidase » capables d'hydrolyser le saccharose ainsi que les liens β -2,1 et β -2,6 des molécules de fructanes sans toutefois prouver leur existence. Le positionnement du substrat, ici le saccharose, dans la boucle du site actif, pourrait expliquer le comportement des FEHs non spécifiques. En effet, les acides aminés avoisinant cette région peuvent modifier la position de la boucle d'insertion facilitant ou pas la fixation du saccharose, notamment le tryptophane en position 82 ainsi que l'acide aminé en position 101. L'acide aminé en position 101 (X) du motif MLYTGX peut être une sérine ou une glycine, conduisant à une inhibition forte par le saccharose (cas des 1-FEH de blé, chicorée et ray-grass). Il peut cependant être remplacé par une valine (6-KEHw1 et w2 de blé), une arginine (6-FEH de blé), une

isoleucine (6-FEH d'*Arabidopsis* et de betterave), une leucine (6&1-FEH de blé et d'*Arabidopsis*) ou une glutamine (1-FEH de chicorée) aboutissant dans tous ces cas à une inhibition très faible par le saccharose (Van den Ende *et al.*, 2009). Toutes les FEHs possédant « un petit acide aminé » comme la leucine ou la sérine à cette position seraient ainsi fortement inhibées par le saccharose. Ces acides aminés agiraient par leur proximité spatiale sur le positionnement du tryptophane 82, modifiant son orientation, et du même coup la boucle permettant la fixation du résidu glucosyl du saccharose (voir Figure II.9 dans la synthèse bibliographique). La facilité de positionnement du résidu glucosyl du saccharose semble déterminante sur l'effet inhibiteur de ce dernier conduisant à une « configuration inhibitrice » ou non (Van den Ende *et al.*, 2009). Dans notre cas, la Pp1&6FEH possède le tryptophane et l'isoleucine permettant un bon positionnement du saccharose en position d'hydrolyse, expliquant sans doute l'activité invertase observée. Pour la PpFEH-INV, on note la présence du tryptophane et de la glycine, la présence de ce dernier étant supposée inhibitrice, mais la présence également de l'asparagine 239 (absente chez Pp1&6FEH) semble plus prépondérante, expliquant probablement la forte activité invertase observée.

In fine, la présence d'un couple fonctionnel **Asp/Lys** ou **Asp/Arg**, détermine la sélectivité envers le saccharose comme substrat donneur dans la famille GH32 (Lammens *et al.*, 2009; Van den Ende *et al.*, 2009). En particulier, toute enzyme capable d'utiliser le saccharose comme substrat donneur (1-SST, 6-SFT, invertase vacuolaires et pariétales), dites de type S, contient ce couple, alors qu'il est absent chez les enzymes dites de types F (FEHs, 1FFT et 6^G-FFTs) ayant une molécule de fructane comme substrat donneur. Certaines FEHs présentes chez les plantes qui n'accumulent pas de fructanes comme *Arabidopsis* sont ainsi considérées comme des « invertases défectives » ayant perdu l'aptitude à hydrolyser le saccharose par mutation sur l'asparagine de la région 239 (Le Roy *et al.*, 2007; Van den Ende *et al.*, 2009). Dans le contexte des FEHs non spécifiques, il est possible que la conformation

de la boucle du site actif favorise les interactions hydrophobes et le relais de charge aboutissant au clivage, pour le saccharose ainsi que pour des molécules de DP plus élevés, sans effet inhibiteur du saccharose en raison d'une configuration qui reste à éclaircir. Par ailleurs, l'inhibition par le saccharose pourra être testée par caractérisation moléculaire de l'activité enzymatique en présence de différentes concentrations en saccharose et fructanes et l'établissement du comportement des cinétiques par des représentations de type Lineweaver-Burk ou Eady-Hoftsee.

En outre, au vu de la spécificité des FEHs, qui diffèrent des FTs par le donneur (saccharose ou fructane) et l'accepteur (fructane, saccharose ou eau) envers les liens $\beta(2-1)$ ou $\beta(2-6)$ du polymère, les FEH de la famille enzymatique EC.3.2.1.80 (exoinulinases; <http://www.cazy.org/>) ont été reclassées dans deux nouvelles familles; EC.3.2.1.153 pour les 1-FEHs et EC.3.2.1.154 pour les 6-FEHs (De Coninck *et al.*, 2005; 2007). Les deux FEHs de fléole que nous avons caractérisées hydrolysent à la fois les liaisons $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$. Elles sont donc difficiles à classer dans l'une ou l'autre de ces nouvelles familles.

VI.3.4. Rôles possibles et implications des “FEHs non spécifiques”

Les enzymes capables d'hydrolyser à la fois le substrat (saccharose) et les produits (fructanes) des FTs pourraient avoir un rôle différent de celui des autres FEHs. Un premier rôle de ces FEHs serait de participer à la régulation des concentrations vacuolaires en saccharose, en complément des invertases, dans les parties aériennes de la plante, cette régulation pouvant être liée au statut carboné de la cellule. La présence probable des différentes activités enzymatiques liées à la synthèse et à la dégradation des fructanes dans le même compartiment cellulaire, la vacuole, suggère en effet qu'il doit exister *in vivo* une régulation fine de ces activités. Le saccharose pourrait agir en tant que molécule « signal » (Halford et Paul, 2003) régulant le niveau d'expression des FEHs (Lothier *et al.*, 2010) et les FEHs non

spécifiques pourraient en retour hydrolyser le saccharose, en plus des invertases, et seraient un levier de plus à la régulation de ce dernier.

Un deuxième rôle pourrait concerner les relations plante-pathogènes ou les relations de commensalité avec les bactéries et les champignons endophytes de la plante. Les fructanes bactériens et fongiques contiennent en effet les deux types de lien, $\beta(2-1)$ ou $\beta(2-6)$. Tout comme les chitinases et autres β -glucanases qui dégradent les sucres à la surface des membranes cellulaires des pathogènes, empêchant ainsi leur reconnaissance, il est suggéré que les FEHs pourraient jouer un rôle important dans les mécanismes de défense (Van den Ende *et al.*, 2004) et correspondre à des PR protéines (Roitsch et González, 2004). La présence de FEHs chez des espèces non productrice de fructanes comme *Arabidopsis* ou la betterave, ainsi que la présence de FEHs non spécifiques chez la fléole permettrait d'empêcher la production de fructanes de DP élevés par les lévanesucrases bactériennes reconnues comme étant toxiques pour les plantes non accumulatrices de fructanes (Cairns, 2003).

D'un autre point de vue, les FEHs identifiées ici dans les parties aériennes de la fléole, différentes de celle identifiées dans le collet (Tamura *et al.*, 2011), pourraient être impliquées dans la redistribution des flux de carbone entre tissus et organes pendant la croissance. Chez la carotte par exemple, l'expression des invertases pariétales est régulée pendant le développement de façon différentielle selon les organes. Ainsi, les quantités de transcrits sont élevées dans les racines primaires pendant la maturation alors que des quantités plus faibles de transcrits se retrouvent dans les racines secondaires, les tiges et les feuilles (Sturm *et al.*, 1995). De même, les invertases acides vacuolaires semblent être régulées de manière différente, s'exprimant surtout dans les racines et le tubercule chez cette espèce. Chez la fléole, la PpFEH-INV1 semble s'exprimer de manière plus importante, d'un facteur de 1 à 3, dans les entrenœuds basaux (haplocorms) et dans les tiges (en dessous de 5 cm) par rapport aux racines et aussi aux autres tissus aériens qui ont servi à leur identification (parties aériennes au-dessus de 5 cm). De manière similaire, la Pp1&6-

FEH1 s'exprime préférentiellement dans les tiges en dessous de 5 cm d'un facteur d'environ 4 à 6 par rapport à la base des feuilles en croissance ou de 3 par rapport aux tissus aériens au-dessus de 5 cm. Ces deux enzymes pourraient ainsi avoir un rôle de régulation des teneurs en fructanes dans ces tissus (base des tiges) par hydrolyse aléatoire du substrat d'initiation de la synthèse (saccharose) et par hydrolyse de manière indifférenciée des liens $\beta(2-1)$ et $\beta(2-6)$ contribuant au contrôle des flux de carbone entre les tissus aériens source, photosynthétiquement actifs, et les tissus puits (base des feuilles en croissance et racines). Par ailleurs, l'existence d'une activité invertase par les FEHs non spécifiques de la plante peut constituer une voie de recours pour la dégradation du saccharose, en cas d'inhibition des invertases classiques par des inhibiteurs *in planta*. Il semble en effet que les inhibiteurs spécifiques des invertases chez la plante n'affectent pas les enzymes du métabolisme des fructanes (Kusch *et al.*, 2009), les FEHs non spécifiques pourraient constituer ainsi une voie parallèle de régulation des teneurs en saccharose.

VII. PERSPECTIVES DE RECHERCHE

VII. PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Plusieurs perspectives scientifiques s'ouvrent à l'issue de cette thèse. Elles peuvent être abordées dans un cadre purement agronomique, notamment pour les teneurs en sucres pendant les stades de développement, ou encore l'effet du fanage sur l'ensilage, mais aussi au niveau physiologique ou même moléculaire pour ce qui concerne les relations structure/fonction des nouvelles enzymes identifiées chez la fléole des prés.

VII.1. FACTEURS AFFECTANT LES TENEURS EN FRUCTANES PENDANT LA CROISSANCE

Le chapitre 1 de cette thèse apporte de nouveaux éléments sur l'accumulation des fructanes et des autres sucres non structuraux pendant la croissance de la fléole. Dans nos conditions de culture, la réduction de la fertilisation de 3,75 à 0,375 mM de NH_4NO_3 n'a eu d'effet ni sur les concentrations en fructanes, ni la biomasse des tissus fauchés. De façon à réduire les coûts environnementaux et financiers des intrants, l'effet de la diminution de la fertilisation azotée mérite d'être plus approfondi pour déterminer le niveau de fertilisation azotée en deçà duquel les concentrations en fructanes augmentent.

De même, l'effet des signaux hormonaux sur le métabolisme des fructanes chez la fléole pendant la croissance pourrait être évalué. Des résultats chez le blé indiquent que l'acide abscissique pourrait jouer un rôle majeur dans la régulation du métabolisme des fructanes par son action à la fois sur l'expression des FTs ainsi que des FEHs (Yang *et al.*, 2004; Ruuska *et al.*, 2008). La fauche, tout comme la défoliation constituant une blessure pour la plante, certaines phytohormones comme le jasmonate et l'éthylène pourraient intervenir dans la régulation du métabolisme des sucres.

De même, la photopériode et l'intensité lumineuse sont des facteurs importants qui influencent les teneurs en fructanes chez les Poacées (Pollock et Lloyd, 1987; Perilleux, 1997) et leur impact sur l'accumulation des fructanes dans les tissus récoltés chez la fléole pourrait être étudié. Des travaux récents indiquent que les conditions d'illumination affectent la régulation des transporteurs de saccharose chez le ray-grass anglais (Furet *et al.*, 2012) pouvant ainsi influencer les teneurs en fructanes via la disponibilité du saccharose pour initier la synthèse.

VII.2. LES FRUCTANES ET L'ENSILAGE

En ce qui concerne l'ensilage, le suivi de la dégradation des fructanes par les enzymes de la plante (à l'exclusion de l'hydrolyse d'origine microbienne) peut être réalisé en silos expérimentaux, à partir du matériel déjà fané à 40 % MS ou pour différentes teneurs en matière sèche permettant d'évaluer les pertes en sucre à différents intervalles de temps et pour différents traitements (après stérilisation, après inoculation par des bactéries lactiques ou non). Des silos expérimentaux en sachets sous vide peuvent être réalisés avec une quantification en entrée et en sortie des principaux paramètres de conservation comme le pH, le pouvoir tampon et la teneur en protéines solubles (qui est un bon indicateur de la protéolyse pendant l'ensilage), en parallèle des concentrations en sucres solubles. D'un point de vue microbiologique, l'utilisation efficace des fructanes par les bactéries lactiques est déterminante pour une bonne qualité de l'ensilage, mais seulement 2 à 5% des bactéries lactiques sont capables de métaboliser les fructanes (Merry *et al.*, 1995; Winters *et al.*, 1998). En effet, l'utilisation des Fructo-Oligosaccharide-Saccharides (FOS) chez les bactéries, en plus de la dégradation, implique des mécanismes de transport du fructose de type PTS (Phospho-Transferase System) ou ABC (ATP Binding Cassette) induits par le substrat en plus de la facilitation par proton symport. Ces gènes, organisés sous la forme d'un opéron *fos*, ont été mis en évidence chez

Lactobacillus paracasei. Le transport est régi par les gènes *fosABCDX* tandis que la β -fructanosidase est sous le contrôle de *fosE*. Ces gènes sont soumis à une répression catabolique en présence de glucose et sont co-transcrits en un seul ARN (Goh *et al.*, 2006). Des fructanases dépendantes d'un autre gène, *fruA*, ont également été mises en évidence chez *Bacteroides fragilis* (Blatch et Woods, 1993). Ainsi, une action rapide des enzymes d'hydrolyse des fructanes de la plante en début d'entreposage ainsi que des enzymes bactériennes permet la libération du fructose et l'amorçage par les lactobacilles de la production de lactate conduisant à un abaissement rapide du pH. Cette chute rapide du pH est une condition importante pour un bon déroulement de l'ensilage évitant la prolifération nuisible des champignons et spores butyriques pendant la conservation (Winters *et al.*, 1998). Il peut donc s'avérer important de cerner les facteurs limitant la libération du fructose, en début d'ensilage, ainsi que l'impact de la dégradation par les FEHs des plantes et de la durée de leur action sur du fourrage directement ensilé après coupe (donc de tissus frais à anaérobiose directe) ou ensilé après fanage.

VII.3. CARACTERISATION DE NOUVELLES FEHs CHEZ LA FLEOLE DES PRES

A l'issue de cette thèse, la poursuite de la caractérisation des gènes clonés s'avère importante. Il faudrait à court terme caractériser d'un point de vue fonctionnel les deux autres gènes identifiés chez la fléole dont l'alignement avec les autres FEHs montre des différences, notamment certaines substitutions *snp* (single nucleotide polymorphisme) et la présence de codons stop en début de séquence qui peuvent apporter de nouvelles informations sur la régulation des FEHs. De plus, il est important de vérifier que toutes les activités de dégradation des fructanes *in planta* ont bien été isolées afin de détecter les enzymes clés du métabolisme des fructanes chez la fléole des prés sachant que chez le blé, sept FEHs différentes ont été clonées

et caractérisées à ce jour (Van den Ende *et al.*, 2003a et b; Kawakami *et al.*, 2005; Van den Ende *et al.*, 2005; Van Riet *et al.*, 2008).

VII.4. REGULATION DE L'ACTIVITE FEH

La compréhension des mécanismes de régulation des FEHs doit prendre en considération l'ensemble des isoformes qui participent à cette activité afin d'évaluer l'importance de chacune pour la physiologie de la plante. Les travaux de Jérémy Lothier sur le ray-grass (Lothier, 2007; Lothier *et al.*, 2007) indiquent que l'activité FEH est régulée au niveau post-transcriptionnelle, même si les mécanismes mis en jeu restent à éclaircir. Il peut aussi bien s'agir d'une régulation de la stabilité des ARNm, d'une modulation de la traduction ou d'une régulation post-traductionnelle par phosphorylation/déphosphorylation ou contrôle redox. Par ailleurs, il est maintenant bien admis que les invertases sont régulées, en partie, par des inhibiteurs protéiques de faible masse moléculaire (Rausch et Greiner, 2004). Ce processus est modulé par des cations divalents qui activent l'inhibition et par le saccharose qui lève l'inhibition. Les inhibiteurs d'invertases seraient impliqués dans le contrôle de l'activité invertase, lors des transitions source/puits (Roitsch et González, 2004) et comme ces inhibiteurs ne semblent pas affecter les enzymes du métabolisme des fructanes (Kusch *et al.*, 2009), il pourrait être intéressant de voir leur action sur les FEHs non spécifiques qui dégradent le saccharose. De même, l'effet des inhibiteurs de la transcription (comme l' α -amanitine, inhibiteur de la transcription bloquant l'ARN polymérase II) ou des inhibiteurs de la traduction (comme le cycloheximide) peuvent être testés en suivant l'évolution de l'activité FEH ainsi que le niveau des transcrits dans des conditions où l'activité FEH augmente. L'obtention d'anticorps spécifiques reconnaissant les FEHs peut apporter des éléments de réponse. Ces anticorps pourraient aussi permettre de localiser les FEHs (vacuolaires, apoplastiques) précisant de ce fait leurs fonctions physiologiques. Cependant, en

raison de la proximité des séquences peptidiques des FEHs entre elles, il est *a priori* difficile d'obtenir des anticorps spécifiques pour chaque enzyme. Néanmoins, l'obtention d'anticorps pouvant reconnaître indistinctement les FEHs, couplés avec une technique séparative comme l'électrophorèse bidimensionnelle, pourrait permettre d'estimer par exemple les quantités d'isoformes présentes pendant la croissance ainsi qu'avant et après fauche.

VII.5. MARQUEURS MOLECULAIRES ET SELECTION VARIETALE

Comme vu précédemment, l'augmentation des teneurs en fructanes chez la fléole présente plusieurs intérêts agronomiques. Les fructanes sont impliqués dans la repousse après défoliation et participent de ce fait à la pérennité de l'espèce, jouant ainsi sur le rendement des récoltes suivantes. Ils sont importants pour les processus de conservation du fourrage comme l'ensilage. Enfin, ils améliorent la production carnée et laitière en augmentant l'efficacité d'utilisation de l'azote par l'animal. Par ailleurs, les fructanes sont également impliqués dans la tolérance aux stress abiotiques. Aussi, un objectif majeur de la sélection variétale est de produire des variétés riches en sucres solubles et en fructanes pouvant être intéressantes pour l'ensilage et la production animale. Les gènes codant les enzymes du métabolisme des fructanes pourraient fournir à l'avenir des marqueurs moléculaires pour la sélection variétale, corrélés avec des teneurs élevées en fructanes conduisant à une meilleure valeur nutritive, une meilleure capacité de repousse et une bonne résistance aux stress abiotiques. Par exemple, l'augmentation des teneurs en fructanes chez le blé pendant la croissance est parallèle à l'augmentation du niveau des transcrits des gènes 1-FEHw1, 1FEHw2 et 1 FEHw3 (Zhang *et al.*, 2008). L'induction de l'expression des 1-FEHs permet de mobiliser les réserves pendant le remplissage du grain et les auteurs de cette étude proposent d'utiliser ces gènes comme marqueurs de sélection. Dans le contexte de l'ensilage, il serait aussi intéressant de tester l'hypothèse selon

laquelle les nouveaux gènes clonés, et surtout PpFEH-INV1, pourraient permettre une utilisation efficace des fructanes en début d'ensilage du fait de sa double fonctionnalité. Si tel est le cas, il pourrait alors servir de marqueur moléculaire pour sélectionner des variétés enrichies en cette activité.

II.6. IMPACTS ENVIRONNEMENTAUX

La sélection de variétés de fléole des prés riches en sucres grâce à une meilleure compréhension des mécanismes d'accumulation, ainsi que l'amélioration des bonnes pratiques de conservation du fourrage, sous forme de foin ou d'ensilage, devraient contribuer à réduire les impacts sur l'environnement de la production animale. De plus, une utilisation efficiente de l'herbe évite le recours aux suppléments alimentaires coûteux, fournis sous forme de "grains", qui augmentent les bilans de carbone sur la production bovine, alors que l'herbe accumule gratuitement le CO₂, sans interférence avec l'alimentation humaine (maïs grain, blé, orge, etc). En outre, le fanage de l'herbe réduit les effluents de l'ensilage qui peuvent polluer les cours d'eaux (Muck *et al.*, 2003).

D'un autre point de vue, l'analyse du cycle de vie (ACV) de la fléole pour la production de biogaz à partir de la biomasse semble montrer de bonnes perspectives pour la diminution des gaz à effet de serre (GES) par rapport aux énergies fossiles d'après une étude réalisée en Finlande (Tuomisto et Helenius, 2008). En effet les graminées pérennes présentent un grand potentiel pour la production de biogaz (Seppälä *et al.*, 2008). L'effet de la date de récolte sur le potentiel de production de méthane chez plusieurs herbacées montre des perspectives intéressantes de l'ordre de 0,17 à 0,49 m³ de méthane (CH₄) par kg de SVA (Solides Volatils ajoutés) et de 25 à 260 m³ de CH₄ par TPH (Tonnes de Poids Humide). Le topinambour, le trèfle rouge et la fléole des prés donnent les rendements potentiels de méthane les plus hauts, de 2900 à 5400 m³ de méthane par hectare (ha), correspondant à un rendement d'énergie

brut de 28 à 53 MWh (Mégawatt-heure par ha) (Lehtomäki *et al.*, 2008). Cependant, plusieurs défis restent à relever en la matière notamment en terme d'optimisation des coûts environnementaux et économiques des procédés de transformation, ainsi que de la valorisation des co-produits (Seppälä *et al.*, 2009).

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A**bbot IR and Matheson NK (1972) Starch depletion in germinating wheat, wrinkled-seeded peas and senescing tobacco leaves. *Phytochemistry* **11**: 1261-1272.
- Abrahamse PA, Vlaeminck B, Tamminga S and Dijkstra J** (2008) The effect of silage and concentrate type on intake behavior, rumen function, and milk production in dairy cows in early and late lactation. *Journal of Dairy Science* **91**: 4778-4792.
- Albrecht G, Mustroph A and Fox TC** (2004) Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots. *Physiologia Plantarum* **120**: 93-105.
- Allard G and Nelson CJ** (1991) Photosynthate partitioning in basal zones of tall fescue leaf blades. *Plant Physiology* **95**: 663-668.
- Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard JP, Huault C, Keller F and Prud'homme MP** (2003a) Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. *Plant Physiology* **132**: 2218-2229.
- Amiard V, Morvan-Bertrand A, Billard JP, Huault C and Prud'homme MP** (2003b) Fate of fructose supplied to leaf sheaths after defoliation of *Lolium perenne* L.: Assessment by ^{13}C -fructose labelling. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1231-1243.
- Asega AF and Carvalho MAM** (2004) Fructan metabolism in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial parts. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 313-319.
- Asega AF, do Nascimento JR, Schroeven L, Van den Ende W and Carvalho MA** (2008) Cloning, characterization and functional analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Cell and Physiology* **49**: 1185-1195.
- Ashikaga K, Tanaka T, Fujii H, Deguchi K and Iida K** (2012) Evaluating the genotype x nitrogen fertilization interaction on the nutritive value of the first crop of timothy (*Phleum pratense* L.) clones. *Grassland Science* **58**: 37-41.
- B**all S, Guan HP, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buléon A, Colomia P and Preiss J (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 349-352.
- Bancal BYP and Triboi E** (1993) Temperature effect on fructan oligomer contents and fructan-related enzyme activities in stems of wheat (*Triticum aestivum* L.) during grain filling. *New Phytologist* **123**: 247-253.

- Bancal P, Henson CA, Gaudillère JP and Carpita NC** (1991) Fructan chemical structure and sensitivity to an exohydrolase. *Carbohydrate Research* **217**: 137-151.
- Bancal P, Carpita NC and Gaudillere JP** (1992) Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytologist* **120**: 313-321.
- Banguela A and Hernandez L** (2006) Fructans: from natural sources to transgenic plants *Biotechnologia Aplicada* **23**: 202-210.
- Bélanger G and Richards JE** (1997) Growth analysis of timothy grown with varying N nutrition. *Canadian Journal of Plant Science* **77**: 373-380.
- Bélanger G and McQueen RE** (1998) Analysis of the nutritive value of timothy grown with varying N nutrition. *Grass and Forage Science* **53**: 109-119.
- Bélanger G, Michaud R, Jefferson PG, Tremblay GF and Brégaré A** (2001) Improving the nutritive value of timothy through management and breeding. *Canadian Journal of Plant Science* **81**: 577-585.
- Bélanger GR, Castonguay Y, Bootsma Y, Mongrain A and Ryan D** (2002) Climate change and winter survival of perennial forage crops in Eastern Canada. *Agronomy Journal* **94**: 1120-1130.
- Bélanger G, Castonguay Y, Bertrand A, Dhont C, Rochette P, Couture L, Drapeau R, Mongrain D, Chalifour FP and Michaud R** (2006) Winter damage to perennial forage crops in eastern Canada: causes, mitigation, and prediction. *Canadian Journal of Plant Science* **86**: 33-47.
- Bélanger G, Tremblay GF and Mongrain D** (2008) Yield and nutritive value of the spring growth of an ageing timothy sward. *Canadian Journal of Plant Science* **88**: 457-464.
- Belzile L** (1987) Effet de la présence de la fléole des prés sur la survie à l'hiver du trèfle rouge. *Canadian Journal of Plant Science* **67**: 1101-1103.
- Bernes G, Hetta M and Martinsson K** (2008) Effects of harvest date of timothy (*Phleum pratense*) on its nutritive value, and on the voluntary silage intake and liveweight gain of lambs. *Grass and Forage Science* **63**: 212-220.
- Bertrand A, Castonguay Y, Nadeau P, Laberge S, Michaud R, Bélanger G and Rochette P** (2003) Oxygen deficiency affects carbohydrate reserves in overwintering forage crops. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1721-1730.
- Bertrand A, Tremblay GF, Pelletier S, Castonguay Y and Bélanger G** (2008) Yield and nutritive value of timothy as affected by temperature, photoperiod and time of harvest. *Grass and Forage Science* **63**: 421-432.
- Bianchi G, Gamba A, Murelli C, Salamini F and Bartels D** (1991) Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Journal* **1**: 355-359.
- Bialeski RL** (1993) Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. *Plant Physiology* **103**: 213-219.

- Biggs DR and Hancock KR** (1998) In vitro digestion of bacterial and plant fructans and effects on ammonia accumulation in cow and sheep rumen fluids. *Journal of Genetic and Applied Microbiology* **44**: 167-171.
- Blatch GL and Woods DR** (1993) Molecular characterization of a fructanase produced by *Bacteroides fragilis* BF-1. *Journal of Bacteriology* **175**: 3058-3066.
- Blake JD, Clarke ML, Jansson PE and McNeil KE** (1982) Fructan from *Erwinia herbicola*. *Journal of Bacteriology* **151**: 1595-1597.
- Bolouri-Moghaddam MR, Le Roy K, Xiang L, Rolland F and Van den Ende W** (2012) Sugar signalling and antioxydant network connections in plant cells. *FEBS Journal* **277**: 2022-2037.
- Bonnett GD and Incoll LD** (1993) Effects on the stem of winter barley of manipulating the source and sink during grain-filling: II. Changes in the composition of water-soluble carbohydrates of internodes. *Journal of Experimental Botany* **44**: 83-91.
- Bonnett GD and Simpson RJ** (1995) Fructan exohydrolase activities from *Lolium rigidum* that hydrolyze beta-2,1- and beta-2,6-glycosidic linkages at different rates. *New Phytologist* **131**: 199-209.
- Bonnett GD, Shins IM, Simpson RJ and Cairns AJ** (1997) Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytologist* **136**: 11-17.
- Borland AM and Farrar JF** (1985) Diel patterns of carbohydrate metabolism in leaf blades and leaf sheaths of *Poa annua* L. and *Poa jemtlandica* (almq.). *New Phytologist* **100**: 519-531.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brady CJ** (1960) Redistribution of nitrogen in grass and leguminous fodder plants during wilting and ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **11**: 276-284.
- Bray EA** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**: 48-54.
- Buckler IES, Thornsberry JM and Kresovich S** (2001) Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genetical Research* **77**: 213-218.
- Buléon A, Colonna P, Planchot V and Ball S** (1998) Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **23**: 85-112.
- Burritt EA, Mayland HF, Provenda FD, Miller RL and Burns JC** (2005) Effect of added sugar on preference and intake by sheep of hay cut in the morning versus the afternoon. *Applied Animal Behaviour Science* **94**: 245-254.
- Buxton DR and Muck RE** (2003) *Silage science and technology*. Agronomy Monograph 42, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI, USA.

- Cai C, Zhao XQ, Zhu YG, Li B, Tong YP and Li ZS** (2007) Regulation of the high-affinity nitrate transport system in wheat roots by exogenous abscisic acid and glutamine. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 1719-1725.
- Cairns AJ and Ashton JE** (1993) Species-dependent patterns of fructan synthesis by enzymes from excised leaves of oat, wheat, barley and timothy. *New Phytologist* **124**: 381-388.
- Cairns AJ, Nash R, Machado de Carvalho MA and Sims IM** (1999) Characterization of the enzymatic polymerization of 2,6-linked fructan by leaf extracts from timothy grass (*Phleum pratense*). *New Phytologist* **142**: 79-91.
- Cairns AJ, Cookson A, Thomas BJ and Turner LB** (2002) Starch metabolism in the fructan-grasses: patterns of starch accumulation in excised leaves of *Lolium temulentum* L. *Journal of Plant Physiology* **159**: 293-305.
- Cairns AJ and Gallagher JA** (2004) Absence of turnover and futile cycling of sucrose in leaves of *Lolium temulentum* L.: implications for metabolic compartmentation. *Planta* **219**: 836-846.
- Cereghino JL and Cregg JM** (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 45-66.
- Chambert R, Treboul G and Dedonder R** (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* **41**: 285-300.
- Chang CW** (1979) Starch and its component ratio in developing cotton leaves. *Plant Physiology* **63**: 973-977.
- Chatterton NJ and Silvius JE** (1980) Photosynthate partitioning into leaf starch as affected by daily photosynthetic period duration in six species. *Physiologia Plantarum* **49**: 141-144.
- Chatterton NJ, Harrison PA, Bennett JH and Asay KH** (1989) Carbohydrate partitioning in 185 accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures. *Journal of Physiology* **134**: 169-179.
- Chatterton NJ, Harrison PA, Thornley WR and Draper EA** (1990) Oligosaccharides in foliage of *Agropyron*, *Bromus*, *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium* and *Phleum*. *New Phytologist* **114**: 167-171.
- Chatterton NJ, Harrison PA, Thornley WR and Bennett JH** (1993) Structure of fructan oligomers in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Journal of Plant Physiology* **142**: 552-556.
- Chatterton NJ and Harrison PA** (1997) Fructan oligomers in *Poa ampla*. *New Phytologist* **136**: 3-10.
- Cheplick GP and Chui T** (2001) Effects of competitive stress on vegetative growth, storage and regrowth after defoliation in *Phleum pratense*. *Oikos* **95**: 291-299.

- Claessens G, Van Laere A and De Proft M** (1990) Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.) *Journal of Plant Physiology* **136**: 35-39.
- Clare BW** (1953) Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. III. - Carbohydrate breakdown during wilting and ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **4**: 527-531.
- Clark BJ, Prioul JL and Coudere H** (1997) The physiological response to cutting in Italian ryegrass. *Journal of the British Grassland Society* **32**: 1-15.
- Clark GT, Zuther E, Outred HA, McManus MT and Heyer AG** (2004) Tissue-specific changes in remobilisation of fructan in the xerophytic tussock species *Festuca novae-zelandiae* in response to a water deficit. *Functional Plant Biology* **31**: 377-389.
- Conaghan P, O'Kiely P and O'Mara FP** (2011) Possibilities of increasing the residual water-soluble carbohydrate concentration and aerobic stability of low dry-matter perennial ryegrass silage through additive and cultivar use. *Grass and Forage Science* **67**: 177-198.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G and El Amrani A** (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 449-459.
- Cummins B, O'Kiely P, Keane MG and Kenny DA** (2007) Conservation characteristics of grass and dry sugar beet pulp co-ensiled after different degrees of mixing. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* **46**: 181-193.

- Darwen CWE and John P** (1989) Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiology* **89**: 658-663.
- Dawson LER, Ferris CP, Steen RWJ, Gordon FJ and Kilpatrick DJ** (1999) The effects of wilting grass before ensiling on silage intake. *Grass and Forage Science* **54**: 237-247.
- De Coninck B, Le Roy K, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, Van Laere A and Van den Ende W** (2005) *Arabidopsis* AtewINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell & Environment* **28**: 432-443.
- De Coninck B, Van den Ende W and Le Roy K** (2007) Fructan ExoHydrolases (FEHs) in plants: properties, occurrence and 3-D structure. In: *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*, Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S (eds.), Research Signpost, Kerala, India, pp.157-179.

- Deinum B, De Beyer J, Nordfeldt PH, Kornher A, Ostgard O and Van Bogaert G** (1981) Quality of herbage at different latitudes. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **29**: 141-150.
- Del Viso F, Puebla AF, Fusari CM, Casabuono AC, Couto AS, Pontis HG, Hopp HE and Heinz RA** (2009a) Molecular characterization of a putative sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) of the cold-resistant Patagonian grass *Bromus pictus* associated with fructan accumulation under low temperatures. *Plant and Cell Physiology* **50**: 489-503.
- Del Viso F, Puebla AF, Hopp HE and Heinz RA** (2009b) Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in the cold tolerant Patagonian species *Bromus pictus*. *Planta* **231**: 13-25.
- Del Viso F, Casabuono AC, Couto AS, Hopp HE, Puebla AF and Heinz RA** (2011) Functional characterization of a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) of the cold-resistant grass *Bromus pictus* by heterologous expression in *Pichia pastoris* and *Nicotiana tabacum* and its involvement in freezing tolerance. *Journal of Plant Physiology* **168**: 493-499.
- Demel RA, Dorrepaal E, Ebskamp MJM, Smeekens JCM and DE Kruijff B** (1998) Fructans interact strongly with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1375**: 36-42.
- De Roover J, Van Laere A, De Winter M, Timmermans JW and Van den Ende W** (1999) Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum* **106**: 28-34.
- De Roover J, Van den Branden, Van Laere A and Van den Ende W** (2000) Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta* **210**: 808-814.
- Dijkstra J, Kebreab E, Mills JA, Pellikaan WF, López S, Balmink A and France J** (2007) Predicting the profile of nutrients available for absorption: from nutrient requirement to animal response and environmental impact. *Animal* **1**: 99-111.
- Dionne J, Rochefort S, Huff DR, Desjardins Y, Bertrand A and Castonguay Y** (2009) Variability for freezing tolerance among 42 ecotypes of green-type annual bluegrass. *Crop Science* **50**: 321-336.
- Drapeau R** (1999) Three harvest management of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) in the mid-north agricultural areas of eastern Canada. *Canadian Journal of Plant Science* **79**: 231-238.
- Duchateau N, Bortlik K, Simmen U, Wiemken A and Bancal P** (1995) Sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. *Plant Physiology* **107**: 1249-1255.

Eagles CF, Thomas H, Volaire F and Howarth CJ (1997) Stress physiology and crop improvement. *Proceedings of the XVIII International Grassland Congress, Canada* **3**: 141-150.

Edelman J and Jefford TG (1968) The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* **67**: 517-531.

Eimert K, Wang SM, Lue WL and Chen J (1995) Monogenic recessive mutations causing both late floral initiation and excess starch accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **7**: 1703-1712.

Fagerberg B (1988) Phenological development in timothy, red clover and lucerne. *Actae Agriculturae Scandinavia* **38**: 159-170.

Farrar SC and Farrar JF (1985) Carbon fluxes in leaf blades of barley. *New Phytologist* **100**: 271-283.

Firkins JL, Hristov AN, Hall MB, Varga GA and St Pierre NR (2006) Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **89**: E31-E51.

Foyer CH, Parry M and Noctor G (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **54**: 585-593.

Fridovich I (1975) Oxygen: boon and bane. *American Scientist* **63**: 54-59.

Gallagher JA, Cairns AJ and Turner LB (2007) Fructan in temperate forage grasses; agronomy, physiology and molecular biology. In: *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*, Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S (eds.), Research Signpost, Kerala, India, pp.15-46.

Gallais AR and Ricroch A (2006). In: *Plantes transgéniques: faits et enjeux*, Editions Quae, France, pp.26-29.

Garcia PMA, Asega AF, Silva EA and Carvalho MAM (2011) Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 664-670.

Gaudet DA, Laroche A and Yoshida M (1999) Low temperature-wheat-fungal interactions: a carbohydrate connection. *Physiologia Plantarum* **106**: 437-444.

Goetz M and 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 Journal* **20**: 707-711.

- Goh YJ, Zhang C, Benson AK, Schlegel V, Lee JH and Hutkins RW (2006)** Identification of a putative operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7518-7530.
- Greenfield P, Smith D and Escalada JA (1974)** Composition of starch accumulated in the leaf laminae of timothy, sorghum and lucerne. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **25**: 1363-1368.
- Gupta AK and Kaur N (2005)** Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Bioscience* **30**: 761-776.

- Halford NG and Paul MJ (2003)** Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnology Journal* **1**: 381-398.
- Hassanat F, Mustafa AF and Seguin P (2006)** Chemical composition and ensiling characteristics of normal and brown midrib pearl millet harvested at two stages of development in southwestern Québec. *Canadian Journal of animal Science* **86**: 71-80.
- Hendry GAF (1993)** Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* **123**: 3-14.
- Henson CA and Livingston DPIII (1996)** Purification and characterization of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes beta-2,6-fructans. *Plant Physiology* **110**: 639-644.
- Henson CA and Livingston DPIII (1998)** Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 715-720.
- Herman EM, Rotter K, Premakumar R, Elwinger G, Bae R, Ehler-King L, Chen S and Livingston DPIII (2006)** Additional freeze hardiness in wheat acquired by exposure to -3°C is associated with extensive physiological, morphological, and molecular changes. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3601-3618.
- Hernandez L, Sotolongo M, Rosabal Y, Menedez C, Ramirez R, Caballero-Mellado J and Arrieta J (2000)** Structural levansucrase gene (*LsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology* **174**: 120-124.
- Hincha DK, Hellwege EM, Heyer AG and Crowe JH (2000)** Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *European Journal of Biochemistry* **267**: 535-540.
- Hincha DK, Zuther E, Hellwege EM and Heyer AG (2002)** Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* **12**: 103-110.

- Hincha DK, Livingston DPIII, Premakumar R, Zuther E, Obel N, Cacela C and Heyer AG** (2007) Fructans from oat and rye: composition and effects on membrane stability during drying. *Biochemistry et Biophysica Acta* **1768**: 1611-1619.
- Hindrichsen IK, Wettstein HR, Machmüller A and Kreuzer M** (2006) Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **113**: 150-161.
- Hisano H, Kanazawa A, Kawakami A, Yoshida M, Shimamoto Y and Yamada T** (2004) Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science* **167**: 861-868.
- Höglind M, Schapendonk A and Van Oijen M** (2001) Timothy growth in Scandinavia: combining quantitative information and simulation modelling. *New Phytologist* **151**: 355-367.
- Honing H** (1980) Mechanical and respiration losses during pre-wilting of grass. In: *Forage conservation in the 80's*. Occasional Symposium 11, Brighton, UK, 27-30 Nov. 1979. British Grassland Society Edition, pp.201-204.
- Housley TL and Pollock CJ** (1993) The metabolism of fructan in higher plants. In: *Science and technology of fructans*, Suzuki M, Chatterton NJ (eds.), CRC Press USA, pp.191-226.
- Humphreys MO** (1989) Water-soluble carbohydrates in perennial ryegrass breeding. I. Genetic differences among cultivars and hybrid progeny grown as spaced plants. *Grass and Forage Science* **44**: 231-236.
- Humphreys MW, Yadav RS, Cairns AJ, Turner LB, Humphreys J and Skøt L** (2006) A changing climate for grassland research. *New Phytologist* **169**: 9-26.
- Iizuka M, Yamaguchi H, Ono S and Minamiura N** (1993) Production and isolation of levan by use of levansucrase immobilized on the ceramic support SM-10. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **57**: 322-324.
- Jefferson PG** (2005) Leaf and stem nutritive value of timothy cultivars of different maturity at an irrigated site in southwestern Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Science* **85**: 377-383.
- Ji X, Van den Ende W, Schroeven L, Clerens S, Geuten K, Cheng S and Bennett J** (2007) The rice genome encodes two vacuolar invertases with fructan exohydrolase activity but lacks the related fructan biosynthesis genes of the Pooideae. *New Phytologist* **173**: 50-62.

- Johnson X, Lidgett A, Chalmers J, Guthridge K, Jones E, Cummings N and Spangenberg G** (2003) Isolation and characterisation of an invertase cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Plant Physiology* **160**: 903-911.
- Jones TWA** (1990) Use of a flowering mutant to investigate changes in carbohydrates during floral transition in red clover. *Journal of Experimental Botany* **41**: 1013-1019.
- Julien MC, Dion P, Lafrenière C, Antoun H and Drouin P** (2008) Sources of *Clostridia* in Raw Milk on Farms. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 6348-6357.

- Kaiser E, Weiss K and Zimmer J** (1997) Fermentation process during the ensiling of green forage low in nitrate. 1. Fermentation process in untreated green forage. *Archiv für Tierernährung* **50**: 87-102.
- Kawakami A, Yoshida M and Van den Ende W** (2005) Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* **358**: 93-101.
- Kawakami A, Sato Y and Yoshida M** (2008) Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany* **59**: 793-802.
- Kemble AR and Macpherson HT** (1954) Liberation of amino acids in perennial ryegrass during wilting. *The Biochemical Journal* **58**: 46-49.
- Kingston-Smith AH, Galtier N, Pollock CJ and Foyer CH** (1998) Soluble acid invertase activity in leaves is independent of species differences in carbohydrates, diurnal sugar profiles and path of phloem loading. *New Phytologist* **139**: 283-292.
- Klebesadel LJ** (1997) Timothy in Alaska: characteristics, history, adaptation, and management. In: *Agricultural and Forestry Experiment Station School of Agriculture and Land Resources Management Bulletin* **105**.
- Knipp G and Honermeier B** (2006) Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *Journal of Plant Physiology* **163**: 392-397.
- Koops AJ and Jonker HH** (1996) Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia: II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiology* **110**: 1167-1175.

- Konstantinova T, Parvanova D, Atanasov A and Djilianov D** (2002) Freezing tolerant tobacco transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* **163**: 157-164.
- Kunelius HT and Suzuki M** (1977) Quality of timothy, brome grass and orchardgrass silages as influenced by N fertilization, harvest and ensiling treatment. *Canadian Journal of Plant Science* **58**: 29-34.
- Kusch U, Harms K, Rausch T and Greiner S** (2009) Inhibitors of plant invertases do not affect the structurally related enzymes of fructan metabolism. *New Phytologist* **181**: 601-612.

- Lammens W, Le Roy K, Schroeven L, Van Laere A, Rabjins A and Van den Ende W** (2009) Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications. *Journal of Experimental Botany* **60**: 727-740.
- Lasseur B, Lothier J, Djoumad A, De Coninck B, Smeekens S, Van Laere A, Morvan-Bertrand A, Van den Ende W and Prud'homme MP** (2006) Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)/fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Experimental Botany* **57**: 2719-2734.
- Lasseur B, Schroeven L, Lammens W, Le Roy K, Spangenberg G, Manduzio H, Vergauwen R, Lothier J, Prud'homme MP and Van den Ende W** (2009) Transforming a fructan:fructan 6G-fructosyltransferase from perennial ryegrass into a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *Plant Physiology* **149**: 327-339.
- Lasseur B, Lothier J, Wiemken A, Van Laere A, Morvan-Bertrand A, Van den Ende W and Prud'homme MP** (2011) Towards a better understanding of the generation of fructan structure diversity in plants: molecular and functional characterization of a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Experimental Botany* **62**: 1871-85.
- Lee MRF, Jones EL, Humphreys MO, Moorby JM, Theodorou MK, MacRae JC and Scollan ND** (2001) Production responses from lambs grazed on *Lolium perenne* selected for an elevated water-soluble carbohydrate concentration. *Animal Research* **50**: 441-449.
- Lehtomäki, A, Viinikainen TA and Rintala JA** (2008) Screening boreal energy crops and crop residues for methane biofuel production. *Biomass & Bioenergy*. **32**: 541-550.
- Le Roy K, Lammens W, Verhaest M, De Coninck B, Rabjins A, Van Laere A and Van den Ende W** (2007a) Unraveling the difference between invertases and fructan exohydrolases: a single amino acid (Asp-239) substitution transforms

- Arabidopsis* cell wall invertase1 into a fructan 1-exohydrolase. *Plant Physiology* **145**: 616-625.
- Le Roy K, Vergauwen R, Cammaer V, Yoshida M, Kawakami A, Van Laere A and Van den Ende W** (2007b) Fructan 1-exohydrolase is associated with flower opening in *Campanula rapunculoides*. *Functional Plant Biology* **34**: 972-983.
- Le Roy K, Verhaest M, Rabijns A, Clerens S, Van Laere A and Van den Ende W** (2007c) N-glycosylation affects substrate specificity of chicory fructan 1-exohydrolase: evidence for the presence of an inulin binding cleft. *New Phytologist* **176**: 317-324.
- Le Roy K, Lammens W, Van Laere A and Van den Ende W** (2008) Influencing the binding configuration of sucrose in the active site of chicory fructan 1-exohydrolase and sugar beet fructan 6-exohydrolase. *New Phytologist* **178**: 572-580.
- Leibensperger RY and Pitt RE** (1988) Modeling the effects of formic acid and molasses on ensilage. *Journal of Dairy Science* **71**: 1220-1231.
- Levitt J** (1980) In: *Responses of plants to environmental stresses*. Vol. 1, 2nd Edn., Academic Press, New York.
- Lewis DH** (1993) Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans - a paper for discussion. *New Phytologist* **124**: 583-594.
- Li B, Geiger DR and Shieh WJ** (1992) Evidence of circular regulation of starch and sucrose synthesis in sugar beet leaves. *Plant Physiology* **99**: 1393-1399.
- Li HG, Yang AK, Zhang XC, Gao F and Zhang JR** (2007) Improving freezing tolerance of transgenic tobacco expressing sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase gene from *Lactuca sativa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **89**: 37-48.
- Lim TP, Caspar T, Somerville C and Preiss J** (1988) Isolation and characterization of starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiology* **86**: 1131-1135.
- Livingston DPIII and Henson CA** (1998) Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* **116**: 403-408.
- Livingston DPIII, Hinch DK and Heyer AG** (2009) Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 2007-2023.
- Lorenzen JH and Ewing EE** (1992) Starch accumulation in leaves of potato (*Solanum tuberosum* L.) during the first 18 days of photoperiod treatment. *Annals of Botany* **69**: 481-485.
- Lothier J** (2007) Métabolisme des fructanes chez *Lolium perenne* L.: Identification de deux gènes codant des fructane exohydrolases (FEHs) et étude de la régulation de l'activité FEH par les sucres solubles, Ph.D, Université de Caen Basse-Normandie, pp.141.

- Lothier J, Lasseur B, Le Roy K, Van Laere A, Prud'homme MP, Barre P, Van den Ende W and Morvan-Bertrand A** (2007) Cloning, gene mapping and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* implicated in fructan synthesis rather than in fructan mobilization. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1969-1983.
- Lothier J, Lasseur B, Prud'homme MP and Morvan-Bertrand A** (2010) Hexokinase-dependent sugar signaling represses fructan exohydrolase activity in *Lolium perenne* L. *Functional plant biology* **37**: 1151-1160.
- Lunn JE and Hatch MD** (1997) The role of sucrose-phosphate synthase in the control of photosynthate partitioning in *Zea mays* leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* **24**: 1-8.
- M****Lachado CF, Morris ST, Hodgson J and Fathalla M** (2005) Seasonal changes of herbage quality within a New Zealand beef cattle finishing pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **48**: 265-270.
- Maleux K and Van den Ende W** (2007) Levans in excised leaves of *Dactylis glomerata*: Effects of light, sugars, temperature and senescence. *Journal of Plant Biology* **50**: 671-680.
- Martineau R, Lapierre H, Ouellet DR, Pellerin D and Berthiaume R** (2006) *In situ* degradation of timothy conserved as restrictively or extensively fermented silage or as hay. *Canadian Journal of Animal Science* **86**: 299-306.
- Marx SP, Nösberger J and Frehner M** (1997a) Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytologist* **135**: 267-277.
- Marx SP, Nösberger J and Frehner M** (1997b) Hydrolysis of fructan in grasses: a beta-(2-6)-linkage specific fructan-beta-fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. *New Phytologist* **135**: 279-290.
- Mayland HF, Shewmaker GE, Harrison PA and Chatterton NJ** (2000) Non-structural carbohydrates in tall fescue cultivars: relationship to animal preference. *Agronomy Journal* **92**: 1203-1206.
- McDonald P, Henderson AR and Heron SJE** (1991) In: *The biochemistry of silage*. 2nd edn, Chalcombe Publication, Marlow, UK.
- McGechan MB** (1990) A review of losses arising during conservation of grass forage: Part 2, storage losses. *Journal of Agricultural Engineering Research* **45**: 1-30.
- McGrath VB, Blakeney AB and Batten GD** (1997) Fructan to nitrogen ratio as an indicator of nutrient stress in wheat crops. *New Phytologist* **136**: 145-152.
- McIntyre CL, Casu RE, Rattey A, Dreccer MF, Kam JW, Herwaarden AF, Shorter R and Xue GP** (2011) Linked gene networks involved in nitrogen

- and carbon metabolism and levels of water-soluble carbohydrate accumulation in wheat stems. *Functional and Integrative Genomics* **11**: 585-597.
- McLeod LB and McLeod JA** (1974) Effects of N and K fertilization on the protein, nitrate and nonprotein reduced fractions of timothy and brome grass. *Canadian Journal of Plant Science* **54**: 331-341.
- McRae KB** (1987) Effect of defoliating timothy cultivars during primary growth on yield, quality and persistence. *Canadian Journal of Plant Science* **66**: 117-123.
- Mele M, Buccioni A and Serra A** (2005) Neutral detergent fibre (NDF) and non-structural carbohydrate (NSC) requirements in the nutrition of dairy ewes. *Italian Journal of Animal Science* **4**: 45-52.
- Meng G and Fütterer K** (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology* **10**: 935-941.
- Merry RJ, Winters AL, Thomas PI, Müller M and Müller T** (1995) Degradation of fructans by epiphytic and inoculated lactic acid bacteria and by plant enzymes during ensilage of normal and sterile hybrid ryegrass. *Journal of Applied Bacteriology* **79**: 583-591.
- Michiels A, Van Laere A, Van den Ende W and Tucker M** (2004) Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1325-1333.
- Mifflin BJ and Habash DZ** (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* **53**: 979-987.
- Miller LA, Moorby JM, Davis DR, Humphreys MO, Scollan ND, McRae JC and Theodorou MK** (2001) Increased concentration of water-soluble carbohydrate in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.): milk production from late-lactation dairy cows. *Grass and Forage Science* **56**: 383-394.
- Mino Y and Maeda K** (1976) Changes in the activities of sucrose and fructosan hydrolysing enzymes in the haplocorm of timothy plant (*Phleum pratense* L.) after cutting. *Japanese Journal of Grassland Science* **22**: 1-6.
- Mino Y, Sato T and Yamamoto S** (1979) Effect of abscisic acid on the induction of sucrose and fructosan hydrolysing enzymes in the haplocorm of timothy (*Phleum pratense* L.) after cutting. *Japanese Journal of Grassland Science* **25**: 1.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T and Sheen J** (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336.
- Morcuende R, Kostadinova S, Perez P, Martín Del Molino IM and Martínez-Carrasco R** (2004) Nitrate is a negative signal for fructan synthesis, and the

- fructosyltransferase-inducing trehalose inhibits nitrogen and carbon assimilation in excised barley leaves. *New Phytologist* **161**: 749-759.
- Morcuende R, Kostadinova S, Perez P and Martinez-Carrasco R** (2005) Fructan synthesis is inhibited by phosphate in warm-grown, but not in cold-treated, excised barley leaves. *New Phytologist*. **168**: 567-574.
- Morikami A, Matsunaga R, Tanaka Y, Suzuki S, Mano S and Nakamura K** (2005) Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco. *Molecular Genetics and Genomics* **272**: 690-699.
- Morvan A, Challe G, Prud'homme MP and Boucaud J** (1997) Rise of fructan exohydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. *New Phytologist* **136**: 81-88.
- Morvan-Bertrand A, Boucaud J and Prud'homme MP** (1999) Influence of the initial levels of carbohydrates, fructans, nitrogen and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L. cv Bravo following defoliation. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1817-1826.
- Morvan-Bertrand A, Boucaud J, Le Saos J and Prudhomme MP** (2001) Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. *Planta* **213**: 109-120.
- Moser LE** (1995) Post-harvest physiological changes in forage plants. In: *Post-harvest physiology and preservation of forages*, Moore KJ and Peterson MA (eds.), ASA and CSSA, Madison, USA, pp.1-19.
- Muck RE** (1987) Dry matter level effects on alfalfa silage quality: I. Nitrogen transformations. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers* **30**: 7-14.
- Muck RE, Moser LE and Pitt RE** (2003) Postharvesting factors affecting ensiling. In: *Silage Science and technology*, Buxton DR, Muck RE, Harisson JH (eds.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, USA, pp.251-259.
- Müller CE, Pauly TM and Udén P** (2007) Storage of small bale silage and haylage- Influence of storage period on fermentation variables and microbial composition. *Grass and Forage Science* **62**: 274-283.
- Müller J, Aeschbacher RA, Sprenger N, Boller T and Wiemken A** (2000) Disaccharide-mediated regulation of sucrose:fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiology* **123**: 265-273.
- Müller M and Lier D** (1994) Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **76**: 406-411.
- Müller M and Steller J** (1995) Comparative studies of the degradation of grass fructan and inulin by strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Bacteriology* **78**: 229-236.

Murphy MR, Baldwin RL and Koong LJ (1982) Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *Journal of Animal Science* **55**: 411-421.

Nagaraj VJ, Altenbach D, Galati V, Lüschnner M, Meyer AD, Boller T and Wiemken A (2004) Distinct regulation of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT), the key enzymes of fructan synthesis in barley leaves: 1-SST as the pacemaker. *New Phytologist* **161**: 735-748.

Nelson CJ and Spollen WG (1987) Fructans. *Physiologia Plantarum* **71**: 512-516.

Neuhaus HE, Kruckeberg AL, Feil R and Stitt M (1989) Reduced-activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*.-II Study of the mechanisms which regulate photosynthate partitioning. *Planta* **178**: 110-122.

Nordheim-Viken H and Volden H (2009) Effect of maturity stage, nitrogen fertilization and seasonal variation on ruminal degradation characteristics of neutral detergent fiber in timothy (*Phleum pratense* L.). *Animal Feed Science and Technology* **149**: 30-59.

Nousiainen J, Rinne M, Hellamaki M and Huhtanen P (2003) Prediction of the digestibility of primary growth and regrowth grass silages from chemical composition, pepsin-cellulase solubility and indigestible cell wall content. *Animal Feed Science and Technology* **110**: 61-74.

Obenland, DM, Sinnmen U, Boiler T and Wiemken A (1991) Regulation of sucrose-sucrose-fructosyltransferase in barley leaves. *Plant Physiology* **97**: 811-813.

Oliver AE, Hinch DK and Crowe JH (2002) Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water contents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **131**: 515-525.

Ortiz-Soto ME, Rivera M, Rudiño-Piñera E, Olvera C and López-Munguía A (2008) Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design and Selection* **21**: 589-595.

Orzechowski S (2008) Starch metabolism in leaves. *Acta Biochimica Polonica* **55**: 435-445.

Orozco-Hernández JR, Brisson GJ and Girard V (1997) Timothy grass or alfalfa silage for cows in midlactation: effect of supplementary barley. *Journal of Dairy Science* **80**: 2876-84.

- Østrem L, Rapacz M, Jørgensen M and Höglind M** (2011) Effect of developmental stage on carbohydrate accumulation patterns during winter of timothy and perennial ryegrass. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil and Plant Science* **61**: 153-163.
- Ouellet DR, Seoane JR, Lapierre H, Flipot P and Bernier JF** (1998) Net energy value of timothy and brome grass silages for beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science* **78**: 107-114.
- Owens VN, Albrecht KA and Muck RE** (1999) Protein degradation and ensiling characteristics of red clover and alfalfa under varying level of shade. *Canadian Journal of Plant Science* **79**: 209-222.
- Paquin R and Saint-Pierre JC** (1980) Endurcissement, résistance au gel et contenu en proline libre de la fléole des prés (*Phleum pratense* L.). *Canadian Journal of Plant Science* **60**: 525-532.
- Paquin, R** (1984) Influence of the environment on cold hardening and winter survival of forage plants and cereals: proline as a metabolic marker of hardening. In: *Being Alive on Land*, Margaris NS, Arianoutsou-Faraggitaki M, Oechel WC (eds.), Junk W Publishers, pp.137-154.
- Paquin R** (1985) Survie à l'hiver des plantes fourragères et des céréales sous les climats nordiques, en particulier au Québec: progrès et perspectives. *Phytoprotection* **66**: 105-139.
- Pavis N, Chatterton NJ, Harrison PA, Baumgartner S, Praznik W, Boucaud J and Prud'homme MP** (2001) Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. *New Phytologist* **150**: 83-95.
- Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O and Bartels D** (1997) Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiologia Plantarum* **99**: 153-159.
- Pelletier S, Tremblay GF, Bélanger G, Seguin P, Drapeau R and Allard G** (2008) Delayed harvest affects mineral and NDF concentrations, and digestibility of timothy. *Canadian Journal of Animal Science* **88**: 325-329.
- Pelletier S, Tremblay GF, Lafrenière C, Bertrand A, Bélanger G, Castonguay Y and Rowsell J** (2009) Non-structural carbohydrate concentrations in timothy as affected by N fertilization, stage of development and time of cutting. *Agronomy Journal* **101**: 1372-1380.
- Pelletier S, Tremblay GF, Bertrand A, Bélanger G, Castonguay Y and Michaud R** (2010) Drying procedures affect non-structural carbohydrates and other nutritive value attributes in forage samples. *Animal Feed Science and Technology* **157**: 139-150.

- Petit HV and Tremblay GF** (1992) In situ degradability of fresh grass and grass conserved under different harvesting methods. *Journal of Dairy Science* **75**: 774-81.
- Perilleux C and Bernier G** (1997) Leaf carbohydrate status in *Lolium temulentum* during the induction of flowering. *New Phytologist* **135**: 59-66.
- Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek PJ and Smeekens SCM** (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* **107**: 125-130.
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T and van Dun K** (1999) Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 313-317.
- Piper CV and Bort KS** (1915) The early agricultural history of timothy. *Journal of the American Society of Agronomy* **7**: 1-14.
- Pollock CJ** (1984) Sucrose accumulation and the initiation of fructan biosynthesis in *Lolium temulentum* L. *New Phytologist* **96**: 527-534.
- Pollock CJ and Lloyd EJ** (1987) The effect of low temperature upon starch, sucrose and fructan synthesis in leaves. *Annals of Botany* **60**: 231-235.
- Pollock CJ, Chatterton NJ** (1988) Fructans. *The Biochemistry of Plants* **14**: 109-141.
- Pollock CJ and Cairns AJ** (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 77-101.
- Pollock C, Farrar J, Tomos D, Gallagher J, Lu C and Koroleva O** (2003) Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. *Journal of Experimental Botany* **54**: 489-494.
- Pons T, Hernández L, Batista FR and Chinea G** (2000) Prediction of a common β -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Science* **9**: 2285-2291.
- Pontis HG and Del Campillo E** (1985) Fructans. In: *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*, Dey PM, Dixon RA (eds;), London: Academic Press, pp.205-227.
- Pontis H** (1989) Fructans and cold stress. *Journal of Plant Physiology* **134**: 148-150.
- Prud'homme MP, Gonzalez B, Billard JB and Boucaud J** (1992) Carbohydrate content, fructan and sucrose enzyme activities in roots, stubble and leaves of ryegrass (*Lolium perenne* L.) as affected by source/sink modification after cutting. *Journal of Plant Physiology* **140**: 282-292.

R**agnarsson S and Lindberg JE** (2008) Nutritional value of timothy haylage in Icelandic horses. *Livestock Science* **113**: 202-208.

Rausch T and Greiner S (2004) Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1696**: 253-261.

- Raven PH, Evert RF and Eichhorn SE** (1999) Photosynthesis, light, and life. In: *Biology of plants*, 6th edition, pp.16-153.
- Raven JA** (2000) Land plant biochemistry. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **355**: 833-846.
- Rebolé A, Treviño J, Barro C, Alzueta C and Caballero R** (1996) Chemical changes associated with the field drying of oat forage. *Field Crops Research* **47**: 221-226.
- Repetto JL, Cajarville C, D'Alessandro J, Curbelo A, Soto C and Garin D** (2005) Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Animal Research* **54**: 73-80.
- Reddy VA and Maley F** (1990) Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 10817-10820.
- Reddy VA and Maley F** (1996) Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 13953-13958.
- Rinne M, Jaakola S and Huhtanen P** (1997) Grass maturity effects on cattle fed silage-based diets. 1. Organic matter digestion, rumen fermentation and nitrogen utilization. *Animal Feed Science and Technology* **67**: 1-17.
- Rinne M, Jaakola S and Huhtanen P** (1999) Silage harvested at different stages of grass growth versus concentrate foods as energy and protein sources in milk production. *Animal Science* **69**: 251-263.
- Rinne M and Nykänen A** (2000) Timing of primary growth harvest affects the yield and nutritive value of timothy – red clover mixtures. *Agricultural and Food Science in Finland* **9**: 121-134.
- Ritsema T and Smeekens SCM** (2003a) Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 223-230.
- Ritsema T and Smeekens SCM** (2003b) Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology* **160**: 811-820.
- Ritsema T, Hernández L, Verhaar A, Altenbach D, Boller T, Wiemken A and Smeekens S** (2006) Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *Plant Journal* **48**: 228-237.
- Roberfroid MB, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD and Neyrinck AM** (2010) Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *The Journal of British Nutrition* **S2**: 1-63.
- Roberfroid MB, Van Loo JAE and Gibson GR** (1998) The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition* **128**: 11-19.
- Roitsch T and González MC** (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**: 606-613.

- Rook AJ and Gill M** (1990) Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. *Animal Production* **50**: 425-438.
- Roth A, Lüscher M, Sprenger N, Boller T and Wiemken A** (1997) Fructan and fructan-metabolizing enzymes in the growth zone of barley leaves. *New Phytologist* **136**: 73-79.
- Rucker G and Knabe O** (1977) Non-mechanical field losses in wilted grasses as influenced by different factors. In: *13th International Grassland Congress Proceedings*, Leipzig, GDR, 18-27 May 1977, Academic Verlag Ed, Berlin, pp.1379-1381.
- Ruuska S, Lewis D, Kennedy G, Furbanks R, Jenkins C and Tabe L** (2008) Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* **66**: 15-32.
- Sage RF and Kubien DS** (2007) The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1086-1106.
- Savoie P** (1988) Hay tedding losses. *Canadian Agricultural Engineering* **315**: 39-42.
- Savoie P and Tremblay G** (1998) La conservation des aliments ensilés et leur effet sur les ruminants. In: *Proceedings of the Congrès du Bœuf*, CPAQ Edn.
- Scheible GN, Lauerer M, Schulze ED, Caboche M and Stitt M** (1997) Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal* **11**: 671-691.
- Schnyder H** (1993) The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling — a review. *New Phytologist* **123**: 233-245.
- Schroeven L, Lammens W, Van Laere A and Van den Ende W** (2008) Transforming wheat vacuolar invertase into a high affinity sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *New Phytologist* **180**: 822-831.
- Scofield GN, Ruuska SA, Aoki N, Lewis DC, Tabe LM and Jenkins CLD** (2009) Starch storage in the stems of wheat plants: localization and temporal changes. *Annals of Botany* **103**: 859-868.
- Seoane JR, Moreno MC and Gervais P** (1981) Nutritional evaluation of six cultivars of timothy comprising a high proportion of sheep grazing, (*Phleum pratense*). **108**: 263-269.
- Seoane JR and Gervais P** (1982) Nutritive value of alfalfa (Iroquois), brome grass (Saratoga) and timothy (Timfor and Champ) as sheep-hay. *Naturaliste canadien* **109**: 103-107.
- Seppälä M, Paavola T, Lehtomäki A, Pakarinen O and Rintala J** (2008), Biogas from energy crops - Optimal pre-treatments and storage, co-digestion and energy balance in boreal conditions. *Water Science and Technology* **58**: 1857-1863.

- Seppälä M, Paavola T, Lehtomäki A and Rintala J** (2009) Biogas production from boreal herbaceous grasses - Specific methane yield and methane yield per hectare. *Bioresource Technology* **100**: 2952-2958.
- Serraj R and Sinclair TR** (2002) Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions ? *Plant, Cell & Environment* **25**: 333-341.
- Shao T, Zhang ZX, Shimojo M, Wang T and Masuda Y** (2005) Comparison of fermentation characteristics of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) during the early stage of ensiling. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **18**: 1727-1734.
- Sharkey TD, Berry JA and Raschke K** (1985) Starch and sucrose synthesis in *Phaseolus vulgaris* as affected by light, CO₂ and abscisic acid. *Plant Physiology* **77**: 617-620.
- Shewmaker GE, Mayland HF, Roberts CA, Harrison PA, Chatterton NJ and Sleper DA** (2006) Daily carbohydrate accumulation in eight tall fescue cultivars. *Grass and Forage Science* **61**: 413-421.
- Shiomi N** (1989) Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in Liliaceous plants. *Journal of Plant Physiology* **134**: 151-155.
- Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S, Yoshihira T, Kosaka S and Osaki M** (2006) Fructan accumulation in wheat stems during kernel filling under varying nitrogen fertilization. *Canadian Journal of Plant Science* **86**: 1027-1035.
- Simon U and Park B** (1983) A descriptive scheme for stages of development in perennial forage grasses. In: *14th International Grassland Congress Proceedings*, Lexington, KY, 15-24 June 1981, Smith JA and Hays VW (eds.), Westview Press, Boulder, USA, pp.416-418.
- Simpson RJ and Bonnett GD** (1993) Fructan exohydrolase from grasses. *New Phytologist* **123**: 453-469.
- Smeekens S** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **51**: 49-81.
- Smeekens S and Rook F** (1997) Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiology* **115**: 7-13.
- Smith D** (1968) Carbohydrate in grasses: IV. Influence of temperature on the sugar and fructosan composition of timothy plant part at anthesis. *Crop Sciences* **8**: 331-334.
- Smith AM, Neuhaus HE and Stitt M** (1990) The impact of decreased activity of starch-branching enzyme on photosynthetic starch synthesis in leaves of wrinkled-seeded peas. *Planta* **181**: 310-315.
- Smouter H and Simpson RJ** (1989) Occurrence of fructans in the Graminae (Poaceae). *New Phytologist* **111**: 359-368.
- Sniffen CJ, O'Connor JD, Van Soest PJ, Fox DG and Russell JB** (1992) A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science* **70**: 3562-3577.

- Sonnenburg ED, Zheng H, Joglekar P, Higginbottom SK, Firbank SJ, Bolam DN and Sonnenburg JL** (2010) Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell* **141**: 1241-1252.
- Sonneveld U and Willmitzer L** (1992) Molecular approaches to sink-source interactions. *Plant Physiology* **99**: 1267-1270.
- Spoelstra SH and Hindle VA** (1989) Influence of wilting on chemical and microbial parameters of grass relevant to ensiling. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **37**: 355-364.
- Spollen WG and Nelson CJ** (1988) Characterization of fructan from mature leaf blades and elongation zones of developing leaf blades of wheat, tall fescue and timothy. *Plant Physiology* **88**: 1349-1353.
- Spollen WG and Nelson CJ** (1994) Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* **106**: 329-336.
- Sprenger N, Bortlik K, Brandt A, Böller T and Wiemken A** (1995) Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 11652-11656.
- Stoyanova S, Geuns J, Hideg E and Van den Ende W** (2010) The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **0**: 1-8.
- Strand A, Foyer CH, Gustafsson P, Gardeström P and Hurry V** (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant, Cell & Environment* **26**: 523-535.
- Sturm A** (1999) Invertases. Primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* **121**: 1-7.
- Sturm A, Šebková V, Lorentz K, Hardegger M, Lienhard S and Unger C** (1995) Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid β -fructofuranosidase in carrot. *Planta* **195**: 601-610.
- Suzuki M** (1968) Fructosan in timothy haplocorm. *Canadian Journal of Botany* **46**: 1201-1206.
- Suzuki M** (1993) Fructans in crop production and preservation. In: *Science and technology of fructans*, CRC Press Edn.
- Suzuki M and Pollock CJ** (1986) Extraction and characterisation of the enzymes of fructan biosynthesis in timothy (*Phleum pratense*). *Canadian Journal of Botany* **64**: 1884-1887.
- Suzuki M and Nass HG** (1988) Fructan in winter wheat, triticale and fall rye cultivars of varying cold hardiness. *Canadian Journal of Botany* **66**: 1723-1728.

Swanson SJ, Bethke PC and Jones RL (1998) Barley aleurone cells contain two types of vacuoles: characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes. *Plant Cell* **10**: 685-698.

Tamura K and Yamada T (2007) A perennial ryegrass CBF gene cluster is located in a region predicted by conserved synteny between Poaceae species. *Theoretical and Applied Genetics* **114**: 273-283.

Tamura KI, Kawakami A, Sanada Y, Tase K, Kumatsu T and Yoshida M (2009) Cloning and functional analysis of a fructosyltransferase cDNA for synthesis of highly polymerized levans in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany* **60**: 893-905.

Tamura KI, Sanada Y, Tase K, Komatsu T and Yoshida M (2011) Pp6-FEH1 encodes an enzyme for degradation of highly polymerized levan and is transcriptionally induced by defoliation in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany* **62**: 3421-3431.

Thorsteinsson B, Harrison PA and Chatterton NJ (2002) Fructan and total carbohydrate accumulation in leaves of two cultivars of timothy (*Phleum pratense* Vega and Climax) as affected by temperature. *Journal of Plant Physiology* **159**: 999-1003.

Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG and Geigenberger P (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant Journal* **35**: 490-500.

Tognetti JA, Salerno GL, Crespi MD and Pontis HG (1990) Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiologia Plantarum* **78**: 554-559.

Tremblay GF, Bélanger G and Drapeau R (2005) Nitrogen fertilizer application and developmental stage affect silage quality of timothy (*Phleum pratense* L.). *Grass and Forage Science* **60**: 337-355.

Trunova TL (1965) Light and temperature systems in the hardening of winter wheat and the significance of oligosaccharides for frost resistance. *Fiziologiya Rastenii* **12**: 70-77.

Tuomisto HL and Helenius J (2008) Comparison of energy and greenhouse gas balances of biogas with other transport biofuel options based on domestic agricultural biomass in Finland. *Agricultural and Food Science* **17**: 240-251.

Turner LB, Cairns AJ, Armstead IP, Thomas H, Humphreys MW and Humphreys MO (2008) Does fructan have a functional role in physiological traits? Investigation by quantitative trait locus mapping. *New Phytologist* **179**: 765-775.

Tymowska-Lalanne Z and Kreis M (1998) The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Advances in Botanical Research* **28**: 71-117.

Ueno K, Ishiguro Y, Yoshida M, Onodera S and Shiomi N (2011) Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chemistry Central Journal* **5**: 16.

Valluru R and Van den Ende W (2008) Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2905-2916.

Valluru R, Link J and Claupein W (2011) Natural variation and morpho-physiological traits associated with water-soluble carbohydrate concentration in wheat under different nitrogen levels. *Field Crops Research* **124**: 104-113.

Valluru R, Lammens W, Claupein W and Van den Ende W (2008) Freezing tolerance by vesicle-mediated fructan transport. *Trends in Plant Science* **13**: 409-414.

Van den Ende W and Van Laere A (1996) Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* **149**: 43-50.

Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Verhaert P and Van Laere A (2000) Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *The Plant Journal* **24**: 447-456.

Van den Ende W, Michiels A, Van Wouterghem D, Clerens SP, De Roover J and Van Laere AJ (2001) Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa and fructan 1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology* **126**: 1186-1195.

Van den Ende W, Michiels A, De Roover J and Van Laere A (2002) Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* **2**: 1281-1295.

Van den Ende W, Clerens S, Van Riet L, Van Laere A, Yoshida M and Kawakami A (2003a) Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-Trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* **131**: 621-631.

Van den Ende W, De Coninck B, Clerens S, Vergauwen R and Van Laere A (2003b) Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-

- fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall invertase-like' specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Journal* **36**: 697-710.
- Van den Ende W, De Coninck B and Van Laere A** (2004) Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends in Plant Science* **9**: 523-528.
- Van den Ende W, Yoshida M, Clerens S, Vergauwen R and Kawakami A** (2005) Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* **166**: 917-932.
- Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Boogaerts D, Le Roy K, Arckens L and Van Laere A** (2006) Cloning and functional analysis of a high DP fructan:fructan 1-fructosyltransferase from *Echinops ritro* (Asteraceae): comparison of the native and recombinant enzymes. *Journal of Experimental Botany* **57**: 775-789.
- Van den Ende W and Valluru R** (2009) Sucrose, sucrosyl oligosaccharides and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany* **60**: 9-18.
- Van den Ende W, Lammens W, Van Laere A, Schroeven L and Le Roy K** (2009) Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes. *FEBS Journal* **276**: 5788-5798.
- Van den Ende W, Coopman M, Clerens S, Vergauwen R, Le Roy K, Lammens W and Van Laere A** (2011) Unexpected presence of graminan- and levan-type fructans in the evergreen frost-hardy eudicot *Pachysandra terminalis* (Buxaceae): purification, cloning and functional analysis of a 6-SST/6-SFT enzyme. *Plant Physiology* **155**: 603-714.
- Van Laere A and Van den Ende W** (2002) Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell & Environment* **25**: 803-813.
- Van Riet L, Nagaraj V, Van den Ende W, Clerens S, Wiemken A and Van Laere A** (2006) Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* **57**: 213-223.
- Van Riet L, Altenbach D, Vergauwen R, Clerens S, Kawakami A, Yoshida M, Van den Ende W, Wiemken A and Van Laere A** (2008) Purification, cloning and functional differences of a third fructan 1-exohydrolase (1-FEHw3) from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiologia plantarum* **133**: 242-253.
- Vereyken IJ, Chupin V, Demel RA, Smeekens SCM and De Kruijff B** (2001) Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1510**: 307-320.

- Vereyken IJ, Chupin V, Islamov A, Kuklin A, Hmicha DK and De Kruijff B** (2003) The effect of fructan on the phospholipid organization in the dry state. *Biophysical Journal* **85**: 3058-3065.
- Vergauwen R, Van den Ende W and Van Laere A** (2000) The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1261-1266.
- Vergauwen R, Van Laere A and Van den Ende W** (2003) Properties of fructan:fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiology* **133**: 391-401.
- Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, De Ranter CJ, Van Laere A, Rabijns A and Van den Ende W** (2007) Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New Phytologist* **174**: 90-100.
- Verhaest M, Van den Ende W, Le Roy K, De Ranter CJ, Van Laere AV and Rabijns A** (2005) X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *Plant Journal* **41**: 400-411.
- Vijn I and Smeekens S** (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* **120**: 351-60.
- Volaire F and Lelièvre F** (1997) Production, persistence, and water-soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought in the south of France. *Australian Journal of Agricultural Research* **48**: 933-944.
- Volaire F, Thomas H and Lelièvre F** (1998) Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought. I. Growth, death, water relations, and solute content in herbage and stubble. *New Phytologist* **140**: 439-449.
- Wagner W, Keller F and Wiemken A** (1983) Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **112**: 359-372.
- Wagner W and Wiemken A** (1986) Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Journal of Plant Physiology* **123**: 429-439.
- Wang C and Tillberg JE** (1996) Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* **97**: 339-345.
- Wang N and Nobel PS** (1998) Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology* **116**: 709-714.

- Wang C, Van den Ende W and Tillberg JE** (2000) Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase mRNA. *Planta* **211**: 701-707.
- Wardlaw IF and Willenbrink J** (1994) Carbohydrate storage and mobilization by the culm of wheat between heading and grain maturity: the relation to sucrose synthase and sucrose-phosphate synthase. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**: 255-271.
- Waterhouse AL and Chatterton NJ** (1993) Glossary in fructan terms. In: *Science and technology of fructans*, Suzuki M, Chatterton NJ (eds) Boca Raton, FL: CRC Press USA, pp.1-6.
- Wei JZ and Chatterton NJ** (2001) Fructan biosynthesis and fructosyltransferase evolution: expression of the 6-sft (sucrose:fructan 6-fructosyltransferase) gene in crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*). *Journal of Plant Physiology* **158**: 1203-1213.
- Weiss WP** (1998) Estimating the available energy content of feeds for dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **81**: 830-839.
- White LM** (1973) Carbohydrate reserves of grasses: a review. *Journal of Range Management* **26**: 13-18.
- Wiemken A, Frehner M, Keller F and Wagner W** (1986) Fructan metabolism, enzymology and compartmentation. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* **5**: 17-37.
- Wiese A, Elzinga N, Wobbes B and Smeekens S** (2004) A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation. *Plant Cell* **16**: 1717-1729.
- Willenbrink J, Bonnet GD, Willenbrink S and Wardlaw IF** (1998) Changes of enzyme activities associated with the mobilization of carbohydrate reserves (fructans) from the stem of wheat during kernel filling. *New Phytologist* **139**: 471-478.
- Winters AL, Merry RJ, Müller M, Davies DR, Pahlow G and Müller T** (1998) Degradation of fructans by epiphytic and inoculant lactic acid bacteria during ensilage of grass. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 304-312.
- Wright DA, Gordon FJ, Stenn RWJ and Patterson DC** (2000) Factors influencing the response in intake of silage and animal performance after wilting of grass before ensiling: a review. *Grass and Forage Science* **55**: 1-13.
- Wulfes R, Nyman P and Kornher A** (1999) Modelling non-structural carbohydrates in forage grasses with weather data. *Agricultural Systems* **61**: 1-16.

Yamamoto S and Mino Y (1985) Partial purification and properties of phleinase induced in stem base of orchardgrass after defoliation. *Plant Physiology* **78**: 591-595.

- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q and Liu L** (2004) Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* **220**: 331-343.
- Yoshida M, Abe J, Moriyama M and Kuwabara T** (1998) Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiologia Plantarum* **103**: 8-16.
- Yu TS, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstar H, Lue WL, Hegemann B, Tung SY, Umemoyo T, Chapple A, Tsai DL, Wang SM, Snith AM, Chen J and Smith SM** (2005) alpha-amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 9773-9779.

- Zadoks JC and Board E** (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* **14**: 415-421.
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM and Chen J** (1998) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytylglycogen. *Plant Cell* **10**: 1699-1711.
- Zeeman SC, Snith SM and Smith AM** (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal* **401**: 13-28.
- Zhang J, Abe J, Dell B, Conocono E, Waters I, Setter T and Appels R** (2009) Water deficits in wheat: fructan exohydrolase (1-FEH) mRNA expression and relationship to soluble carbohydrate concentrations in two varieties. *New Phytologist* **181**: 843-850.
- Zhang J, Huang S, Fosu-Nyarko J, Dell B, McNeil M, Waters I, Moolhuijzen P, Conocono E and Apples R** (2008) The genome structure of the 1-FEH genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): new markers to track stem carbohydrates and grain filling QTLs in breeding. *Molecular Breeding* **22**: 339-351.