

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. OULD-AHMED Marouf», 2012. Université de Caen (France) – Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue (Canada), 193 pages.

Résumé

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.

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 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 plant 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.