

THÈSE
pour le
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

Ecole doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie Végétale

Présentée et soutenue publiquement

Le 13 Décembre 2012

Par Antoine Monier

**Rôle des phosphatases acides dans le métabolisme et le stockage des sucres
dans la vacuole chez *Arabidopsis thaliana* : approches *in vitro* et *in silico*.**

Devant la commission d'examen formée de :

M. LEMOINE Rémi	Directeur de Recherches CNRS, Poitiers.....	<i>Rapporteur</i>
Mme. PRUD'HOMME Marie-Pascale	Professeur, Université de Caen.....	<i>Rapporteur</i>
M. LETISSE Fabien	Maître de Conférences, Université Paul Sabatier-Toulouse	<i>Examineur</i>
M. MAZAT Jean-Pierre	Professeur émérite, Université Victor-Segalen-Bordeaux2	<i>Examineur</i>
M. BEAUVOIT Bertrand	Maître de Conférences (HDR), Université Victor-Segalen-Bordeaux2	<i>Directeur de thèse</i>

REMERCIEMENTS

Je remercie l'UMR 1332 "Biologie du Fruit et Pathologie" du Centre de Recherches INRA de Bordeaux et l'Université de Bordeaux de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement l'équipe "Métabolisme" de m'avoir accueilli et de m'avoir fourni tout ce que était matériellement et intellectuellement nécessaire à la réalisation de ce projet et plus particulièrement à Sophie Colombié, Martine Dieuaide-Noubhani et Marie-Helene Andrieu dont l'aide et les conseils ont été d'une grande aide tout au long de cette thèse.

Un merci très particulier à mon directeur de thèse, Bertrand Beauvoit sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. Il a su me donner goût au travail de recherche et m'a offert toute la liberté d'action pour la réalisation de ce projet tout en m'encadrant efficacement dans les moments plus difficiles.

Enfin, je remercie Madame Marie-Pascale Prud'Homme et Messieurs Rémi Lemoine, Fabien Létisse et Jean-Pierre Mazat d'avoir accepté d'évaluer ce travail et pour le temps qu'ils vont y consacrer.

Parce qu'une thèse ne se résume pas seulement à un manuscrit, je tenais également à remercier l'ensemble des personnes croisées durant ces quelques années passées dans le laboratoire. Je pense notamment à Michel Hernould, Pierre Baldet et Louise Gilbert qui m'ont donné goût au travail de recherche lors de mon master.

Un merci tout particulier à mes collègues de bureau, Lisa Boureau et Nicolas Viron avec qui j'ai passé de très bons moments. Ces instants de détente ont été très profitables et m'ont permis de me changer les idées dans les moments difficiles.

Je réserve ces dernières lignes pour remercier la personne la plus importante de ma vie, Valentine.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	3
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
ABRÉVIATIONS	10
LE LABORATOIRE, L'ÉQUIPE ET LES OBJECTIFS	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
I. PRÉAMBULE	15
II. LE MODÈLE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	17
III – UNE HISTOIRE D'ÉCHELLE : DE L'ORGANE À LA COMPARTIMENTATION SUB-CELLULAIRE	19
III.A. À L'ÉCHELLE DE LA PLANTE : RELATIONS SOURCES-PUITS	19
III.B. À L'ÉCHELLE DE LA CELLULE: MÉTABOLISME DES SUCRES DANS LES CELLULES PUIITS	21
III.C. LA VACUOLE : MÉTABOLISME & STOCKAGE DES SUCRES	25
III.D. LES " PURPLE ACID PHOSPHATASES"	35
IV – LE MÉTABOLISME: MÉTHODES DE MESURE DE FLUX	43
IV.A. HISTORIQUE	43
IV.D. UN BESOIN DE DYNAMIQUE	45
V. MODÉLISATION CINÉTIQUE	49
V.A. HISTORIQUE	49
V.B. PARAMETRAGE ET RESOLUTION D'UN MODELE CINETIQUE	49
VI. OBJECTIFS GÉNÉRAUX ET PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE	53
VI.A. PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE	53
CHAPITRE I	55

ANALYSES FONCTIONNELLES DE LA PAP26 PAR UNE APPROCHE <i>IN VIVO</i> ET <i>IN ORGANELLO</i>	55
I.OBJECTIFS:	55
II. SELECTION DES GÈNES CANDIDATS.	57
III. CULTURE EN HYDROPONIE	57
III.A. CHOIX DU MILIEU & DU SYSTÈME DE CULTURE	57
III.B. PHÉNOTYPAGE ENZYMATIQUE DES PLANTES MUTANTES	61
IV. ANALYSE <i>IN VITRO</i> SUR VACUOLES ISOLÉES	63
IV.A. PRODUCTION DE PROTOPLASTES À PARTIR DE RACINES.....	63
IV.B. PRODUCTION DE PROTOPLASTES À PARTIR DE FEUILLES	65
IV.C. QUALITÉ DES VACUOLES ISOLÉES.....	65
V. LE TRANSPORT DANS LES VACUOLES	71
V.A. PRINCIPES DE LA MÉTHODE	71
V.B. ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA PAP SUR VACUOLES ISOLÉES.....	77
VI. DISCUSSION	81
VI.A. LES TRANSPORTEURS VACUOLAIRES.....	81
VI.B. LE G6P, UN SUBSTRAT PRÉFÉRENTIEL DE LA PAP26 VACUOLAIRE ?	83
VI.C. LE TRANSPORT DES HEXOSE-Pi, UNE ÉTAPE CONTRÔLANTE ?.....	85
CHAPITRE II	89
CULTURE DE TISSU RACINAIRE ET MARQUAGES ISOTOPIQUES CHEZ COLO ET LE MUTANT <i>PAP26</i>	89
I. OBJECTIFS	89
II. MESURE DES FLUX PAR MARQUAGES ISOTOPIQUES	91
II.A. ÉVOLUTION DE MARQUAGE AU COURS DU TEMPS.....	91
II.B. MARQUAGES SUR TEMPS COURTS.....	93
III. EFFET DU SUCRE EXTERNE SUR LES RACINES EN CULTURE	97
III.A. PRÉREQUIS : IDENTIFICATION DE L'ÉTAT STATIONNAIRE MÉTABOLIQUE	97
III.B. EFFET DU SUCRE EXTERNE SUR LES CINÉTIQUES DE MARQUAGE DES COMPOSES TOTAUX, SOLUBLES ET INSOLUBLES CHEZ LE SAUVAGE	101
III.C. CINÉTIQUES DE MARQUAGE DES SUCRES SOLUBLES	105
III.D. ANALYSE DU MARQUAGE DU SACCHAROSE	107
IV. CALCUL DES VITESSES DE SYNTHÈSE DES SUCRES	109
IV.A. DÉTERMINATION DE LA RAS DES SUCRES	109
IV.B. VITESSES UNIDIRECTIONNELLES DE SYNTHÈSE DU SACCHAROSE ET DES HEXOSES CHEZ LE SAUVAGE	109
IV.C. VITESSES UNIDIRECTIONNELLES DE SYNTHÈSE DU SACCHAROSE ET DES HEXOSES PAR LA MÉTHODE DISCRÈTE CHEZ LE MUTANT <i>PAP26</i>	113
V. DISCUSSION	117

V.A. LE CYCLE DES HEXOSE-PHOSPHATES.....	117
V.B. LIMITES DE L'APPROCHE	119
CHAPITRE III	123
MODÉLISATION DE LA COMPARTIMENTATION ET DU MÉTABOLISME DES SUCRES DES RACINES EN CULTURE	123
I - OBJECTIFS.....	123
II. INTRODUCTION	125
III. CRÉATION ET UTILISATION DU MODÈLE	125
III.A. QUATRE VERSIONS DU MODÈLE DE DIFFÉRENTES COMPLEXITÉ	125
III.B. ÉTAT STATIONNAIRE D'UN SYSTÈME EN CROISSANCE	127
III.C. PARAMETRAGE DES MODELES	129
IV. ÉVALUATION ET OPTIMISATION DES MODÈLES.....	137
IV.A. CONCENTRATIONS EN SUCRES À L'ÉTAT STATIONNAIRE.....	137
IV.B. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES À OPTIMISER	141
IV.D. LES SOLUTIONS À L'ÉTAT STATIONNAIRE ET DISPERSION DES VALEURS OPTIMISÉES	143
IV.E. VERS UN PARAMÉTRAGE MOYEN.....	145
V. ANALYSE DES MODÈLES AVEC LES PARAMÈTRES OPTIMISÉS	147
V.A. ÉTAT STATIONNAIRE MÉTABOLIQUE	147
V.B. MODÉLISATION DES CINÉTIQUES DE MARQUAGE	147
V.C. EXPLOITATION DU MODÈLE	155
VI. DISCUSSION	165
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	171
I. RAPPEL DES OBJECTIFS, METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE ET PRINCIPAUX RÉSULTATS.....	171
II. DONNÉES EXPERIMENTALES VS. MODÉLISATION <i>IN SILICO</i> : DEUX APPROCHES COMPLÉMENTAIRES.....	171
III. PERSPECTIVES ET VALORISATIONS	173
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	177
I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE	179
I.A. VARIÉTÉ ET TRANSFORMANTS D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	179
I.B. STÉRILISATION DES GRAINES	179
I.C. CHAMBRE DE CULTURE	181
I.D. CROISEMENTS DES MUTANTS	181
I.E. CONDITIONS DE CULTURE	181
I.F. PRÉPARATION DE PROTOPLASTES ET DE VACUOLES	183
II. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	185

II.A. CHOIX DES AMORCES	185
II.B. VÉRIFICATION DE L'HOMOZYGOTIE	187
II.C. CYCLES PCR	187
II.D. CONFIRMATION DE L'HOMOZYGOTIE	187
III. ANALYSES MÉTABOLIQUES ET ENZYMATIQUES.....	188
III.A. RESPIRATIONS DES RACINES.....	188
III.B. EXTRACTION DES TISSUS ET SÉPARATION DE COMPOSÉS INTRACELLULAIRES	188
III.C. SÉPARATION ET DOSAGE DU SACCHAROSE, GLUCOSE ET FRUCTOSE PAR HPLC	190
III.D. DOSAGES ENZYMATIQUE DES MÉTABOLITES.....	192
III.E. DOSAGES COLORIMÉTRIQUES	193
III.F. DOSAGES DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES.....	193
III.G. MARQUAGES ISOTOPIQUES & DETERMINATION DES RAS	198
IV. TRAITEMENT DES DONNÉES PAR INFORMATIQUE	200
BIBLIOGRAPHIE	203
ANNEXES	211
I. DONNÉES COMPLÉMENTAIRES.....	211
II. COMMUNICATIONS & "WORKSHOP"	218
II.A. PUBLICATION	218
II.B. COMMUNICATION ORALE	218
II.C. COMMUNICATIONS PAR AFFICHE	218
II.D. WORKSHOP	218
III. RÉSUMÉ	220

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1. MÉCANISME D'IMPORT DU SACCHAROSE DANS LES CELLULES PUIITS.....	18
FIGURE 2. PRINCIPAUX RÔLES DU SACCHAROSE CHEZ LES VÉGÉTAUX.....	20
FIGURE 3. COMPARTIMENTATION DES SUCRES DANS UNE CELLULE PUIITS.....	22
FIGURE 4. CYCLES FUTILES DU SACCHAROSE DANS LES TISSUS HÉRÉROTROPHES.....	24
FIGURE 5. "DIAGRAMMATIC REPRESENTATION OF THE VARIOUS TRANSPORT SYSTEMS DOCUMENTED FOR PLANT CELLS".....	28
FIGURE 6. ARBRES PHYLOGÉNÉTIQUES DES TRANSPORTEURS DE MONOSACCHARIDES ET DE SACCHAROSE CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	30
FIGURE 7. LES LIAISONS DE COORDINATION DES ATOMES DE FE ET DE ZN DANS LE CENTRE BIMÉTALLIQUE DE LA PROTÉINE ATPAP26.....	36
FIGURE 8. PRÉDICTION DE LA STRUCTURE 3D DE LA PROTÉINE PAP26 D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> PAR HOMOLOGIE DE SÉQUENCES.....	36
FIGURE 9. CARTE DE CLASSIFICATION DE LA FAMILLE MULTIGÉNIQUE DES PAPS CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	38
FIGURE 10. PROFIL D'EXPRESSION DES 28 GÈNES CODANT POUR LES PAPS D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	38
FIGURE 11. PRÉDICTION DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE LA PROTÉINE ATPAP26 CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	40
FIGURE 12. RÔLES HYPOTHÉTIQUES DES PAPS SÉCRÉTÉES ET VACUOLAIRES DANS LA CARENCE EN PI.....	40
FIGURE 13. ETAPES DE CONSTRUCTION D'UN MODÈLE CINÉTIQUE <i>IN SILICO</i>	50
FIGURE 14. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL CONCERNANT LE RÔLE DE L'ÉCHANGEUR D'HEXOSES-PHOSPHATES/PI ET DES PAPS DANS LE MÉTABOLISME ET LE STOCKAGE DES SUCRES DANS LA VACUOLE.....	52
FIGURE 15. EFFET DES SUCRES EXTERNES SUR LA CROISSANCE DES PLANTULES.....	58
FIGURE 16. ACTIVITÉ G6PASE ACIDE DE PLANTULE ENTIÈRE DE LIGNÉES SAUVAGE ET MUTANTES.....	58
FIGURE 17. ACTIVITÉ G6PASE ACIDE DANS LES FEUILLES ET LES RACINES DES LIGNÉES COLO ET <i>PAP26</i>	60
FIGURE 18. ACTIVITÉ INVERTASE ACIDE DANS LES FEUILLES ET LES RACINES DE LIGNÉES SAUVAGE ET MUTANTES.....	60
FIGURE 19. ISOLEMENT DE VACUOLES À PARTIR DE PROTOPLASTES DE FEUILLES ET DE RACINES D' <i>ARABIDOPSIS</i>	62
FIGURE 20. ISOLEMENT DE VACUOLES À PARTIR DE PROTOPLASTES DE FEUILLES SELON DEUX PROTOCOLES.....	64
FIGURE 21. ACTIVITÉ PHOSPHATASE ACIDE SUR DIFFÉRENTES FRACTIONS.....	66
FIGURE 22. ACTIVITÉ A-MANNOSIDASE SUR DIFFÉRENTES FRACTIONS.....	66
FIGURE 23. ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PLASTIDIALES ET CYTOSOLIQUES MESURÉES SUR VACUOLES ISOLÉES.....	68
FIGURE 24. ENRICHISSEMENTS DES ENZYMES DE LA VACUOLE PAR RAPPORT AU PROTOPLASTE.....	68
FIGURE 25. CONTAMINATION DES VACUOLES ISOLÉES PAR LE CYTOSOL ET LES CHLOROPLASTES.....	68
FIGURE 26. TENEURS EN SUCRES ET EN PI DES VACUOLES.....	70
FIGURE 27. PROTONATION ET DÉPROTONATION DE L'ACRIDINE ORANGE (AO) ET D'UN AGENT DÉCOUPLANT.....	70
FIGURE 28. DÉTERMINATION DU PH VACUOLAIRE.....	72
FIGURE 29. EFFET DE L'ATP ET DU PPI SUR L'ÉNERGISATION DES VACUOLES.....	72
FIGURE 30. ENREGISTREMENT TYPIQUE DE L'EFFET D'UN SUCRE-PI ET DU CCCP SUR LA FLUORESCENCE DE L'ACRIDINE ORANGE.....	74
FIGURE 31. EFFET DES SUCRES SUR LA VITESSE DE SORTIE DE PROTONS DE VACUOLES ISOLÉES DE LA LIGNÉE SAUVAGE COLO.....	74
FIGURE 32. EFFET DES SUCRES SUR LA VITESSE DE SORTIE DE PROTONS CHEZ LES MUTANTS <i>GPT2</i> ET <i>SUT4</i>	76
FIGURE 33. EFFET DES SUCRES SUR LA VITESSE DE SORTIE DES PROTONS CHEZ LES MUTANTS <i>TMT1-2</i>	76
FIGURE 34. ACTIVITÉ G6P- ET PEP-PHOSPHATASE ACIDE SUR VACUOLES ÉCLATÉES ISSUES DES LIGNÉES COLO ET <i>PAP26</i>	78
FIGURE 35. SCHÉMA HYPOTHÉTIQUE DU FONCTIONNEMENT <i>IN VITRO</i> DES ACTIVITÉS G6P- (A) ET PEP-PHOSPHATASE ACIDE (B) DANS DES VACUOLES INTACTES (A).....	78
FIGURE 36. EXEMPLE DE DÉTERMINATION DE VITESSE D'APPARITION DU [U- ¹⁴ C]-GLUCOSE À PARTIR DE [U- ¹⁴ C]-G6P SUR VACUOLES INTACTES.....	78
FIGURE 37. ACTIVITÉ DE SYNTHÈSE DU GLUCOSE ET DU PYRUVATE À PARTIR DU G6P ET DU PEP SUR VACUOLES INTACTES.....	80
FIGURE 38. CINÉTIQUE DE MARQUAGE D'UNE SÉRIE D'INTERMÉDIAIRES SUR UNE VOIE MÉTABOLIQUE LINÉAIRE.....	90
FIGURE 39. MARQUAGES SUR TEMPS COURTS DES VOIES DE SYNTHÈSE ET DE DÉGRADATION DU SACCHAROSE.....	94
FIGURE 40. VITESSE DE CONSOMMATION D'O ₂ DES RACINES EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE.....	96
FIGURE 41. EFFET DU SUCRE EXTERNE SUR LA CROISSANCE DU TISSU RACINAIRE..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.	98
FIGURE 41. EFFET DU SUCRE EXTERNE SUR LA CROISSANCE DU TISSU RACINAIRE.....	98
FIGURE 42. TENEURS EN SUCRES SOLUBLES (A) ET EN GLUCOSE-6-PHOSPHATE (B) DU TISSU RACINAIRE EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE.....	98
FIGURE 43. VITESSE DE CONSOMMATION DU GLUCOSE PAR LES RACINES EN FONCTION DU TEMPS DE CULTURE.....	100

FIGURE 44. CINÉTIQUE D'INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITÉ DANS LES RACINES EN CULTURE	100
FIGURE 45. CINÉTIQUE D'INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITÉ DANS LES COMPOSÉS INSOLUBLES ET SOLUBLES DES RACINES EN CULTURE.....	102
FIGURE 46. PART DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LA FRACTION INSOLUBLE PAR RAPPORT À LA RADIOACTIVITÉ TOTALE	102
FIGURE 47. PART DE LA RADIOACTIVITÉ INCORPORÉE DANS LES FRACTIONS NEUTRE (A), CATIONIQUE (B) ET ANIONIQUE (C) PAR RAPPORT À LA TOTALITÉ DES COMPOSÉS SOLUBLES	104
FIGURE 48. CINÉTIQUE D'INCORPORATION DE LA RADIOACTIVITÉ DANS LES SUCRES SOLUBLES DE LA LIGNÉE COLO.....	106
FIGURE 49. EVOLUTION DE LA RAS DU GLUCOSYL ET DU FRUCTOSYL DU SACCHAROSE	106
FIGURE 50. CINÉTIQUE D'ÉVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (RAS) DU G6P	108
FIGURE 51. CINÉTIQUE D'ÉVOLUTION DE LA RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (RAS) DES SUCRES SOLUBLES DES LIGNÉES COLO ET MUTANTES	108
FIGURE 52. CINÉTIQUES DE SYNTHÈSE DES SUCRES CHEZ COLO.....	110
FIGURE 53. TENEURS EN SUCRES DANS LES RACINES EN CULTURE DE COLO ET DU MUTANT <i>PAP26</i>	112
FIGURE 54. TENEUR EN G6P DANS LES RACINES EN CULTURE DE COLO ET DU MUTANT <i>PAP26</i>	112
FIGURE 55. FLUX D'INTERCONVERSIONS DES SUCRES SUR COLO (A) ET <i>PAP26</i> (B)	114
FIGURE 56. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU RÉSEAU MÉTABOLIQUE ÉTUDIÉ DANS LES 4 VERSIONS DU MODÈLE	126
FIGURE 57. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU FONCTIONNEMENT D'UNE VOIE MÉTABOLIQUE LINÉAIRE DANS UNE CELLULE EN CROISSANCE	128
FIGURE 58. CONCENTRATION DES SUCRES À L'ÉTAT STATIONNAIRE (M0).....	136
FIGURE 59. CONCENTRATION DES SUCRES À L'ÉTAT STATIONNAIRE (M1 & M2).....	138
FIGURE 60. CONCENTRATION DES SUCRES À L'ÉTAT STATIONNAIRE (M3).....	140
FIGURE 61. EXEMPLE DE RÉSULTATS D'UN TEST DE SENSIBILITÉ.....	140
FIGURE 62. EXEMPLE DE L'EFFET D'UN JEU DE PARAMÈTRE SUR LE SCORE <i>SCE</i> ET SUR LA TENEUR EN SUCRES CALCULÉE À L'ÉTAT STATIONNAIRE (M2)	142
FIGURE 63. EXEMPLE DE RÉSULTATS D'UNE OPTIMISATION (M2)	142
FIGURE 64. CONCENTRATIONS DES SUCRES À L'ÉTAT STATIONNAIRE APRÈS OPTIMISATION	146
FIGURE 65. EXEMPLES DE SIMULATION DE L'ÉVOLUTION DE LA RAS AU COURS DU TEMPS (M2).....	148
FIGURE 66. COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DE LA RAS DU GLUCOSE, DU FRUCTOSE ET DU SACCHAROSE TOTAL AU COURS DU TEMPS	150
FIGURE 67. COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DE LA RAS DU G6P TOTAL AU COURS DU TEMPS	152
FIGURE 68. EXEMPLE D'UN GRAPHIQUE LOGSIMULATION = F(LOGEXPÉRIENCE)	154
FIGURE 69. COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DE LA RAS EN FONCTION DU PARAMÉTRAGE DE LA SUSY.....	154
FIGURE 70. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU RÉSEAU MÉTABOLIQUE ÉTUDIÉ : RÔLE DU PLASTE DANS LA VERSION 3 DU MODÈLE	154
FIGURE 71. RÔLE DU PLASTE DANS L'ÉVOLUTION DE LA RAS DES SUCRES AU COURS DU TEMPS	156
FIGURE 72. CARTE DE FLUX DE LA VERSION 3 DU MODÈLE DU MÉTABOLISME DES SUCRES DANS LES RACINES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	158
FIGURE 73. COEFFICIENTS DE CONTRÔLE DES CONCENTRATIONS EN SUCRES.....	160
FIGURE 74. COEFFICIENTS DE CONTRÔLE DES CYCLES DE SUBSTRAT	162
FIGURE 75. EFFET DE LA MODULATION DE LA PHOSPHATASE ACIDE (PAP), DE L'ÉCHANGEUR HEXOSE-PI/PI (GPT) ET DE L'INVERTASE ACIDE (INV) SUR LES CONCENTRATIONS EN SUCRES ET SUR LES FLUX.....	164
FIGURE 76. COMPARAISON ENTRE LES FLUX CALCULÉS PAR LE MODÈLE CINÉTIQUE ET CEUX CALCULÉS PAR LA MÉTHODE PAR INTERVALLES.	166
FIGURE 77. PRINCIPE DE FÉCONDATION ENTRE DEUX INDIVIDUS D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	180
FIGURE 78. CULTURE HYDROPONIQUE DE COLO À 20 JOURS	180
FIGURE 79. MONTAGE UTILISÉ DANS LA CULTURE DE RACINES D' <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	182
FIGURE 80. PRINCIPE DE LA SÉLECTION DES MUTANTS HOMOZYGOTES PAR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	186
FIGURE 81. SÉPARATION DES FRACTIONS NEUTRE, ANIONIQUE ET CATIONIQUE DES COMPOSÉS HYDROSOLUBLES.....	189
FIGURE 82. PRINCIPE DES DOSAGES DES SUCRES PAR LA MÉTHODE ENZYMATIQUE	191
FIGURE 83. PRINCIPE DU DOSAGE DE L'ACTIVITÉ FRUCTOKINASE (A) ET GLUCOKINASE (B)	195
FIGURE 84. PRINCIPE DU DOSAGE DE L'ACTIVITÉ PHOSPHOFRUCTOKINASE.....	195
FIGURE 85. PRINCIPE DU DOSAGE DE L'ACTIVITÉ G6PDH (A) ET GAPDH (B).....	197
FIGURE 86. DÉTERMINATION DE LA RAS DU G6P (A) ET DE L'ACTIVITÉ G6PASE SUR VACUOLES ISOLÉES (B).....	197

TABLEAU I. PROPRIÉTÉS ET CARACTÉRISATION DES 5 PAPS D' <i>A. THALIANA</i> CONNUES À CE JOUR.	40
TABLEAU II. ACTIVITÉ PHOSPHATASE DE LA PAP12 ET DE LA PAP26 SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS PHOSPHORYLÉS.....	42
TABLEAU III. LISTE NON EXHAUSTIVE DES PROGRAMMES DE SIMULATIONS UTILISABLES EN BIOLOGIE	50
TABLEAU IV. COMPARAISON DE DEUX MÉTHODES D'ISOLEMENT DE VACUOLES	64
TABLEAU V. VITESSES DE CONSOMMATION DES SUCRES EXTERNES	100
TABLEAU VI. COMPARAISON DU MÉTABOLISME DES RACINES EN PRÉSENCE DE FRUCTOSE OU DE GLUCOSE EXTERNE	102
TABLEAU VIII. CALCULS DES FLUX DE SYNTHÈSE DES SUCRES CHEZ COLO.....	110
TABLEAU IX . CALCULS DES FLUX DE SYNTHÈSE DES SUCRES CHEZ LE MUTANT <i>PAP26</i>	112
TABLEAU X. FLUX SPÉCIFIQUES D'EXPANSION DES SUCRES.	128
TABLEAU XI. PARAMÈTRES PAR DÉFAUT DU MODÈLE.....	130
TABLEAU XII. ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES PRINCIPALES ENZYMES DU RÉSEAU	132
TABLEAU XIII. RÉACTIONS ET ÉQUATIONS DE VITESSES UTILISÉES DANS LES DIFFÉRENTS MODÈLES.....	134
TABLEAU XIV. ACTIVITÉ PHOSPHATASE DE LA PROTÉINE <i>PAP26</i> PURIFIÉE SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS	136
TABLEAU XV. PARAMÈTRES CINÉTIQUES DE LA PROTÉINE <i>PAP26</i> PURIFIÉE	136
TABLEAU XVI. COHÉRENCE DU MODÈLE AVANT ET APRÈS OPTIMISATION	138
TABLEAU XVII. VALEURS MOYENNES DES PARAMÈTRES OPTIMISÉS	144
TABLEAU XVIII. COMPARAISON DES MODÈLES M1, M2 ET M3 AVEC LES EXPÉRIENCES.....	152
TABLEAU XIX. GÈNES ÉTUDIÉS, MUTANTS ET AMORCES ASSOCIÉES.....	178
TABLEAU XX. SÉQUENCES DES AMORCES D'AMPLIFICATION DE LA BORDURE GAUCHE (5' → 3') DES T-DNA	178
TABLEAU XXI. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE MURASHIGE & SKOOG	182

ABRÉVIATIONS

[U-14C]-fructose	fructose marqué au 14C sur tous ses carbones
[U-14C]-glucose	glucose marqué au 14C sur tous ses carbones
3'UTR	3' Untranslated Region (région non traduite en 3')
5'UTR	5' Untranslated Region (région non traduite en 5')
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ADN-T ou t-DNA	Acide DéoxyriboNucléique de transfert
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
AO	Acridine orange®
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine 5' triphosphate
CCCP	carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
COPASI	COmplex PAthway Simulator
DO	Densité Optique
dpm	Désintégrations par minute
EDTA	Acide éthylène diamine trétraacétique
EtOH	Ethanol
F6P	Fructose-6-phosphate
FK	Fructokinase
G1P	Glucose-1-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PDH	Activité glucose-6-phosphate déshydrogenase
GAPDH	Activité glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
GK	Glucokinase
GPT	glucose-6-phosphate/phosphate translocator
HK	Hexokinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INV	Invertase
kDa	kilo Dalton (10^3)
Ki	constante d'inhibition
Km	constante de Michaelis
LB, RB	Left Border, Right Border
LDH	Lactate déshydrogénase
MF	Matière Fraîche
Milieu MS	Milieu de culture Murashige & Skoog
mQ	eau miliQ
MS	Matière sèche
MU	4-méthylumbellifèrone
MUM	4-méthylumbelliferyl- α -mannopyranoside
NAD+(H)	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (réduit)
NADP+(H)	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé (réduit)

p/v	poids/volume
PAP	Purple Acid Phosphatase
pb, Mb	paire de bases, M bases (10^6)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	phosphoénolpyruvate
PFK	Phosphofructokinase
Pi	phosphate inorganique
PySCeS	python Simulator for Cellular Systems
RAS	radioactivité spécifique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
rpm	rotation par minute
SCE	Somme des carrés des écarts
SPS	Saccharose phosphate synthase
SuSy	Saccharose synthase
SUT4	sucrose transporter
TAIR	The Arabidopsis Information Ressource
Tm	Température moyenne à laquelle 50% des brins d'ADN sont hybridés
TMT	tonoplast monosaccharide transporter
TRIS	Tris hydroxyméthylaminométhane
Ui	Unité enzymatique internationale
UDP	Uridine-5'-diphosphate
UDPG	Uridine-5'-diphosphate-glucose
v/v	volume/volume
Vm (ou Vmax)	Vitesse maximale d'une enzyme

LE LABORATOIRE, L'ÉQUIPE ET LES OBJECTIFS

L'UMR 1332 BFP "Biologie du Fruit et Pathologie" s'intéresse à deux aspects fondamentaux de la recherche végétale, *i)* l'étude du développement précoce du fruit et la mise en place des critères de qualité des fruits charnus et *ii)* l'étude de pathogènes non cultivables de plante et de leurs interactions avec leurs plantes hôtes ou leurs vecteurs. Mon travail de thèse s'inscrit dans la première thématique et s'intègre à l'équipe *Métabolisme* dont l'activité centrale regroupe la modélisation intégrative du fruit de tomate et l'analyse des réseaux métaboliques. L'objectif de l'équipe est de mieux comprendre le métabolisme et la manière dont il répond aux conditions environnementales et influence la production et la qualité de la biomasse végétale.

Les recherches effectuées au cours de mon doctorat ont pour objectif d'étudier l'implication d'activités phosphatases acides dans le métabolisme et le stockage des sucres dans la vacuole d'*Arabidopsis thaliana*. Mon travail s'inscrit dans la continuité de celui mené par Ana Paula Alonso décrivant une voie de biosynthèse du glucose impliquant du G6P et une activité putative G6Pase acide sur les pointes de racines de maïs. Avant la présentation des résultats obtenus une synthèse bibliographique sera détaillée en guise d'introduction afin de replacer le sujet dans son contexte scientifique.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. PRÉAMBULE

Dans la première partie de l'introduction de ce manuscrit, je présenterai les raisons du choix d'*Arabidopsis thaliana* comme modèle d'étude. Dans la deuxième partie, seront développés les liens étroits qui existent entre la photosynthèse, le transport du saccharose et la compartimentation subcellulaire des sucres. Cette partie sera également l'occasion de détailler les mécanismes d'imports des sucres dans la vacuole et de présenter la famille multigénique des "Purple Acid Phosphatases" (PAPs) chez *Arabidopsis thaliana*. La troisième partie décrira l'approche utilisée dans mon travail de thèse, notamment les contraintes, limites et précautions à prendre dans l'étude du métabolisme chez les végétaux. Dans le but de valoriser et d'exploiter les données expérimentales générées par les approches en -omique, les approches *in silico* se sont développées en même temps que les progrès de la micro-informatique ; ce point sera abordé dans la quatrième partie de cette introduction. Finalement, la cinquième et dernière partie présentera le contexte de recherche dans lequel s'est placé ce sujet, les objectifs généraux ainsi que la présentation de mon travail de thèse.

Arabidopsis thaliana est une petite plante à fleur (20-25cm) appartenant à la famille des *Brassicaceae*, famille connue pour regrouper les espèces cultivées du chou, du radis et du colza. Elle est découverte au XVI^{ème} siècle par un botaniste allemand, Johannes Thal, qui publie en 1577 "*Sylva Hercynia*" dans lequel apparaît pour la première fois la description de cette plante sous le nom de *Pilosella siliquosa* (Ressource, TAIR). Ce nom change à plusieurs reprises avant qu'elle ne soit connue sous l'appellation *Arabidopsis thaliana* en hommage à son découvreur. Il faut ensuite attendre 1907 et les travaux de Friedrich Laibach sur le nombre de chromosomes chez différentes espèces pour voir apparaître *A. thaliana* dans une étude. Ce n'est qu'à partir de 1943 qu'*Arabidopsis thaliana* intéresse véritablement la communauté scientifique. Laibach décrit à cette époque les nombreux avantages que cette plante présente, cycle de vie court (6 à 8 semaines à partir de la germination pour obtenir des graines matures ; <http://www.arabidopsis.org>, croisements facilités, descendance nombreuse, petite taille permettant de la cultiver en grand nombre dans des environnements confinés tels que des chambres de cultures et surtout facilité de la mutagenèse ; pour revue (Meyerowitz, 2001)). L'étudiante de Laibach, Erna Reinholz, publie en 1945 sa thèse, dans laquelle elle expose ses travaux sur la création de mutants à partir de rayons-X. C'est à cette époque que naît la première collection de mutants d'*Arabidopsis thaliana*. C'est à Laibach et ses étudiants que l'on doit aujourd'hui les bases des larges collections d'écotypes d'*Arabidopsis*.

Elle ne devient plante modèle qu'avec l'essor de la génétique, de la physiologie et de la biologie moléculaire dans les années 1980 (Pour revue (Meyerowitz, 2001)). À cette époque, l'idée de se tourner vers un organisme commun pour les végétalistes anime tous les débats. Le pétunia, pour sa facilité de transformation, et la tomate, pour la large collection de mutants déjà disponibles, divisent la communauté scientifique. Pourtant la balance penchera du côté des défenseurs d'*Arabidopsis* pour les raisons évoquées quelques lignes plus haut. Son génome de petite taille (≈ 120 Mb réparties sur 5 chromosomes) est un avantage certain et a permis le développement rapide des outils génétiques et moléculaires. En 1986 apparaît le premier séquençage d'un gène d'*Arabidopsis* et le premier transformant par un insert d'ADN-t est rendu public (Meyerowitz, 2001).

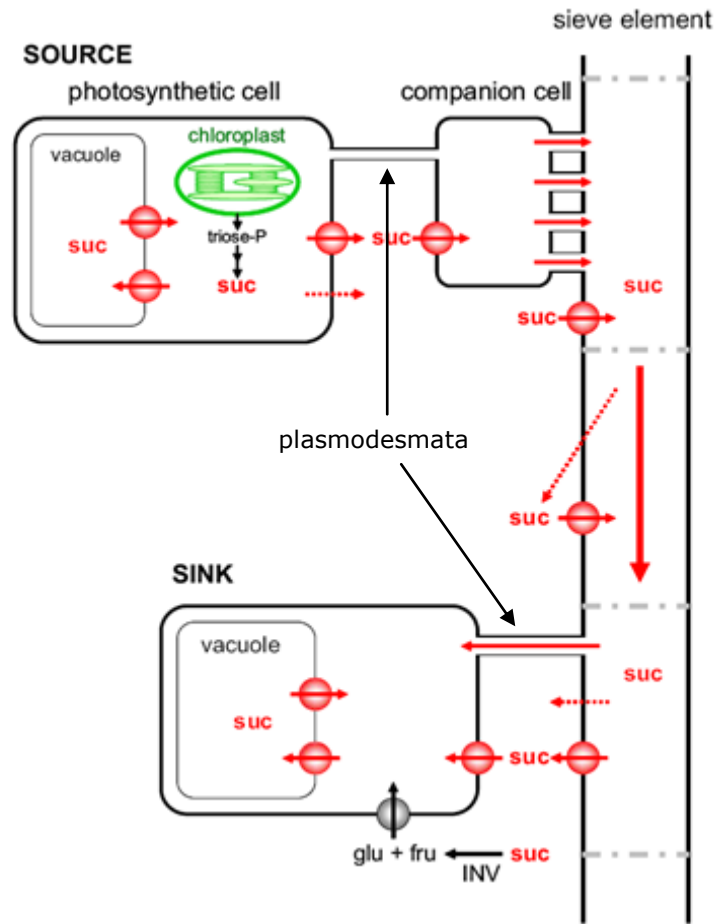


Figure 1. Mécanisme d'import du saccharose dans les cellules puits.

Selon (Shiratake, 2007). Le saccharose synthétisé dans le cytosol des cellules photosynthétiques est transporté vers l'apoplasme par des transporteurs ou par simple diffusion (en tirés). Le saccharose retrouvé dans l'apoplasme est chargé dans les cellules compagnes (CC) puis dans les tissus conducteurs ("sieve elements" ou SE) *via* des plasmodesmes. Le saccharose chargé dans le SE des organes sources est transporté vers les organes puits par la force de puits. Le saccharose est déchargé du SE au niveau des cellules des organes puits par voie symplastique (plasmodesmes) ou apoplastique. Le saccharose "apoplastique" peut être déchargé dans les cellules puits par des transporteurs du saccharose ou être clivé par des invertases acides pariétales afin de rentrer dans la cellule sous forme d'hexoses par des transporteurs dédiés. Le saccharose peut être stocké dans la vacuole des cellules sources et puits par des transporteurs de saccharose tonoplastiques.

III – UNE HISTOIRE D'ÉCHELLE : DE L'ORGANE À LA COMPARTIMENTATION SUB-CELLULAIRE

Les assimilâts produits au cours de la photosynthèse dans les feuilles sont transportés à travers la plante vers les organes cibles. La relation organe source-organe puits est essentielle pour rendre compte de ce phénomène.

III.A. À L'ÉCHELLE DE LA PLANTE : RELATIONS SOURCES-PUITS

Un organe source est un organe qui va produire d'avantage d'assimilâts carbonés que nécessaire. Les organes puits, tels que les racines, les fruits ou les jeunes feuilles, nécessitent un apport externe en assimilâts provenant des organes sources. Il y a donc un échange dynamique entre les photo-assimilâts produits lors de la photosynthèse et la nutrition minérale et hydrique des plantes puisée par les racines dans le sol. L'ensemble de ces composants transite à la fois par le système de circulation de la plante (xylème et phloème), et par les voies apoplastique et symplastique, impliquant dans ce cas des molécules membranaires spécialisées (canaux, transporteurs, facilitateurs, etc.). Le saccharose représentant la forme principale du transport du carbone, on peut résumer les deux grands mécanismes de son import (indirectement produit par la photosynthèse) dans les tissus puits de la manière suivante (**figure.1**):

i. la voie symplastique. Le saccharose est transféré de cellule en cellule au travers des structures appelées plasmodesmes. Le "déchargement" des assimilâts par voie symplastique est un mécanisme passif qui suit les gradients de concentration (Oparka, 1990). Dans ce cas, le saccharose est "livré" intact dans le cytoplasme des cellules.

ii. la voie apoplastique. Le saccharose peut passer directement au travers de la membrane plasmique grâce à un symport saccharose- H^+ (Lemoine et al., 1999) ou bien, être hydrolysé par une invertase pariétale en fructose et glucose qui sont ensuite importés dans les cellules grâce à un symport hexoses- H^+ (Sauer and Stadler, 1993; Fillion et al., 1999).

Le saccharose synthétisé dans les tissus sources est transporté par la sève élaborée circulant dans un tissu conducteur, le phloème. Lorsque le saccharose est déchargé dans les cellules puits, la voie symplastique utilisant le gradient de

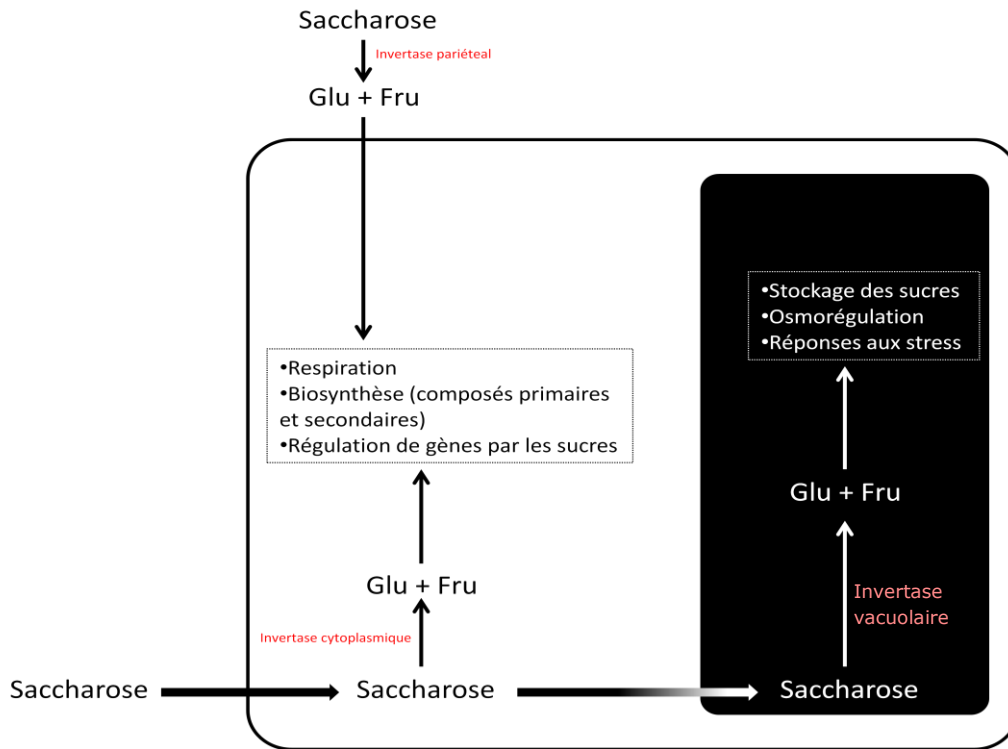


Figure 2. Principaux rôles du saccharose chez les végétaux

Les fonctions suivantes sont également connues pour le saccharose : préservation des protéines et stabilisation des membranes en conditions de stress hydrique ; Rôle de transport du carbone

concentration de saccharose n'est pas suffisante. Dès lors que la concentration dans la cellule puits est supérieure à sa concentration dans le phloème le sucre ne peut plus rentrer passivement. Selon la loi de Münch et Krafts, une "force de puits" existe à plusieurs niveaux permettant le maintien du gradient de concentration entre les tissus sources et puits : **i)** clivage du saccharose en hexoses par les invertases pariétales. Le glucose et le fructose peuvent rentrer dans la cellule puits par des transporteurs spécifiques (**figure.1**) **ii)** clivage intracellulaire du saccharose par la sucrose synthase (SuSy) et les invertases neutres (cytosoliques) ou acides (vacuolaires) **iii)** utilisation du saccharose pour la synthèse de polymères tels que l'amidon ou les polysaccharides pariétaux. Ces deux mécanismes permettent non seulement de créer un gradient de saccharose mais également d'amplifier le gradient osmotique. Le stockage vacuolaire des sucres et la transformation du saccharose permettent donc de constituer une véritable "force de puits", déplaçant de façon irréversible le saccharose de son site de production (la feuille) vers son site d'utilisation (les racines, les fruits ...).

III.B. À L'ÉCHELLE DE LA CELLULE: MÉTABOLISME DES SUCRES DANS LES CELLULES PUIITS

En fonction de la demande par le tissu hétérotrophe (puits) et de son statut physiologique, le saccharose a plusieurs devenir dans la cellule (**figure.2**). Il va entrer dans différentes voies de biosynthèse localisées dans plusieurs compartiments subcellulaires. Le saccharose peut alimenter la glycolyse (cytosol) pour y être oxydé en pyruvate ; ce pyruvate servant de précurseur au cycle de Krebs dont le but est de produire de l'énergie sous la forme de molécules d'ATP et de NADH. Le saccharose peut en outre servir de source carbonée pour la biosynthèse de métabolites primaires nécessaires au développement de l'organe. Le saccharose est également stocké sous forme de polymères (amidon, composés pariétaux) ou bien utilisé pour la synthèse de composés secondaires (composés phénoliques, terpénoïdes, flavonoïdes...). Le saccharose non hydrolysé par l'invertase peut également être clivé par la sucrose synthase (SuSy) en UDP-Glucose et fructose (**figure.3**). À la différence de l'activité invertase, la SuSy est réversible *in vivo* (Geigenberger and Stitt, 1993). Trois hexoses phosphates (*i.e.* G6P, F6P, G1P) et deux sucres nucléotidiques (*i.e.* ADPG et UDPG) jouent un rôle central pour connecter toutes les voies mises en

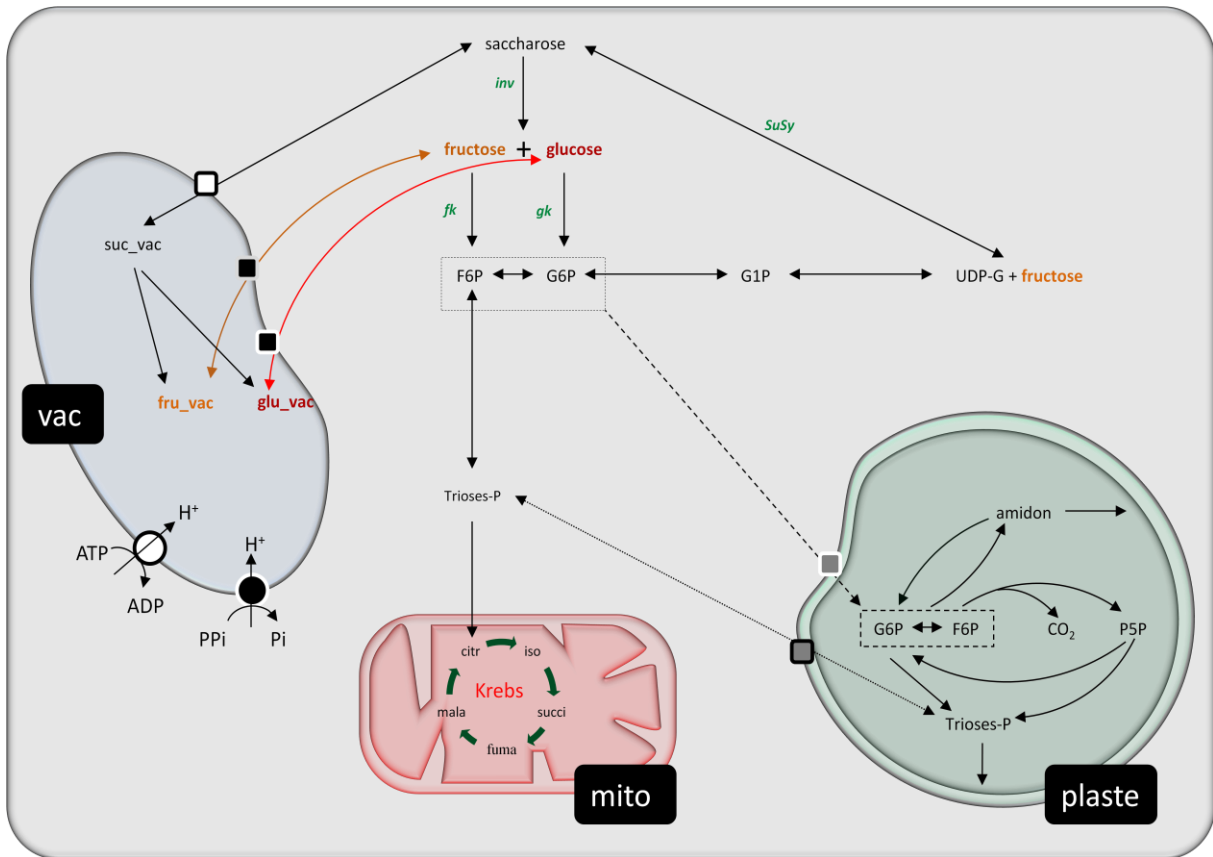


Figure 3. Compartimentation des sucres dans une cellule puits de plantes non accumulatrice de fructanes

En carré blanc entouré de noir (□) les transporteurs de saccharose, en carré noir entouré de blanc (■) les transporteurs d'hexoses, en carré gris entouré de blanc (◻) les échangeurs hexose-Pi/Pi et en carré gris entouré de noir (◼) les triose-Pi/Pi. Les hexoses et le saccharose, après clivage par une invertase neutre cytosolique (*inv*) ou par la saccharose synthase (*SuSy*), peuvent servir à alimenter la respiration et les voies de biosynthèses, après l'action de la fructokinase (*fk*), de la glucokinase (*gk*) et/ou des hexokinases, de la phosphoglucose isomérase (PGI) et de l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase). Les hexoses et le saccharose peuvent être stockés dans la vacuole des cellules puits, grâce à des transporteurs localisés dans le tonoplaste qui catalysent un antiport sucre/proton. Deux pompes H⁺-ATPase et H⁺-pyrophosphatase tonoplastiques permettent de maintenir la différence de potentiel électrochimique en protons nécessaire au fonctionnement des transporteurs. Dans la vacuole, le saccharose peut être dégradé en glucose et fructose par une invertase acide (*Inv*).

jeu dans le métabolisme du saccharose (**figure.3**). Les interconversions entre ces différents esters phosphoriques sont assurées par des enzymes particulières, localisées dans le cytosol et le plaste pour la PGI (phosphoglucoisomérase) et la PGM (phosphoglucomutase), uniquement dans le cytosol pour l'UGPase (UDPG pyrophosphorylase), et uniquement dans le plaste pour l'AGPase (ADPG pyrophosphorylase). Dans ce cadre, l'UDPG cytosolique sert de précurseur à la synthèse des polysaccharides pariétaux et du saccharose alors que l'ADPG plastidial sert de précurseur à la synthèse d'amidon. Remarquons tout de même que l'ADPG peut également être synthétisé dans le cytosol par la saccharose synthase à partir d'ADP de saccharose (Streb et al., 2009). Enfin, les sucres (saccharose, glucose et fructose) peuvent être transportés dans la vacuole pour y être stockés et/ou pour y être hydrolysés dans le cas du saccharose.

■ Les cycles de substrats ou cycles futiles

En parallèle à ces activités de clivage (Invertase et SuSy), d'autres enzymes participent à la re-synthèse du disaccharide (*e.g.* SPS). Cette coexistence d'activités antagonistes permet d'identifier quatre principaux cycles de substrats (nommés autrefois cycles futiles à cause de leur bilan énergétique consommant de l'ATP). Les conséquences physiologiques de ces cycles sont à l'heure actuelle toujours discutées (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001) et peuvent être déclinées dans plusieurs modèles de tissus puits (le fruit de tomate (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001), la racine (Alonso et al., 2005; Alonso et al., 2007a) et le tissu parenchymateux (Rohwer and Botha, 2001)). Selon un article de 2001, trois des quatre cycles impliquent le saccharose, le quatrième faisant intervenir l'amidon (**figure.4**)(Nguyen-Quoc and Foyer, 2001) :

i) Cycle de dégradation et de synthèse du saccharose cytosolique. Le disaccharide est clivé dans le cytosol par l'invertase neutre et/ou la SuSy et resynthétisé dans le même compartiment par la SPS. Le rôle de ce dernier cycle reste à débattre, mais il est probable qu'il participe à la force de puits du saccharose.

ii) Cycle de dégradation et de synthèse du saccharose via la vacuole. Le saccharose est clivé dans la vacuole par des invertases acides en glucose et fructose. Ces deux hexoses sont remobilisés dans le cytosol pour re-synthétiser le saccharose par la SuSy et par la SPS. Le rôle de ce cycle serait de permettre l'augmentation du stockage des sucres sous forme

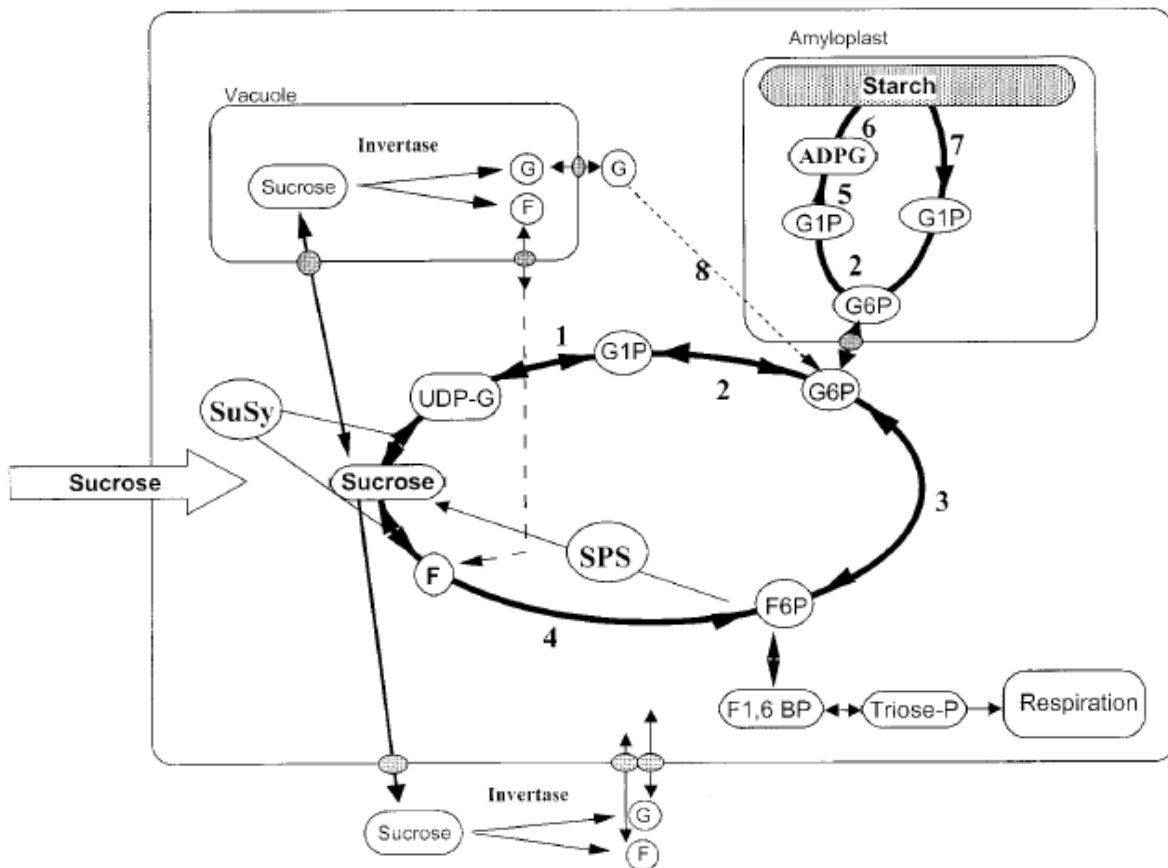


Figure 4. Cycles futiles du saccharose dans les tissus h er otrophes.

Les quatre cycles sont ceux décrits dans le texte selon des travaux de 2001 (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). Ces cycles impliquent du saccharose, des hexoses ainsi, des sucres phosphates ainsi que la compartimentation sub-cellulaire d'une cellule végétale.

d'hexoses concentrés dans la vacuole. Nous pouvons supposer également qu'il participe à la force de puits du saccharose en diminuant la concentration cytosolique du disaccharide et en augmentant la pression osmotique de la cellule permettant l'entrée de nutriments dans la cellule.

iii) Cycle de dégradation et de synthèse du saccharose dans l'apoplasme. Le saccharose est exporté en dehors de la cellule où il est clivé par les invertases acides pariétales. Les hexoses sont ensuite remobilisés dans la cellule par des transporteurs. Là encore le rôle de ce cycle est mal défini car une faible proportion de saccharose quitte la cellule par cette voie ; mais à la différence du cycle vacuolaire où les hexoses sont stockés pour une seule cellule, ce cycle pourrait servir d'organe de stockage commun des sucres pour plusieurs cellules. L'existence des cycles du saccharose reste spéculative. Il est difficile de quantifier indépendamment la part de chaque cycle du saccharose car la relation bilan est la même pour tous. Il est également possible qu'il existe une régulation concertée des cycles du saccharose par l'expression de peptides inhibiteurs des invertases, associés à la paroi et au cytosol des cellules puits (Link et al., 2004; Rausch and Greiner, 2004; Ruan et al., 2009) et pour revue (Koch, 2004).

iv) Cycle de synthèse et d'hydrolyse de l'amidon dans l'amyloplaste. L'intensité de ce cycle est minimale *in vivo* car un des points de contrôle de ce cycle futile se situerait au niveau de l'interconversion G6P – G1P au niveau de l'UGPase (Tiessen et al, 2002) et l'autre, au niveau de l'échange des hexoses phosphates entre le plaste et le cytosol (Kunz et al, 2010).

III.C. LA VACUOLE : MÉTABOLISME & STOCKAGE DES SUCRES

La vacuole est plus qu'un simple organite permettant l'expansion cellulaire et le stockage des déchets de la cellule végétale. Les plantes possèdent en réalité plusieurs types de vacuoles, chacune étant spécialisée dans une ou plusieurs fonctions particulières. Chez les angiospermes, les vacuoles sont décrites en deux grandes familles : les vacuoles lytiques et les vacuoles de stockage (Paris et al., 1996; Jauh et al., 1999). Un troisième type de vacuole a été identifié comme spécialisé dans le stockage des pigments et des protéines produites en réponse au développement et à l'environnement (Jauh et al., 1998). Les différents types de vacuoles peuvent être discriminés en fonction de la nature des aquaporines (Tonoplast Intrinsic Proteins) présentes dans le tonoplaste (Paris et al., 1996; Jauh et al., 1998; Jauh et al., 1999; Jiang et al., 2001;

Martinoia et al., 2007). Les vacuoles présentent systématiquement un pH acide par rapport au cytosol ; ce pH résulte de l'activité de pompes à protons. Cette différence de pH (ΔpH) est la composante majeure de la différence de potentiel électrochimique en H^+ de part et d'autre du tonoplaste, il n'en reste pas moins qu'il existe également une différence de potentiel électrique de quelques dizaines de mV ($\Delta\psi$ positif à l'intérieur de la vacuole). Cette dernière composante peut avoir un rôle moteur dans l'accumulation d'anions dans la vacuole (acides organiques, nitrate, etc.). Toutes les vacuoles présentent des pompes V-ATPases. En revanche, la présence de pompes V-PPases dépendrait du type de vacuoles (Maeshima, 2000; Martinoia et al., 2007). Le type et la fonction de la vacuole vont directement dépendre de la spécialisation et de la localisation du tissu (Otegui et al., 2002; Martinoia et al., 2007). Il est courant de retrouver des cellules possédant ces deux types de vacuoles en même temps. Dans la suite de cette introduction, nous ne parlerons que des vacuoles de stockage. Dans les racines, les vacuoles de stockage peuvent atteindre des tailles différentes. Chez le maïs, à l'extrémité (jusqu'à 2mm) les vacuoles représentent un volume égal à 30% du volume cellulaire total. Plus on s'éloigne, plus la part des vacuoles est importante : ainsi entre 2 et 5mm de l'extrémité racinaire, la vacuole occupe un volume identique au cytosol. Entre 5 et 7mm, le volume de/des vacuoles dépasse celui du cytosol pour atteindre 85 % du volume total de la cellule (Lee et al., 1990). La vacuole est l'organe majeur de stockage chez la plante. Le nombre et la quantité de composés retrouvés dans la vacuole vont dépendre de la nature et de l'âge du tissu, de l'espèce ou encore des conditions environnementales. On peut y trouver du glucose et du fructose en grande quantité (jusqu'à 100mM dans la pointe d'asperge) ou du saccharose dans des proportions moindres (30 à 40mM dans la pointe d'asperge et le fleuron de brocoli)(McKenzie et al., 2004). Il arrive que certains sucres soient présents à des concentrations plus élevées dans la vacuole que dans le cytosol. C'est le cas chez l'asperge et le brocoli pour le saccharose, le glucose et le fructose (McKenzie et al., 2004) et des racines de la betterave à sucre pour le saccharose ($[\text{saccharose}]_{\text{cyt}} = 76 \text{ mM}$; $[\text{saccharose}]_{\text{vac}} = 514 \text{ mM}$)(Saftner et al., 1983). Dans d'autres cas, la concentration de saccharose vacuolaire (déterminée par fractionnement non aqueux) est inférieure à celle observée dans le cytosol. Chez l'orge par exemple, elle est de 232 mM dans le cytosol et de 21 mM dans la vacuole (Winter et al., 1993). Il arrive alors que, si le saccharose ne s'accumule

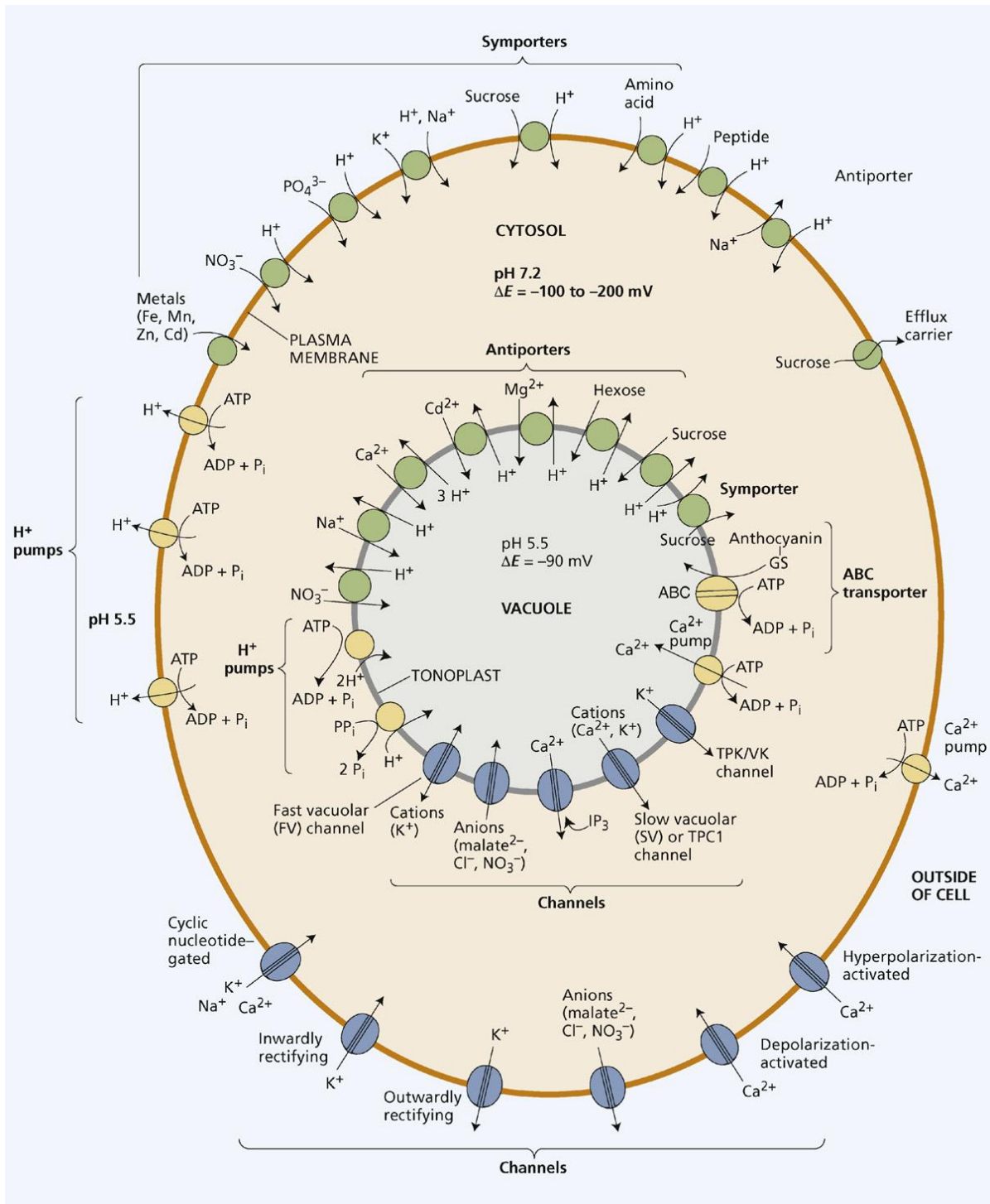


Figure 5. "Diagrammatic representation of the various transport systems documented for plant cells".

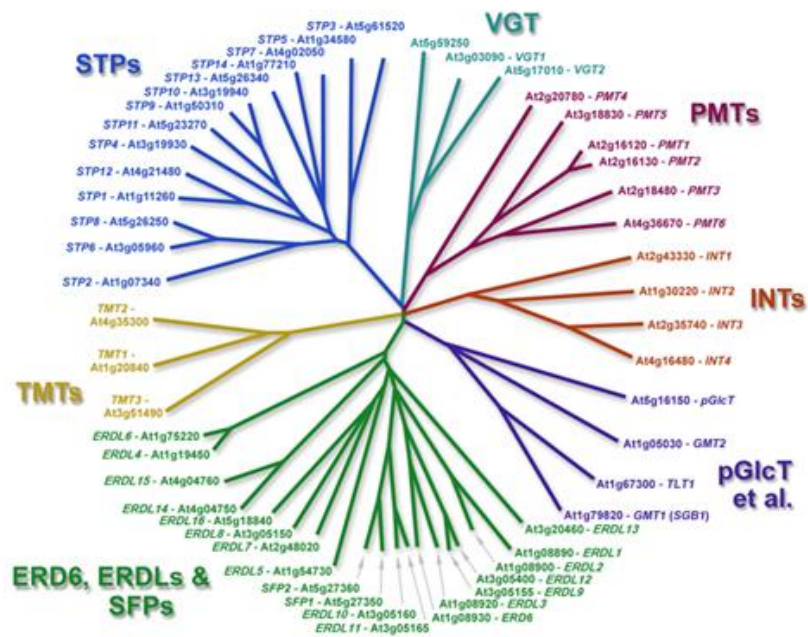
Selon (Taiz and Zeiger, 2002; Etxeberria et al., 2012). Both tonoplast and plasma membrane contain ion channels and H⁺ pumps. The tonoplast is also equipped with H⁺/antiporters and ABC transporters whereas the plasma membrane houses a variety of H⁺/solute symporters.

pas dans la vacuole, certains hexoses s'y concentrent (Preisser et al., 1992; Heineke et al., 1994). Acides organiques, acides aminés, ions, fructanes, enzymes et autres métabolites secondaires sont également des composés que l'on peut retrouver dans la vacuole (pour revue (Matile, 1987; Etxeberria et al., 2012)). Si une telle variété de composés est retrouvée à l'intérieur même des vacuoles, il faut pouvoir les faire entrer. Une revue de 2012 (Etxeberria et al., 2012), reprend les mécanismes de transport à travers la membrane plasmique et le tonoplaste (**figure.5**). On retrouve la panoplie complète des transporteurs et facilitateurs retrouvés généralement dans le règne vivant parmi lesquels les pompes V-PPases et V-ATPases nécessaires au maintien des gradients ioniques. Nous noterons comme fait marquant l'absence totale de transporteur vacuolaire du phosphate ; ce fait est plutôt déconcertant car des expériences de RMN *in vivo* du ³¹P ont démontrées la présence de phosphate inorganique en quantité importante à l'intérieur de la vacuole, réserves qui sont notamment mobilisées par les racines lors d'une carence en Pi (Matile, 1987; Lee et al., 1990; Lee and Ratcliffe, 1993; Stefanovic et al., 2011). Seul un papier de 2011 relate la présence possible d'un transporteur du Pi (PHT1) au niveau de vacuoles lytiques mais il semblerait que la présence de cette protéine soit uniquement due à un mécanisme de régulation afin de dégrader ce transporteur (Bayle et al., 2011).

■ La vacuole : transport des sucres à travers le tonoplaste

Il existe deux types de transport des sucres à travers le tonoplaste, **i**) un transport passif et **ii**) un transport actif, utilisant directement ou indirectement la différence de potentiel électrochimique en protons établie de part et d'autre du tonoplaste. Historiquement, les expériences de biochimie classique menées sur vacuoles isolées ont identifié un certain nombre d'activités de transport pour les sucres. La distinction entre le mécanisme passif ou actif est faite, soit indirectement, sur la base de l'effet de l'ATP (et plus rarement le PPI), sur la cinétique de transport du sucre radiomarké, soit directement, en mesurant les mouvements de protons associés au transport à l'aide de sondes fluorescentes (Fontes et al., 2010) ou par patch clamp (Isayenkov et al., 2010; Schneider et al., 2011; Schulz et al., 2011). Dans la plupart des cas, les entités moléculaires responsables du transport ne sont pas identifiées. Ainsi, dans le cas du saccharose et à partir de vacuoles provenant de feuilles, un mécanisme de diffusion facilitée du disaccharide a été identifié (Kaiser and Heber, 1984;

A



B

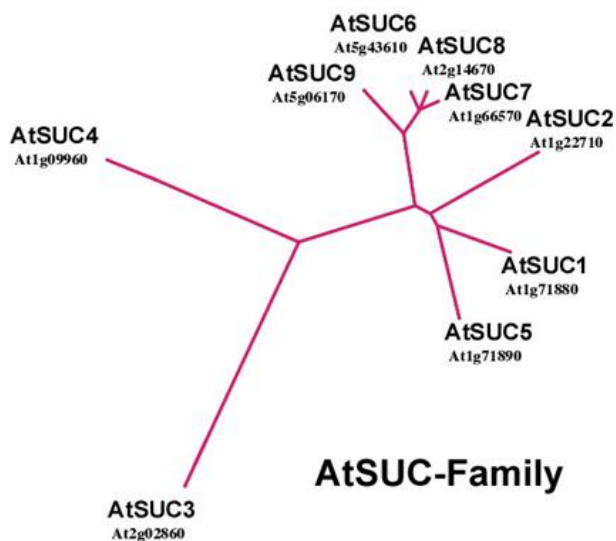


Figure 6. Arbres phylogénétiques des transporteurs de monosaccharides et de saccharose chez *Arabidopsis thaliana*

(A) Transporteurs de monosaccharides, (B) transporteurs de saccharose.

Martinoia et al., 2000). Le glucose et le fructose peuvent utiliser un système de canaux pour rentrer dans la vacuole du fruit du pêcher (Shiratake et al., 1997). Cette dernière étude est à nuancer car, si les auteurs ont regardé l'absence d'effet de l'ATP sur le transport du glucose et du fructose, l'apport du PPi dans le but d'activer les pompes V-PPases (pompes PPi dépendantes) n'a pas été testé. Des études menées dans les années 70 et 80 relatent déjà l'existence d'un transport actif ATP-dépendant (Doll et al., 1979; Briskin et al., 1985). Les auteurs suggèrent l'existence d'un antiport H⁺/saccharose dans la racine de la betterave à sucre. Chez le fruit, un transporteur actif de sucre tonoplastique a été identifié à la fin des années 80 et permettait l'échange du sorbitol du cytosol vers la vacuole (Yamaki, 1987; Shiratake et al., 1997). Depuis, nous avons à dispositions de nombreuses ressources, notamment les données du séquençage des génomes ; elles apportent des informations précieuses en groupant les transporteurs putatifs de mono- et de disaccharides en familles multigéniques sur la base de profil d'hydropathie mettant en évidence 12 domaines transmembranaires et de la conservation de motifs de séquences. Chez *A.thaliana*, les transporteurs de sucres vacuolaires peuvent être regroupés selon trois caractéristiques, les transporteurs de monosaccharides (VGT, TMT, etc.)(**figure.6**, A), de saccharose (SUT ou SUC)(**figure.6**, B) et de sucre phosphate (GPT). Nous ne détaillerons que 4 familles, chacune ayant un lien plus ou moins évident avec la vacuole (VGT, TMT, SUT et GPT). Pour la plupart des membres de ces familles, les informations concernant la localisation du transporteur (membrane plasmique, tonoplaste...), sa spécificité (mono- ou disaccharide...) et son mécanisme (symport, antiport, facilitateur) restent spéculatives. Les informations des bases de données demandent donc à être croisées avec les données non ciblées de la protéomique, actuellement disponibles pour les vacuoles isolées de cellules et de feuilles d'*Arabidopsis*, et à être vérifiées par des études fonctionnelles ciblées (knock out, surexpression, expression hétérologue...).

■ Transporteurs TMTs

Chez *Arabidopsis thaliana*, des études *in silico* ont mis en évidence une première famille multigénique, les TMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter), comprenant TMT1, 2 et 3, codant pour des transporteurs putatifs de monosaccharides localisés dans le tonoplaste. Des études *in vivo* ont démontré

que les protéines TMT étaient bien tonoplastiques (Carter et al., 2004; Endler et al., 2006; Wormit et al., 2006). Les protéines TMT1 et TMT2 ont été caractérisées comme des antiports H⁺/glucose dans les vacuoles isolées de riz et d'*A.thaliana* (Wormit et al., 2006; Neuhaus, 2007; Cho et al., 2010). Il a également été démontré que les deux transporteurs TMT1 et TMT2 pouvaient prendre en charge à la fois du glucose et du fructose (Wormit et al., 2006). Mais une étude récente a remis en question la spécificité des TMTs à transporter exclusivement des hexoses. Ainsi, par des expériences de patch-clamp sur des vacuoles isolées obtenues à partir de cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana*, les auteurs démontrent que les transporteurs TMT1/2 feraient entrer du saccharose dans la vacuole en échange d'un proton (antiport)(Schulz et al., 2011).

■ Transporteurs VGTs

Plus récemment, une autre famille de transporteurs putatifs d'hexoses, les VGT (Vacuolar Glucose Transporter), a été mise en évidence. Cette famille comprend trois gènes, dont seulement deux protéines (VGT1 et VGT2) ont bien été localisées dans le tonoplaste (Aluri and Büttner, 2007) et pour revue (Buttner, 2007). VGT3 serait localisé sur la membrane du chloroplaste (Buttner, 2007). Une étude fonctionnelle portant sur VGT1 a été menée (Aluri and Büttner, 2007) où AtVGT1 a été surexprimé chez des levures ce qui a permis d'étudier les capacités de transport de cette protéine. Dans ce système hétérologue, la surexpression permet le transport du glucose (Km = 3,7mM) et dans une moindre mesure du fructose (Km non précisé). Chez des mutants *vgt1*, les auteurs ont démontré l'implication de ce transporteur dans la capacité de germination des graines et de floraison des fleurs (Aluri and Büttner, 2007).

■ Transporteurs SUTs

Chez *Arabidopsis thaliana*, on dénombre neuf gènes codant pour autant de protéines SUTs (pour revue (Kühn and Grof, 2010)). Ces protéines sont la plupart du temps associées au transport longue distance du saccharose à travers la plante (Weise et al., 2000; Kühn and Grof, 2010). Cependant, une approche de protéomique à partir de vacuoles isolées a identifié SUT4 dans des cellules du mésophylle d'orge (Endler et al., 2006). Des travaux récents démontrent que le transporteur AtSUT4 est de nature identique au transporteur LjSUT4 du lotus, il

s'agit d'un symport H^+ /saccharose localisé dans le tonoplaste (Reinders et al., 2008; Schulz et al., 2011). En surexprimant AtSUT4 chez la levure, le K_m du transporteur pour le saccharose à pH5,5 est d'environ 12 mM (Weise et al., 2000). En surexprimant AtSUT4 chez des mutants *tmt1/2*, il a été observé une fuite de protons de la vacuole en même temps que du saccharose était ajouté. Ils proposent l'explication suivante: le saccharose rentre dans la vacuole contre un gradient de H^+ *via* les antiports TMT1/2 et sort de ce compartiment par le symport SUT4 (Schulz et al., 2011).

■ Transporteurs GPTs

La famille GPT est à classer un peu à part car elle n'est supposée transporter que des hexoses phosphates. Si l'antiport (G6P/Pi) GPT1 est aujourd'hui bien caractérisé, le cas de GPT2 est plus complexe (Kammerer et al., 1998; Niewiadomski et al., 2005; Kunz et al., 2010). Alors que GPT1 est impliqué dans l'import du G6P dans les plastes non chlorophylliens (Niewiadomski et al., 2005), le rôle de GPT2 n'a à ce jour été relié qu'à la synthèse de l'amidon et au rythme circadien (Kunz et al., 2010). La mise en évidence de la présence de GPT2 dans le protéome de la vacuole d'*A. thaliana* (Jaquinod et al., 2007) et des dernières découvertes sur SUT4 et TMT1/2 nous poussent à reconsidérer les mécanismes d'échanges des sucres entre le cytosol et la vacuole. La question du transport et du devenir des monoesters phosphorylés, et plus spécifiquement du G6P et du F6P, dans la vacuole se pose alors. Il a été démontré en surexprimant AtGPT1 et AtGPT2 dans des levures, que le G6P s'échangeant à une stoechiométrie 1/1 contre le Pi ; ce rapport n'est que de 1/2 lorsque le PEP s'échange contre le Pi (Niewiadomski et al., 2005). L'activité de transport du phosphate a été testée sur des protéines issues de feuilles du mutant *gpt2* et reconstituées dans des liposomes artificiels. Alors que chez le Col0 le transport du G6P est possible, il ne se fait plus dans les liposomes issus du mutant *gpt2* (Kunz et al., 2010).

III.D. LES " PURPLE ACID PHOSPHATASES"

Les "Purple Acid Phosphatases" (PAPs) sont des protéines connues depuis de longues années. Chez les animaux, leur découverte date des années 1980 (Klabunde et al., 1995). Les PAPs sont parmi les phosphatases acides les plus étudiées chez l'animal de par leur lien étroit avec le métabolisme de l'os ; elles

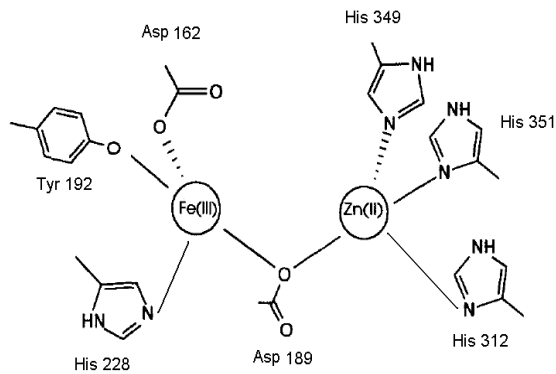


Figure 7. Les liaisons de coordination des atomes de Fe et de Zn dans le centre bimétallique de la protéine AtPAP26.

D'après les données publiées (Klabunde et al., 1995)

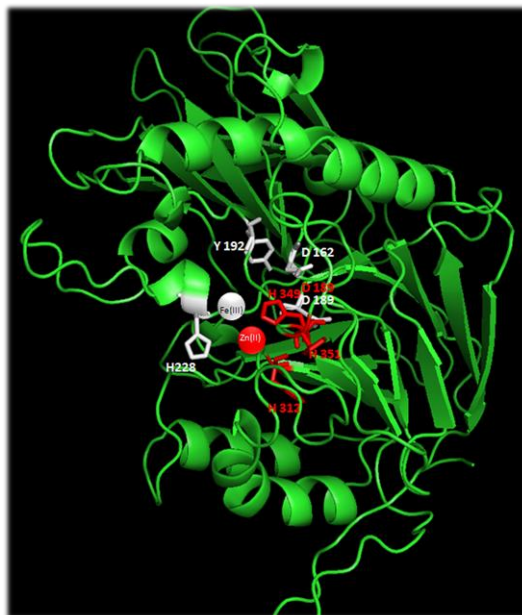


Figure 8. Prédiction de la structure 3D de la protéine PAP26 d'*Arabidopsis thaliana* par homologie de séquences.

La référence est la PAP de haricot (numero PDB 1KBP) et le logiciel utilisé est ESyPred3D. La protéine est visualisée dans Pymol. En blanc les motifs et chaînes latérales d'acides aminés fixant Fe³⁺, en rouge ceux fixant Zn²⁺

sont des cibles de choix pour la recherche biomédicale, notamment dans le développement de nouvelles chimiothérapies pour lutter contre l'ostéoporose (pour revue (Schenk et al., 2012)). Elles sont également impliquées, chez les mammifères, dans le transport des ions, et dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en tant que réponse immunitaire. Toujours chez les mammifères, les PAPs sont connues pour porter une activité hydrolytique (phosphatase) mais également peroxydase selon les mécanismes proposés par Haber-Fenton. L'ensemble des PAPs connues à ce jour ont en commun plusieurs caractéristiques essentielles : **i)** elles sont glycosylées à la hauteur de 5 à 10% de leur masse moléculaire, **ii)** elles sont caractérisées par une couleur rose/violette en solution. Cette couleur résulte de liaisons et du transfert de charge entre un résidu tyrosine et un ion ferrique du centre catalytique (pour revue (Olczak et al., 2003; Schenk et al., 2012)). **iii)** Contrairement aux autres phosphatases acides, les PAPs sont insensibles au tartrate (Hayman and Cox, 1994; Klabunde et al., 1995). **iv)** Elles sont caractérisées par un centre bimétallique. Chez l'animal, ce centre se constitue de deux atomes de fer : Fe^{3+}/Fe^{2+} (Hayman and Cox, 1994; Klabunde et al., 1995; Schenk et al., 2012) alors que chez les végétaux, le Fe^{2+} est remplacé au choix par un ion manganèse ou de zinc : Fe^{3+}/Zn^{2+} (Mn^{2+}) (pour revue (Klabunde et al., 1995; Olczak et al., 2003; Tran et al., 2010a)) (**figure.7 & 8**). **v)** Les PAPs possèdent toutes cinq motifs conservés traduisant leur appartenance à ce groupe : (GDxG-xn-GDxxY-xn-GNHE/D-xn-VxxH-xn-GHxH ; les lettres en gras représentent les résidus liant les ions métalliques) (Li et al., 2002; Tran et al., 2010a; Schenk et al., 2012).

Chez les animaux, les PAPs sont présentes sous forme de monomères d'environ 35KDa (Klabunde et al., 1995). Les PAPs végétales peuvent se présenter sous la forme de monomères de la même taille que leurs homologues animales (35KDa), mais également sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères, où chaque sous-unité pèse environ 55KDa et sont reliées par un pont disulfure (Olczak et al., 2003; Schenk et al., 2012). En comparant les séquences en acides aminés, il a été observé que les PAPs animales présentaient entre elles environ 80% d'homologie (Schenk et al., 2012). Les PAPs végétales d'environ 55 KDa présentent une identité de séquences de 70%. Bien que les PAPs animales (35KDa) et végétales (~55 KDa) ne présentent qu'une faible homologie de séquence (20%), les petites PAPs végétales (35 KDa) sont plus proches des PAPs animales (35KDa) que des

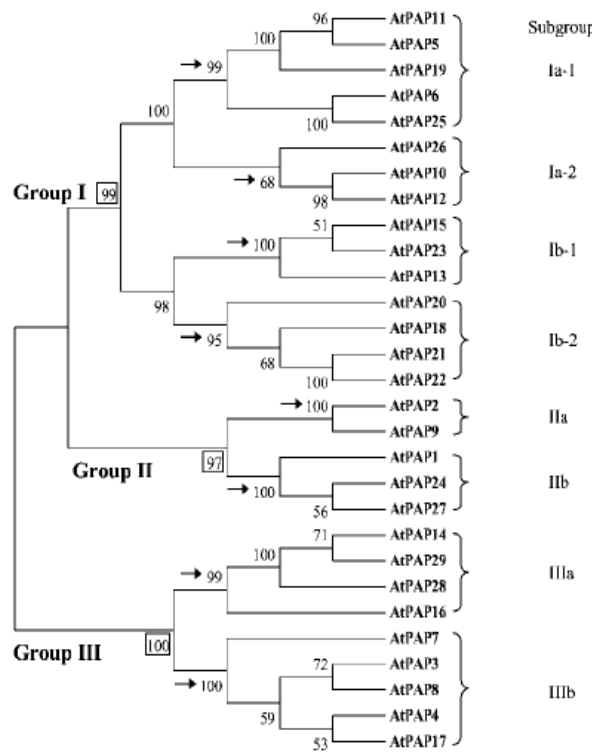


Figure 9. Carte de classification de la famille multigénique des PAPs chez *Arabidopsis thaliana*
 Selon (Li et al., 2002). L'arbre est construit à partir des séquences en acides aminés prédites à partir des séquences nucléotidiques (génomique et ADNc).

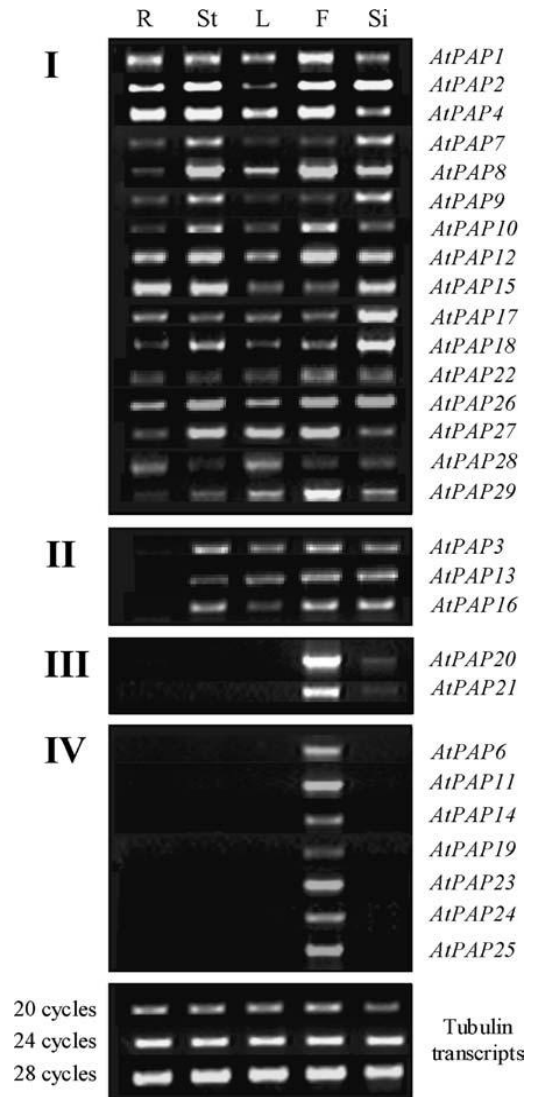


Figure 10. Profil d'expression des 28 gènes codant pour les PAPs d'*Arabidopsis thaliana*
 Selon (Zhu et al., 2005). R (racine), St (tige), L (feuille), F (fleur), Si (silique).

larges PAPs végétales (~55 KDa) ; ces petites PAPs sont alors qualifiées de "mammalian-like plant PAP" (Schenk et al., 2012).

■ Les PAPs chez *Arabidopsis thaliana*

Dans la majorité des espèces, les PAPs sont représentées par une famille multigénique. Chez le riz, 26 gènes codant pour des PAPs ont été identifiés *in silico* (Zhang et al., 2010). Chez *Arabidopsis thaliana*, nous retrouvons 29 gènes codant potentiellement pour 28 protéines PAPs, l'un des gènes étant un pseudo-gène (pour revue (Li et al., 2002)). Les comparaisons de séquences et les profils d'expression de ces PAPs ont permis de définir trois groupes (**figure.9**). L'étude des transcrits de cette famille multigénique faite sur différents tissus de la plante permet de les classer selon les organes dans lesquels ils sont exprimés (**figure.10**): **i**) dans les fleurs exclusivement (AtPAP6, AtPAP11, AtPAP14, AtPAP19, AtPAP23, AtPAP24 et AtPAP25), **ii**) dans les fleurs et les siliques (AtPAP20, AtPAP21), **iii**) dans les fleurs, les siliques, les feuilles et les tiges (AtPAP3, AtPAP13, AtPAP16) et **iv**) dans les fleurs, les siliques, les feuilles, les tiges et les racines (les autres PAPs). Sur ces 28 gènes, seules quelques protéines ont été totalement ou partiellement caractérisées : PAP12, PAP15, PAP17, PAP23, PAP26-V, PAP26-S1 & PAP26-S2 (Tran et al., 2010a; Schenk et al., 2012). Les trois PAP26 correspondent respectivement aux formes vacuolaires (V) et sécrétées (S1 et S2). Alors que AtPAP15 est directement reliée à la teneur en ascorbate en modulant l'entrée du myo-inositol dans la voie de biosynthèse de la vitamine C, cette PAP a été liée à la protection de la plante lors de stress impliquant une augmentation de l'ozone (Zhang et al., 2008). Elle est également reliée à la remobilisation du phosphate dans la graine et le pollen, notamment par son activité phytase qui reste peu répandue chez les PAPs (Kuang et al., 2009). AtPAP15 n'est par contre pas induite par une carence en Pi, ni au niveau transcriptionnel (ARNm), ni post-transcriptionnel (protéine). À l'inverse, AtPAP17 est bien induit transcriptionnellement par la carence en Pi. Peu de choses sont connues sur les caractéristiques de ce monomère, si ce n'est sa capacité à hydrolyser préférentiellement le pNPP et à posséder une activité peroxydase (Del Pozo et al., 1999; Tran et al., 2010a; Schenk et al., 2012). Tout comme AtPAP15, AtPAP23 n'est pas induite par une carence en phosphate (ARNm & protéine). AtPAP23 est majoritairement exprimée au niveau du méristème apical des fleurs chez *Arabidopsis*. Le rôle de cette PAP est mal connu mais il semblerait

Tableau I. Propriétés et caractérisation des 5 PAPs d'*A.thaliana* connues à ce jour.
Selon (Tran et al., 2010a)

AtPAP designation	AGI code	Upregulated by Pi starvation?		Subcellular localization	Best substrate	Physical properties			Proposed function(s)	Refs.
		Transcript	Protein			Native M_r (kDa)	Subunit M_r (kDa)	A_{max} (nm)		
AtPAP12	At2g27190	Yes	Yes	Secretome	PEP	130	60	520	Extracellular Pi scavenging	[22,54,70]
AtPAP15	At3g07130	No	No	n.d.*	Phytic acid	58	60	n.d.	(i) Ascorbate biosynthesis, (ii) Pi mobilization from phytic acid	[7,84,85]
AtPAP17	At3g17790	Yes	n.d.	n.d.	pNPP**	n.d.	34	n.d.	(i) Pi mobilization, (ii) ROS metabolism	[22,53,54,58]
AtPAP23	At4g13700	No	No	n.d.	ATP	n.d.	52	n.d.	Flower: (i) Pi metabolism and (ii) Fe/Mn homeostasis	[80]
AtPAP26-V	At5g34850	No	Yes	Cell vacuole	PEP	100	55	520	Intracellular Pi recycling	[53,86]
AtPAP26-S1	At5g34850	No	Yes	Secretome	PEP	65	55	500	Soil Pi scavenging	[54]
AtPAP26-S2	At5g34850	No	Yes	secretome	PEP	65	55	n.d.	Soil Pi scavenging	[54]

* Not determined.
** Para-nitrophenyl-P.

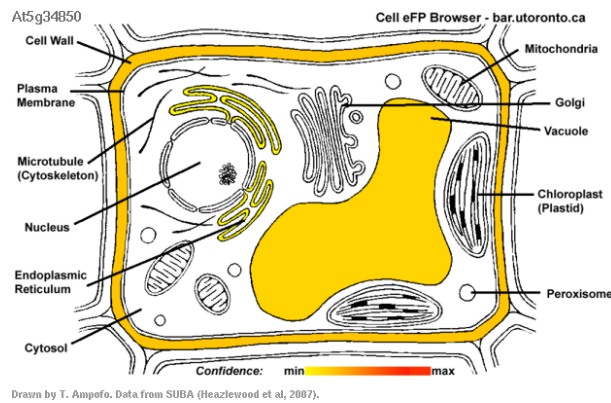


Figure 11. Prédiction de la localisation subcellulaire de la protéine AtPAP26 chez *Arabidopsis thaliana*.

La PAP26 est située à la fois au niveau du RE, de la vacuole et de la paroi. Selon le BAR de Toronto (http://bar.utoronto.ca/cell_efp/cgi-bin/cell_efp.cgi). Ces données sont confirmées par l'étude protéique menée sur le protéome de la vacuole (Carter et al., 2004) et par les approches *in vivo* en 2010 par l'équipe du Dr Plaxton (Hurley et al., 2010)

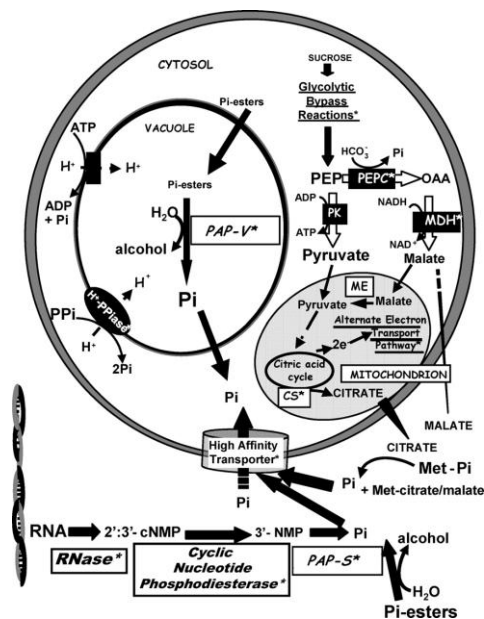


Figure 12. Rôles hypothétiques des PAPs sécrétés et vacuolaires dans la carence en Pi
Selon (Tran et al., 2010a).

qu'elle soit impliquée dans l'homéostasie du fer et du magnésium de la fleur (Zhu et al., 2005). Les PAP12 et PAP26 possèdent des fonctions liées ; elles sont toutes deux impliquées dans la remobilisation du phosphate lors d'une carence. Mais ces deux protéines divergent sur certains points. La PAP12 est exclusivement sécrétée alors que la PAP26 est au choix sécrétée ou localisée dans la vacuole. La PAP12 fonctionne en homodimère alors que la PAP26 s'organise en monomère pour les formes sécrétées (PAP26-S1 et PAP26-S2) et en homodimère lorsqu'elle est adressée à la vacuole (PAP26-V) (**tableau.I**). Cette localisation vacuolaire a été démontrée *in silico via* l'étude du protéome de la vacuole et *in vivo* par des expériences de fusion du promoteur de la protéine PAP26 avec de la "m-cherry" (Hurley et al., 2010; Tran et al., 2010b) (**figure.11**). Dans tous les cas, les PAP12 et PAP26 portent la majorité de l'activité phosphatase acide de la plante (sécrétée et vacuolaire) (Tran et al., 2010b). Bien que les deux PAPs (PAP12 et PAP26) soient induites par une carence en phosphate, les mécanismes de régulations sont différents. L'expression du gène codant pour la PAP12 est fortement induite lors de l'appauvrissement en Pi dans le sol alors que le niveau de transcrite de la PAP26 reste invariable quelle que soit la concentration externe en Pi ; en revanche la PAP26 subit des régulations post-traductionnelles (dont les mécanismes sont mal connus) qui vont moduler son activité phosphatase (Tran et al., 2010a; Tran et al., 2010b). La PAP12 est également soumise à ce mode de régulation. La PAP12, la PAP26-S1 et S2 seraient reliées à la remobilisation du phosphate externe grâce à sa capacité à hydrolyser les esters mono-phosphorylés (**figure.12**). En plus de cette fonction pour les PAP26-S1 et S2, la PAP26-V a été hypothétiquement impliquée dans le recyclage du phosphate cellulaire *via* son activité catalytique sur les composés mono-phosphorylés identifiés *in vitro* (Hurley et al., 2010; Liang et al., 2010; Tran et al., 2010a; Tran et al., 2010b). Mais à ce jour, aucune preuve directe de cette activité hydrolytique vacuolaire n'a été apportée.

■ Activité phosphatase et peroxydase des PAPs

In vitro, l'activité phosphatase mesurée sur protéine purifiée est optimale à pH=5,6 alors que l'activité peroxydase l'est à pH=9. Point intéressant, les PAPs n'ont pas de substrat spécifique. Elles peuvent *in vitro* hydrolyser une large gamme de composés phosphorylés, tels que des métabolites (PEP, l'ADP, le G6P,

Substrate	Relative activity		
	AtPAP12	AtPAP26-S1	AtPAP26-S2
PEP	100	100	100
β -Naphthyl-P	116	115	118
<i>Para</i> -nitrophenyl-P	101	94	83
Phenyl-P	98	14	96
NaPPi	63	83	41
ADP	68	74	77
ATP	81	19	52
P-tyrosine	60	30	71
6-P-gluconate	67	57	69
Glucose-6-P	40	54	63
3-P-glycerate	38	48	67
Glycerol-3-P	44	34	59
α -Naphthyl-P	43	25	53
Ribose-3-P	25	41	41
Ribose-5-P	9	25	50
P-threonine	29	15	49
GTP	45	11	29
P-serine	14	0	26
Fructose-6-P	0	7	32
dAMP	12	8	19
AMP	9	10	22
Glucose-1-P	6	9	6

Acid phosphatase (APase) activity was determined with 5 mM of each compound using the spectrophotometric Pi assay described in the Materials and methods. Activity is expressed relative to the rate of Pi hydrolysis from 5 mM PEP, set at 100%. All values represent means of $n = 3$ separate determinations and are reproducible to within $\pm 10\%$ of the mean value.

Tableau II. Activité phosphatase de la PAP12 et de la PAP26 sur différents substrats phosphorylés Selon (Tran *et al.*, 2010). Les activités mesurées sont toutes présentées en activité relative par rapport à l'activité phosphatase mesurée sur le PEP.

le GTP), ou des composés artificiels, l'orthonitrophényl-phosphate ou des phospho-peptides. (Bozzo et al., 2004; Veljanovski et al., 2006; Kaida et al., 2008). En général, elles sont peu actives sur les pentoses Pi, trioses Pi, nucléotides mono-, di- ou triphosphorylés ; en revanche, le substrat préférentiel demeure le PEP (d'où le nom de PEP phosphatase dont elles ont été affublées à diverses reprises) et, de façon moindre, les hexoses-Pi et pentoses-Pi (**tableau.II**). En revanche, en fonction des protéines, des spécificités surprenantes peuvent surgir : capacité hydrolytique importante sur les phosphopeptides artificiels pour les PAP12 et PAP26 (Tran et al., 2010b) ou sur le phytate (une forme multi phosphorylée de l'inositol) pour la PAP15 (Zhang et al., 2008; Kuang et al., 2009). Les PAPs ont été jusqu'à ce jour uniquement reliées à des compartiments acides. Or, les activités peroxydases sont déterminées *in vitro* à un pH optimal proche de 9 (Tran et al., 2010b). À notre connaissance, aucune activité peroxydase n'a encore été détectée à des pH compatibles avec un environnement acide de ces protéines.

IV – LE MÉTABOLISME: MÉTHODES DE MESURE DE FLUX

Le terme métabolisme dérive du grec et signifie "changer" ou "renverser" (<http://www.etymonline.com>). Dans ce contexte, le métabolisme peut être défini comme l'ensemble des réactions par lesquelles les composants cellulaires sont formés, interconvertis ou dégradés.

IV.A. HISTORIQUE

■ La notion d'enzyme

Des travaux datant du début du XVIII^{ème} siècle et menés par le scientifique français René Antoine Ferchault de Réaumur, démontrent que la digestion de la viande par les oiseaux de proie résulte de l'action chimique de suc gastrique plutôt que d'une action mécanique. "*La digestion est opérée par la seule action d'un dissolvant et par la fermentation qu'il fait naître*" (pour revue (Cornish-Bowden et al., 2005)). Réaumur est le premier à explicitement proposer l'existence "d'activité enzymatique", même si ce terme n'arrivera que plus tard. En 1833, Payen et Persoz isolent la *diastase*, une substance extraite à partir de malt. Ils démontrent que cette substance est à elle seule responsable de la fermentation alcoolique. Ce terme *diastase* est encore aujourd'hui présent dans

notre vocabulaire puisque le suffixe *-ase* a été conservé pour désigner toute molécule portant une activité enzymatique. La première enzyme découverte provient donc d'un organisme végétal. Trois années plus tard, en 1836, Schwann isole la première enzyme animal, la pepsine qui se trouve être responsable de la digestion dans l'estomac (Cornish-Bowden et al., 2005). Plusieurs substances sont isolées dans les années qui suivent, dont l'invertase de levure, découverte en 1860 par Berthelot. Khune, qui découvre la trypsine dans le pancréas, propose de regrouper l'ensemble de ces substances sous le terme "enzyme" signifiant en grec "dans le levain" (<http://www.etymonline.com>) autrement traduit par Cornish-Bowden et collaborateurs "dans la levure". La nature de ces substances reste inconnue et divise la communauté scientifique ; il faudra attendre 1926 et la cristallisation de l'uréase par James B. Sumner pour trancher et valider la nature protéique des enzymes (Cornish-Bowden et al., 2005).

IV.D. UN BESOIN DE DYNAMIQUE

Les données génétiques, transcriptomiques et métabolomiques ne sont pas suffisantes pour rendre compte des régulations des flux métaboliques d'une cellule ou d'un organisme. Le métabolome rend compte d'un état biologique à un instant *t*. Si l'on souhaite comprendre les régulations métaboliques et ainsi visualiser une dynamique temporelle de cette image figée, la mesure des flux métaboliques est primordiale. Plusieurs approches expérimentales et *in silico* développées chez les plantes permettent d'avoir accès aux flux métaboliques au sein d'un réseau.

a) Modélisation des marquages à l'état stationnaire : la fluxomique

¹³C

La fluxomique est basée sur l'utilisation d'un précurseur marqué pour mettre en évidence les remaniements des squelettes carbonés dans un réseau métabolique à l'état stationnaire métabolique et isotopique. Elle repose donc sur la structure branchée du réseau, qui est souvent de grande taille et met en jeu des inter-conversions entre classes de métabolites (sucres, acides aminés, lipides, acides organiques, etc.). Elle nécessite des techniques d'analyse donnant accès au marquage absolu ou relatif des carbones de certains métabolites. Le choix de la nature du traceur, de son marquage et des métabolites analysés prennent une

place importante dans la détermination des flux. Les flux sont calculés par un logiciel d'optimisation (*i.e.* ¹³CFLUX, (Wiechert, 2001)) en comparant les enrichissements avec les valeurs données par un modèle décrivant le devenir des carbones dans le réseau. Cette approche a été appliquée avec succès sur des cultures de cellules de différentes origines (Rontein et al., 2002; Ratcliffe and Shachar-Hill, 2006) mais aussi en culture *in vitro* sur des tissus racinaires (Dieuaide-Noubhani et al., 1995; Alonso et al., 2005; Alonso et al., 2007b) et des embryons (Junker et al., 2007).

b) Modélisation des cinétiques de marquage hors état stationnaire

Actuellement, se développe la même approche de fluxomique mais cette fois-ci à l'état préstationnaire. Elle repose ici sur l'analyse de la cinétique de propagation du marquage à l'intérieur du réseau métabolique. Le précurseur peut être uniformément marqué au ¹⁴C ou au ¹³C et l'introduction du marqueur peut se faire, au choix, à l'état stationnaire métabolique ou pas. Dans ce cas, l'écriture du modèle devra rendre compte de l'évolution du marquage et des concentrations (Colón et al., 2010). Ces approches portent sur des réseaux de plus petites tailles que ci-dessus et relativement peu branchés. Les flux sont calculés par un logiciel d'optimisation (voir *e.g.* "Computer Simulation of Metabolism", www.hort.purdue.edu/cfpesp/models) en comparant les cinétiques de marquage avec les valeurs données par un modèle phénoménologique. Celui-ci est défini par un système d'équations différentielles paramétrées par les Km et Vm apparents de chaque étape, ce qui nécessite de connaître *a priori* le sens des flux. La détermination de ces paramètres est assortie du calcul de coefficients de contrôle pour chacune de ces étapes. Chez les plantes, ce type d'approche a été appliqué avec succès notamment sur des voies de synthèse de métabolites secondaires, comme le métabolisme des composés phénoliques à partir de la phénylalanine (Matsuda et al., 2003; Colón et al., 2010) ou le métabolisme de la choline (McNeil et al., 2000c) et de l'éthanolamine (McNeil et al., 2000b).

c) Modélisation des cinétiques enzymatiques

Cette approche permet de calculer les flux et les concentrations en métabolites intermédiaires dans une voie métabolique d'après les propriétés cinétiques et thermodynamiques des enzymes et des réactions. Elle s'applique particulièrement bien aux systèmes branchés et mettant en jeux des processus

réversibles. Ces modèles ne s'utilisent que pour des réseaux de taille relativement petite (limitant le nombre d'équations différentielles à résoudre) pour lesquels le mécanisme de chacune des enzymes est relativement bien connu. Le but est toujours d'identifier les étapes contrôlantes, susceptibles d'être modifiées pour améliorer, par sélection ou "engineering génétique", la capacité de biosynthèse d'un composé jugé intéressant. De tels modèles ont notamment été utilisés pour décrire le contrôle du cycle de Calvin et de la photosynthèse (Pettersson and Ryde-Pettersson, 1988; Poolman et al., 2000), du métabolisme du saccharose (Rohwer and Botha, 2001; Uys et al., 2007) ou du métabolisme des acides aminés découlant de l'aspartate (Curien et al., 2009).

V.MODÉLISATION CINÉTIQUE

V.A. HISTORIQUE

La première simulation numérique d'une cinétique enzymatique concerne une peroxydase et date de 1943. Ces travaux, menés par Britton Chance, ont consisté à résoudre des équations mathématiques pour calculer les constantes de vitesse de l'enzyme. Il s'agit de la première vérification expérimentale du mécanisme enzymatique formulé par Michaelis-Menten-Henri (Chance, 1943; Schallau and Junker, 2010). Pour cela, il utilisa l'un des premiers ordinateurs mécaniques jusque là utilisés pour calculer des trajectoires balistiques par l'armée américaine (le premier ordinateur électronique sera inventé quelques années plus tard, en 1946). Il fonctionne à partir de tubes à vide comparables à des néons. La fragilité des lampes était la cause principale de pannes, dont la plus récurrente était la combustion d'insectes sur ces lampes provoquant un arrêt du système. C'est de cette époque que provient le terme "BUG" qui désigne à la fois un insecte en argot américain mais également un dysfonctionnement informatique. Il faudra attendre l'avènement et la démocratisation du micro-ordinateur pour voire émerger des outils performants de modélisation enzymatique.

V.B. PARAMETRAGE ET RESOLUTION D'UN MODELE CINETIQUE

Pour construire un modèle mathématique décrivant la dynamique d'un réseau métabolique, il faut procéder en 4 étapes successives : **i)** la construction du

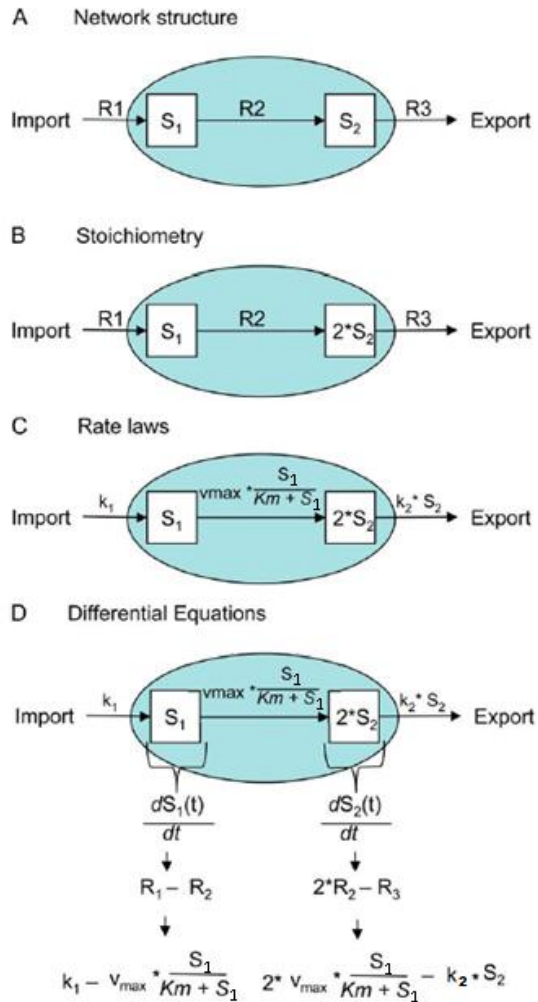


Figure 13. Etapes de construction d'un modèle cinétique *in silico*

D'après (Schallau and Junker, 2010). Construction of an exemplary kinetic model. (A), Information about basic connectivities. (B), Stoichiometric data adds numerical dependencies between the metabolites. (C), Rate laws defining the reaction rate of each enzymatic step. (D), Combining the stoichiometric data with the rate laws into a system of ODEs describing the change in metabolite concentrations over time.

Name	Details and Links
Matlab	Computing language for algorithm development, data visualization, data analysis, and numeric computation; add-on module SimBiology: prefabricated toolbox for biological simulations. http://www.mathworks.com/products/matlab/
COPASI	Complex Pathway Simulator; software for the simulation and analysis of biochemical networks; time-course simulation, steady-state analysis, MCA, elementary mode analysis, parameter scans, and estimations. http://www.copasi.org
Jarnac	Language for dynamic simulation, steady-state analysis, simple stability analysis, matrix arithmetic, MCA, metabolic structural analysis, and stochastic simulation. http://sbw.kgi.edu/software/jarnac.htm
PySCeS	The Python Simulator for Cellular Systems: Python-based open-source software tool for structural analysis, simulation of the evolution of a cellular system over time, MCA, steady-state analysis. http://pysces.sourceforge.net/index.html
ScrumPy	Open-source Python tool kit for kinetic and structural modeling, calculation of steady states, time-course simulation, MCA, and determination of elementary modes and enzyme subsets. http://mudshark.brookes.ac.uk/index.php/Software/ScrumPy
E-Cell	Object-oriented software suite for modeling, simulation, and analysis of large-scale complex systems such as biological cells. http://www.e-cell.org/ecell

Tableau III. Liste non exhaustive des programmes de simulations utilisables en biologie

Selon (Schallau and Junker, 2010)

réseau métabolique. **ii)** validation de la stœchiométrie des réactions. **iii)** description des lois cinétiques régissant les réactions et **iv)** transposition de ces lois cinétiques par des équations différentielles (**figure.13**)(pour revue (Schallau and Junker, 2010)). Lorsqu'une réaction est régie par des lois cinétiques, des contraintes doivent être appliquées aux équations mathématiques. Ces valeurs correspondent aux V_{max} , K_i , K_m , etc. et sont obtenues expérimentalement. Plus un réseau métabolique sera complexe, plus le nombre d'équations, et donc de paramètres, sera grand ; dans ce cas il est difficile d'obtenir expérimentalement l'ensemble des paramètres cinétiques. Il faut très souvent se contenter d'informations provenant d'études précédentes pour compléter le paramétrage. Enfin, la résolution du modèle à la main étant impossible au vu de la complexité des calculs, l'utilisation de logiciels dédiés est indispensable. Matlab, COPASI, Jarnac, PySCeS, ScrumPy, E-Cell, etc. sont autant de possibilités qui s'offrent à nous (**tableau.III**). Dans tous les cas, ces logiciels doivent proposer des fonctions essentielles pour modéliser des cinétiques : solveur d'équations différentielles ordinaires (ODEs), simulation de cinétiques et résolution d'état stationnaire, optimisation des paramètres, analyse de sensibilité (e.g. "Metabolic control Analysis" ou MCA), interface graphique et import/export de fichiers dans un format standard (e.g. SBML). Pour ces raisons, trois logiciels sont intéressants, Matlab, PySCeS et COPASI mais chacun présentant des avantages et des limitations. Matlab propose par exemple un code facile d'accès et une grande flexibilité avec notamment la possibilité de rajouter des "boîtes à outils" spécialisées pour effectuer les fonctions listées ci-dessus. Il reste un logiciel couteux et ses très nombreuses fonctionnalités mathématiques utilisées dans de très nombreuses disciplines peuvent perdre l'utilisateur. PySCeS est un logiciel gratuit permettant de simuler des systèmes cellulaires complexes. Il n'existe pas d'interface graphique et toutes les commandes doivent passer par une console avec le langage python. Malgré une installation complexe et une prise en main difficile, ce logiciel offre beaucoup de flexibilité à partir du moment où les bases en informatique de l'utilisateur sont poussées. COPASI est également un logiciel gratuit spécialisé dans la modélisation et l'analyse de réseaux biochimiques complexes. Il présente l'avantage d'être contrôlable entièrement par une interface graphique intuitive et se compose de nombreux greffons tels des outils d'optimisation performants ((Hoops et al., 2006) ; <http://www.copasi.org>) souvent absents des solutions gratuites. Il est également capable d'importer et d'exporter des fichiers au format xml.

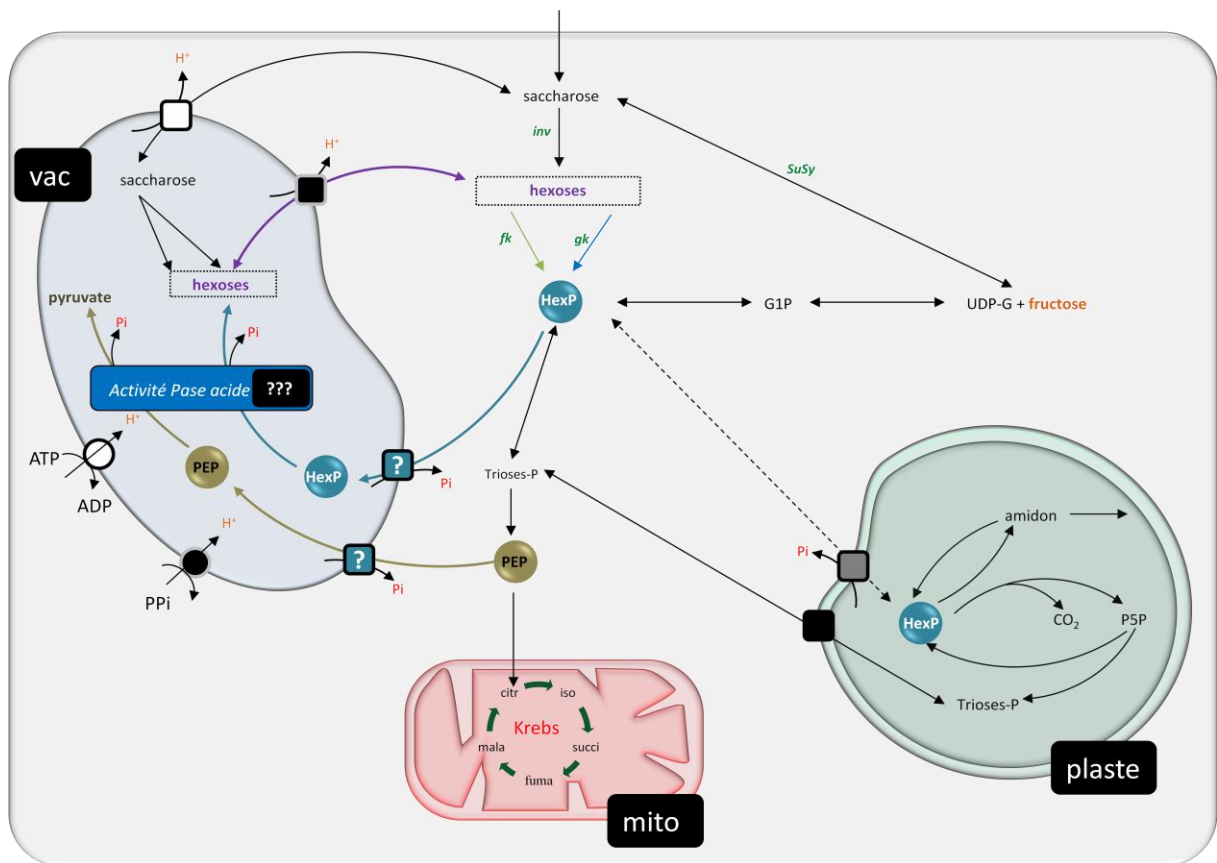


Figure 14. Hypothèses de travail concernant le rôle de l'échangeur d'hexoses-phosphates/Pi et des PAPs dans le métabolisme et le stockage des sucres dans la vacuole d'une cellule puits

VI. OBJECTIFS GÉNÉRAUX ET PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE

VI.A. PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE THÈSE

Les travaux du laboratoire sur les pointes de racines de maïs ont mis en évidence *in vitro* une activité phosphatase acide très forte, tant sur le PEP (Brouquisse et al., 2007) que sur le G6P (Alonso et al., 2007b) comme substrats. Une étude plus récente sur le murissement du fruit de tomate met en évidence une co-induction entre un gène codant une invertase vacuolaire et un gène codant une protéine de la famille des PAPs ("Purple Acid Phosphatase")(Mounet, 2009). Cette activité phosphatase pourrait potentiellement avoir un lien avec le métabolisme des sucres.

Par des approches complémentaires de génétique inverse, de biochimie, de fluxomique et de bio-informatique, nous proposons de mettre en évidence l'entrée d'esters phosphorylés dans la vacuole et leur hydrolyse par des phosphatases acides, selon le schéma de la **figure 14**. Dans ce contexte, le rôle de la protéine PAP26 dans la synthèse des hexoses vacuolaire sera principalement étudié. À partir de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et grâce aux nombreuses ressources disponibles, nous étudierons le transport et le métabolisme des sucres à deux niveaux d'intégration :

- à l'échelle de la vacuole isolée
- à l'échelle de la racine excisée en culture *in vitro*

Nous déclinons ce travail en trois chapitres afin de répondre à l'hypothèse proposée dans la **figure 14** :

- I)** Identification chez *Arabidopsis thaliana* du ou des porteurs de l'activité G6Pase et PEPase acide *in vivo* et *in organello* à partir de jeunes plantules et de vacuoles isolées.
- II)** Mise en évidence par une approche de marquage isotopique de l'existence des activités phosphatases sur des racines excisées en culture *in vitro*.
- III)** Construction *in silico* d'un modèle cinétique déterministe qui rendra compte des expériences de marquage. Ce modèle sera également exploité comme modèle informatif et prédictif.

ANALYSES FONCTIONNELLES DE LA PAP26 PAR UNE APPROCHE MUTANT SUR PLANTULES ET SUR VACUOLES ISOLÉES

I.OBJECTIFS:

Ce chapitre a plusieurs objectifs : **i)** mettre au point un système de culture hydroponique de plantules compatibles, à terme, avec la mise en culture du tissu racinaire. **ii)** identifier le porteur majoritaire de l'activité phosphatase acide *in vivo* (plantules cultivées en hydroponie) et **iii)** valider *in organello* le candidat identifié dans le point précédent à l'aide de vacuoles isolées. Nous en profiterons également pour étudier les mouvements de protons associés aux transporteurs d'hexoses tonoplastiques.

II. SELECTION DES GÈNES CANDIDATS.

Une approche "gène candidat" comporte toujours certains risques car il peut exister une redondance fonctionnelle à l'intérieur d'une même famille multigénique mais également entre plusieurs familles multigéniques. Nous avons constitué une collection de mutants d'*Arabidopsis thaliana*. Il s'agit de mutants "perte de fonction" affectés à différents niveaux du métabolisme des sucres: des mutants affectés dans le transport putatif des sucres et des sucres phosphates (*gpt2*, *sut4*, *tmt1* & *tmt2*) ainsi que des mutants dont l'activité enzymatique chez le sauvage pourrait influencer directement sur le métabolisme des sucres (simple-mutants *pap10*, *pap12*, *pap17*, *pap26*, *inv3*, *inv4*, double-mutants *inv3xpap26* & *inv3xinv4* et triple mutant *pap26xinv3xinv4*). Les gènes candidats *pap10*, *pap12*, *pap17* et *pap26* ont été sélectionnés sur la base de leur expression dans la racine et leur induction par la carence en Pi. L'homozygotie de tous ces mutants a été vérifiée comme décrit dans matériel et méthodes.

III. CULTURE EN HYDROPONIE

III.A. CHOIX DU MILIEU & DU SYSTÈME DE CULTURE

Le choix du milieu de culture s'est fait en pensant aux futures expériences de marquage. En amont de ces expériences, la nécessité de partir d'une quantité importante de tissu racinaire a impliqué une culture hydroponique des plantules en condition stérile et en présence d'un sucre externe. La mise au point a été faite sur la lignée sauvage d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia 0. Pour *A.thaliana*, la majorité des cultures en milieu hydroponique se basent sur le milieu nutritif Murashige et Skoog systématiquement associé à un sucre soluble, du glucose ou du saccharose. La concentration en sucre couramment utilisée dans la littérature est variable, puisqu'elle peut aller de 0,5% à 4% (Alonso et al., 2005; Conde et al., 2006; Lim et al., 2009). Les conséquences sur le métabolisme de la plante ne sont pas anodines. Par exemple, la présence de glucose ou de saccharose dans les milieux liquides est connue pour favoriser la croissance et le nombre des racines latérales (Mishra et al., 2009; Roycewicz and Malamy, 2012), augmentant ainsi les capacités de production de matériel racinaire pour les marquages. Cet effet est par ailleurs potentialisé par la carence en Pi (Fang et al., 2009; Thibaud et al., 2010). Même si le saccharose paraît être

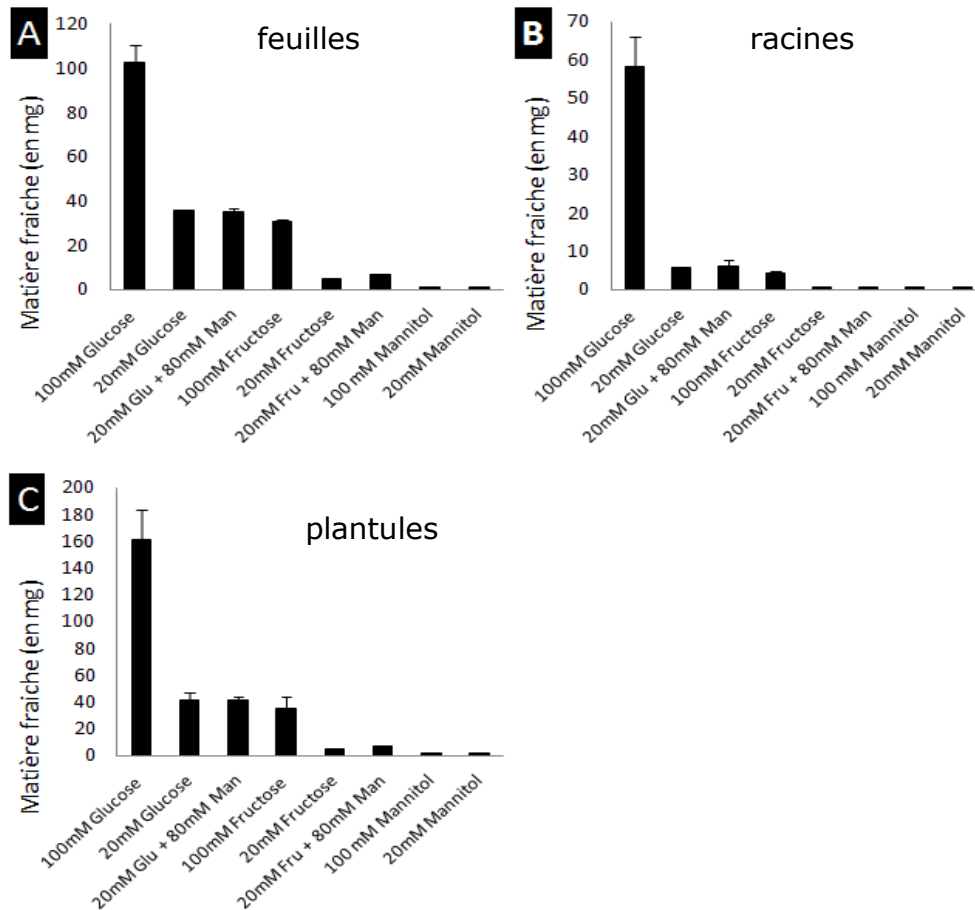


Figure 15. Effet des sucres externes sur la croissance des plantules

Poids frais par plantule des feuilles (A), des racines (B) et du total (feuilles + racines)(C) 20 jours après le début de la germination. Les graines sont mises à germer et à croître en présence de milieu MS ½ + glucose 100mM pendant 7 jours puis le milieu est changé avec les combinaisons suivantes : glucose 100mM, glucose 20mM, glucose 20mM + mannitol 80mM, fructose 100mM, fructose 20mM, fructose 20mM + mannitol 80mM, 100mM mannitol & 20mM mannitol. Moyennes et écarts types sont calculés avec n=10.

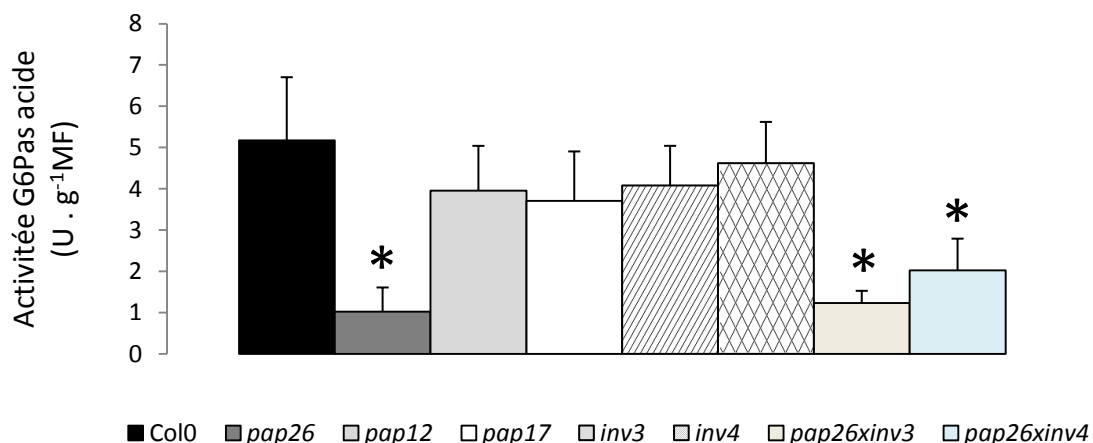


Figure 16. Activité G6Pase acide de plantule entière de lignées sauvage et mutantes

L'activité G6Pase acide a été mesurée comme décrit dans matériel et méthodes sur des homogénats de plantules cultivées en hydroponie pendant 14 à 20 jours, comme décrit dans Matériel et Méthodes. Moyennes et écarts types sont calculés avec n=3 (*inv3*, *inv4*, *pap12* et *pap17*), n>9 (*col0*, *pap26*, *pap26xinv3* et *pap26xinv4*) *: p < 0,01 vs. Col0.

un meilleur substrat que le glucose et le fructose puisqu'il est transporté à travers toute la plante, il peut dans certains cas induire des pics d'anthocyanes chez les plantules d'*Arabidopsis* (Jeong et al., 2010b). C'est pour cette raison que nous avons écarté l'utilisation de ce di-saccharide dans nos cultures ; l'autre raison porte sur l'hydrolyse du saccharose par des invertases sécrétées dans le milieu de culture. De plus, il a été démontré les racines sont alimentées majoritairement par le glucose et le fructose (Bret-Harte and Silk, 1994). Ces concentrations en sucres correspondent à des valeurs intermédiaires de celles retrouvées dans le phloème (~700mM)(Bret-Harte and Silk, 1994) et celles que nous avons mesuré dans les racines (~15mM). Notre choix s'est alors porté sur ces deux hexoses, deux monosaccharides métabolisables par les racines (Srivastava and Srivastava, 2011). Des tests ont été faits avec deux concentrations d'hexoses : 20mM (0,2%) et 100mM (1%) de glucose ou de fructose (**figure.15**). Pour prendre en compte le déséquilibre osmotique engendré par la présence des sucres, nous avons testé un sucre non perméant et non métabolisable (mannitol) utilisé, soit seul à 20 mM ou 100 mM, soit à 80 mM combiné à 20 mM de glucose ou de fructose (**figure.15**). À vingt jours de culture et que ce soit pour les feuilles ou les racines, le glucose à une concentration de 100mM présente la croissance la plus favorable. Pour les feuilles, la biomasse produite est 60% plus importante qu'en présence de fructose 100 mM ou du glucose 20mM (**figure.15, A**). Sur les racines, la quantité de biomasse produite avec un milieu de culture complétement avec 100 mM de glucose est encore plus élevée puisque le gain est compris entre 95 et 90% comparé aux autres conditions (**figure.15, B**). Ceci n'est pas dû à un stress osmotique car à la même concentration, le mannitol n'induit pas de croissance. L'ajout du mannitol en présence de 20 mM de glucose ou de fructose ne modifie en rien la production de la biomasse, comparé aux mêmes concentrations en hexoses en l'absence de mannitol. Enfin, il est à noter que la croissance des racines et des feuilles est quasi-nulle en présence de 20 et de 100mM de mannitol, les plantules, après les premiers jours de germination, présentant des phénotypes caractéristiques d'arrêt de croissance (feuilles extrêmement petites avec perte de la coloration verte et absence presque complète de racines). Pour ces raisons, les cultures hydroponiques se dérouleront systématiquement dans un milieu nutritif 0,5 MS complété avec 100mM de glucose.

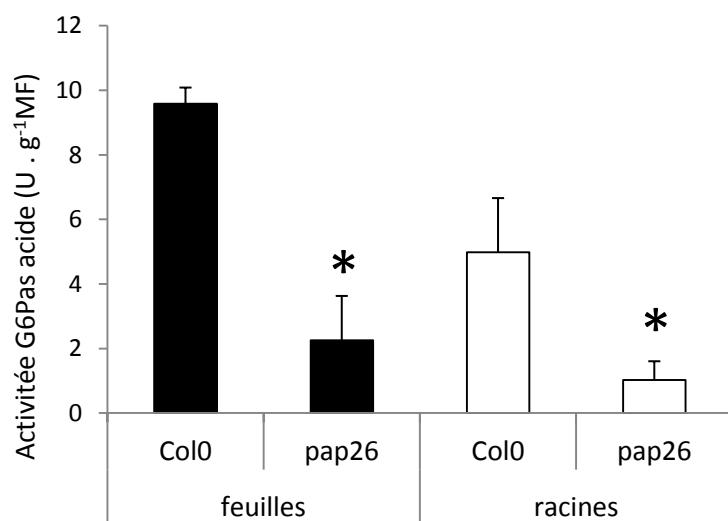


Figure 17. Activité G6Pase acide dans les feuilles et les racines des lignées Col0 et *pap26*

L'activité G6Pase acide a été mesurée comme décrit dans matériel et méthodes sur des homogénats de feuilles (■) et de racines (□) issues de plantules cultivées en hydroponie pendant 14 à 20 jours, comme décrit dans Matériel et Méthodes. Moyennes et écarts types sont calculés avec n=7 (feuilles) et n=15 ou 18 pour les racines. * : p < 0,01 vs. Col0.

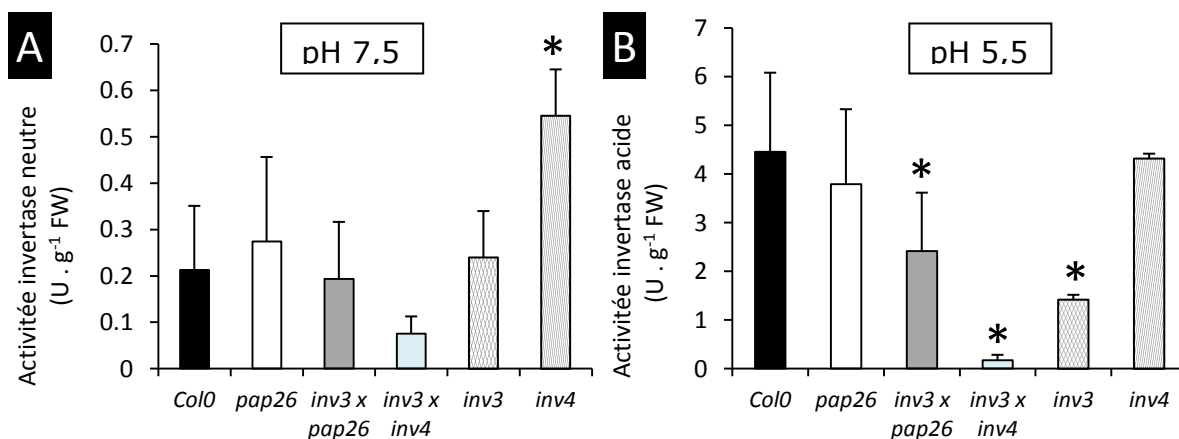


Figure 18. Activité invertase dans les racines de lignées sauvage et mutantes

L'activité invertase a été mesurée comme décrit dans matériel et méthodes sur des homogénats de racines issues de plantules cultivées en hydroponie pendant 14 à 22 jours à pH 7,5 (A) ou 5,5 (B), comme décrit dans Matériel et Méthodes. Chaque mesure provient d'un mélange de 5 plantules. Moyennes et écarts types sont calculés avec $3 \leq n \leq 10$. * : p < 0,05 vs. Col0.

III.B. PHÉNOTYPAGE ENZYMATIQUE DES PLANTES SAUVAGES ET MUTANTES

Nous avons mesuré dans cette partie les activités G6P-phosphatase et invertase acides de plusieurs mutants d'insertions de la famille des PAPs et chez des mutants affectés dans l'activité invertasique acide. Les doubles mutants présentés ici sont issus de nos propres croisements.

a) Activité G6P-phosphatase acide

Notre hypothèse portant sur la capacité des protéines PAPs à porter l'activité G6Pase acide, nous avons mesuré cette activité sur des plantules entières âgées de 14 à 20 jours (**figure.16**). Le sauvage (Col0) présente une activité moyenne G6Pase acide de 5 U.gMF⁻¹. Les mutants *pap12* et *pap17*, *inv3* et *inv4* ne présentent pas de différences significatives de cette activité. En revanche, l'activité G6Pase acide mesurée chez le mutant *pap26* est fortement réduite puisqu'elle n'est plus que d'environ 1 U.gMF⁻¹, soit une diminution d'un facteur 5 comparé au sauvage. Les double-mutants *pap26xinv3* et *pap26xinv4* possèdent une activité similaire au simple-mutant *pap26*. La majeure partie de l'activité G6Pase acide est donc portée par la protéine PAP26 sur plantule entière. Nous n'avons pas identifié la protéine responsable du reste de l'activité mesurée mais on peut raisonnablement exclure PAP12 et PAP17 car chez les deux mutants correspondants, l'activité G6Pase acide n'est pas affectée ; cette activité peut être portée par une autre PAP ou par une phosphatase acide appartenant à une autre famille. Nous avons mesuré l'activité G6Pase, chez le sauvage et le mutant *pap26*, dans les feuilles et dans les racines séparément (**figure.17**). L'activité G6Pase diminue dans les mêmes proportions (75 – 80 %) dans les feuilles et les racines. D'autre part, l'activité mesurée dans les racines est deux fois plus faible que celle mesurée dans les feuilles, chez le sauvage et le mutant *pap26*. Dans les deux types de tissus, l'activité G6Pase acide est donc portée majoritairement par la protéine PAP26.

b) Activité invertasique acide

Nous avons également mesuré l'activité invertasique dans les racines (**figure.18**) chez des mutants *pap26* et invertase. À pH acide, l'activité invertase mesurée sur feuilles est fortement diminuée (78%, **non montré**) chez le double

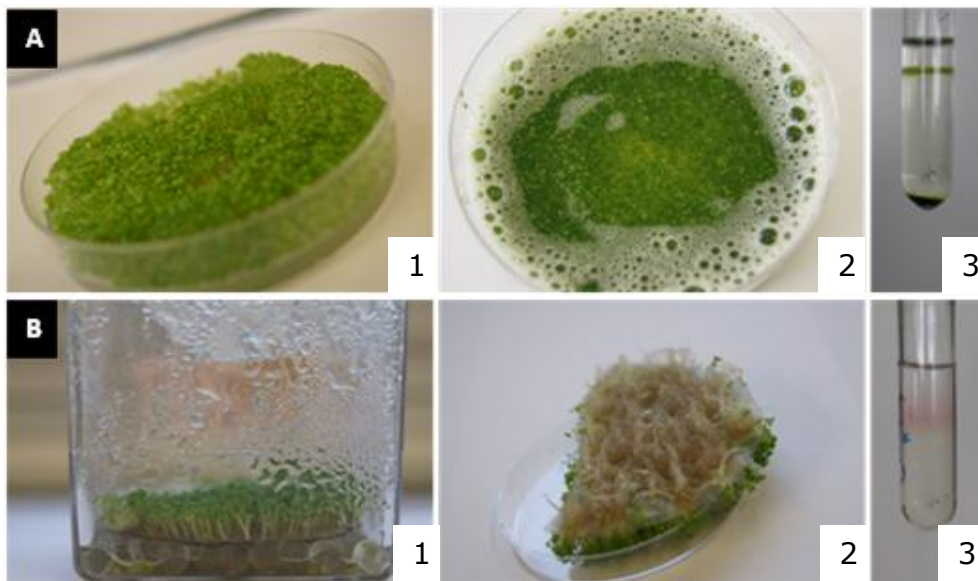


Figure 19. Isolement de vacuoles à partir de protoplastes de feuilles et de racines d'Arabidopsis

(A) Culture de plantules âgées de 10 jours. Les graines sont mises à germer sur un milieu gélosé MS $\frac{1}{2}$ + saccharose 1% (photo A-1). Les feuilles sont hachées puis digérées par un cocktail d'enzymes (photo A-2). Les vacuoles sont purifiées sur gradient. Elles sont situées entre le ménisque supérieur et l'anneau de protoplastes non éclatés (photo A-3). (B) Culture de plantules âgée de 6 jours. Les graines sont mises à germer sur un milieu liquide MS $\frac{1}{2}$ + glucose 1% (photo B-1). Les racines dépassant de la grille sont séparées des feuilles, hachées puis digérées par un cocktail d'enzymes. Les vacuoles sont purifiées sur gradient comme décrit dans Matériel & Méthodes. Les vacuoles sont colorées au rouge neutre. Après visualisation au microscope optique, seule une fraction très faible de vacuoles sont intactes, les autres ayant éclaté.

mutant *inv3xinv4*, et dans une moindre mesure pour le double mutant *pap26xinv3* (35%). Sur les racines et au même pH, le profil des activités est identique avec une diminution de 96% pour le double mutant *inv3xinv4* et de 54% pour le double mutant *pap26xinv3*. Le mutant *inv4* ne semble pas affecté dans cette activité. Le double mutant invertase (*inv3xinv4*) présente donc une forte chute de son activité invertase acide, à la fois dans les feuilles et les racines. La majeure partie de l'activité invertase acide des racines semble portée par le gène codant la protéine invertase3.

IV. ANALYSE *IN VITRO* SUR VACUOLES ISOLÉES

Le but est ici de vérifier *in organello* si la protéine PAP26 est bien porteuse de l'activité G6Pase dans la vacuole.

IV.A. PRODUCTION DE PROTOPLASTES À PARTIR DE RACINES

Des protocoles permettant de générer des protoplastes sont décrits pour le pois (Baldet et al., 1993), la baie de raisin (Fontes et al., 2010) ou encore pour les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Zhai et al., 2009). La génération de protoplastes à partir de racines est par contre peu documentée. Nous avons tenté d'ajuster les protocoles de la littérature pour réaliser des protoplastes à partir de racines en culture hydroponique. Des essais sur des plantules de 12 à 14 jours cultivés sur MS n'ont pas permis de générer des protoplastes malgré les différents paramètres optimisés (nature et concentrations en enzymes, durée de digestion...). Nous avons pu produire des protoplastes à partir d'un autre système de culture nous permettant de travailler sur du tissu plus jeune : les graines sont mises à germer sur une grille reposant sur des billes de verre immergées dans un milieu liquide MS ½ complété avec du glucose à 100mM (boîtes Magenta) (**figure.19, B**). Six jours de culture après germination sont nécessaires pour produire des quantités suffisantes de racines pour les analyses. Le rendement reste assez faible : quelques milliers de protoplastes sont isolés à partir d'une centaine de graines semées. Enfin, à partir de ces protoplastes de racines, il nous a été difficile d'isoler suffisamment de vacuoles, la fragilité des organelles à cet âge étant probablement en cause (**figure.19, B**). Il existe un protocole qui assure un meilleur rendement de production de protoplastes, mais il faut partir de plantules encore plus jeunes, 4 jours (Bargmann and Birnbaum,

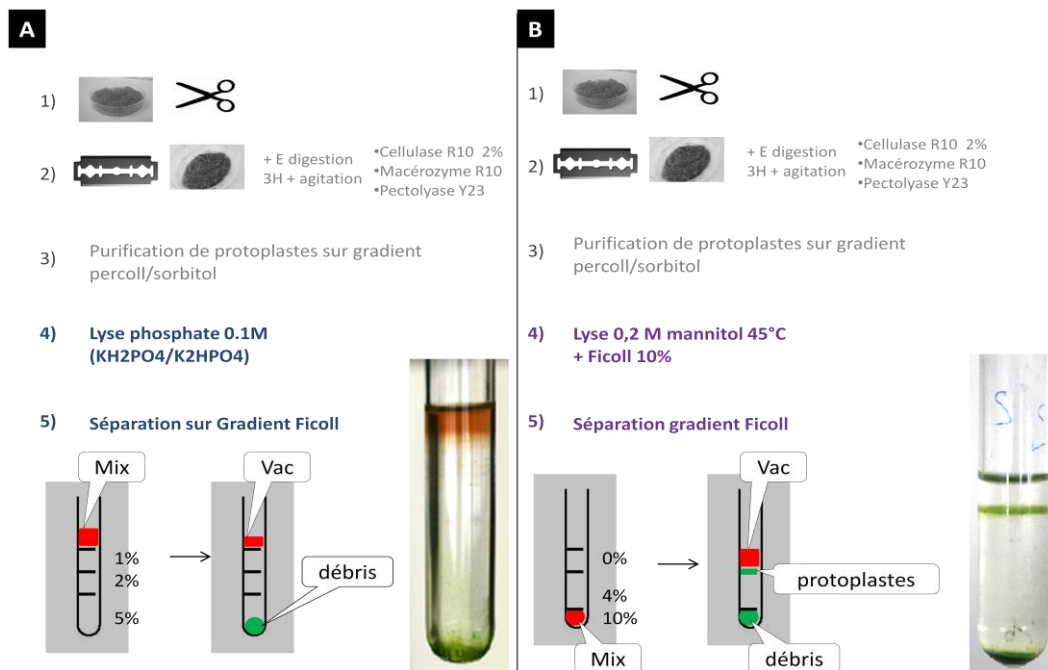


Figure 20. Isolement de vacuoles à partir de protoplastes de feuilles selon deux protocoles

Les 3 premières étapes sont identiques jusqu'à la purification des protoplastes. (A) Production de vacuoles à partir d'une lyse « phosphate ». Le mix protoplastes + tampon de lyse est déposé au dessus du gradient. Par centrifugation, les vacuoles, les protoplastes et les débris cellulaires migrent au fond du tube. (B) Production de vacuoles à partir d'une lyse « mannitol ». Le mix protoplastes + tampon de lyse est recouvert de tampons adéquats. Les vacuoles libérées remontent dans la phase supérieure du gradient, au dessus de l'anneau de protoplastes non lysés.

Tableau IV. Comparaison de deux méthodes d'isolement de vacuoles

Le rendement de production des vacuoles est calculé selon la quantité initiale de protoplastes purifiés. L'activité PEP phosphatase est ramenée à la quantité de protéines présentes dans chaque fraction.

	Lyse phosphate	Lyse mannitol
Rendement de production des vacuoles à partir des protoplastes	2-5%	12-18%
Activité PEP phosphatase acide (nmol. min ⁻¹ .mg ⁻¹ protéines)	78 +/- 3,12	949 +/- 192

2010). Il semblerait également que les protoplastes produits par cette méthode soient fragiles. La protéine PAP26 étant aussi bien située dans les feuilles que dans les racines (Tran et al., 2010b), et en raison des contraintes sus-citées, nous nous sommes dirigés vers la production de protoplastes issus de jeunes feuilles d'*A.thaliana*.

IV.B. PRODUCTION DE PROTOPLASTES À PARTIR DE FEUILLES

La génération de protoplastes à partir de feuilles est plus aisée. Une adaptation de plusieurs protocoles a permis d'optimiser les rendements de production de protoplastes (Baldet et al., 1993; Zhai et al., 2009; Fontes et al., 2010). Nous pouvons produire de routine, à partir d'environ 800mg de matière fraîche, environ 25×10^6 protoplastes par mL (soit un peu moins de 20×10^6 de protoplastes au total). Ces chiffres sont en adéquation avec ceux de la littérature (Yoo et al., 2007; Fontes et al., 2010).

■ Isolement de vacuoles de feuilles

Le premier protocole testé, basé sur une lyse hypotonique dans un tampon phosphate de potassium (Baldet et al., 1993)(**figure.20, A**) a été peu concluant (manque de reproductibilité, effet inhibiteur du Pi sur les activités de transport et d'hydrolyse du G6P). Le second protocole testé, basé sur une lyse hypo-osmotique dans une solution 0,2M de mannitol (Fontes et al., 2010)(**figure.20, B**) a conduit à un bien meilleur rendement de vacuoles (**tableau.IV**). De plus, ces mêmes vacuoles possèdent une activité spécifique phosphatase acide plus importante, tant sur le PEP (**Tableau.IV**) que sur le G6P comme substrat (**non montré**). Pour la suite du travail, nous avons choisi le protocole de lyse hypo-osmotique utilisant du mannitol.

IV.C. QUALITÉ DES VACUOLES ISOLÉES

a) Activité PEP phosphatase acide & alpha-mannosidase

Nous avons mis en évidence lors du phénotypage des mutants PAP que l'activité phosphatase acide était principalement portée par la PAP26 (cf. **figures.17**). Nous avons comparé cette activité sur les feuilles broyées à partir desquelles

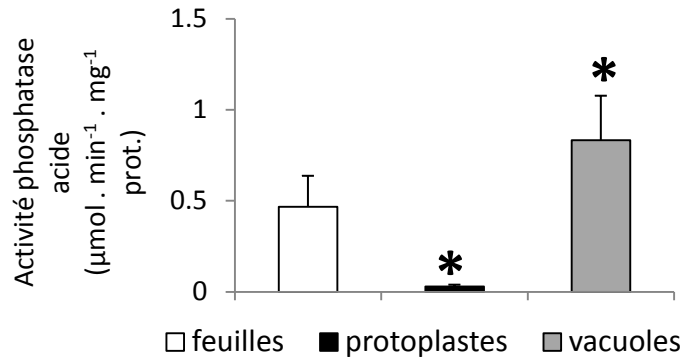


Figure 21. Activité phosphatase acide sur différentes fractions

Les feuilles hachées sont prélevées juste avant l'ajout du cocktail enzymatique. Les protoplastes sont prélevés juste avant l'ajout du tampon de lyse. Les vacuoles sont prélevées dans le gradient après centrifugation. L'activité phosphatase acide a été mesurée en suivant l'oxydation du NADH à pH 5,5 en présence de lactate déshydrogénase et de 5 mM de PEP. * : $p < 0,05$ vs. feuilles.

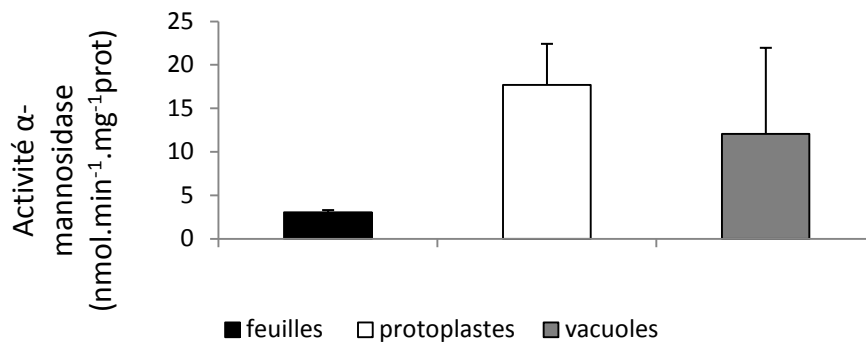


Figure 22. Activité α-mannosidase sur différentes fractions

Les feuilles hachées sont prélevées juste avant l'ajout du cocktail enzymatique. Les protoplastes sont prélevés juste avant l'ajout du tampon de lyse. Les vacuoles sont prélevées dans le gradient après centrifugation. L'activité α-mannosidase est mesurée selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes.

nous avons produit les protoplastes, sur les protoplastes et sur les vacuoles isolées. Les activités PEPases sont rapportées à la quantité de protéines (**figure.21**). L'activité PEPase mesurée sur protoplastes est très faible comparée à celle mesurée sur les feuilles broyées et sur les vacuoles isolées. La préparation des protoplastes à partir des feuilles s'accompagne donc d'une perte importante de l'activité PEPase acide. Ceci suggère que la majeure partie de l'enzyme est localisée dans les parois et dans les espaces extracellulaires du tissu foliaire, et est donc sécrétée. Ces résultats confirment des travaux récents (Hurley et al., 2010) à propos d'une forme vacuolaire et sécrétée de la PAP26. Si on fait l'hypothèse que les protéines pariétales sont mineures par rapport aux protéines totales du tissu foliaire, on peut estimer qu'environ 10 % de la PEPase acide seraient intracellulaires. Ceci n'est pas étonnant si on considère le nombre important d'études, tant sur des cultures cellulaires que sur des feuilles ou des racines de différentes origines, ayant caractérisé les formes sécrétées des PEPases acides (Veljanovski et al., 2006; Hurley et al., 2010; Liang et al., 2010; Tran et al., 2010a). Notons que, lorsque nous appliquons un facteur de conversion de 15 mg de protéines par g MF, l'activité PEPase acide mesurée sur feuille broyées est du même ordre de grandeur que celle mesurée sur les feuilles de plantules âgée de 20 jours ayant poussé sur milieu liquide (moyenne de $9,8 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$, cf **figure.17**). En parallèle, nous avons mesuré l'activité α -mannosidase sur ces 3 types de fractions. L' α -mannosidase est souvent utilisée comme marqueur vacuolaire (Benkeblia et al., 2007; Krueger et al., 2011) mais elle est également associée aux autres compartiments endomembranaires tels que l'appareil de Golgi ou le réticulum endoplasmique (Saint-Jore-Dupas et al., 2006). Contrairement à ce qui a été observé pour l'activité PEPase à pH acide, l'activité α -mannosidase ne diminue pas lors de la préparation des protoplastes mais, au contraire, augmente (**figure.22**). Ce phénomène rend compte d'une contamination importante des protoplastes par les enzymes hydrolytiques portant une activité α -mannosidase. Par conséquent, lors de la préparation ultérieure des vacuoles, l'activité α -mannosidase ne se trouve pas enrichie par rapport aux protoplastes de départ.

En parallèle à l'activité PEPase et α -mannosidase, nous avons mesuré les activités des glycéraldéhyde-3-Pi déshydrogénases (GAPDH) à NADP et à NAD et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) à NADP sur les protoplastes et sur les vacuoles. Les résultats mettent en avant l'hétérogénéité des

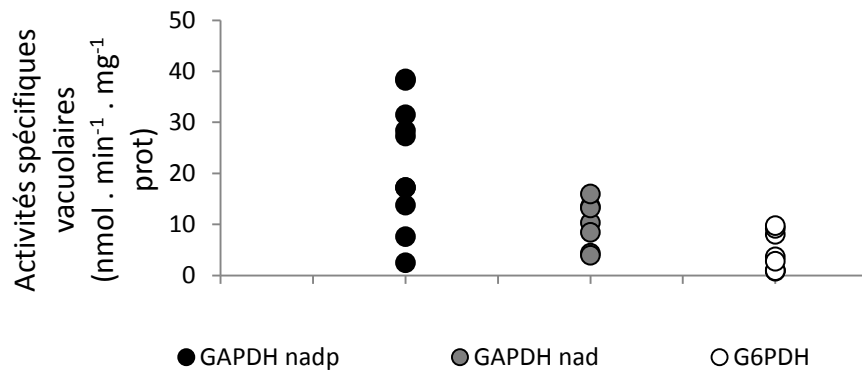


Figure 23. Activités enzymatiques plastidiales et cytosoliques mesurées sur vacuoles isolées
 Les vacuoles sont purifiées à partir de feuilles âgées de 10 jours. Les activités glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) sont mesurées à pH 8 en présence de NADH ou de NADPH, respectivement.

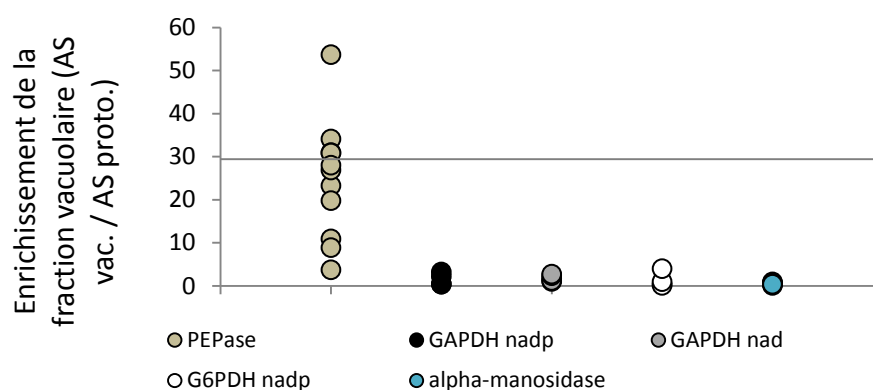


Figure 24. Enrichissements des enzymes de la vacuole par rapport au protoplaste
 Les enrichissements vacuolaires pour chaque activité sont calculés en faisant le rapport des activités spécifiques mesurées dans les vacuoles par celles mesurées sur les protoplastes correspondants. La ligne grise représente l'enrichissement vacuolaire maximal calculé à partir du rendement protéique

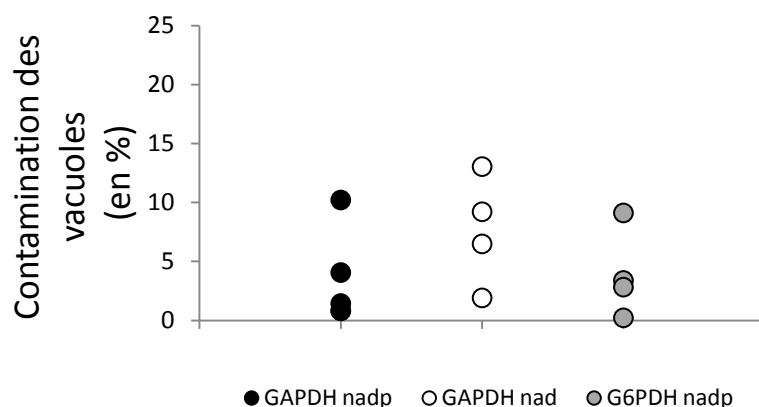


Figure 25. Contamination des vacuoles isolées par le cytosol et les chloroplastes
 Les vacuoles sont purifiées à partir de feuilles âgées de 10 jours. Les deux activités GAPDH sont mesurées à pH 8. Le pourcentage de contamination est calculé à partir des enrichissements déterminés dans la figure 24 pour chaque activité (%age contamination = enrichissement du marqueur/enrichissement PEPase). Chaque point représente une préparation indépendante.

préparations (**Figure.23**). Ces activités sont classiquement utilisées comme marqueurs des compartiments cellulaires : la GAPDH à NAD est associée aux chloroplastes, la GAPDH à NADH aux plastes et au cytosol, tout comme la G6PDH.

b) Enrichissement et pureté de la fraction vacuolaire

Les calculs d'enrichissement des cinq enzymes dans la vacuole par rapport aux protoplastes montrent que la PEPase se concentre très largement dans les vacuoles, à l'inverse des trois activités déshydrogénases mesurées (**figure.24**). Selon la littérature, les protéines vacuolaires représentent moins de 1% du total protéique cellulaire (Villiers, 2008) et 2,4 % des protéines totales des feuilles (Jaquinod et al., 2007; Tohge et al., 2011). Dans nos conditions et en tenant compte du rendement de production de vacuoles à partir des protoplastes (10 à 18%), nous avons calculé que les protéines vacuolaires représentent environ 3,4 % des protéines totales des protoplastes, ce qui correspond à un facteur d'enrichissement maximal d'environ 30 ($100/3,4 = 29,4$). Il est important de noter que, pour la majorité des préparations testées, le facteur d'enrichissement de la PEPase acide se concentre à des valeurs comprises entre 20 et 35, ce qui suggère que la PEPase acide des protoplastes a une localisation majoritairement vacuolaire (cf. **figure.24**). Enfin, la mesure des activités spécifiques des GAPDH et de la G6PDH a été utilisée pour évaluer la pureté des vacuoles ainsi préparées (**figure.25**). Les pourcentages de contamination des activités GAPDH (NAD et NADP-dépendantes) et G6PDH sont la plupart du temps faibles (inférieurs à 10%), ce qui correspond à des valeurs couramment acceptées dans la littérature (Jaquinod et al., 2007; Tohge et al., 2011).

Un des inconvénients du fractionnement subcellulaire est qu'à partir du moment où les protoplastes sont lysés, la composition interne des vacuoles peut changer ; les transporteurs du tonoplaste laissant fuir bon nombre de métabolites qui étaient stockés *in vivo* dans la vacuole. Cet effet est d'autant plus fort que, faute d'ATP et de P_i dans les tampons de préparation, les pompes à protons ne peuvent plus assurer le fonctionnement des transports actifs de solutés.

c) Dosages des sucres et du Pi dans les vacuoles

Avant de réaliser des expériences de transport sur les vacuoles, il est important

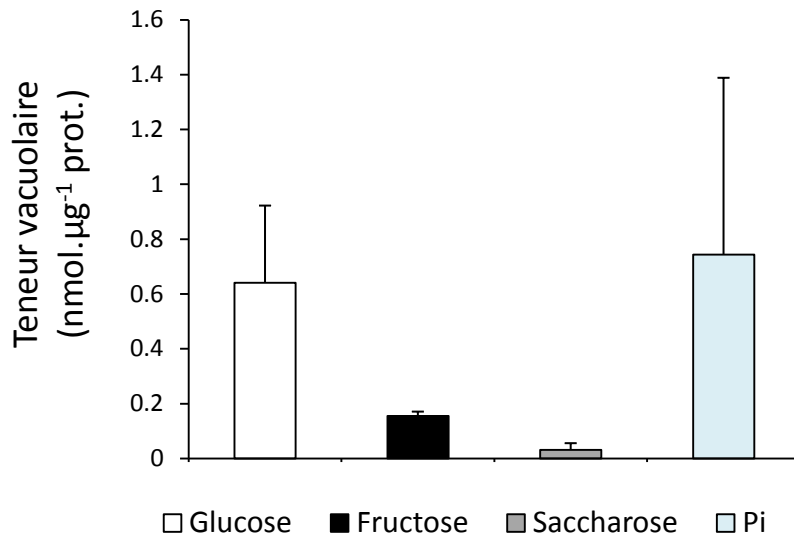


Figure 26. Teneurs en sucres et en Pi des vacuoles

Les sucres sont dosés sur des fractions de vacuoles isolées : en blanc le glucose (□), en noir (■) le fructose, en gris (▒) le saccharose et en bleu (■) le Pi. La quantité de sucre mesurée est rapportée à la quantité de protéines dosées. La barre d'erreur est calculée à partir de l'écart moyen de 4 valeurs (sucres) ou 3 valeurs (Pi) indépendantes.

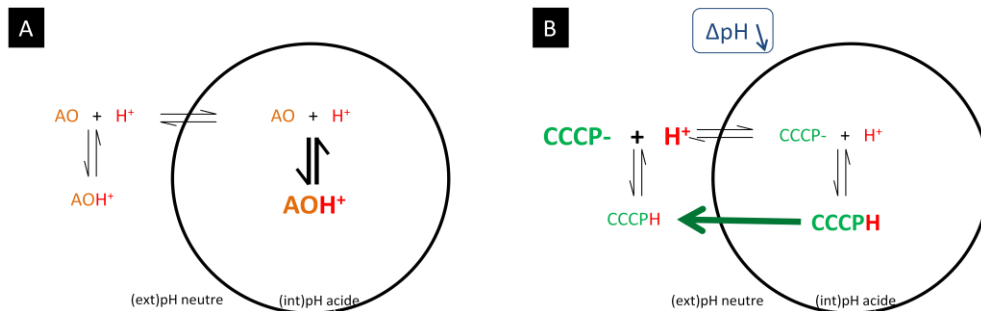


Figure 27. Protonation et déprotonation de l'acridine orange (AO) et d'un agent découplant

(A) AO est la forme déprotonée de l'acridine orange. AOH est sa forme protonée, espèce la plus perméante. La forme protonée s'accumule préférentiellement dans le compartiment le plus acide. Le signal de fluorescence diminue alors par "quenching". (B) L'ajout d'un agent découplant protonophore (CCCP) va créer un cycle mettant en jeu la diffusion des formes protonées et déprotonées de la molécule et la sortie nette d'un proton. La conséquence directe est la diminution du gradient de pH.

de connaître la teneur en sucres et en Pi endogènes dans les préparations de vacuoles. Les dosages de ces composés ont été faits sur plusieurs préparations (**figure.26**). On peut noter l'absence de détection du G6P par nos techniques de dosage et la quasi-absence de saccharose dans les préparations de vacuoles. De plus, l'hexose majoritaire demeure le glucose, environ 3 fois plus concentré que le fructose, rapport qui est proche de celui mesuré sur les feuilles d'*Arabidopsis in vivo*. En prenant une densité moyenne de 26,3 millions de vacuoles par mg de protéines mesurée sur nos préparations et un volume moyen de 16,2 μL par million de vacuoles (Kaiser et al., 1986; Dietz et al., 1990), on peut estimer que la concentration intra-vacuolaire en glucose, fructose, saccharose et Pi pourrait être égale à 1,2, 0,4, 0,13 et 1,7mM, respectivement. Ainsi, dans les expériences futures, la présence de phosphate intra-vacuolaire conditionnera le fonctionnement de l'échangeur hexose-Pi/Pi dans le sens de l'entrée d'hexose-Pi. Dans le cas des transporteurs d'hexoses, une concentration de 5 mM de sucre externe sera utilisée pour favoriser le transport dans le sens de l'entrée du sucre.

V. LE TRANSPORT DANS LES VACUOLES

Lorsque les vacuoles sont prêtes, il est important de travailler dans des délais brefs (de l'ordre de l'heure) afin de ne pas perdre leur intégrité structurale et fonctionnelle. Le premier critère de fonctionnalité que nous avons testé est la capacité des vacuoles isolées à générer une différence de potentiel électrochimique en protons, et plus spécifiquement, une différence de pH transmembranaire.

V.A. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Cette méthode repose sur l'utilisation d'une base faible et liposoluble, l'acridine orange (AO), qui se distribue de part et d'autre des membranes biologiques en fonction de la différence de pH. Cette molécule a déjà été utilisée sur des vacuoles isolées de carotte (Timmers et al., 1995), sur des suspensions de chloroplastes (Schuldiner et al., 1972) ainsi que sur des cellules de soja en culture (He et al., 2007). Sur des vacuoles intactes, nous avons mesuré la fluorescence de l'acridine orange émise à 530 nm après excitation à 495 nm (**figure.27**). Les membranes sont perméables à cette molécule sous sa forme neutre, qui se concentre alors sous sa forme protonée dans le compartiment

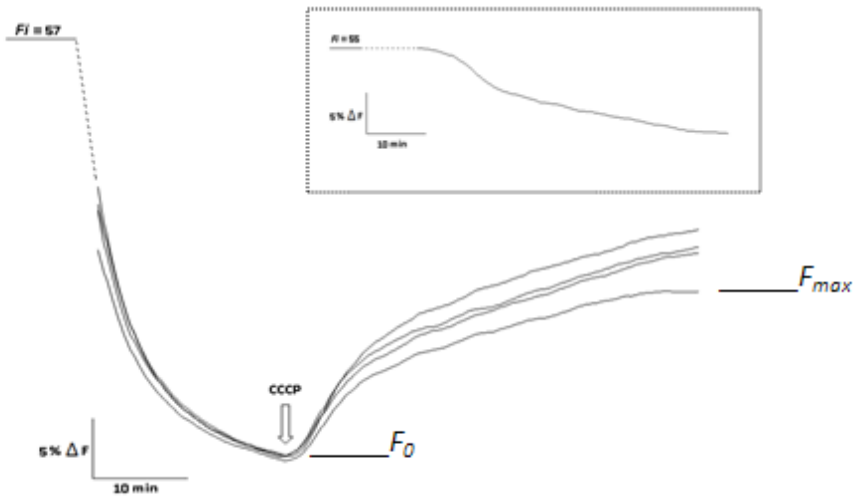


Figure 28. Détermination du pH vacuolaire

Cinétique de fluorescence de suspensions de vacuoles isolées en présence d'acridine orange. F_i correspond à la fluorescence initiale au moment où l'on ajoute les vacuoles. F_0 est la fluorescence minimale à laquelle nous rajoutons l'agent découplant, ie. $2,5 \mu\text{M}$ de CCCP. F_{max} est la fluorescence maximale restaurée. Chaque courbe représente une préparation de vacuole. Dans l'encart, un exemple de blanc à retrancher à l'enregistrement initial. Le ΔpH , et par extension le pH vacuolaire, a été calculé ($n=12$) en utilisant la formule suivante (Rottenberg et al., 1972) :

$$k = \frac{[H^+]_{ext} \cdot [AO]_{ext}}{[AOH^+]_{ext}} = \frac{[H^+]_{int} \cdot [AO]_{int}}{[AOH^+]_{int}} ; \text{ Avec à l'équilibre : } [AO]_{ext} = [AO]_{int} ;$$

$$\text{Soit : } \frac{[H^+]_{int}}{[H^+]_{ext}} = \frac{[AOH^+]_{int}}{[AOH^+]_{ext}} ; \Delta\text{pH} = \log\left(\frac{\frac{F_{max} - F_0}{F_{max}}}{1 - \left(\frac{F_{max} - F_0}{F_{max}}\right)} \times \frac{\text{Vol}_{tot}}{\text{Vol}_{vac}}\right)$$

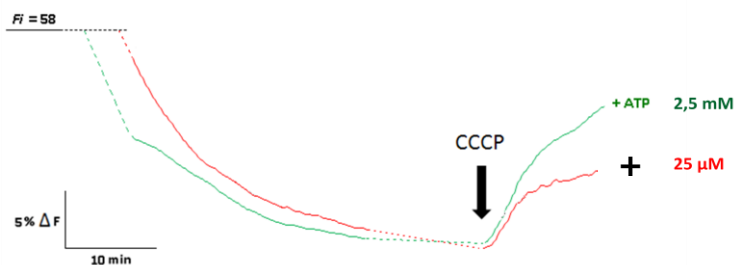


Figure 29. Effet de l'ATP et du PPI sur l'énergisation des vacuoles

Des vacuoles ont été énergisées en présence de $2,5\text{mM}$ d'ATP ou de $25\mu\text{M}$ de PPI. ATP et PPI sont ajoutés en même temps que l'acridine orange. L'ajout de $2,5 \mu\text{M}$ CCCP est effectué lorsque le "quenching" de la fluorescence ne varie plus.

acide. Cette accumulation a pour conséquence de diminuer le signal de fluorescence ("quenching"), dont les mécanismes restent encore débattus (Timmers et al., 1995; Zoccarato et al., 1999). Néanmoins, l'utilisation de ce traceur fluorescent nécessite de contrôler que le "quenching" est sensible aux variations du ΔpH transmembranaire. En fin d'expérience, un découplant protonophore (ici, le CCCP) est ajouté, le ΔpH s'annule, l'acridine orange sort et s'équilibre avec le compartiment externe et le phénomène de "quenching" diminue (**figure.27**). C'est cette propriété de "restauration" de la fluorescence que nous utiliserons comme critère d'intégrité à la fin de chaque expérience.

a) Energisation des vacuoles et calcul du pH vacuolaire

Dans un premier temps, il est nécessaire d'énergiser les vacuoles en activant les pompes V-ATPase et V-PPase en rajoutant de l'ATP ou du PPi aux concentrations habituellement utilisées (Fontes et al., 2010). Lorsque l'ATP est ajouté à la suspension, l'émission de fluorescence à 530nm diminue rapidement au cours du temps jusqu'à se stabiliser. Après ajout du CCCP, nous observons une restauration partielle de la fluorescence de départ, nous pouvons en déduire que les vacuoles sont bien fonctionnelles et surtout intactes (**figure.28**). Il est à noter que l'addition de CCCP, en l'absence de vacuole, provoque une diminution significative de la fluorescence de l'acridine (**figure.28, encart**). Ce tracé peut potentiellement servir à corriger les tracés enregistrés en présence de vacuoles. Dans les expériences ultérieures qui seront faites en présence de sucres, des tracés de référence seront enregistrés pour chaque molécule ajoutée et serviront à corriger les signaux de fluorescence. Des expériences contrôles similaires ont été faites avec le G6P, le glucose, le fructose et le saccharose. Selon les travaux de thèse de Natasha Fontes (Delrot, S. : communication personnelle), il existerait deux populations de vacuoles dans les préparations issues de cellules de baie de raisin en culture, l'une énergisée par le PPi l'autre, par l'ATP, chacune de ces populations ayant des capacités de transport spécifiques. Sur ces préparations, que ce soit en présence d'ATP ou de PPi, la capacité des vacuoles à s'énergiser est bien réelle (**figure.29**). Ne souhaitant pas discriminer les deux types de vacuoles, nous avons ajouté à la fois de l'ATP et du PPi dans les expériences suivantes. Enfin, à partir des signaux de fluorescence mesurés avant et après l'addition de CCCP, il est possible d'estimer la valeur du pH intra-vacuolaire (Rottenberg et al., 1972). Une valeur de pH vacuolaire égale à $5,56 \pm$

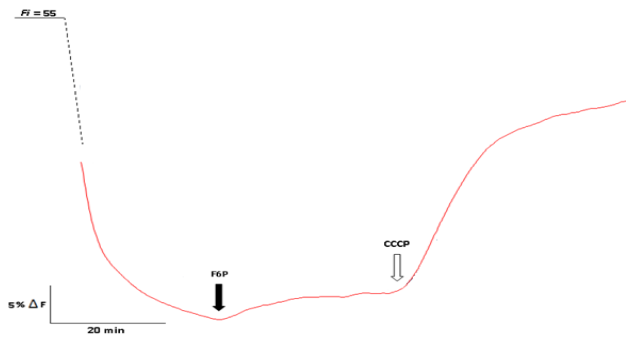


Figure 30. Enregistrement typique de l'effet d'un sucre-Pi et du CCCP sur la fluorescence de l'acridine orange

La cinétique de fluorescence est obtenue sur une préparation de vacuoles de feuilles de Col0. La flèche noire correspond au moment où le sucre est ajouté (ici 5 mM de F6P), la flèche blanche correspond à l'ajout de 2,5μM de CCCP.

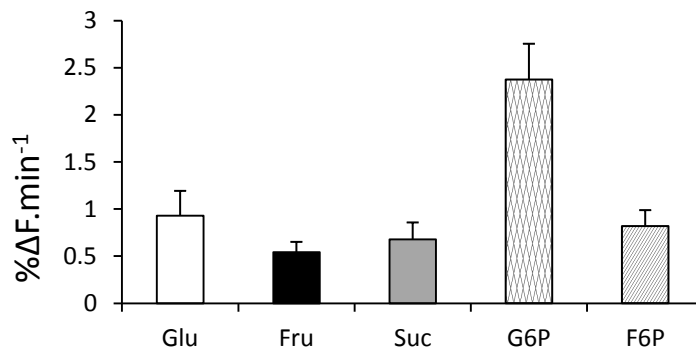


Figure 31. Effet des sucres sur la vitesse de sortie de protons de vacuoles isolées de la lignée sauvage Col0

À partir de vacuoles purifiées à partir de feuilles de Col0, la vitesse de sortie de protons a été estimée à partir des pentes initiales d'augmentation de la fluorescence au moment de l'ajout du sucre. L'activité est exprimée en %ΔF.min⁻¹. n=1 à 2 déterminations, sur 3 préparations différentes. Les écart-types sont calculés à partir des régressions sous le logiciel Kaleidagraph.

0,12 a été calculée, ce qui est conforme à ce qui a déjà été publié (Nishimura, 1982).

b) Effet des sucres sur le gradient de pH

■ Chez le sauvage

À partir d'une préparation de vacuoles issues de la lignée sauvage Col0, nous avons testé l'effet de l'addition de différents sucres sur la fluorescence. À titre d'exemple, la **figure 30** montre qu'après ajout du F6P, nous observons une remontée rapide de la fluorescence qui traduit une alcalinisation du milieu intravacuolaire (jusqu'à atteindre un nouveau plateau). Il en est de même pour le G6P, le saccharose et, dans une moindre mesure, le glucose et le fructose (**non montré**). Lorsque le CCCP est ajouté en fin d'expérience, la fluorescence augmente rapidement ce qui démontre l'intégrité des vacuoles (**figure.30**). L'addition de ces sucres produit donc un changement d'état stationnaire des efflux de protons à travers le tonoplaste. Le fait que les signaux de fluorescence ne re-diminuent pas au bout d'un certain temps suggère que les transporteurs fonctionnent en régime de flux sans atteindre l'équilibre thermodynamique. Pour les hexoses, ceci traduit probablement, mais nous ne l'avons pas vérifié, une forte capacité d'accumulation des sucres dans les vacuoles. Pour le saccharose et les sucres-phosphates, ce régime de flux pourrait être en plus la conséquence de l'hydrolyse dans la vacuole de ces composés par l'invertase et les PAPs, respectivement. Suivant la même procédure que Fontes Da Silva *et al.* (2010), un paramètre (ΔF par minute) a été calculé pour rendre compte de la vitesse initiale de sortie de protons au moment où l'on rajoute le sucre. Il faut néanmoins garder à l'esprit que ces vitesses rendent indirectement compte de la capacité des sucres à s'échanger contre des protons, mais ne permettent pas de calculer, ni le flux de proton associé, ni la stœchiométrie du transporteur. La **figure.31** montre que le G6P est le sucre qui induit la plus forte vitesse de sortie de protons avec un $\% \Delta F \cdot \text{min}^{-1}$ d'environ 2,3. Le glucose, le fructose, le F6P et le saccharose n'induisent qu'une faible vitesse de sortie de protons avec une valeur comprise entre 0,6 et 1 $\% \Delta F \cdot \text{min}^{-1}$.

■ Etude des mutants

Des expériences semblables ont été menées sur la collection de mutants. Les

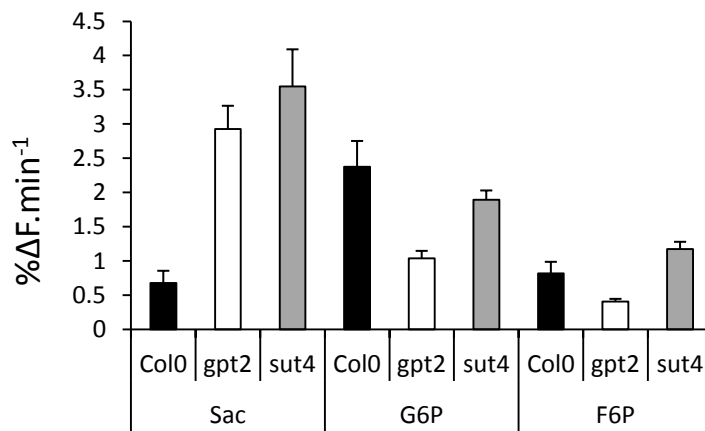


Figure 32. Effet des sucres sur la vitesse de sortie de protons chez les mutants *gpt2* et *sut4*

Sur des vacuoles purifiées de feuilles de Col0 et des mutants *gpt2* et *sut4*, la vitesse d'augmentation de la fluorescence est exprimée en %ΔF.min⁻¹. n=1 à 4 déterminations sur 4 préparations différentes. Les écart-types sont calculés à partir des régressions sous le logiciel Kaleidagraph.

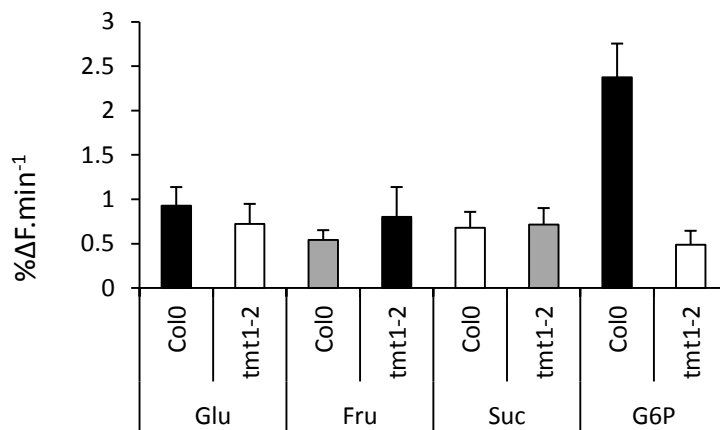


Figure 33. Effet des sucres sur la vitesse de sortie des protons chez les mutants *tmt1-2*

À partir de vacuoles purifiées de feuilles de Col0 et du mutant *tmt1-2*, l'activité de sortie des protons a été estimée à partir des pentes initiales des signaux de fluorescence. n= 2 à 4 déterminations sur 2 préparations différentes. Les écart-types sont calculés à partir des régressions sous le logiciel Kaleidagraph.

mutants *sut4* et *gpt2* sont particulièrement intéressants. Chez *gpt2*, la vitesse d'augmentation de la fluorescence après ajout du G6P ou du F6P est environ deux fois moins forte que chez le sauvage (**figure.32**). GPT2 permet donc de transporter le G6P et le F6P dans la vacuole, sans toutefois être à l'origine de toute l'activité de transport. Le mutant *sut4*, qui possède toujours un transporteur GPT2 théoriquement fonctionnel, répond comme le sauvage à l'ajout de F6P ou de G6P. Lors de l'ajout de saccharose, les mutants *gpt2* et *sut4* présentent tous les deux des vitesses d'augmentation de la fluorescence très élevées par rapport au sauvage (**figure.32**). En collaboration avec Fatma Lecourieux de l'équipe de Serge Delrot (ISVV, Institut Scientifique de la Vigne et du Vin), nous avons étendu notre étude au double mutants *tmt1/2*. *In vitro*, ces mutants ont été décrits comme étant partiellement déficients pour l'entrée ATP-dépendante du glucose dans les vacuoles (Cho et al., 2010). La **figure 33** montre que l'addition de glucose, de fructose et de saccharose à des suspensions de vacuoles isolées de chacune de ces lignées ne présentent pas de différence significative de mouvements de protons par rapport au sauvage. En revanche, l'ajout de G6P induit un flux de sortie de protons important chez le sauvage qui est très atténué chez le double mutant *tmt* (**figure.33**). Le mutant affecté dans le gène codant pour la PAP26 a aussi été analysé pour regarder l'effet du G6P par rapport au sauvage. Le mutant *pap26* se comporte de manière identique au sauvage Col0 à l'ajout du G6P (**non montré**). Ce résultat suggère que l'activité d'échange du G6P contre le Pi intra-vacuolaire peut se faire avec le pool de Pi préexistant et/ou grâce à l'activité des PAPs vacuolaires.

V.B. ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA PAP SUR VACUOLES ISOLÉES

Nous venons de démontrer que le G6P pouvait rentrer dans les vacuoles par le translocateur GPT2 et potentiellement par un ou plusieurs transporteurs TMT. Nous avons étudié le devenir de ce sucre phosphate à l'intérieur des vacuoles. Nous procéderons également à ces expériences sur des vacuoles purifiées provenant de plantes sauvages et mutées pour le gène codant pour la PAP26 pour mettre en évidence le rôle de la PAP et du transport des sucres phosphates dans ce processus.

a) Activité phosphatase acide sur vacuoles lysées

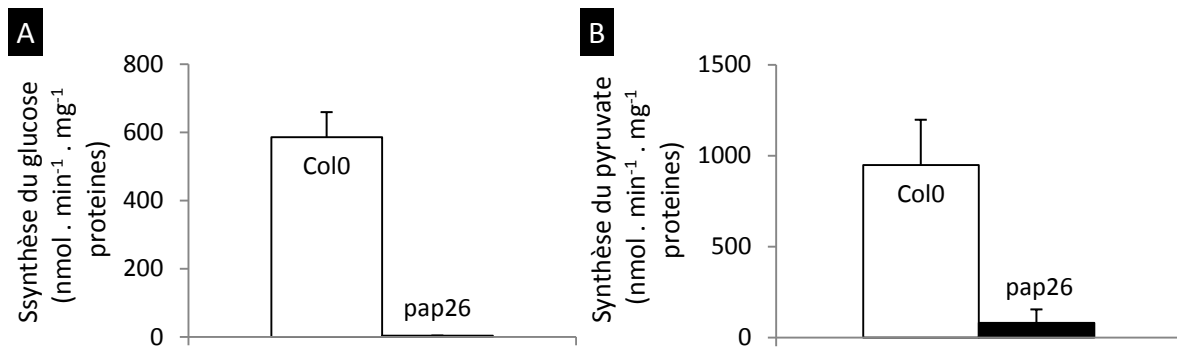


Figure 34. Activité G6P- et PEP-phosphatase acide sur vacuoles éclatées issues des lignées Col0 et *pap26*

(A) vitesse de synthèse de glucose mesurée sur des vacuoles purifiées éclatées. (B) vitesse d'oxydation du NADH mesurée sur des vacuoles purifiées incubées à pH 5,5 en présence de 0,5U.ml⁻¹ de lactate-déshydrogénase, 5mM ATP, et de 10 mM PEP. En blanc les mesures effectuées sur des vacuoles Col0, en noir sur des vacuoles issues de feuilles du mutant *pap26*. n = 3 à 6 mesures sur 2 (*pap26*) à 6 préparations (Col0) différentes.. Les écart-types sont calculés à partir des régressions sous le logiciel Kaleidagraph.

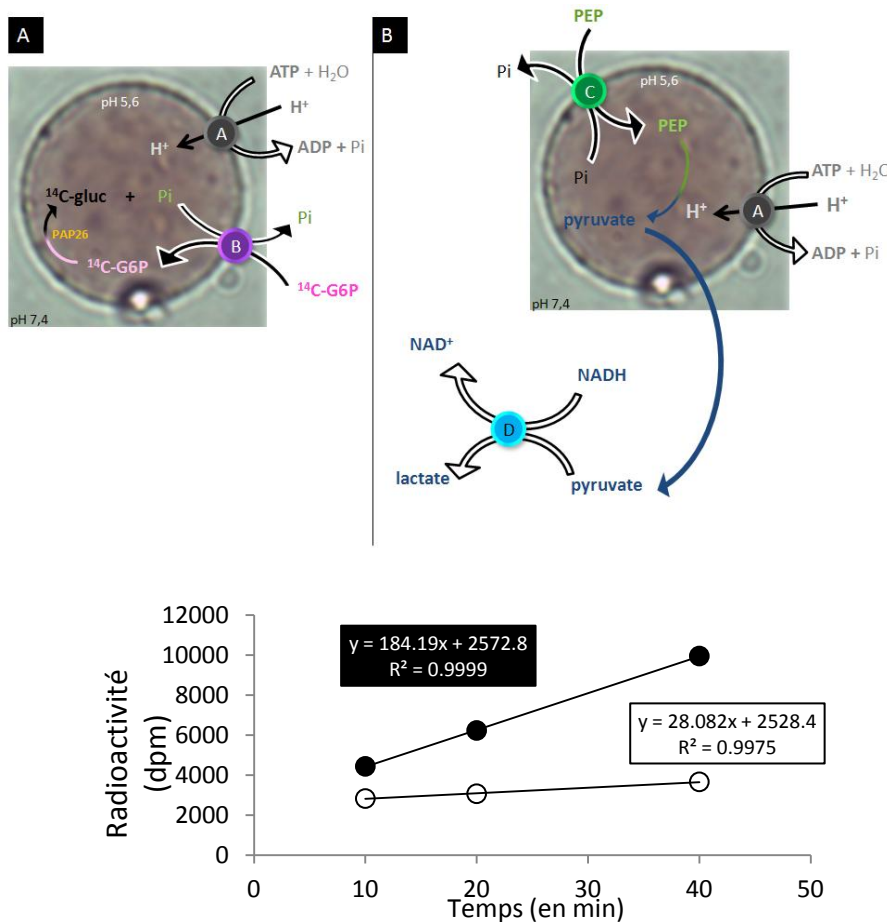


Figure 35. Schéma hypothétique du fonctionnement *in vitro* des activités G6P- (A) et PEP-phosphatase acide (B) dans des vacuoles intactes (A)

Le ¹⁴C-G6P (100dpm/nmol) entre dans la vacuole où il est hydrolysé en ¹⁴C-glucose + Pi. Après extraction, La radioactivité du ¹⁴C-glucose produit est quantifiée à différents temps d'incubation.. (B) Le PEP entre dans la vacuole où il est déphosphorylé en pyruvate. Une fois sortie, le pyruvate est pris en charge par la LDH (lactate déshydrogénase). La disparition du NADH est mesurée en continu à 340nm.

Figure 36. Exemple de détermination de vitesse d'apparition du [U-¹⁴C]-glucose à partir de [U-¹⁴C]-G6P sur vacuoles intactes

Les vacuoles purifiées incubées à pH 7,4 en présence de 5 mM d'ATP et de 5 mM [U-¹⁴C] glucose-6-Pi (100 dpm.nmole⁻¹). Le milieu réactionnel est stoppé à différents temps (10', 20' et 40') et la radioactivité du glucose produit est analysée comme décrit dans matériel et méthodes. En noir (●) les mesures du sauvage, en blanc (○) celles du mutant *pap26*. La pente et le R² dans le rectangle noir sont ceux calculés chez le sauvage, la pente et le R² dans le rectangle blanc sont ceux calculés chez le mutant.

Tout d'abord, les activités G6Pase et PEPase acides ont été mesurées à pH acide sur des vacuoles lysées (**figure.34**). L'activité G6Pase mesurée chez le sauvage est de 586 nmol.min⁻¹.mg⁻¹protéines. Elle est de 17 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ protéines chez le mutant *pap26*, soit une diminution d'un facteur 34. Dans une proportion moindre, l'activité PEPase acide chute d'un facteur 12 chez le mutant par rapport au sauvage, avec une valeur égale à 81 nmol.min⁻¹.mg⁻¹protéines. Les vacuoles isolées de feuilles du mutant *pap26* sont donc caractérisées par une forte déficience (à plus de 90%) en activité phosphatase acide.

b) Activité phosphatase sur vacuoles intactes

Sur des préparations de vacuoles intactes et énergisées à l'ATP, nous avons mesuré les activités de synthèse du glucose et du pyruvate en présence de G6P et de PEP exogène, respectivement. Le système expérimental est schématisé dans la **figure 35**. Le but est de reproduire l'environnement vacuolaire *in vitro* : dans ce système intégré, la libération du [U-¹⁴C]-glucose nécessite le transport et la déphosphorylation du [U-¹⁴C]-G6P. À un pH externe de 7,4 mimant le pH cytosolique, les vacuoles restent intactes et pour favoriser l'activité des phosphatases acides intra-vacuolaires, les vacuoles sont énergisées par les pompes à protons V-ATPase. La **figure 36** représente un exemple de détermination de vitesse d'apparition du [U-¹⁴C]-glucose à partir de [U-¹⁴C]-G6P sur vacuoles intactes. Selon le même principe, nous avons aussi utilisé le PEP comme substrat des phosphatases acides, la présence de lactate déshydrogénase exogène permettant de suivre en continu la synthèse du pyruvate relargué par les vacuoles intactes et énergisées (**figure.37, B**). Les activités de synthèse du glucose et du pyruvate mesurées sur des vacuoles issues de Col0 sont égales à environ 150 et 100 nmol.min⁻¹.mg⁻¹protéines (**figure.37**). Chez le mutant *pap26*, ces activités sont diminuées de respectivement 16,4 et 2,3 fois par rapport au sauvage (**figure.37, A & B**). Il est important de noter que les activités de synthèse de glucose et de pyruvate mesurées sur des vacuoles intactes excèdent très largement l'activité G6Pasique et PEPasique que l'on peut mesurer à pH 7,4 sur des vacuoles lysées (16±2 nmol.min⁻¹.mg⁻¹protéines). Ceci exclut la participation de phosphatase externe dans l'activité mesurée sur organelles intactes.

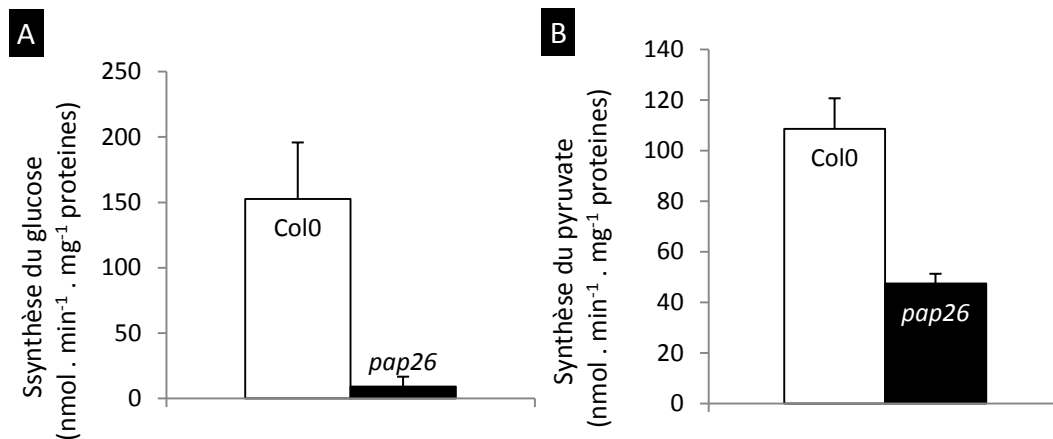


Figure 37. Activité de synthèse du glucose et du pyruvate à partir du G6P et du PEP sur vacuoles intactes

(A) vitesse de synthèse de glucose mesurée sur des vacuoles purifiées comme décrit dans la figure 20. La synthèse du glucose est calculée à partir de la pente calculée dans la **figure 36** en appliquant le calcul suivant : pente/RASG6P x (facteur de dilution)/[prot]_{extrait}. (B) vitesse d'oxydation du NADH mesurée sur des vacuoles purifiées incubées à pH 7,4 en présence de 0,5U.ml⁻¹ de lactate-déshydrogénase, 5mM ATP, et de 10 mM PEP. En blanc, les mesures effectuées sur des vacuoles purifiées à partir de feuilles de Col0, en noir, sur des vacuoles provenant du mutant *pap26*. Synthèse du glucose : n=3 déterminations sur 2 (*pap26*) à 3 (*Col0*) préparations différentes. Les écart-types sont calculés à partir des régressions sous le logiciel Kaleidagraph.

VI.A. LES TRANSPORTEURS VACUOLAIRES

Dans ce travail, nous avons utilisé une méthode indirecte pour étudier des mutants potentiellement affectés dans le transport des sucres (*sut4*, *tmt*, *gpt2*). L'interprétation des variations des signaux de fluorescence de l'acridine orange restent qualitatifs: ils permettent de mettre en évidence des mouvements de protons associés au transport de molécules. Cependant, une faible amplitude de variation induite par l'addition d'un sucre peut tout autant traduire une faible quantité de transporteur ou une faible stœchiométrie H⁺/sucre. En outre, il faut bien garder en tête que seul un transport couplé à un (des) proton(s) est visualisé. L'absence de modification de fluorescence engendrée par un métabolite ne signifie pas automatiquement l'absence de transport du sucre, mais seulement que ce dernier ne fait pas intervenir de proton ou qu'un flux opposé compense la sortie de H⁺. Les expériences sur vacuoles isolées de feuilles de Col0 montrent que le saccharose, le glucose, le fructose et les hexoses phosphates, tels que G6P et F6P, semblent faire intervenir un transport actif impliquant l'échange d'un ou de plusieurs H⁺. L'inactivation du gène GPT2 démontre qu'une partie du transport du G6P et du F6P dans la vacuole est assurée par la protéine GPT2. Le mécanisme de ce transporteur étudié lors de son expression hétérologue chez la levure, serait un antiport G6P/Pi, avec une stœchiométrie de 1/1 (Niewiadomski et al., 2005). Néanmoins, ce mécanisme d'échange n'exclut pas un mouvement de protons lors du transport, qui pourrait être liée à la différence de pK entre l'hexose-6-Pi et le Pi qui est égale à 0,7. De façon surprenante, les transporteurs TMT, qui seraient impliqués chez *Arabidopsis thaliana* dans l'entrée du glucose, du fructose et du saccharose dans la vacuole, semblent également associés au transport du G6P. Dans ce contexte, la construction d'un triple mutant *gpt2xtmt1xtmt2* devrait répondre à la question du transport tonoplastique des hexoses-phosphates. En ce qui concerne le transport des hexoses, contrairement aux travaux de Schulz et al (2002), le mutant *tmt1/2* n'est pas affecté dans l'efflux de H⁺ lié à l'entrée du glucose et du saccharose. Cependant, la redondance fonctionnelle des VGT n'est pas à exclure chez les mutants *tmt1/2*. Ces deux familles de transporteurs seraient capables

de transporter à travers le tonoplaste le glucose et le fructose (Martinoia et al., 2012). Il a également été démontré par expression hétérologue d'AtVGT1 chez la levure, que cette protéine transportait le glucose de façon ATP-dépendante (Aluri and Büttner, 2007).

En ce qui concerne le transport du saccharose, nous n'avons pas trouvé dans la collection de mutant des mouvements entrant de H⁺ après ajout de saccharose. Bien au contraire, nous avons noté une augmentation nette du flux sortant de H⁺ en présence de saccharose chez les mutants *gpt2* et *sut4*, ceci suggère un lien entre le métabolisme vacuolaire du saccharose et les protéines GPT2 et SUT4. Dans le cas de *gpt2*, on pourrait envisager une augmentation des enzymes du métabolisme du saccharose (transporteurs vacuolaires, SPS et/ou invertases) comme effet secondaire des perturbations engendrées par la mutation. Un phénotypage enzymatique complet du mutant *gpt2* pourrait à l'avenir répondre à cette question. En ce qui concerne SUT4, l'expression hétérologue de cette protéine a montré sa capacité à transporter le saccharose (Schneider et al., 2011). En outre, une étude des mouvement de H⁺ par patch-clamp a montré que le mécanisme du SUT4 serait plutôt un symport saccharose-H⁺ (Schulz et al., 2011). Chez le mutant *sut4*, il est logique d'observer une activité antiport saccharose/H⁺ supérieure au sauvage.

VI.B. LE G6P, UN SUBSTRAT PRÉFÉRENTIEL DE LA PAP26 VACUOLAIRE ?

Notre travail montre qu'environ 10% de l'activité totale tissulaire serait localisée dans les vacuoles et portée par la protéine PAP26. Le PEP a depuis longtemps été présenté comme le substrat préférentiel des PAP acides (Bozzo et al., 2002; Veljanovski et al., 2006; Tran et al., 2010a), nous apportons la démonstration formelle que le PEP est hydrolysé en pyruvate et Pi par des vacuoles intactes de feuilles. En outre, malgré une capacité hydrolytique des PAPs plus de deux fois inférieure pour le G6P que pour le PEP (Bozzo et al., 2002; Veljanovski et al., 2006), nos résultats démontrent l'existence. **i)** d'un transport du G6P à l'intérieur de la vacuole. **ii)** d'une hydrolyse en glucose plus Pi par la protéine PAP26. Le F6P peut également traverser le tonoplaste mais sa prise en charge *in organello* par la PAP26 n'a pas encore pu être démontrée faute de F6P radioactif disponible. En outre, des expériences préliminaires menées sur des vacuoles

isolées du mutant *gpt2* ont montré une diminution de 30% de l'activité de synthèse de glucose à partir du G6P par rapport au sauvage, suggérant le rôle de ce translocateur dans cette voie de synthèse. Physiologiquement, le transport et l'hydrolyse des esters phosphoriques vacuolaires ont depuis longtemps été intégrés dans les processus d'adaptation à la carence en phosphate (Tran et al., 2010a) (cf. **figure.12**, Introduction). Lors de la carence en phosphate, le gène GPT2 (au contraire de GPT1 et à l'instar de nombreux gènes codant pour des PAPs) est induit dans les plantules d'*Arabidopsis thaliana* (Misson et al., 2005; Morcuende et al., 2007). Cette induction de GPT2, qui mériterait à l'avenir d'être vérifiée au niveau fonctionnel sur vacuoles isolées, s'insère parfaitement dans notre schéma explicatif où le translocateur servirait à approvisionner la PAP vacuolaire en esters phosphoriques. Il convient d'être prudent quant aux extrapolations de ces expériences *in organello* aux situations *in vivo*. En effet, nos tests sur vacuoles isolées ont été effectués avec des concentrations optimales en G6P et PEP (5mM) qui excèdent les Km mesurés *in vitro* pour l'échangeur plastidial de la racine de pois (environ 0,7-1,1 mM pour le G6P et 2,9 mM pour le PEP)(Kammerer et al., 1998). De plus, dans les pointes de racines de maïs, la teneur en PEP est 40 fois plus faible que celle du G6P (Brouquisse et al., 2001). Il est donc possible qu'*in vivo* la compétition entre les deux substrats soit largement en faveur du G6P. Notons néanmoins que, par la méthode de fractionnement anhydre, des traces de G6P et de PEP ont été détectées dans le compartiment vacuolaire de tubercules de pomme de terre (correspondant à des concentrations de 0,01 à 0,06 mM, (Farré et al., 2001; Farré et al., 2008) et dans les feuilles de tomate (Dieuaide-Noubhani, communication personnelle). Ce résultat, qui ne remet pas en cause le transport de ces métabolites dans la vacuole, pourraient s'expliquer par un contrôle cinétique porté majoritairement par l'étape de transport par rapport à l'activité hydrolytique.

VI.C. LE TRANSPORT DES HEXOSE-P_i, UNE ÉTAPE LIMITANTE ?

Il est à noter que l'activité G6P- et PEP-phosphatase mesurée sur vacuoles intactes est inférieure à celle mesurée sur les vacuoles lysées à pH 5,5. Ainsi, l'activité phosphatase sur vacuoles intactes ne représente que 26% de l'activité totale sur G6P et 12% en présence de PEP. On peut donc émettre l'hypothèse

d'un fort contrôle exercé par l'étape de transport des ester-phosphoriques. Nous avons vu plus haut que la vitesse de déphosphorylation (et donc de transport) dans les vacuoles de feuilles d'*A.thaliana* mesurée sur vacuoles intactes était de $120 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines. Cette valeur est du même ordre de grandeur que la vitesse d'entrée de glucose (environ $50 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines) estimée à partir des cinétiques publiées par Wormit et al., 2006. Ceci fait de l'échangeur G6P/Pi et de la G6Pase une voie potentiellement non négligeable d'import de glucose dans la vacuole. Par extrapolation, il est possible d'estimer l'activité spécifique de l'échangeur G6P/Pi en rapportant ces valeurs à la masse de tissu frais. Ainsi, en prenant des valeurs d'abondance de 3,4 % de protéines vacuolaires dans les protéines totales et de 1,5 % de protéines dans 1 gramme de poids frais, il est possible de calculer une activité spécifique d'environ $60 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF dans les feuilles d'*Arabidopsis*. En comparaison, l'activité spécifique de l'échangeur des plastes d'endosperme de maïs, calculée selon le même principe (Kammerer et al., 1998), est d'environ $40 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF.

CALCULS DES FLUX DE SYNTHÈSE DES SUCRES CHEZ Col0 ET LE MUTANT *PAP26*

I. OBJECTIFS

Ce chapitre a pour but de présenter les principaux résultats d'une approche de marquage au ^{14}C sur du tissu racinaire en culture. Nous avons découpé ce chapitre en trois parties: **i)** principe des mesures des flux par marquages isotopiques sur temps courts. **ii)** effet du sucre externe sur les racines en culture et sur les cinétiques d'incorporation de la radioactivité. **iii)** calculs des vitesses de synthèse et d'hydrolyse des sucres chez le sauvage et le mutant *pap26*. Cette dernière partie permettra de conclure quant à la participation de la protéine PAP26 à la synthèse des hexoses au niveau cellulaire.

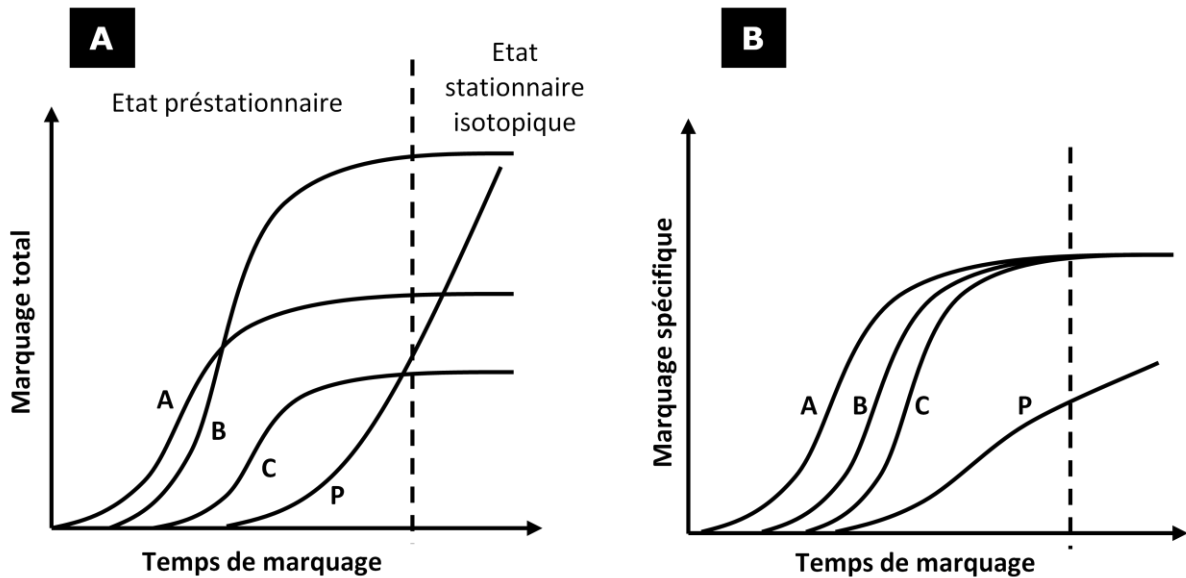
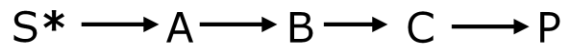


Figure 38. Cinétique de marquage d'une série d'intermédiaires sur une voie métabolique linéaire
 Etats isotopiques pré-stationnaire et stationnaire dans une voie métabolique où A, B et C dérivent l'un de l'autre de façon simple, c'est-à-dire sans perte ni addition de marquage. (A) La quantité d'isotope marqué présente dans chacun des intermédiaires augmente au cours de l'état pré-stationnaire puis se stabilise lorsque l'état stationnaire est atteint. Dans le produit terminal, elle augmente de façon linéaire. (B) A l'état stationnaire, les enrichissements spécifiques des intermédiaires deviennent égaux à celui du précurseur. Celui du produit terminal reste inférieur et continue d'augmenter dans la mesure où les quantités initiales, donc non marquées, sont significatives.

II. MESURE DES FLUX PAR MARQUAGES ISOTOPIQUES

L'objectif de ce chapitre est de montrer comment l'analyse de cinétiques de marquages isotopiques sur temps courts à l'état stationnaire métabolique permet de calculer des vitesses unidirectionnelles (flux) dans une chaîne linéaire de réactions.

Dans un système exclusivement dynamique, les concentrations en métabolites varient au cours du temps. Lorsqu'un traceur isotopique est rajouté dans cet état, la taille des pools des métabolites et le marquage des métabolites doivent être estimés à chaque instant. L'interprétation des cinétiques de marquages fait donc appel à la modélisation de l'évolution des concentrations et du marquage des composés de la voie métabolique par des équations différentielles contenant de nombreuses inconnues ce qui complexifie sensiblement la résolution mathématique (voir par exemple Colon et al (2010)). En revanche, si le traceur isotopique est introduit dans le système lorsque les flux métaboliques et les teneurs en composés intermédiaires sont constants (état stationnaire métabolique), les équations isotopiques s'en trouvent grandement simplifiées car les teneurs en métabolites sont fixes et seul l'enrichissement des molécules métabolites varie.

Sur un réseau de taille restreinte, les interconversions des sucres ne font pas intervenir de remaniement intramoléculaire, nous avons écarté l'utilisation de traceurs stables (^{13}C) et avons décidé de travailler à partir de marqueurs radioactifs uniformément marqués (^{14}C) qui présentent l'avantage d'être détectables à de faibles concentrations lors d'études de cinétiques sur temps courts ce qui limite la perturbation du système biologique.

II.A. ÉVOLUTION DE MARQUAGE AU COURS DU TEMPS

La **figure 38** montre que, dans une voie métabolique linéaire à l'état stationnaire métabolique, les intermédiaires se marquent les uns après les autres. Après un temps suffisamment long, le marquage des différents intermédiaires ne varie plus et l'accumulation du marquage dans les produits terminaux des voies étudiées se fait à vitesse constante ; on dit que l'état stationnaire isotopique est atteint. Pour les atomes ou groupes d'atomes dérivant l'un de l'autre dans la voie métabolique, le marquage total comme le marquage spécifique augmentent

pendant la phase pré-stationnaire en fonction de l'ordre des composés dans la voie métabolique. À l'état stationnaire, pour les groupes d'atomes dérivant du précurseur par voie linéaire, la quantité de marquage incorporée est proportionnelle aux quantités de composés analysées (**Figure.38, A**), tandis que le marquage spécifique est identique à celui du précurseur (**Figure.38, B**). Ce marquage spécifique est modifié par rapport à celui du précurseur dans le cas de voies branchées et de recyclage. L'état stationnaire est atteint après un temps variable selon le type cellulaire étudié : de l'ordre de quelques minutes chez les bactéries, ce temps se compte en heures ou en jours chez les végétaux en fonction du type de tissu en culture et de la nature du traceur utilisé. L'atteinte de l'état stationnaire isotopique dépend directement du turnover du composé considéré. Ce turnover étant défini par le rapport entre la valeur de la vitesse de synthèse ou de dégradation d'un composé donné et la taille du pool. Ainsi, plus la taille du pool est importante et/ou plus la vitesse est faible, plus le temps pour atteindre l'état stationnaire isotopique est retardé. La compartimentation cellulaire peut également être un facteur influençant la vitesse d'établissement de cet état stationnaire. Si un composé intermédiaire est présent dans plusieurs compartiments, plus la vitesse d'échange est faible et/ou plus la taille du pool de ce composé dans le dit compartiment est élevée, plus l'état stationnaire isotopique est long à atteindre.

II.B. MARQUAGES SUR TEMPS COURTS

Les marquages sur temps courts permettent de quantifier des flux métaboliques. Pour cela, la vitesse d'incorporation du marquage (dA^*/dt) est mesurée dans les composés d'intérêt. Pourtant, il faut noter que la vitesse d'incorporation du traceur n'est pas la vitesse de la réaction (ou flux). En effet, la vitesse d'incorporation dépend de la vitesse de réaction mais aussi du marquage spécifique du précurseur. La quantification du flux (dA/dt) d'après un marquage radioactif implique donc la détermination de la radioactivité spécifique (RAS) du précurseur : $dA/dt = d(A^*/RAS_S)/dt$

La RAS étant définie par la quantité de radioactivité incorporée par mole de composé. Expérimentalement, la mesure en continu de la radioactivité du composé (A^*) et de la radioactivité spécifique du précurseur (RAS_S) est

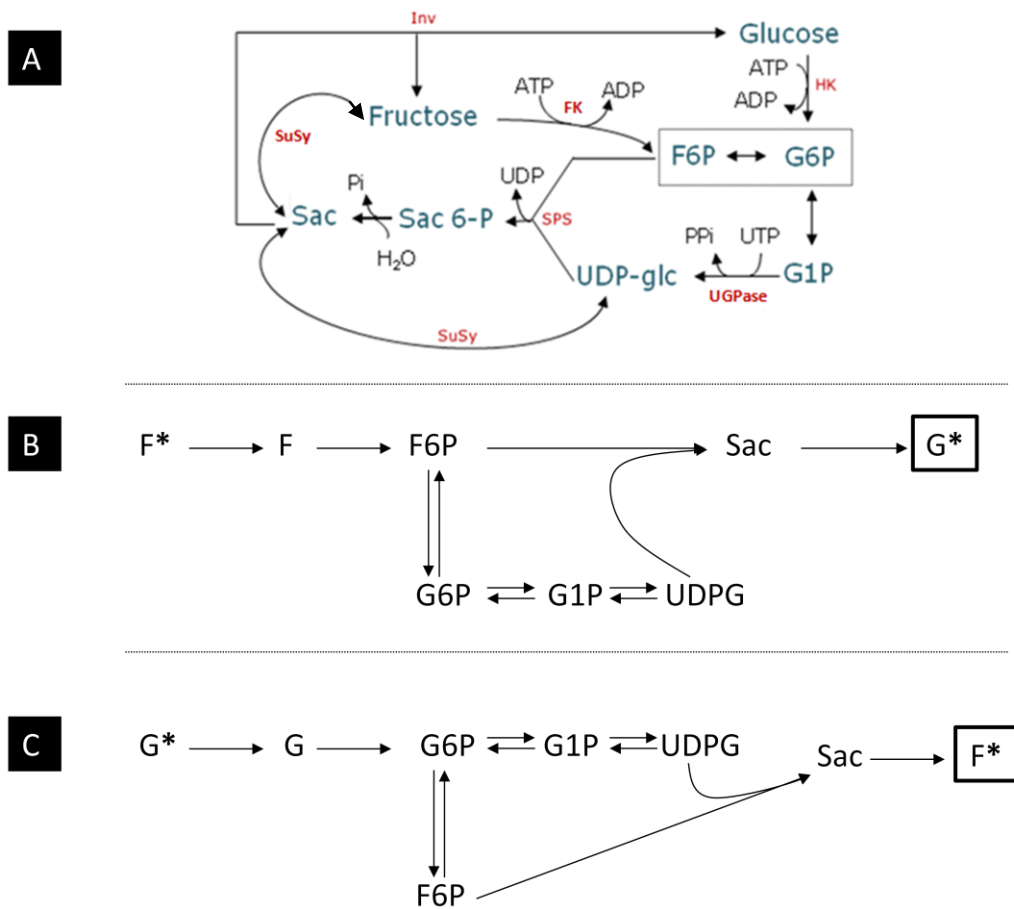


Figure 39. Marquages sur temps courts des voies de synthèse et de dégradation du saccharose

A- Le cycle du saccharose dans une cellule végétale

UGPase : UDP-glc pyrophosphorylase ; **FK** : fructokinase ; **HK** : Hexokinase ; **Inv** : Invertase ; **SPS** : saccharose-6-Pi synthase ; **SuSy** : saccharose synthase

B- et C- : Linéarisation schématique du cycle du saccharose lors d'un apport de fructose radiomarqué (B) ou de glucose radiomarqué (C).

inaccessible. La détermination des vitesses passe donc par le calcul de la quantité du composé A synthétisée au cours de chaque intervalle de temps en tenant compte de l'augmentation des dpm dans le composé (A*) et de la RAS moyenne du précurseur S pendant le même intervalle de temps (Alonso, 2003; Alonso et al., 2007b). Dans notre exemple, l'équation précédente se traduit alors de la manière suivante :

$$A(t+1) = A(t) + (A^*(t+1) - A^*(t)) / \overline{RAS_A}$$

■ Exemple du cycle du saccharose

Le **figure 39** représente le cycle du saccharose, avec les enzymes de synthèse et de clivage du saccharose (SPS+SPase, Susy et invertase), les enzymes d'interconversion des sucres phosphate (PGI, PGM, UGPase) et les kinases (HK et FK). L'approche de marquage sur temps courts permet d'étudier ce cycle comme une voie linéaire. Ainsi, l'ajout de fructose externe radiomarké (cf. **figure.39, B**) permet de suivre l'incorporation de la radioactivité dans les hexoses Pi, puis le saccharose et enfin le glucose. Inversement, l'ajout de glucose externe radiomarké (cf. **figure.39, C**) permet de suivre l'incorporation de la radioactivité dans les hexoses Pi, puis le saccharose et enfin, le fructose. L'utilisation de ces deux précurseurs exogènes permet donc d'étudier les voies de synthèse du glucose et du fructose intracellulaire.

■ Synthèse du saccharose

Lors d'une cinétique de marquage, la radioactivité incorporée dans le saccharose augmente au cours du temps à cause de l'activité de l'enzyme (e.g. la SPS et/ou SuSy) et de l'augmentation de la RAS du précurseur. Dans le cas où les précurseurs du saccharose (UDPG, F6P, G1P, G6P) sont en échange isotopique rapide, la vitesse unidirectionnelle de synthèse du saccharose est calculée à partir de l'incorporation de la radioactivité dans le glucosyl du saccharose et de la RAS du G6P selon la formule suivante:

$\frac{dsaccharose}{dt} = d(dpm_{saccharose} \times 0,5 / RAS_{G6P}) / dt$ (cf. II.B.). Dans la pratique, la quantité de saccharose synthétisée au cours de chaque intervalle de temps est donnée par la relation suivante : $[saccharose]_{(t+1)} = [saccharose]_{(t)} + (dpm_{saccharose(t+1)} - dpm_{saccharose(t)}) / (RAS_{G6P(t+1)} + RAS_{G6P(t)})$ (**équation 1**).

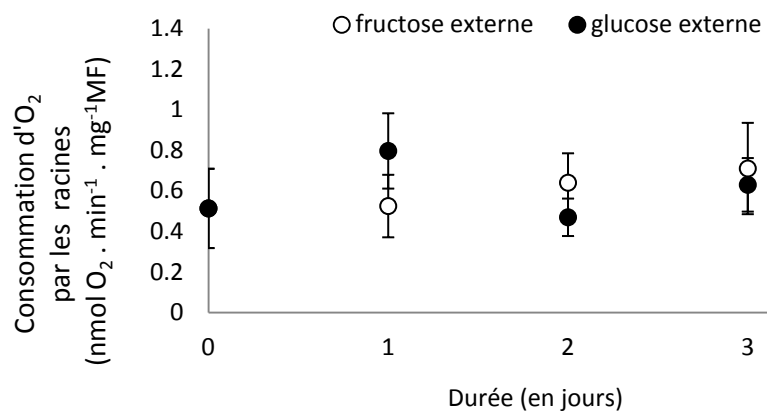


Figure 40. Vitesse de consommation d'O₂ des racines en fonction du temps de culture.

Les plantules sont cultivées jusqu'à 20 jours. A cette date, les racines sont séparées des parties aériennes puis mises en culture dans le milieu de culture MS + 200mM de fructose (●) ou de glucose (○). La vitesse de consommation en O₂ a été mesurée par la méthode polarographique comme décrit dans matériel et méthodes. Chaque mesure provient d'un mélange de 5 plantules. Moyennes et écarts types sont calculés avec $5 \leq n \leq 7$.

■ Synthèse des hexoses

Selon le même principe, il est possible de quantifier la vitesse de synthèse des hexoses. Dans ce cas, deux voies de biosynthèse sont possibles :

a) Origine de l'hexose : hydrolyse du saccharose

Si l'on fait l'hypothèse que la seule origine du glucose (lors de l'incubation sur fructose) et du fructose (lors de l'incubation sur glucose) est l'hydrolyse du saccharose (*via* l'activité invertasique), le calcul de la vitesse unidirectionnelle de synthèse du glucose ou du fructose à partir du saccharose passe par la formule suivante:

$$d\text{hexose}/dt = d(\text{dpm}_{\text{hexose}} \times 2 / \text{RAS}_{\text{saccharose}}) / dt$$

En pratique, la quantité de glucose ou de fructose synthétisée au cours de chaque intervalle de temps est calculée selon la formule suivante:

$$[\text{hexose}]_{(t+1)} = [\text{hexose}]_{(t)} + (\text{dpm}_{\text{hexose}(t+1)} - \text{dpm}_{\text{hexose}(t)}) \times 4 / (\text{RAS}_{\text{saccharose}(t+1)} + \text{RAS}_{\text{saccharose}(t)}) \quad (\text{équation 2}).$$

b) Origine de l'hexose : hydrolyse des hexoses Pi

Si l'on fait l'hypothèse que la seule origine du glucose (lors de l'incubation sur fructose) et du fructose (lors de l'incubation sur glucose) est l'hydrolyse des hexoses-Pi correspondants (*via* l'activité hexose-6-phosphatase), le calcul de la vitesse unidirectionnelle de synthèse du glucose ou du fructose à partir des hexoses-Pi passe par la formule suivante :

$$d\text{hexose}/dt = d(\text{dpm}_{\text{hexose}} / \text{RAS}_{\text{G6P}}) / dt.$$

En pratique, la quantité de glucose ou de fructose synthétisée au cours de chaque intervalle de temps est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{hexose}]_{(t+1)} = [\text{hexose}]_{(t)} + (\text{dpm}_{\text{hexose}(t+1)} - \text{dpm}_{\text{hexose}(t)}) \times 2 / (\text{RAS}_{\text{G6P}(t+1)} + \text{RAS}_{\text{G6P}(t)}) \quad (\text{équation 3}).$$

III. EFFET DU SUCRE EXTERNE SUR LES RACINES EN CULTURE

III.A. PRÉREQUIS : IDENTIFICATION DE L'ÉTAT STATIONNAIRE MÉTABOLIQUE

Une part importante du travail a consisté à cultiver les tissus racinaires excisés en présence de 200 mM de glucose ou de fructose et de vérifier l'existence d'un

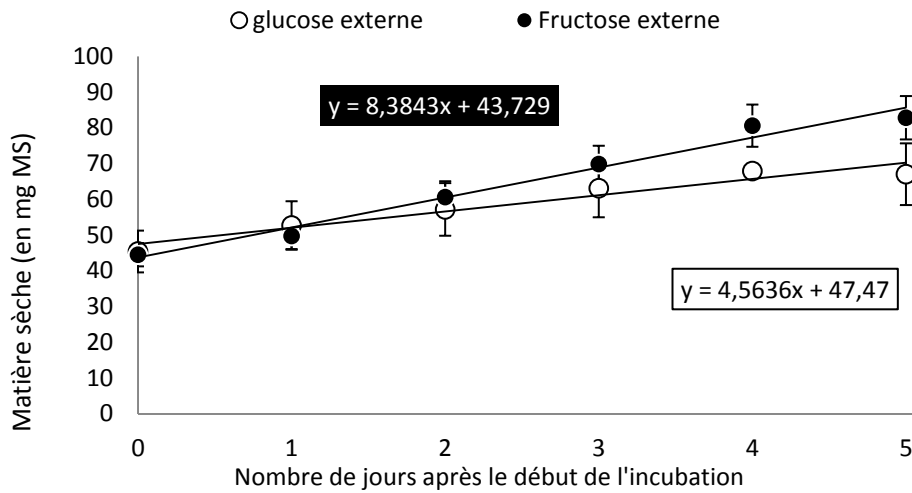


Figure 41. Effet du sucre externe sur la croissance du tissu racinaire

Les plantules sont cultivées jusqu'à 20 jours ; à cette date, les racines sont séparées des parties aériennes puis mises en culture dans le milieu de culture MS + 200mM de fructose (●) ou de glucose (○). **En noir**, la pente calculée à partir des racines cultivées en présence de fructose, **en blanc** à partir de racines cultivées en présence de glucose. Chaque mesure provient d'un mélange de racines issues de 10 plantules ; les moyennes et écarts types sont calculés avec $4 \leq n \leq 5$.

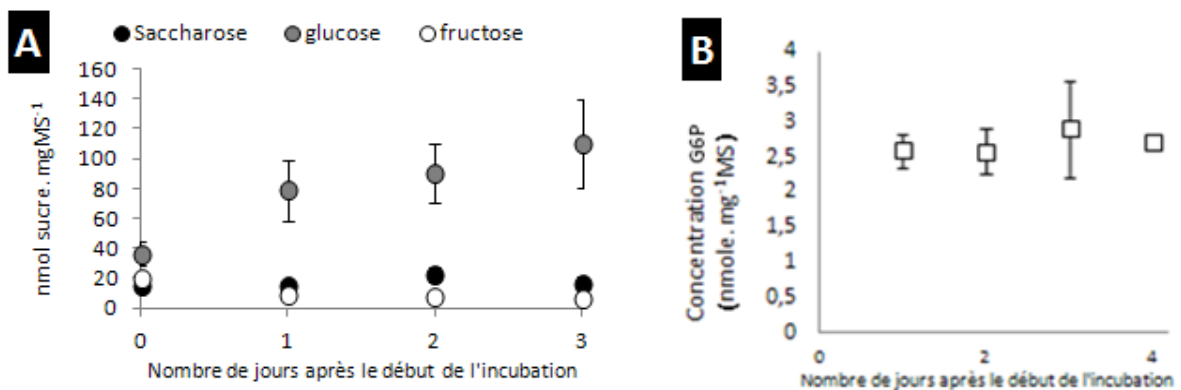


Figure 42. Teneurs en sucres solubles (A) et en glucose-6-phosphate (B) du tissu racinaire en fonction du temps de culture

Les plantules sont cultivées jusqu'à 20 jours. À cette date, les racines sont séparées des parties aériennes puis mises en culture dans le milieu de culture MS + 200mM de glucose. Les teneurs en saccharose (○), en glucose (●) et en fructose (●) ont été mesurées par HPLC et par dosage enzymatique comme décrit dans matériel et méthodes. Chaque mesure provient d'un mélange de racines issues de 5 ou 10 plantules ; les écarts moyens sont calculés selon $n = 12$ au minimum. La teneur en G6P (□) a été mesurée par la méthode enzymatique comme décrit dans matériel et méthodes. Chaque mesure provient d'un mélange de racines issues de 5 ou 10 plantules ; les écarts moyens sont calculés selon $n = 3$.

état stationnaire métabolique sur ces deux substrats carbonés, en mesurant en certains nombre de flux et d'intermédiaires métaboliques.

a) Consommation d'O₂

Nous avons donc cultivé les racines en présence de glucose ou de fructose. Quel que soit le substrat, la vitesse de consommation d'oxygène (**figure.40**) reste constante entre 1 et 3 jours de culture, à une valeur moyenne comprise 0,5 et 0,8 nmol O₂.min⁻¹.mgMS⁻¹. Ces valeurs sont par ailleurs très proches des respirations racinaires mesurées lors de la croissance des plantules (**non montré**). On peut donc conclure que le métabolisme du tissu est globalement stable au cours du temps quel que soit l'apport en sucre externe.

b) Croissance du tissu racinaire

Nous avons suivi la quantité de matière sèche acquise par les racines lors des incubations, en présence de glucose ou de fructose externe (**figure.41**). Dans les deux cas, les racines acquièrent de la matière, preuve que la culture de racine est viable et en croissance même si il est difficile à ce niveau de discriminer croissance et division cellulaire. En présence de glucose externe, le gain de matière sèche est de 10,6% en 24H. En présence de fructose, le gain est plus important puisqu'il passe à 16% en 24H. En cinq jours, la quantité de matière sèche augmente de 32% en présence de glucose et de 46% en présence de fructose externe (p<0,03). Il semblerait donc que le fructose soit plus favorable à la croissance racinaire, sans que cela se traduise par une vitesse de respiration significativement augmentée.

c) Evolution des teneurs en sucres des racines

Les trois principaux sucres solubles ont été dosés sur des racines en culture pendant 24, 48 et 72H (**figure.42, A**) ainsi que le G6P (**figure.42, B**). Le G6P, le sucre phosphate majoritaire des racines (Brouquisse et al., 1991; Alonso, 2003), est présent tout au long de cette cinétique à une concentration constante d'environ 2,5 nmol.mgMS⁻¹. Le saccharose et le fructose sont constants sur la durée de l'incubation avec des concentrations respectives d'environ 18 et 7 nmol.mgMS⁻¹ respectivement. Le glucose s'accumule pour se

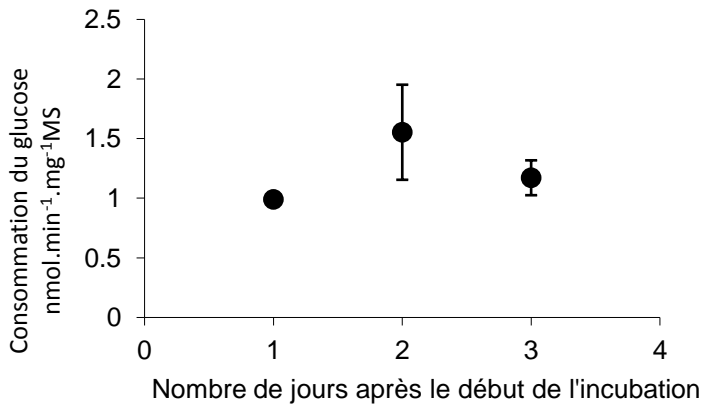


Figure 43. Vitesse de consommation du glucose par les racines en fonction du temps de culture

Les plantules sont cultivées jusqu'à 20 jours. À cette date, les racines sont séparées des parties aériennes puis mises en culture dans le milieu de culture MS + 200mM de glucose. La vitesse de consommation du glucose a été calculée à partir de la vitesse initiale de l'incorporation de [U-¹⁴C]-glucose (à une RAS de 10 à 30 dpm / nmol) dans les racines en culture sur des temps courts (10, 20 et 40 min), comme décrit dans matériel et méthodes. Chaque point est la pente ± erreur à partir de 3 temps différents et 3 mesures par temps.

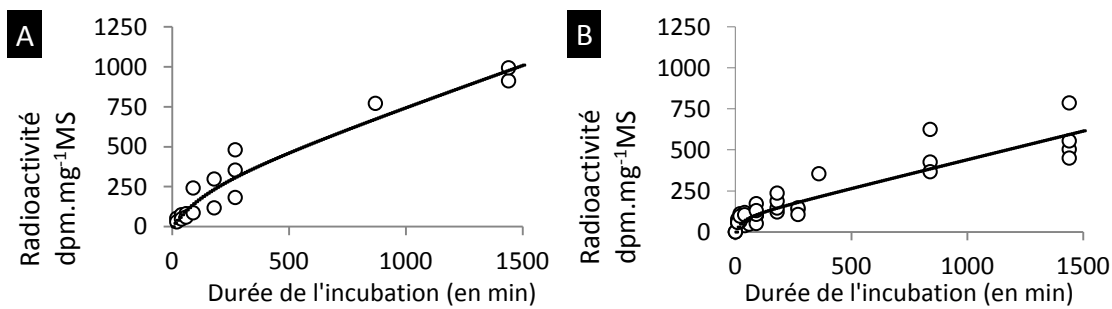


Figure 44. Cinétique d'incorporation de la radioactivité dans les racines en culture

Des racines sauvages sont mises à incuber en présence de 200 mM de [U-¹⁴C]-fructose (A) ou [U-¹⁴C]-glucose (B) à une RAS de 10 à 30 dpm.nmol⁻¹. La radioactivité totale incorporée a été normalisée par rapport à la RAS du milieu de culture. Le tracé en continu correspond à la régression non-linéaire des points expérimentaux selon l'équation suivante : $y = a*t/(b+t) + c*t$. Chaque point est la moyenne ± écart type de 3 mesures faites sur chaque incubation.

Tableau.V. Vitesses de consommation des sucres externes

Les vitesses d'incorporation des sucres radiomarqués dans les composés totaux (A) et insolubles (B), exprimées en $\mu\text{mol hexoses.min}^{-1}.\text{gMS}^{-1}$, sont calculées sur les premiers temps de l'incubation (10 - 90min). Chaque valeur est la pente ± erreur calculée à partir de 3 à 5 temps différents et 3 mesures par temps.* : $p < 0,05$ vs. Col0 ; ♣ : $p < 0,05$ vs. [U-¹⁴C]-glu

A	[U- ¹⁴ C]-glu	[U- ¹⁴ C]-fru	B	[U- ¹⁴ C]-glu	[U- ¹⁴ C]-fru
	Col0	1,01 ± 0,14		1,25 ± 0,25 ♣	Col0
<i>pap26</i>	1,37 ± 0,10*	1,37 ± 0,14	<i>pap26</i>	0,11 ± 0,06	0,19 ± 0,01 ♣

concentrer à $110 \text{ nmol.mgMS}^{-1}$, soit un gain de 70% en 72H (J₀ vs. J₃ : $p < 0,01$).

d) Consommation du glucose

La vitesse de consommation du glucose a été mesurée par l'incorporation sur temps courts de glucose radioactif dans le tissu racinaire. La **figure 43** montre une valeur sensiblement identique à 24, 48 et 72 H, avec une valeur moyenne d'environ $1,25 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ MS}$, confirmant ainsi la stabilité de la vitesse de respiration au cours de la culture. Il est à noter qu'il n'a pas été possible de déterminer ce flux par la mesure de la disparition du sucre dans le milieu de culture à cause de sa trop forte concentration initiale et du phénomène d'évaporation du milieu par un apport d'air humide.

Suite à ces expérimentations, nous avons choisi de cultiver les racines en présence de glucose ou de fructose avant de procéder aux marquages. Sur les pointes de racines de maïs il avait été observé une perturbation due au stress coupure, essentiellement sur les quatre premières heures (Alonso, 2003). Afin de s'affranchir de ce problème les racines ont été incubées 24H après la mise en culture avant de procéder aux expériences de marquage.

III.B. EFFET DU SUCRE EXTERNE SUR LES CINÉTIQUES DE MARQUAGE DES COMPOSÉS TOTAUX, SOLUBLES ET INSOLUBLES CHEZ LE SAUVAGE

Les composés solubles se composent des sucres, des acides aminés et des acides organiques majoritairement ; les composés insolubles de la paroi, des protéines, de l'amidon et des lipides majoritairement.

a) Incorporation de la radioactivité dans les racines

L'efficacité d'incorporation de la radioactivité dans les racines est dépendante de la nature du sucre externe (**figure.44**). En présence de fructose, la quantité de radioactivité incorporée dans les tissus racinaire atteint environ $1000 \text{ dpm.mgMS}^{-1}$ 24 H après le début de l'incubation (**figure.44, A**). Dans les mêmes conditions mais avec le glucose, l'incorporation de la radioactivité totale est de $600 \text{ dpm.mgMS}^{-1}$, soit un rendement inférieur de 40%. Quel que soit le précurseur, on observe une cinétique biphasique de l'incorporation totale de la radioactivité

Tableau.VI. Comparaison du métabolisme des racines en présence de fructose ou de glucose externe

Les calculs de flux ont été faits à partir des données des figures 40 et 41 pour la consommation d'oxygène et la croissance, respectivement, en prenant un rapport MF/MS égal à 10 et identique sur les deux substrats, un rapport CO₂/O₂ de 1 (Alonso, 2003), et une teneur en carbone dans la biomasse égale à 40%. La vitesse initiale de consommation de chacun des hexoses a été calculée à partir de la figure 44.

	Fructose	Glucose
Vitesse de croissance (jour ⁻¹)	0,13±0,02	0,07±0,006
Croissance (μmol équiv. hexose.min ⁻¹ .gMS ⁻¹)	0,49±0,08	0,27±0,03
vitesse de respiration (μmol O ₂ .min ⁻¹ .gMF ⁻¹)	0,61± 0,08	0,62 ± 0,17
Respiration (μmol équiv. hexose.min ⁻¹ .gMS ⁻¹)	1,0 ± 0,13	1,0 ± 0,28
Croissance + respiration (μmol équiv. Hexose.min ⁻¹ .gMS ⁻¹)	1,49±0,21	1,27±0,31
Vitesse de consommation des hexoses (μmol.min ⁻¹ .gMS ⁻¹)	1,25 ± 0,25	1,01 ± 0,14

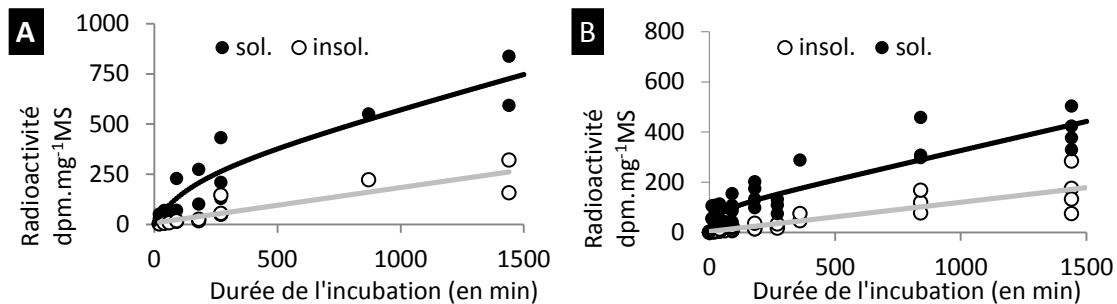


Figure 45. Cinétique d'incorporation de la radioactivité dans les composés insolubles et solubles des racines en culture

Des racines sauvages sont mises à incuber en présence de 200 mM de [U-¹⁴C]-fructose (A) ou [U-¹⁴C]-glucose (B) à une RAS de 10 à 30 dpm/nmol. La radioactivité incorporée dans les composés solubles (●) et insolubles (○), a été mesurée après extraction éthanolique comme décrit dans matériel et méthodes puis normalisée par rapport à la RAS du milieu de culture. Les tracés en continu correspondent aux régressions linéaire et non-linéaire des points expérimentaux selon les équations suivantes : $y = a*t/(b+t) + c*t$ et $y = a*t$. Chaque point est la moyenne ± écart type de 3 mesures faites sur chaque incubation.

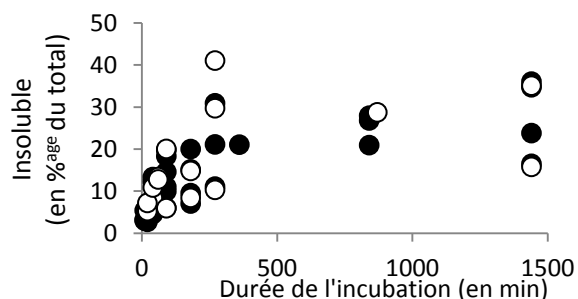


Figure 46. Part de la radioactivité incorporée dans la fraction insoluble par rapport à la radioactivité totale

Les pourcentages sont calculés à partir des données des figures 44 & 45 en présence de [U-¹⁴C]-fructose (○) et de [U-¹⁴C]-glucose (●)

chez le Col0 : une incorporation rapide de la radioactivité suivie d'un ralentissement, que l'on peut approximer à une incorporation quasi-linéaire. Le **tableau V** montre que la vitesse de consommation du sucre, calculée à partir de la vitesse initiale d'incorporation de la radioactivité, est significativement plus forte en présence de fructose qu'en présence de glucose, notamment pour les composés insolubles. Ces valeurs sont corroborées par l'estimation de la consommation d'hexoses liée à la croissance et à la respiration (**tableau.VI**). En outre, on peut constater que le rendement de croissance est relativement faible sur les deux substrats, seulement 20 et 30% des hexoses consommés sont incorporés dans la biomasse sur fructose et glucose, respectivement. Ce rendement est plus faible que celui qui a été mesuré sur les pointes de racines de maïs en culture en présence de 60 mM de glucose, où il atteignait 50% (Alonso, 2003). Cela peut s'expliquer par le fait que les pointes de racines présentaient essentiellement des cellules en division alors que dans le cas de la culture de tissu racinaire, les cellules sont différenciées.

b) Incorporation de la radioactivité dans les composés solubles et insolubles

La **figure 45** représente la répartition de la radioactivité entre les composés solubles (pour rappel : sucres, acides aminés et acides organiques principalement) et insolubles (pour rappel : paroi, protéines, amidon et lipides principalement). À la manière du profil d'incorporation de la radioactivité totale dans les racines (cf. **figure.44**), la cinétique de marquage de la fraction soluble (**figure.45**, ●) est également biphasique. Ce profil particulier n'est pas visible pour la fraction insoluble (**figure.45**, ○) où l'incorporation de la radioactivité dans les composés insolubles suit une cinétique quasi-linéaire, avec une vitesse d'incorporation environ 1,5 fois plus rapide en présence de fructose par rapport au glucose. Cette différence est en accord avec le facteur 1,5 observé entre les vitesses de croissance respectives des racines (cf. **tableau.VI**). Nous constatons qu'en début de marquage, les composés insolubles représentent une faible proportion du marquage total ; en revanche ces composés se marquent rapidement et atteignent ~20% du marquage total au bout de 4,5H (270 minutes). Cette observation est valable à la fois pour le fructose et le glucose externe (**figure.46**). À 24H (1440 minutes), les composés insolubles ne

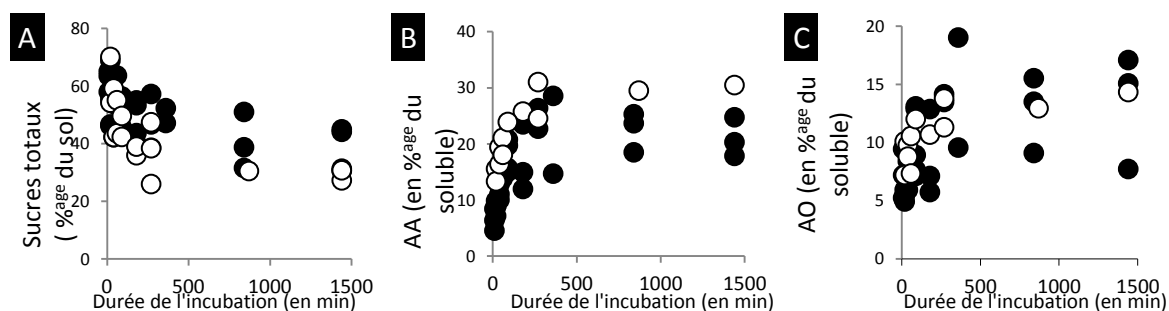


Figure 47. Part de la radioactivité incorporée dans les fractions neutre (A), cationique (B) et anionique (C) par rapport à la totalité des composés solubles

Les composés solubles, issues des incubations en présence de [U-14C]-fructose (○) et de [U-14C]-glucose (●) externe, ont été séparés par des résines anioniques et cationiques comme décrit dans Matériel et Méthodes. Les pourcentages ont été calculés à partir des radioactivités incorporées dans les fractions neutre (sucres totaux), cationique (acides aminés, AA) et anionique (acides organiques, AO). Chaque point est la moyenne \pm écart type de 3 mesures faites sur chaque incubation.

Tableau.VII. Contamination du marquage intracellulaire par le sucre exogène

La radioactivité contaminante, exprimée en dpm.mgMS^{-1} et normalisée par rapport à la RAS externe, a été mesurée en plongeant les racines pendant quelques secondes en présence de [U-14C]-fructose et de [U-14C]-glucose externe à une RAS de 10 à 30 dpm.nmol^{-1} . Chaque valeur est la moyenne \pm écart type d'au moins 10 mesures faites sur 3 à 4 incubations indépendantes.

	dpm.mgMS^{-1}
[U-14C]-glucose	$0,83 \pm 0,26$
[U-14C]-fructose	$0,86 \pm 0,42$

que 30% du marquage final. Ces résultats confirment d'une part que les composés insolubles dérivent directement des composés solubles et, d'autre part que le marquage selon une cinétique biphasique des composés solubles traduit probablement que certains métabolites sont marqués très rapidement, tandis que d'autres se marquent avec un retard.

c) Incorporation de la radioactivité dans les sucres, les acides organiques et les acides aminés

Le marquage de ces composés se comporte de la même manière quel que soit le sucre (glucose ou fructose) présent dans le milieu externe. À partir des composés solubles, nous avons séparé la fraction neutre, comprenant essentiellement les sucres, la fraction anionique, riche en acides organiques et en esters phosphoriques, et la fraction cationique, renfermant les acides aminés. Parmi les composés solubles, les sucres (glucose, fructose et saccharose) sont ceux qui se marquent le plus vite puisqu'ils représentent environ 60% des composés marqués après 20 minutes d'incubation (**figure.47, A**). À partir de 20 minutes, le pourcentage des sucres marqués dans la fraction soluble diminue rapidement pour se stabiliser à 40%. En revanche, quel que soit le sucre présent à l'extérieur, le marquage des acides aminés et des acides organiques est faible en début d'incubation (moins de 5% à 20 minutes) puis augmente progressivement pour se stabiliser à 15% au bout de 4H30 (270 minutes) pour les acides organiques et à 30% pour les acides aminés (*cf. figure.47, B & C*).

III.C. CINÉTIQUES DE MARQUAGE DES SUCRES SOLUBLES

Après séparation des sucres solubles par HPLC (voir matériel et méthodes), nous avons déterminé la radioactivité incorporée dans le saccharose, le glucose et le fructose endogène. Comme précédemment, pour chaque expérience, nous avons normalisé la quantité de radioactivité par la RAS du précurseur du milieu d'incubation. À noter qu'en présence de glucose et de fructose, respectivement, les marquages du glucose et du fructose interne sont initialement très élevés (**non montré**). Nous avons émis l'hypothèse que les racines pouvaient être contaminées par le sucre externe malgré plusieurs rinçages (milieu froid + eau glacée). Cependant, des marquages sur des temps très courts (quelques secondes) ont montré que la contamination ne pouvait pas excéder 1dpm.mgMS^{-1} (**tableau.VII**). Il est donc possible que la forte concentration en sucre externe

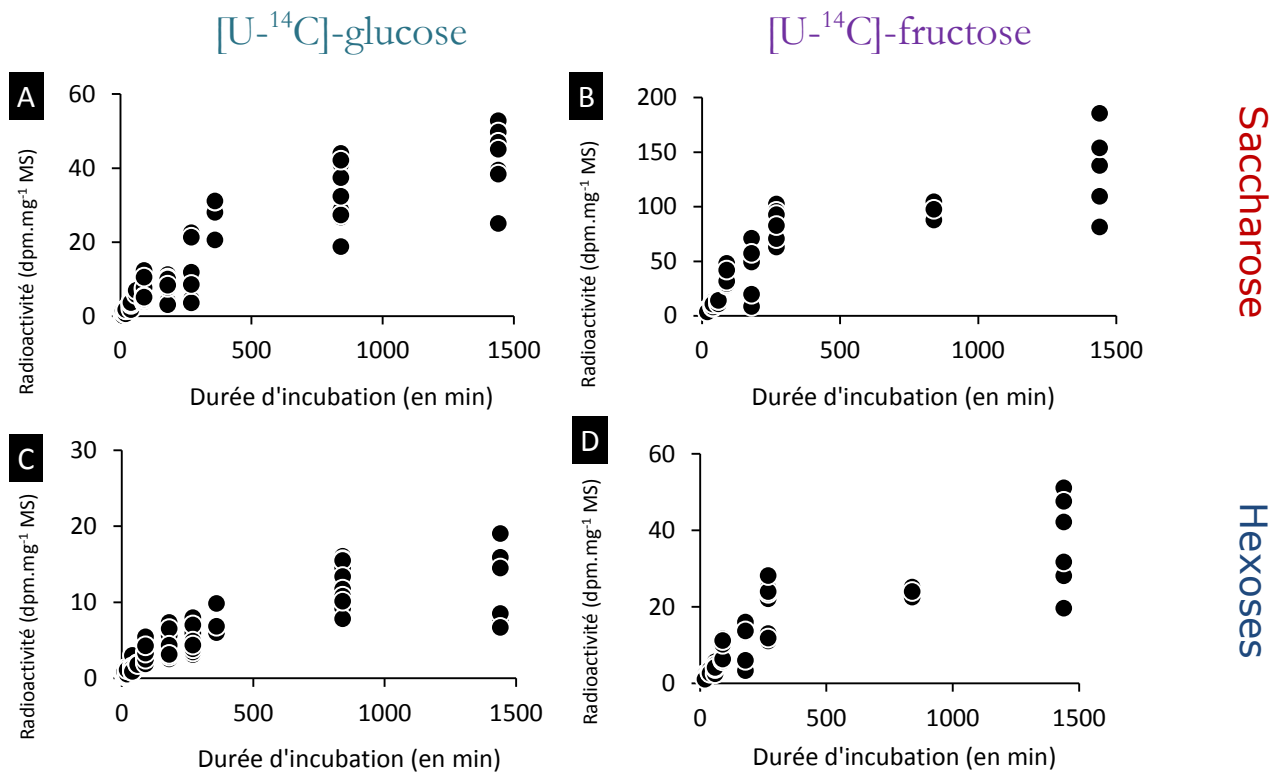


Figure 48. Cinétique d'incorporation de la radioactivité dans les sucres solubles de la lignée Col10
 Les sucres ont été purifiés par HPLC à partir de la fraction neutre provenant d'extraits de racines cultivées en présence de [U-¹⁴C]-glucose (A) et (C) ou de [U-¹⁴C]-fructose (B) et (D), comme décrit dans matériel et méthodes, et la radioactivité incorporée dans le saccharose (A, B), le fructose (C) et le glucose (D) a été normalisée par la RAS du précurseur. Chaque point est le résultat d'une mesure.

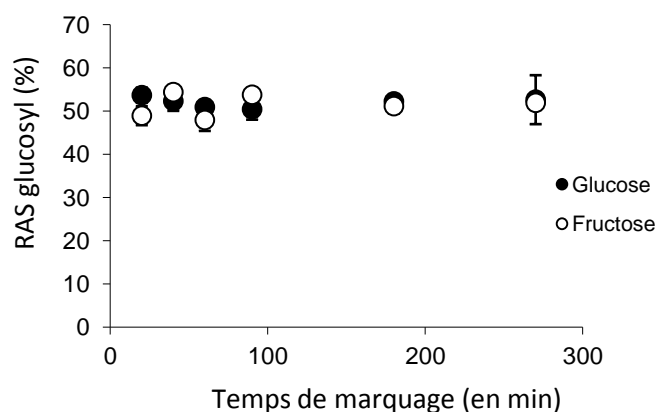


Figure 49. Evolution de la RAS du glucosyl et du fructosyl du saccharose
 La RAS du glucosyl et du fructosyl du saccharose est déterminée en présence de [U-¹⁴C]-Glucose (●) et de [U-¹⁴C]-Fructose (○) à partir d'invertase commerciale. Chaque point est la moyenne ± écart type de 2 ou 3 mesures sur 2 incubations indépendantes.

favorise une entrée rapide du précurseur dans la racine excisée par la voie apoplastique et/ou symplastique (Saftner et al., 1983; Etxeberria et al., 2005) ce qui conduit à un marquage rapide du pool de sucre cytoplasmique et/ou vacuolaire (Etxeberria et al., 2005). L'analyse du marquage du glucose et du fructose intracellulaire à partir de glucose et de fructose exogène, respectivement, ne s'entend que si l'on s'intéresse aux échanges entre compartiments (extérieur vs. cytoplasme ou cytoplasme vs. vacuole). Les marquages du glucose et du fructose ne peuvent être analysés lorsque l'on marque respectivement avec du glucose et du fructose car ils traduisent avant tout l'entrée des sucres dans les racines. La **figure 48** représente les cinétiques d'incorporation de la radioactivité dans les sucres solubles chez la lignée sauvage Col0. Pour chaque sucre, on distingue une phase rapide de marquage, suivie d'un ralentissement puis d'un plateau. On peut remarquer que quel que soit le temps d'incubation, la radioactivité incorporée dans le saccharose est environ deux fois moins importante en présence de glucose comparé au fructose (cf. **figure.48, A vs. B**). Le marquage du glucose interne en présence de fructose (cf. **figure.48, D**) est, là aussi, environ deux fois plus efficace que le marquage du fructose interne en présence de glucose (cf. **figure.48, C**). Ces résultats tendent à confirmer nos résultats précédents qui concluaient à une préférence métabolique des racines pour le fructose vis-à-vis du glucose comme source de carbone.

III.D. ANALYSE DU MARQUAGE DU SACCHAROSE

La part de radioactivité portée respectivement par les résidus glucosyl et fructosyl du saccharose a été déterminée en fonction du temps d'incubation, en présence de glucose et de fructose comme précurseur. La **figure 49** démontre que les résidus fructosyl et le glucosyl sont marqués à environ 50% quel que soit le temps d'incubation (du moins à partir de 20 min) et quel que soit le précurseur. En se basant sur ce résultat, deux conclusions importantes peuvent être tirées : **i)** Sur les deux substrats carbonés, la SuSy (qui condense un UDPG et un fructose) ne participe pas significativement au marquage du saccharose par rapport à la SPS (qui condense un F6P et un UDPG). Si cela avait été le cas, un déséquilibre de marquage se serait produit en début de cinétique, en faveur du glucosyl en présence du glucose externe (à cause de la dilution opérée par la SuSy à partir du fructose intracellulaire froid) et en faveur du fructosyl en

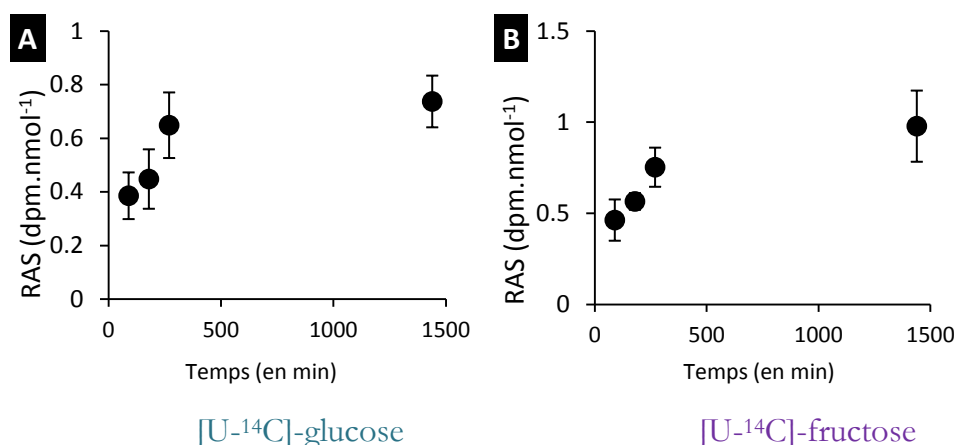


Figure 50. Cinétique d'évolution de la radioactivité spécifique (RAS) du G6P

La RAS du G6P est mesurée sur 24H, (A) en présence de [U-¹⁴C]-Glucose et (B) [U-¹⁴C]-Fructose. n = 4 à 8. La différence de marquage à 24H n'est pas significative (glucose externe vs. Fructose externe).

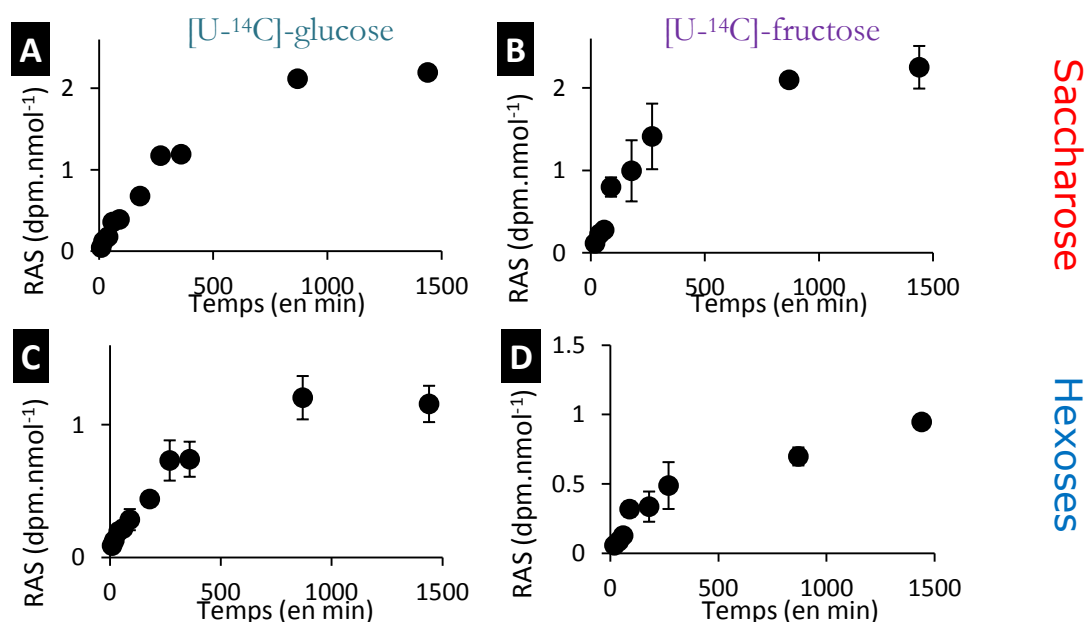


Figure 51. Cinétique d'évolution de la radioactivité spécifique (RAS) des sucres solubles de lignée Col0

Les sucres ont été purifiés par HPLC à partir de la fraction neutre provenant d'extraits de racines cultivées en présence de [U-¹⁴C]-glucose (A) et (C) ou de [U-¹⁴C]-fructose (B) et (D), comme décrit dans matériel et méthodes, et la radioactivité incorporée dans le saccharose (A, B), le fructose (C) et le glucose (D) a été normalisée par la RAS du précurseur et à la teneur respective en chacun des sucres. Chaque point est la moyenne de 3 mesures au minimum par incubation (n = 3 à 6).

présence de fructose externe (à cause de l'entrée directe de fructose chaud opérée par la SuSy). **ii)** Sur les deux substrats carbonés, la PGI, la PGM et l'UGPase catalysent un échange rapide de la radioactivité entre les hexoses phosphates et les sucres nucléotidiques, c'est-à-dire entre le G6P, le F6P, le G1P et l'UDPG, aboutissant alors à un marquage quasi-identique des deux résidus du saccharose.

IV. CALCUL DES VITESSES DE SYNTHÈSE DES SUCRES

Selon le principe présenté en début de chapitre (*cf.* II.B.), le calcul des vitesses de synthèse du saccharose et des hexoses n'est possible qu'à la condition de connaître la RAS du précurseur directe du sucre. Nous venons de voir que le G6P, le F6P, le G1P et l'UDPG sont à l'équilibre isotopique dès les 20 premières minutes de la cinétique, pour cette raison nous utiliserons dans nos calculs le G6P comme précurseur du saccharose.

IV.A. DÉTERMINATION DE LA RAS DES SUCRES

Afin de suivre plus précisément l'incorporation de la radioactivité dans ces sucres, nous nous sommes intéressés à la quantité de radioactivité incorporée par mole de composé (RAS). Le G6P se marque à 100% en présence de fructose et à 80% si le sucre présent à l'extérieur est du glucose (**figure.50**). La capacité de marquage est de 100% pour les pools intracellulaires de saccharose, de glucose et de fructose (**figure.51**). Ainsi, quel que soit le précurseur exogène, au bout de 24H de culture, la RAS du saccharose tend vers une valeur de 2 dpm.nmol⁻¹, alors que celle du glucose et du fructose tend vers 1 dpm.nmol⁻¹ (**figure.51**). Il n'existerait donc pas de pool de sucre soluble non accessible au précurseur. Cette situation diffère singulièrement d'autres modèles de tissus en culture *in vitro*, par exemple les pointes de racines de maïs (Alonso, 2003) pour lesquels les pools de glucose n'étaient marqués qu'à hauteur de 70%. Un autre fait marquant concerne le saccharose qui semble également se marquer plus vite en présence de fructose externe.

IV.B. VITESSES UNIDIRECTIONNELLES DE SYNTHÈSE DU SACCHAROSE ET DES HEXOSES CHEZ LE SAUVAGE

a) Synthèse du saccharose

Tableau VIII: Calculs des flux de synthèse des sucres chez Col0.

Les vitesses initiales de synthèse des sucres ont été calculées à partir des régressions non linéaires de la *figure 52*, i.e. le flux de la SPS (V_{SPS}) à partir de [saccharose] = f(temps), le flux maximal des invertases ($V_{maxINVases}$) à partir de [glucose] ou [fructose] = f(temps) (*figures.52 C et D*, respectivement) et, le flux maximal des hexosePases ($V_{maxHexPase}$) à partir de [glucose] ou [fructose] = f(temps) (*figure.52 A et B*, respectivement). Enfin, le flux des hexosePases a été calculé à partir de la formule suivante : $V_{HexPase} = V_{maxHexPase} \times (V_{maxINVases} - V_{SPS}) / V_{maxINVases}$. On part de l'hypothèse que le flux de SPS est rendu unidirectionnel par la S6Pase et que l'activité de la SuSy est négligeable. Les flux sont exprimés en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ MS. Les écart-types sont calculés à partir des régressions sous le logiciel Kaleidagraph.

	glucose	fructose
Flux SPS	0,113± 0,026	0,400± 0,140
Flux max Invertases (si flux Hexose6Pases = 0)	0,247± 0,025	0,941± 0,044
Flux max Hexose6Pases (si flux invertases = 0)	0,097± 0,011	0,235± 0,054
Flux Hexose6Pases ($V_{HexPase}$)	0,052± 0,006	0,129± 0,028

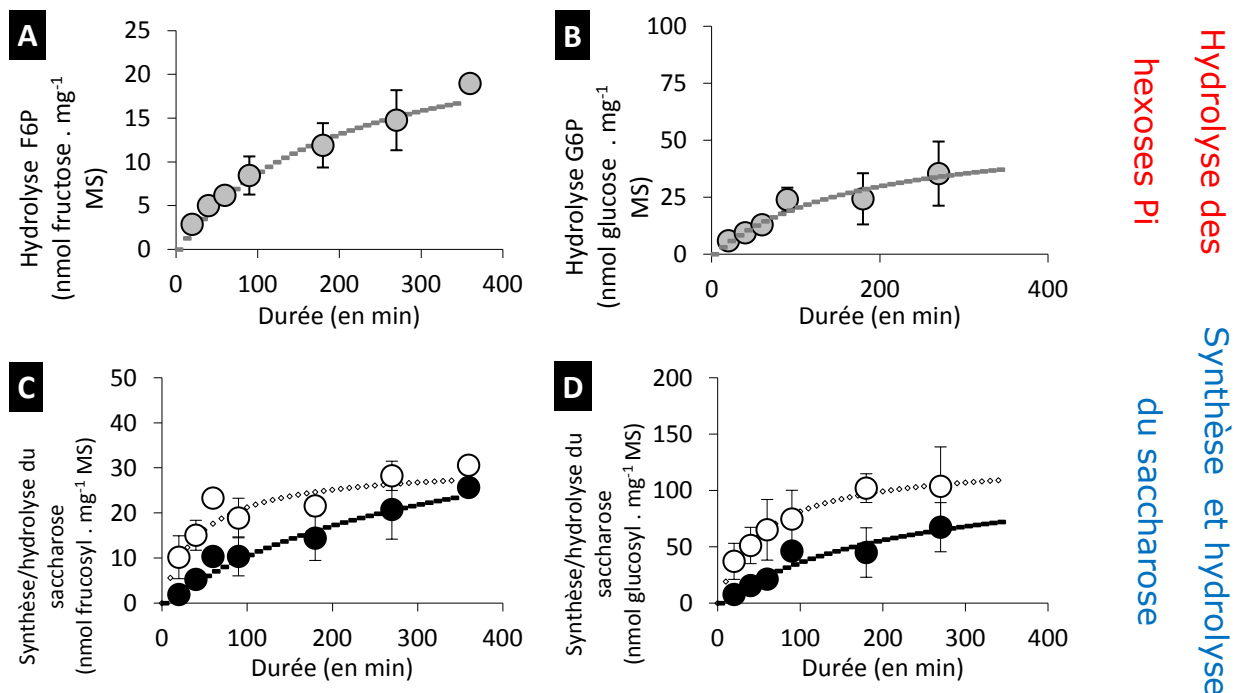


Figure 52. Cinétiques de synthèse des sucres chez Col0

Les quantités de saccharose, de glucose et de fructose synthétisées ont été calculées en présence de [^{14}C]-glucose (A & C) et de [^{14}C]-fructose (B & D) en utilisant les données des *figures 50 et 51*, et les équations 1, 2 et 3 détaillées dans le texte. En noir (●) la synthèse du saccharose à partir des hexoses Pi, en blanc (○) la synthèse du fructose (C) ou du glucose (D) à partir du saccharose, et en gris (●) la synthèse du fructose (A) ou glucose (B) à partir des hexoses Pi. Le tracé en pointillés correspond à la régression non-linéaire des points expérimentaux selon l'équation suivante : $y = a \cdot t / (b + t)$. Chaque point est la moyenne \pm écart type de 3 déterminations au minimum.

Nous avons vu en introduction de ce chapitre, le formalisme qui permet, à partir de cinétiques de marquage, de calculer les vitesses unidirectionnelles d'une réaction dans un réseau linéaire. La **figure 52** (C et D) représente les courbes d'évolution de la synthèse du saccharose à partir du G6P (calculée à partir de l'**équation 1**). On peut noter que la synthèse suit une cinétique bi-phasique avec une augmentation, suivie d'un ralentissement puis d'un plateau. En début, la cinétique rend essentiellement compte de la synthèse du saccharose avec une perte de marquage très faible due à une RAS du saccharose faible. Cela traduit une faible perte du marquage par les réactions de dégradation. En revanche, dans la deuxième phase de la cinétique, la courbe s'infléchit en même temps que la RAS du saccharose augmente. Il est remarquable que la cinétique de synthèse du saccharose est plus rapide sur fructose que sur glucose (**figures 52**, C vs. D ; ronds noirs ●). Les pentes initiales, qui correspondent au flux à travers la SPS et la S6Pase, sont égales à 0,113 et 0,400 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MS sur glucose et fructose, respectivement (cf. **tableau.VI**).

b) Synthèse des hexoses à partir du saccharose via l'invertase

La **figure 52** (C et D) représente la synthèse du glucose et du fructose à partir du saccharose, calculées à partir de l'**équation 2** en faisant l'hypothèse que la seule origine des hexoses est le saccharose. Là encore, la cinétique de synthèse du fructose sur glucose externe est moins rapide que la cinétique de synthèse du glucose sur fructose (cf. **figures 52**, C vs. D ; ronds blancs ○). En effet, la vitesse de synthèse du fructose est d'environ 0,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMS}^{-1}$ alors que celle du glucose est d'environ 0,95 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMS}^{-1}$, soit une différence d'un facteur 3 (**tableau.VIII**).

c) Synthèse des hexoses à partir des hexoses-phosphates

La **figure 52** (A et B) représente la synthèse des hexoses à partir des hexoses-Pi, calculée à partir de l'**équation 3** en faisant l'hypothèse que les hexoses proviennent uniquement des hexoses-Pi. Là encore, la cinétique de synthèse du fructose à partir du F6P (glucose externe) est moins rapide que la cinétique de synthèse du glucose à partir du G6P (fructose externe)(cf. **figures 52**, A vs. B ; ronds gris ●). En effet, la vitesse de synthèse du fructose est d'environ 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{mgMS}^{-1}$ alors que celle du glucose est d'environ 0,24 $\mu\text{mol}\cdot\text{mgMS}^{-1}$, soit une

Tableau IX : Calculs des flux de synthèse des sucres chez le mutant *pap26*.

Les vitesses initiales de synthèse des sucres, exprimées en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, ont été calculées comme décrit dans le tableau VI.

	glucose	fructose
Flux SPS	$0,178 \pm 0,027$	$0,367 \pm 0,049$
Flux max Invertases (si flux Hexose6Pase = 0)	$0,213 \pm 0,013$	$0,667 \pm 0,079$
Flux max Hexose6Pases (si flux invertases = 0)	$0,104 \pm 0,009$	$0,235 \pm 0,037$
Flux Hexose6Pases (V_{HexPase})	$0,017 \pm 0,002$	$0,129 \pm 0,015$

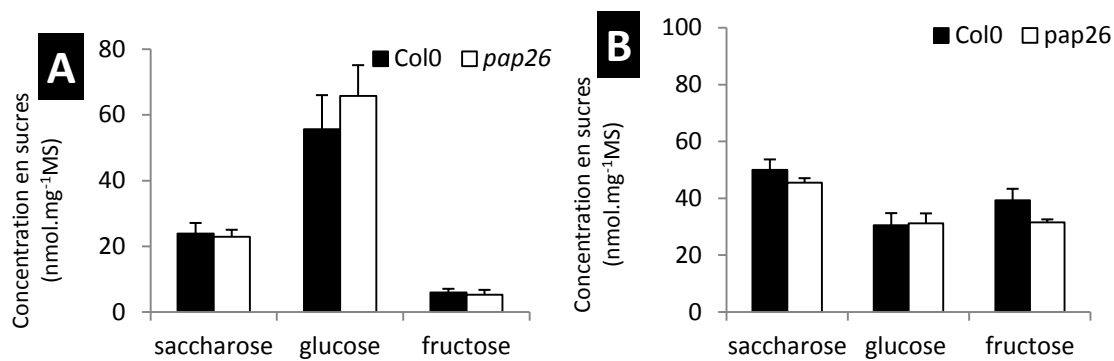


Figure 53. Teneurs en sucres dans les racines en culture de Col0 et du mutant *pap26*.

Les sucres ont été purifiés par HPLC à partir de la fraction neutre provenant d'extraits de racines cultivées pendant 1 à 1,5 jour en présence de glucose (A) ou de fructose (B). Chaque valeur est la moyenne \pm écart type de 12 à 18 mesures sur 3 incubations indépendantes.

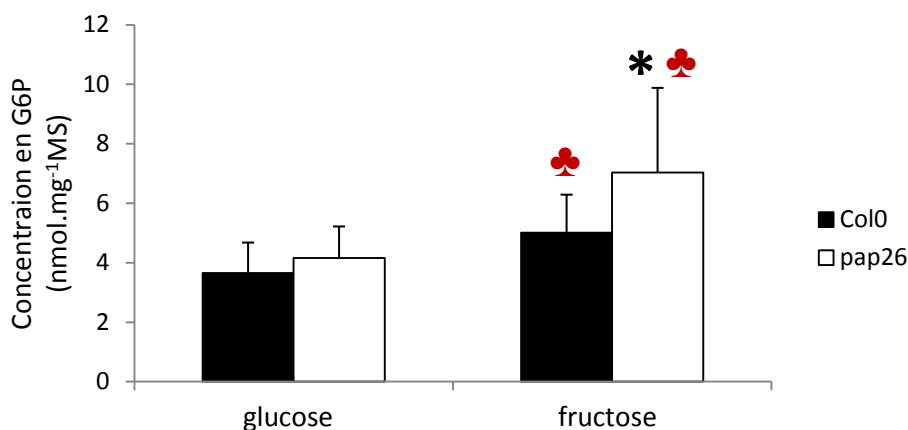


Figure 54. Teneur en G6P dans les racines en culture de Col0 et du mutant *pap26*

Les concentrations en G6P sont celles mesurées sur des extraits éthanoliques, comme décrit dans Matériel et Méthodes, provenant de racines mises en culture pendant 1 à 1,5 jour. Chaque valeur est la moyenne \pm écart type de 12 mesures sur 3 incubations indépendantes. *: $p < 0,02$ vs. Col0 ; ♣ : $p < 0,05$ vs. glucose.

différence de 60% (cf. **tableau.VIII**).

Deux faits marquants sont clairement visibles sur la **figure 52** (C et D) : **i)** sur glucose, la synthèse du fructose à partir du saccharose est beaucoup plus rapide que la synthèse du saccharose (ronds vides (○) vs. ronds pleins (●), **figure.52**, C) et **ii)** sur fructose, la synthèse du glucose à partir du saccharose est également beaucoup plus rapide que la synthèse du saccharose (ronds vides (○) vs. ronds pleins (●), **figure.52**, D). Or, à l'état stationnaire et si les hexoses avaient pour seule origine le saccharose, ces cinétiques devraient être superposables. Ces faits mettent donc en évidence qu'il existe dans les racines en culture une voie de synthèse des hexoses qui ne passe pas par les invertases. À partir des vitesses initiales consignées dans le **tableau VIII**, on peut estimer que 54 et 57 % ($(V_{max_{INVases}} - V_{SPS}) / V_{max_{INVases}}$) de la radioactivité incorporée dans le fructose et le glucose, respectivement, ont une autre origine que le saccharose (**tableau.VIII**). Si l'on applique ces pourcentages aux pentes initiales des cinétiques de synthèse du fructose et du glucose à partir des hexoses Pi, on obtient des valeurs de flux à travers les hexoses-6-phosphatases de 52 et 129 nmol.min⁻¹.gMS⁻¹ sur glucose et fructose, respectivement (**tableau.VIII**).

IV.C. VITESSES UNIDIRECTIONNELLES DE SYNTHÈSE DU SACCHAROSE ET DES HEXOSES PAR LA MÉTHODE DISCRÈTE CHEZ LE MUTANT PAP26

a) Vitesse de consommation des sucres et teneur intracellulaire en sucres solubles

Les racines excisées du mutant *pap26* ont été mises en culture *in vitro* dans les mêmes conditions décrites plus haut pour le sauvage, soit en présence de 200 mM de glucose ou de fructose. Nous avons calculé les vitesses de consommation des sucres externes pour le mutant *pap26* (cf. **tableau.V**). Le seul fait notable est que le mutant présente une vitesse de consommation des sucres plus rapide que le Col0 sur glucose ($p < 0,05$). En revanche, sur fructose, la différence n'est pas significative. Dans ces conditions de culture, les racines du mutant *pap26* et du sauvage Col0 ne présentent pas des teneurs en sucres significativement différentes (**figure.53**) mais les concentrations en G6P varient. Sur glucose, le mutant *pap26* accumule 13% de G6P de plus que le Col0 ($p < 0,10$), sur fructose, le gain est de 40% chez le mutant *pap26* ($p < 0,05$) (**figure.54**). Cette

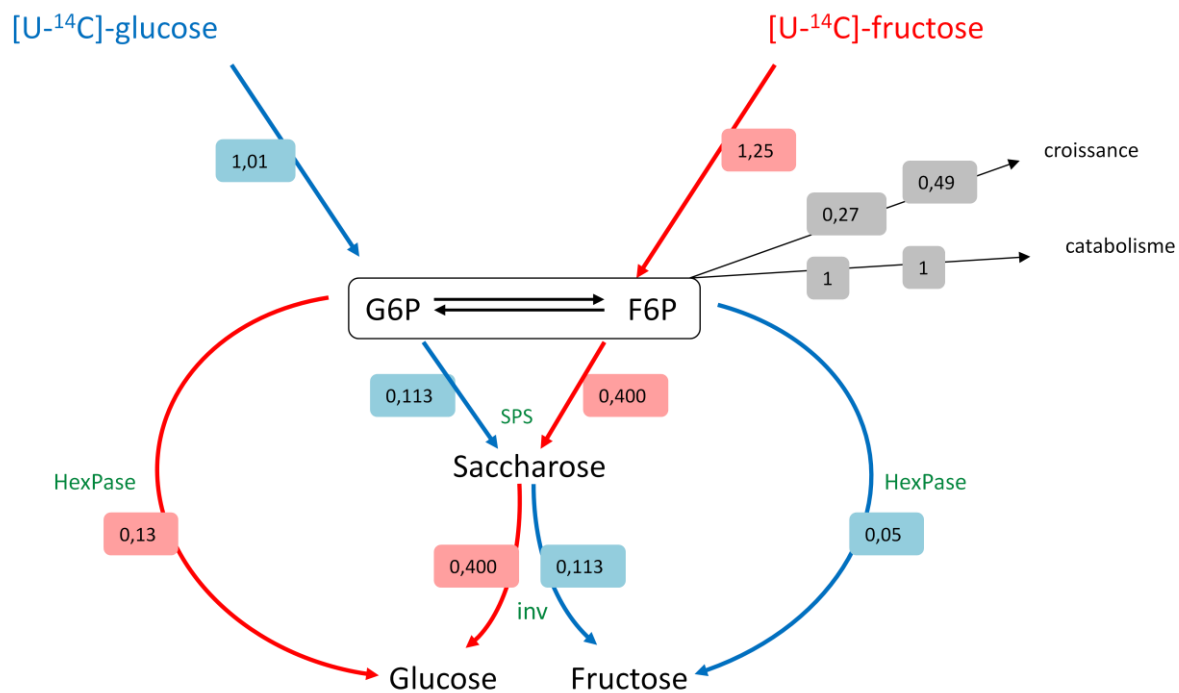
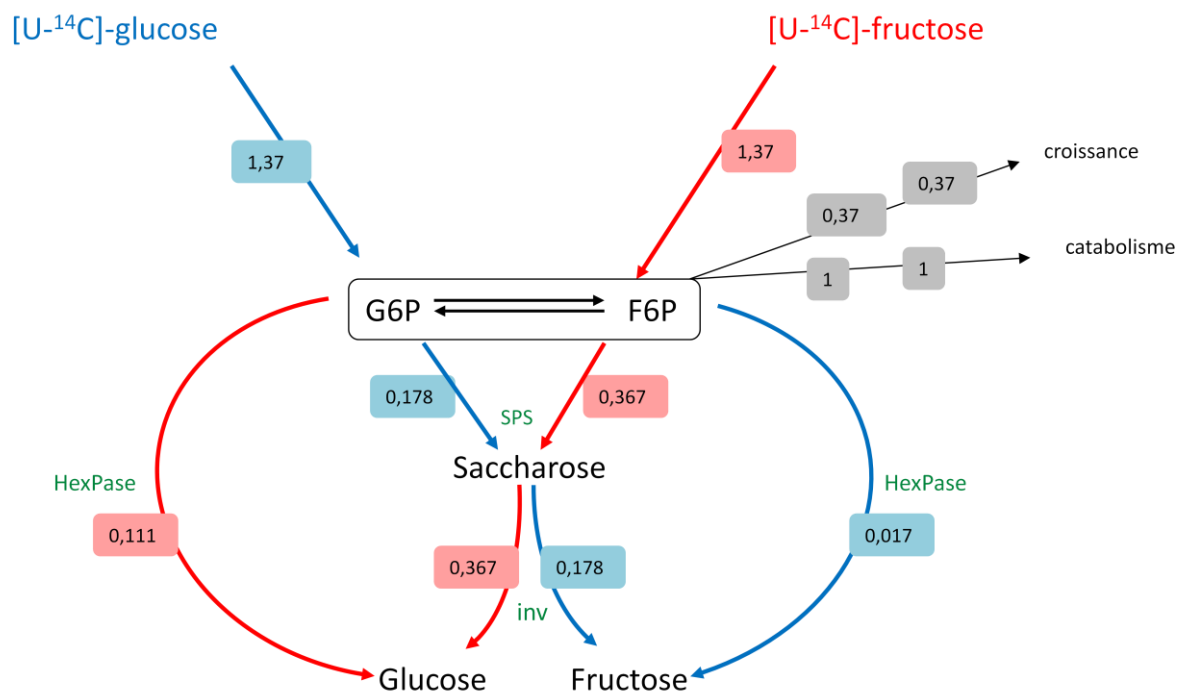
A**B**

Figure 55. Flux d'interconversions des sucres sur *Col0* (A) et *pap26* (B)

Les flux sont extraits des *tableaux VIII et IX*. On part de l'hypothèse que le flux de SPS est rendu uni-directionnel par la S6Pase et que l'activité de la SuSy est négligeable. Les flux sont exprimés en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, en **bleu** les flux calculés en faisant entrer du glucose, en **rouge**, du fructose.

augmentation du G6P pourrait effectivement traduire une diminution de la vitesse d'utilisation des hexoses Pi chez le mutant *pap26*.

b) Vitesses de synthèses du saccharose et des hexoses

Les cinétiques de synthèses des sucres ont été générées comme décrit plus haut pour le sauvage (cf. **figure 50**), en utilisant les cinétiques d'incorporation de la radioactivité dans les sucres et la RAS du saccharose et du G6P (**non montré**). Les résultats des calculs de vitesses initiales sont présentés dans le **tableau IX**. Quel que soit le précurseur, le flux à travers la SPS est inférieur à la vitesse maximale de synthèse du fructose et du glucose (0,178 vs. 0,213 et 0,367 vs. 0,667 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ MS sur glucose et fructose, respectivement). Ces résultats montrent que chez le mutant une part de la radioactivité des hexoses ne provient pas du saccharose (16,4% et 45% sur glucose et fructose, respectivement). Néanmoins, ces pourcentages sont inférieurs à ceux calculés pour Col0 (54 et 57% respectivement) ce qui suggère que le mutant est affecté dans la synthèse des hexoses. Ainsi, chez le mutant, le flux de la F6Pase et de la G6Pase est égal à 0,129 et 0,017 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ MS sur glucose et fructose, respectivement (cf. **tableau VII**).

c) Comparaison des cartes de flux de Col0 vs. *pap26*

À partir des données du **tableau VIII** et **IX**, il est possible de dessiner la carte de flux sur les deux sources de carbone, à la fois chez le sauvage et chez le mutant *pap26* (**figure.55**, A & B, respectivement).

Chez le sauvage, on peut remarquer que sur glucose et fructose, respectivement, le cycle du saccharose concerne environ 15% ($113/1000*100$) et 30% ($400/1255*100$) des hexoses consommés par les racines à l'état stationnaire. Enfin et c'est le plus important, sur glucose, le cycle du F6P concernerait environ un tiers ($52/(52+113)*100$) du fructose synthétisé, alors que sur fructose, le cycle du G6P représenterait environ un quart ($129/(129+400)*100$) du glucose synthétisé à l'état stationnaire.

Chez le mutant *pap26*, le cycle du saccharose n'est pas significativement modifié par rapport au sauvage : il concerne environ 13% ($178/1370*100$) et 27% ($400/1370*100$) des hexoses consommés par les racines à l'état stationnaire. En revanche, le mutant *pap26* présente un flux F6Pase diminué de presque 66% sur glucose comparé au sauvage alors que le flux G6Pase ne diminue que de 15% sur

fructose. Cette diminution des cycles des hexoses Pi chez le mutant est en accord avec l'augmentation de la teneur en G6P mesurée sur ces mêmes racines. Cependant, l'établissement d'un lien entre la valeur des flux et la concentration en ce métabolite intermédiaire est ici biaisé par la méthode de calcul. En effet, comme il a été évoqué dans l'introduction de ce chapitre, l'utilisation du glucose externe ne nous donne pas accès au flux G6Pase, et l'utilisation du fructose externe, au flux F6Pase.

V. DISCUSSION

V.A. LE CYCLE DES HEXOSE-PHOSPHATES

Dans ce chapitre, nous avons mis au point un système de culture de tissu racinaire *in vitro* adapté à des marquages isotopiques à l'état stationnaire métabolique. L'utilisation de glucose ou de fructose comme seule source de carbone, même si notre modèle est éloigné des conditions physiologiques, a l'avantage de mettre en évidence les interconversions entre les hexoses et le saccharose. De plus, contrairement à ce qui a pu être observé sur les pointes de racines de maïs (Alonso, 2003) et sur le péricarpe de tomate (Henri, 2008), la totalité des pools de sucres (saccharose, fructose, glucose et G6P) se marquent presque à 100% quel que soit le précurseur, ce qui fait des racines d'*Arabidopsis thaliana* un modèle performant de marquage. L'analyse du marquage des résidus glucosyl et fructosyl du saccharose suggère un équilibre rapide des hexoses-Pi et une faible activité de la sucrose synthase (SuSy). Ceci vient probablement du fait que les racines utilisent les hexoses (glucose ou fructose) et non pas le saccharose comme sources de carbone (Bret-Harte and Silk, 1994). Le second fait notable est que les racines possèdent un métabolisme bien plus actif lorsque la source de carbone externe est du fructose : vitesse de consommation d'hexose plus forte et sans changement de la vitesse de respiration, ce qui se traduit par une vitesse et un rendement de croissance plus élevés sur fructose. Métaboliquement, l'incorporation de radioactivité dans les sucres est plus rapide, avec notamment un flux calculé à travers la SPS environ 3 fois supérieur. Sur glucose, le cycle du saccharose reste inférieur à ce qui a été mesuré sur la pointe de racine de maïs (15% vs. 44%) (Alonso et al 2003). Le fait nouveau apporté par nos mesures est l'existence d'une voie de synthèse du fructose et du glucose

à partir des hexoses-Pi, qui a été mise en évidence sur les incubations en présence de glucose et de fructose, respectivement. Ces cycles des hexoses-Pi représenteraient entre un quart et un tiers de la synthèse de ces hexoses. Enfin, le mutant *pap26*, en dépit d'une perte d'activité spécifique de plus de 80% sur les racines, n'est affecté que de 15 à 66% pour les flux G6Pase et F6Pase, respectivement. Ces résultats suggèrent que la PAP26 n'est pas la seule impliquée dans les cycles des hexoses-Pi. En effet, les 20% de l'activité phosphatase acide restants pourraient être responsables des flux résiduels de ces cycles. La déficience de l'activité phosphatase acide se traduit par une augmentation de la teneur en G6P, principalement lorsque les racines sont cultivées en présence de fructose.

V.B. LIMITES DE L'APPROCHE

Les calculs de vitesse unidirectionnelle, dans ce travail, présentent des limites. La principale limite repose sur le fait que les voies métaboliques étudiées sont compartimentées. Or, nos calculs utilisent le marquage global d'un composé et la RAS globale de son précurseur, indépendamment de la compartimentation de l'un et de l'autre. Dans des expériences de marquage, le précurseur peut se trouver confiné à certains compartiments. C'est par exemple le cas du G6P cytosolique qui sert de précurseur à la synthèse de saccharose dans le cytosol. Or notre approche ne permet pas de différencier le marquage du G6P cytosolique, du G6P plastidial et éventuellement du G6P vacuolaire. La RAS du précurseur (ici G6P) est donc surestimée ce qui fausse les calculs de vitesse. Dans nos calculs de vitesse de synthèse du saccharose, si la RAS du G6P est surestimée, la vitesse de synthèse sera, elle, sous-estimée puisque l'on divise par une valeur (RAS du G6Ptotal) plus forte que la RAS du G6P cytosolique. L'existence d'isoenzymes dans ces compartiments est également problématique. En effet, l'approche ne permet pas de différencier le glucose ou le fructose hydrolysé par les invertases acides (vacuole) ou neutres (cytosol). Elle ne permet pas non plus de quantifier le recyclage du glucose et du fructose lorsque les racines sont incubées en présence de glucose et de fructose externe, respectivement. Les contraintes ne sont pas uniquement biologiques, la technique elle-même montre certaines limites. En effet, nos calculs se basent sur

ne approximation d'un régime linéaire de vitesse unidirectionnelle (*i.e.* absence de recyclage des produits de la voie) ; nous partons du principe que sur notre intervalle de temps (inférieur à 90 minutes) les vitesses de synthèse et d'hydrolyse sont constantes. Expérimentalement, il est très difficile d'obtenir des données suffisamment fiables sur des intervalles de temps courts (moins de 10 minutes). C'est pour ces raisons que nous avons décidé de compléter cette étude par une analyse des cinétiques de marquage de façon globale par une approche de modélisation cinétique.

MODÉLISATION DE LA COMPARTIMENTATION ET DU MÉTABOLISME DES SUCRES DES RACINES EN CULTURE

I - OBJECTIFS

Dans le chapitre précédent, nous avons réalisé des cinétiques de sucres marqués au ^{14}C sur du tissu racinaire en culture. Dans ce chapitre, nous tenterons de modéliser ces résultats expérimentaux pour calculer des flux d'interconversion des sucres. Cette modélisation se fera en 3 étapes : **i)** la validation de l'état stationnaire métabolique. **ii)** la validation du modèle décrivant les cinétiques de marquage et **iii)** l'analyse des cartes de flux, du contrôle cinétique (approche MCA) et du pouvoir prédictif du modèle retenu.

II. INTRODUCTION

Notre objectif est de modéliser le métabolisme et la compartimentation des sucres solubles dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* en culture. Nous avons choisi d'utiliser COPASI qui présente une interface graphique intuitive tout en permettant de gérer de très nombreux paramètres. En complément, COPASI propose des outils d'optimisations et d'analyse de sensibilité accessibles. Lorsque la modélisation repose sur la résolution d'un certain nombre d'équations différentielles, on doit faire face au problème de l'unicité de la solution mathématique ; c'est-à-dire qu'à partir de valeurs initiales différentes, les solutions trouvées doivent obligatoirement converger vers la même valeur. Dans ce travail, nous avons pris la précaution de résoudre chacune des versions du modèle en partant de valeurs initiales de variables allant de 10^{-6} à 10^6 .

III. CRÉATION ET UTILISATION DU MODÈLE

III.A. QUATRE VERSIONS DU MODÈLE DE DIFFÉRENTES COMPLEXITÉS

Nous analyserons 4 modèles différents notés de M0 (modèle 0) à M3 (modèle 3) ; le M0 étant le plus simple, le M3 le plus complexe.

■ Modèle 0

La base de modèle est inspiré de celui créé en 2001 par Johan Rohwer, modifié en 2007 (Rohwer and Botha, 2001; Uys et al., 2007) et accessible à partir du site : <http://jji.biochem.sun.ac.za/>. Nous avons modifié ce réseau en envisageant une seule entrée de précurseur (glucose ou fructose) et une seule sortie au niveau du fructose-6-Pi (**figure.56**, M0). Le réseau de base ne modélise pas la sortie des hexoses-Pi vers la synthèse d'amidon, la synthèse de paroi ou la voie des pentoses-Pi. Il se compose de 9 réactions, 13 variables et 56 paramètres.

■ Modèle 1

Le modèle 1 (M1) est en tout point identique au M0 mais prend en compte le transport des sucres et l'hydrolyse du saccharose dans la vacuole (**figure.56**, M1). Première conséquence à cet ajout, le réseau passe de 9 à 12 réactions, de 56 à 74 paramètres et de 13 à 23 variables. Trois transporteurs sont rajoutés afin de pouvoir prendre en compte l'échange des sucres vacuolaires.

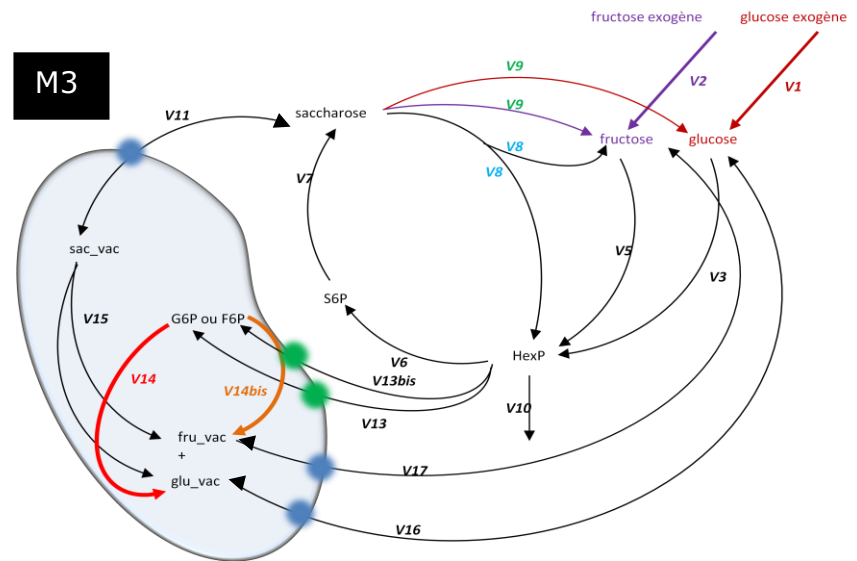
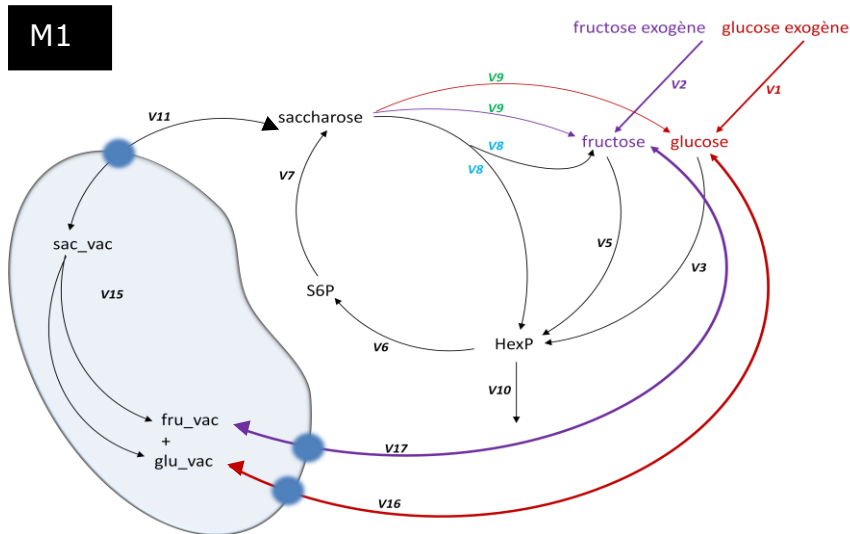
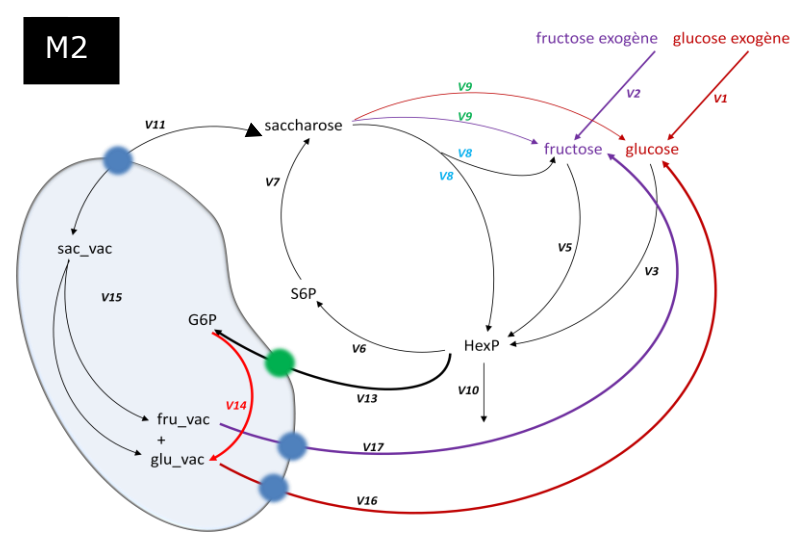
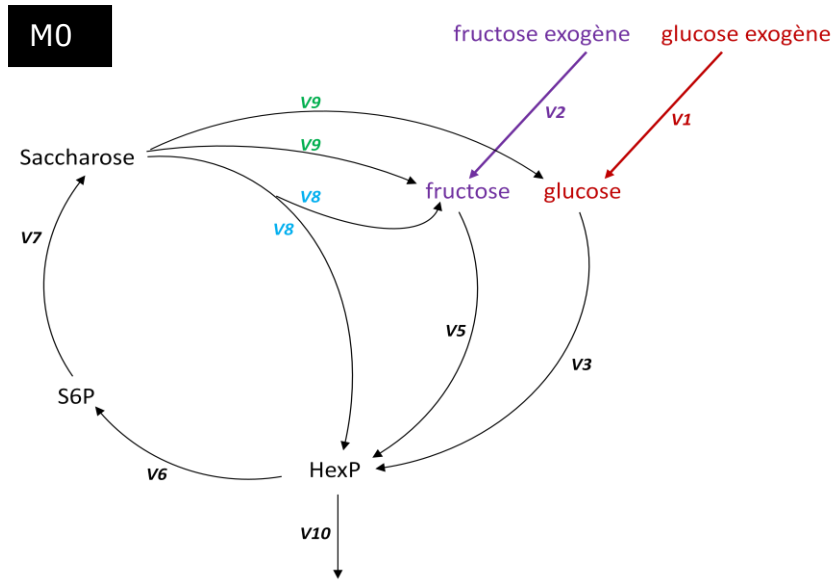


Figure 56. Représentation schématique du réseau métabolique étudié dans les 4 versions du modèle

Le sucre entrant dans le système est au choix du glucose ou du fructose. V1 ou 2 = flux d'entrée du sucre ; V3 = Hexokinase ; V5 = Fructokinase ; V6 = Saccharose Phosphate Synthase ; V7 = Saccharose Phosphatase ; V8 = Saccharose Synthase ; V9 = Invertase neutre ; V10 = flux de sortie vers la glycolyse ; V11 = entrée/sortie du saccharose dans la vacuole ; V15 = Invertase acide ; V16 = entrée/ sortie du glucose vacuolaire ; V17 = entrée / sortie du fructose vacuolaire ; V13 = entrée du G6P dans la vacuole ; V13bis = entrée du F6P dans la vacuole V14 = G6P phosphatase ; V14bis = F6P phosphatase.

■ Modèle 2

Le modèle 2 (**figure.56**, M2) se complexifie avec l'ajout de deux nouvelles réactions comparé au M1, celle permettant l'entrée du G6P dans la vacuole et celle hydrolysant le G6P en glucose plus phosphate (catalysé par la PAP vacuolaire) dans ce même compartiment. Cette version se compose de 14 réactions, 23 variables et 81 paramètres.

■ Modèle 3

Basé sur le modèle 2, nous avons intégré la possibilité pour l'échangeur G6P/Pi et la PAP de fonctionner à partir du G6P ou du F6P (**figure.56**, M3). Cette dernière version se compose de 16 réactions, 24 variables et 83 paramètres.

Les systèmes d'équations différentielles de ces 4 versions du modèle sont regroupés dans l'**annexe S1**.

III.B. ÉTAT STATIONNAIRE D'UN SYSTÈME EN CROISSANCE

Dans un modèle de cellules ou de tissu en croissance à l'état stationnaire, il est indispensable de tenir compte de la quantité de substrat carboné qui est consommé pour maintenir les concentrations en métabolites intermédiaires constantes pendant la division et le grandissement cellulaire (**figure.57**). Ces flux, appelés flux d'expansion (F_{exp}), sont d'autant plus importants que la taille des pools est importante et que la cellule se multiplie rapidement. Pour chaque intermédiaire S_n , à l'état stationnaire :

$$F_{expS_n} = \mu \times [S_n] ; \text{ Avec } \mu = \frac{dX}{X} \times \frac{1}{dt}$$

Où : μ est le taux de croissance, X , la quantité de biomasse et $[S_n]$, la concentration en intermédiaire S_n (**figure.57**).

Toujours dans le cas d'un système en expansion, le flux spécifique du précurseur S_0 peut être donné par la relation suivante :

$$F_{S_0} = -\frac{d_{S_0}}{dt} \times \frac{1}{X}$$

$$F_{S_0} = \mu \times \left(\sum_{i=1}^n [S_n] \right) + \frac{d_{[P]}}{dt} \times \frac{1}{X}$$

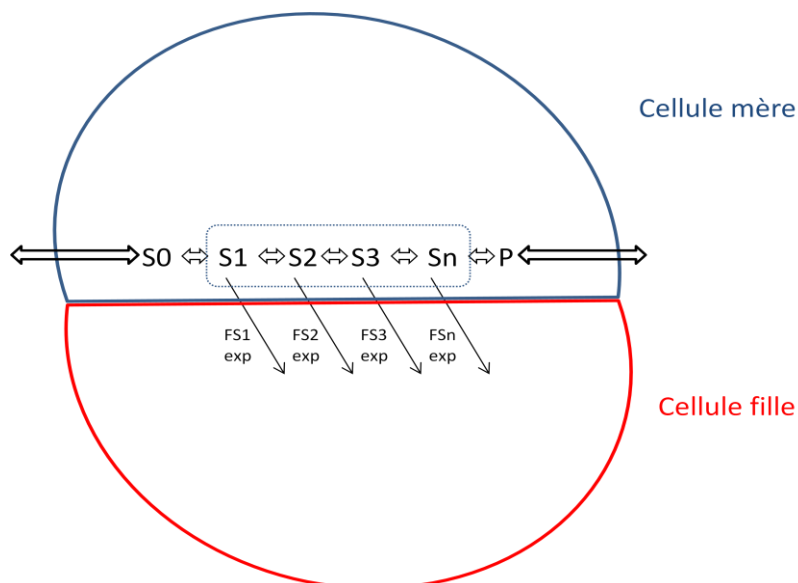


Figure 57. Représentation schématique du fonctionnement d'une voie métabolique linéaire dans une cellule en croissance

Le substrat précurseur S_0 rentre dans la cellule. Les espèces intermédiaires S_n sont tirées vers la cellule fille via un flux d'expansion. P est un produit excrété par la cellule.

Tableau X. Flux spécifiques d'expansion des sucres.

Les flux sont calculés en utilisant $\mu_{\text{Glucex}} = 6,67 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ et $\mu_{\text{Frucex}} = 1,16 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ (cf. figure.41). Les concentrations sont celles mesurées à l'état stationnaire sur des racines en culture. En comparaison, les flux de consommation d'hexoses sont de l'ordre de $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$ sur les deux sources de sucre externe (cf. chapitre 1).

	Sucre interne	Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{gMF}^{-1}$)	Flux d'expansion ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gMF}^{-1}$)
Glucose externe	Saccharose	1,55	0,103385
	Glucose	5,1	0,34017
	Fructose	0,85	0,056695
Fructose externe	Saccharose	3,35	0,3886
	Glucose	2,2	0,2552
	Fructose	1,9	0,2204

Où $[S_n]$ et $[P]$ sont respectivement les concentrations en substrats et en produit à l'état stationnaire.

Dans cette dernière équation, plus les valeurs du taux de croissance (μ) et des teneurs en métabolites intermédiaires ($[S_n]$) seront élevées, plus l'influence des flux d'expansion sera grande sur le flux de consommation de S_0 . En utilisant les valeurs de vitesse de croissance tissulaire déterminée dans le chapitre précédent, nous avons calculé le flux spécifique d'expansion des trois principaux sucres intracellulaires en présence de fructose externe ou de glucose externe (**tableau.X**). Les flux d'expansion des trois sucres restent faibles par rapport aux flux de consommation de sucres par les racines : ils représentent moins de 0,4% des flux d'entrée des sucres et moins de 1% des flux calculés dans le chapitre précédent. Ces flux étant négligeables, ils ne seront pas inclus dans nos modèles.

III.C. PARAMETRAGE DES MODELES

a) Taille du compartiment vacuolaire (M1, M2 et M3)

Chez le maïs, il a été démontré que la taille de la vacuole pouvait varier en fonction de la position de la cellule dans la racine (Lee et al., 1990). Dans notre paramétrage initial, nous utiliserons comme valeur par défaut un volume de la vacuole de 65% du volume total. Nous ferons l'approximation que le cytosol occupe le reste du volume (35%) (**tableau.XI**).

b) Métabolites en concentrations fixes et co-facteurs

La concentration en sucre du milieu (200 mM, fixée en fonction de travaux antérieurs et de nos propres expérimentations (Brouquisse et al., 1991; Alonso et al., 2007a)), sera considérée comme constante, ce qui est conforme à nos observations expérimentales (*cf.* chapitre II). Les teneurs en ATP et ADP ont été déterminées expérimentalement sur des racines de Col0 incubées pendant 24 heures en présence de 200 mM de glucose ou de fructose. Les résultats, sensiblement identiques pour les deux types d'incubation, donnent $0,10 \pm 0,01$ et $0,024 \pm 0,002 \mu\text{mol.g}^{-1}$ MF pour l'ATP et l'ADP, respectivement. La valeur du rapport ATP/ADP qui en résulte (environ 4,1) est plus faible que celle mesurée sur racine de maïs (Brouquisse et al., 2001; Alonso et al., 2007a). En outre, en

Tableau XI. Paramètres par défaut du modèle

Concentration en métabolites externes et en co-facteurs. * Afin de tout exprimer en mM, nous avons converti les données exprimées en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF en utilisant une densité tissulaire de 1,1 g de tissu frais par mL, correspondant à un rapport poids frais sur poids sec de 10.

Paramètre	Valeur initiale	Références
GlceX or Fruex	200 mM	[a] & [h] [60-200,mM]
ATP = UTP	0,29 mM*	0,2 – 0,3 mM [b] ; [c]
ADP = UDP	0,07 mM*	
Rapport ATP/ADP	4,1	3 – 7 [b] ; [i]
PPi	0,013 mM	0,012 – 0,2 [c] ; 0,03 [j]
Pi cytoplasme	1,4 mM*	[d]
Pi vacuole	10,8 mM*	[d]
Vacuole (% volume total)	65%	55 – 85 % [e]
Cytosol (% volume total)	35%	
ΔpH vacuolaire	1	1 – 1,5 [f] ; 1,5 – 2 [k]
pG6P	0,52 x HexP	[g]
pF6P	0,26 x HexP	[g]
pUDPG	0,19 x HexP	[g]

[a] (Alonso et al., 2007a); **[b]** calculés selon nos propres mesures (0,1 $\mu\text{mol ATP.g}^{-1}$ MF, 0,024 $\mu\text{mol ADP.g}^{-1}$ MF). + (Alonso et al., 2007a) ; **[c]** (Tiessen et al., 2002) ; **[d]** Calculé à partir des mesures de ^{31}P NMR sur racines de maïs (0,5 and 7 $\mu\text{mol Pi.g}^{-1}$ MF, respectivement dans le cytoplasme et les vacuoles). + (Lee and Ratcliffe, 1993) ; **[e]** (Lee et al., 1990) ; **[f]** (Thom et al., 1982) ; **[g]** Calculé à partir des concentrations en UTP et PPi et des constantes d'équilibre de la phosphogluco isomérase (G6P/F6P); phosphogluco mutase (G6P/G1P) et UDP-glucose pyrophosphorylase (UTP \times G1P/UDPG \times PPi), égales à 2, 19 et 0,31, respectivement (Farré et al., 2001) selon les formules décrites dans le texte ; **[h]** (Brouquisse et al., 2001) ; **[i]** (Roberts, 1990) ; **[j]** (Roberts, 1990) ; **[k]** (Roberts et al., 1980)

ce qui concerne les nucléotides UTP et UDP, nous appliquerons les égalités suivantes: $UTP=ATP$ et $UDP=ADP$. Ceci est conforme aux concentrations cytosoliques estimées dans le tubercule de pomme de terre, où les concentrations de l'UTP et de l'ATP sont très proches (respectivement 238 et 292 μM) et celles de l'UDP et de l'ADP sont du même ordre de grandeur (respectivement 53 et 87 μM) (Tiessen et al., 2002). Les teneurs en phosphate inorganique cytosolique et vacuolaire, estimées par RMN *in vivo* du ^{31}P des racines de pois et de maïs (Lee et al., 1990), sont égales à 0,5 et 7 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MF pour le cytosol et la vacuole, respectivement. Dans nos modèles, les concentrations cytosoliques en ATP, ADP et Pi et la concentration vacuolaire en Pi sont calculées à partir des teneurs ci-dessus et du volume respectif du cytosol et de la vacuole. La concentration en PPi cytosolique, difficile à obtenir expérimentalement, a été estimée à environ 200 μM chez la canne à sucre et la pomme de terre (Rohwer and Botha, 2001; Tiessen et al., 2002). Cependant, par une méthode indirecte utilisant la RMN du ^{31}P , la teneur en PPi de racines de maïs a été estimée à 30 μM (Roberts, 1990). Le delta pH entre en considération dans le mécanisme des transports actifs et notamment dans le fonctionnement des antiports sucre-proton vacuolaire (*cf.* chapitre I). Le delta pH entre le cytosol et la vacuole a été estimé par RMN *in vivo* du ^{31}P sur des pointes de racines de maïs à 1,5-2 (Roberts et al., 1980; Roberts et al., 1982). Ceci est cohérent avec la valeur de pH intra-vacuolaire égale à $5,56 \pm 0,12$, correspondant à un delta pH moyen de $1,85 \pm 0,09$, mesurée *in organello* sur des vacuoles isolées de feuilles d'*Arabidopsis* (*cf.* chapitre I). Les valeurs initiales de tous ces paramètres sont consignées dans le **tableau XI**.

c) Les hexoses phosphates et sucres nucléotidiques

Pour simplifier notre modèle, nous avons regroupé les concentrations cytoplasmiques en G6P, G1P, F6P et l'UDPG en un seul pool d'hexoses phosphates (HexP). La proportion de chacune de ces molécules dans le pool d'HexP sera calculée en faisant l'approximation d'un quasi-équilibre entre ces différentes espèces, hypothèse vérifiée par nos expériences de marquages (*cf.* **figure.49**, chapitre II). Les calculs nécessitent les valeurs des concentrations en UTP et PPi listées ci-dessus ainsi que les valeurs des constantes d'équilibre (K_{eq}) des réactions concernées (Farré et al., 2001). Ainsi, à partir des égalités suivantes :

Tableau XII. Activités spécifiques des principales enzymes du réseau

Les activités spécifiques ont été mesurées comme décrit dans matériel et méthodes sur des racines âgées de 12 à 20 jours ou cultivées *in vitro* pendant 24 heures. Le nombre de réplicas est au minimum de n = 4. L'erreur est basée sur l'écart moyen de ces valeurs.

Activité spécifique ($\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$)	
INVaci	3,24 \pm 0,95
INVneu	0,16 \pm 0,04
GK	0,66 \pm 0,09
FK	0,46 \pm 0,02
PFK	1,38 \pm 0,07
SPS	0,22 \pm 0,03
PAP	4,28 \pm 0,55
SuSy	0,32 \pm 0,08

$$\text{HexP} = \text{G6P} + \text{F6P} + \text{G1P} + \text{UDPG}$$

$$K_{\text{eq_PGI}} = \text{G6P}/\text{F6P}$$

$$K_{\text{eq_PGM}} = \text{G6P}/\text{G1P}$$

$$K_{\text{eq_UGPase}} = (\text{UTP} \times \text{G1P})/(\text{UDPG} \times \text{PPi})$$

Nous pouvons exprimer chaque entité en fonction du pool total d'Hexoses-Pi cytosoliques. Ainsi, les fractions **p** du G6P, du F6P et de l'UDPG sont données par les équations suivantes dont les valeurs initiales de ces trois paramètres sont consignées dans le **tableau XI**:

$$p_{\text{G6P}} = 1/(1 + 1/K_{\text{eq.PGI}} + 1/K_{\text{eq.PGM}} * (1 + \text{UTP}/\text{PPi} * K_{\text{eq.UGPase}}))$$

$$p_{\text{F6P}} = 1/(1 + K_{\text{eq.PGI}} + K_{\text{eq.PGI}}/K_{\text{eq.PGM}} * (1 + \text{UTP}/\text{PPi} * K_{\text{eq.UGPase}}))$$

$$p_{\text{UDPG}} = 1/(1 + \text{PPi}/\text{UTP}/K_{\text{eq.UGPase}} * (1 + K_{\text{eq.PGM}} + K_{\text{eq.PGM}}/K_{\text{eq.PGI}}))$$

d) Caractéristiques cinétiques et thermodynamiques des enzymes,
des réactions & équations de vitesse

Ces valeurs proviennent en partie de la littérature et en partie de nos mesures expérimentales. Les paramètres enzymatiques difficilement mesurables et indisponibles dans la littérature sont extrapolés à partir d'activités proches. Par exemple, pour le paramétrage du transporteur vacuolaire GPT, nous avons utilisé les informations connues pour GPT1 chez le plaste. Les capacités catalytiques d'un certain nombre d'enzymes ont été mesurées sur des racines d'*Arabidopsis* (**tableau.XII**). Il est à noter que les activités spécifiques de ces enzymes ne changent pas significativement en fonction de la nature du substrat carboné (glucose ou fructose) utilisé pendant la culture *in vitro* (**non montré**). Les équations de vitesses sont écrites en fonction des mécanismes enzymatiques et des données de la littérature (**tableau.XIII**). Les équations de vitesse des enzymes prennent en compte les concentrations locales des réactifs, des effecteurs et des enzymes. Pour tenir compte de la concentration réelle de l'enzyme, le Vmax des enzymes localisées dans un compartiment a été multiplié par le pourcentage du volume occupé par le compartiment considéré. Comme cela a été fait pour d'autres tissus excisés (McNeil et al., 2000b; McNeil et al., 2000c; Colón et al., 2009), nous avons formalisé l'entrée des sucres (glucose et fructose) dans les cellules de racines (V1 et V2, respectivement) par une diffusion simple. La phosphorylation des sucres a été formalisée par une activité

Tableau XIII. Réactions et équations de vitesses utilisées dans les différents modèles

Certaines réactions sont communes à l'ensemble des modèles, d'autres sont spécifiques de certaines versions.

Réaction	Flux	Fonction mathématique
Glcex -> Glc	V1 ou V2 =	$V_{max1} \times (Glcex - Glc) / V_{max2} \times (Fru_{ex} - Fru)$
Glc + ATP -> HexP + ADP	V3 =	$V_{max3} \times (Glc / K_{m3Glc}) \times (ATP / K_{m3ATP}) / ((1.0 + ATP / K_{m3ATP}) \times (1.0 + Glc / K_{m3Glc} + Fru / K_{m4Fru} + pG6P \times HexP / K_{i3G6P} + pF6P \times HexP / K_{i4F6P})) / cytosol$
Fru + ATP -> HexP + ADP	V5 =	$V_{max5} / (1.0 + Fru / K_{i5Fru}) \times (Fru / K_{m5Fru}) \times (ATP / K_{m5ATP}) / (1.0 + Fru / K_{m5Fru} + ATP / K_{m5ATP} + Fru \times ATP / (K_{m5Fru} \times K_{m5ATP}) + ADP / K_{i5ADP}) / cytosol$
2*HexP = UDP + Suc6P	V6 =	$V_{max6} \times (pF6P \times HexP \times pUDPG \times HexP - Suc6P \times UDP / Keq6) / (pF6P \times HexP \times pUDPG \times HexP \times (1.0 + Suc6P / K_{i6Suc6P}) + K_{m6F6P} \times (1.0 + phos / K_{i6Pi}) \times (pUDPG \times HexP + K_{i6UDPGlc}) + K_{m6UDPGlc} \times pF6P \times HexP + V_{max6} / (V_{max6} \times Keq6) \times (K_{m6UDP} \times Suc6P \times (1.0 + pUDPG \times HexP / K_{i6UDPGlc}) + UDP \times (K_{m6Suc6P} \times (1.0 + K_{m6UDPGlc} \times pF6P \times HexP / (K_{i6UDPGlc} \times K_{m6F6P} \times (1.0 + phos / K_{i6Pi}))) + Suc6P \times (1.0 + pF6P \times HexP / K_{i6F6P}))) / cytosol$
Suc6P -> Suc + phos	V7 =	$V_{max7} \times Suc6P / (K_{m7Suc6P} + Suc6P) / cytosol$
HexP + Fru = UDP + Suc	V8 =	$-V_{max8} \times (Suc \times UDP - Fru \times pUDPG \times HexP / Keq8) / (Suc \times UDP \times (1.0 + Fru / K_{i8Fru}) + K_{m8Suc} \times (UDP + K_{i8UDP}) + K_{m8UDP} \times Suc + V_{max8} / (V_{max8} \times Keq8) \times (K_{m8UDPGlc} \times Fru \times (1.0 + UDP / K_{i8UDP}) + pUDPG \times HexP \times (K_{m8Fru} \times (1.0 + K_{m8UDP} \times Suc / (K_{i8UDP} \times K_{m8Suc})) + Fru \times (1.0 + Suc / K_{i8Suc})))) / cytosol$
Suc -> Glc + Fru	V9 =	$V_{max9} / (1.0 + Glc / K_{i9Glc}) \times Suc / (K_{m9Suc} \times (1.0 + Fru / K_{i9Fru}) + Suc) / cytosol$
HexP -> glycolysis	V10 =	$V_{max10} \times pF6P \times HexP / (K_{m10F6P} + pF6P \times HexP) / cytosol$
Suc = Sucvac	V11 =	$(V_{f11} \times Suc / K_{m11Suc} - V_{r11} \times Suc_{vac} / K_{m11Suc_{vac}}) / (1.0 + Suc / K_{m11Suc} + Suc_{vac} / K_{m11Suc_{vac}})$
HexP + phosvac = G6Pvac + phos	V13 =	$V_{f13} / (K_{m13G6P} \times K_{m13phosvac}) \times (pG6P \times HexP \times phos_{vac} - G6P_{vac} \times phos / Keq13) / ((1.0 + pG6P \times HexP / (K_{m13G6P} + pF6P \times HexP) + G6P_{vac} / (K_{m13G6P_{vac}} + F6P_{vac})) \times (1.0 + phos_{vac} / K_{m13phosvac} + phos / K_{m13phos}))$
HexP + phosvac = F6Pvac + phos	V13bis =	$V_{f13} / (K_{m13G6P} \times K_{m13phosvac}) \times (pF6P \times HexP \times phos_{vac} - F6P_{vac} \times phos / Keq13) / ((1.0 + pF6P \times HexP / (K_{m13G6P} + pG6P \times HexP) + F6P_{vac} / (K_{m13G6P_{vac}} + G6P_{vac})) \times (1.0 + phos_{vac} / K_{m13phosvac} + phos / K_{m13phos}))$
G6Pvac -> Glcvac + phosvac	V14 =	$V_{max14} \times G6P_{vac} / (K_{m14G6P_{vac}} \times (1.0 + phos_{vac} / K_{i14Pivac} + F6P_{vac} / K_{mF6P_{vac}}) + G6P_{vac}) / vacuole$
F6Pvac -> Fruvac + phosvac	V14bis =	$V_{max14} \times F6P_{vac} / (K_{m14G6P_{vac}} \times (1.0 + phos_{vac} / K_{i14Pivac} + G6P_{vac} / K_{mG6P_{vac}}) + F6P_{vac}) / vacuole$
Sucvac -> Fruvac + Glcvac	V15 =	$V_{max15} / (1.0 + Glcvac / K_{i15Glc_{vac}}) \times Suc_{vac} / (K_{m15Suc_{vac}} \times (1.0 + Fru_{vac} / K_{i15Fru_{vac}}) + Suc_{vac}) / vacuole$
Glc = Glcvac	V16 =	$(V_{f16} \times Glc / K_{m16Glc} - V_{r16} \times Glc_{vac} / K_{m16Glc_{vac}}) / (1.0 + Glc / K_{m16Glc} + Glc_{vac} / K_{m16Glc_{vac}})$
Fru = Fruvac	V17 =	$(V_{f16} \times Fru / K_{m16Glc} - V_{r16} \times Fru_{vac} / K_{m16Glc_{vac}}) / (1.0 + Fru / K_{m16Glc} + Fru_{vac} / K_{m16Glc_{vac}})$

glucokinase et fructokinase (V3 et V5, respectivement), par un mécanisme de Michaelis-Menten irréversible, doublé d'une inhibition compétitive par le G6P et le F6P pour la glucokinase, et d'une inhibition non-compétitive par le fructose et d'une inhibition compétitive par l'ADP, pour la fructokinase. Etant donnée l'absence de donnée quant à leur abondance respective dans notre matériel d'étude, il ne nous a pas paru opportun de décrire les différentes isoenzymes d'hexokinase répertoriées à ce jour pour la racine de maïs (da-Silva et al., 2001). Les invertases neutre et acide (V9 et V15, respectivement) ont été formalisées de façon identique selon une cinétique michaelienne irréversible en prenant en compte une inhibition compétitive par le fructose et non-compétitive par le glucose. Les transporteurs d'hexoses vacuolaires (V16 et V17) ont été décrits selon un mécanisme michaelien réversible, symétrique ($V_f=V_r$), faisant intervenir le ΔpH (antiport) et une compétition de force égale entre le fructose et le glucose comme substrats. L'échangeur G6P/Pi vacuolaire (V13) a été formalisé selon un mécanisme michaelien réversible et asymétrique ($V_f \neq V_r$). Dans le modèle 3, une compétition entre le G6P et le F6P comme substrats est en outre envisagée (V13 et V13bis, respectivement). La saccharose synthase (SuSy) a été formalisée selon un mécanisme de Michaelis-Menten réversible et asymétrique, en utilisant un jeu de paramètres moyens provenant des différentes isoformes décrites chez le tabac, la canne à sucre et *Arabidopsis* (Matic et al., 2004; Uys et al., 2007). Néanmoins, les conséquences de la présence de telle ou telle isoforme sur nos simulations seront évaluées dans ce chapitre. La saccharose-Pi synthase ou SPS (V6) a été décrite selon un mécanisme de Michaelis-Menten réversible et asymétrique, avec une inhibition compétitive du Pi. La saccharose-6-phosphatase (V7) a été formalisée en fixant des valeurs arbitraires de V_m et de K_m ne rendant pas cette enzyme contrôlante par rapport à la SPS (V6) (Rohwer and Botha, 2001). Le phosphofructokinase (V10) est décrite selon un mécanisme michaelien irréversible simple en prenant en compte néanmoins la modulation par l'ATP de son affinité apparente pour le F6P (Uys et al., 2007). Les paramètres, avec les références bibliographiques correspondantes sont consignés dans l'**annexe S2**.

e) Cas de la phosphatase acide vacuolaire (PAP)

L'activité hexose-phosphatase du modèle a été paramétrée à partir de nos

Tableau XIV. Activité phosphatase de la protéine PAP26 purifiée sur différents substrats

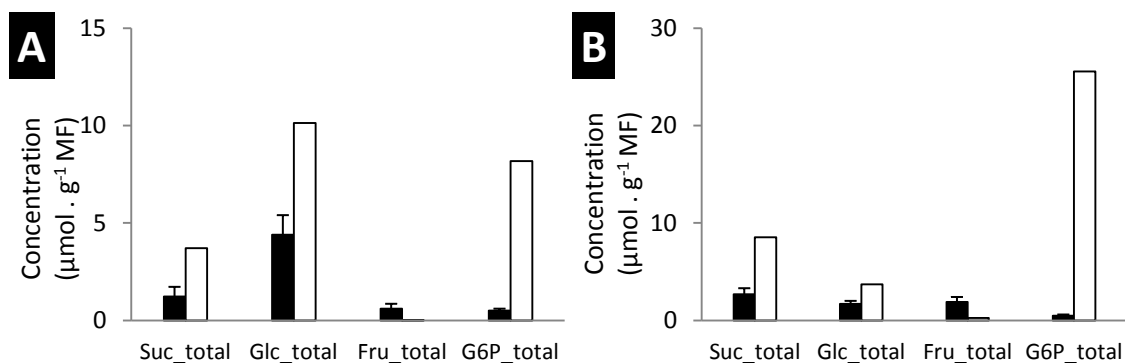
L'activité phosphatase à pH acide (5,5) en présence de 5 mM de différents composés phosphorylés a été dosée comme décrit dans matériel et méthodes à partir de 2µl de protéine diluée au 1/100. L'activité relative est calculée en utilisant l'activité phosphatase mesurée sur le PEP (354 mM.min⁻¹), comme référentiel, comme décrit dans le matériel et méthodes. La protéine PAP26 purifiée provient du laboratoire de W. C. Plaxton (l'université du Queen's, Canada).

Substrats	ATP	G6P	F6P	G1P	PEP
Activité relative (% ^{age} de PEP)	6	61	48	11	100

Tableau XV. Paramètres cinétiques de la protéine PAP26 purifiée

L'activité phosphatase à pH acide (5,5) a été mesurée en présence à différentes concentration de G6P ou de F6P comme décrit dans matériel et méthodes, à partir de 2µl de protéine diluée au 1/100. Les valeurs de Km et de Vmax, exprimées en mM et en mM.min⁻¹, respectivement, ont été déterminées par régression non-linéaire de la représentation de la vitesse de libération de Pi en fonction de la concentration en substrat et en prenant comme hypothèse un mécanisme de Michaelis-Menten, selon la formule suivante : $(V_{max} \times [substrat]) / ([substrat] + K_m)$

KmG6P (mM)	VmaxG6P (mM.min ⁻¹)	KmF6P (mM)	VmaxF6P (mM.min ⁻¹)
1,0 ± 0,1	7,3 ± 0,3	3,0 ± 0,4	7,9 ± 0,5

**Figure 58. Concentration des sucres à l'état stationnaire (M0)**

Les concentrations en sucres sont mesurées expérimentalement par HPLC sur n=90 échantillons. Les concentrations sont les moyennes des dosages effectués sur des racines cultivées pendant 24H en présence de glucose (A) ou de fructose (B). Les données expérimentales sont présentées en noir, les concentrations simulées en blanc. Pour être comparées aux valeurs dosées, les concentrations en métabolites calculées par le modèle ont été converties en µmol / g MF en utilisant une densité tissulaire de 1,1 g MF / ml correspondant à un rapport MF/ MS de 10.

mesures expérimentales avec la protéine PAP26 purifiée provenant du laboratoire de W. C. Plaxton (département de biologie et de biochimie de l'université du Queen's, Canada). D'une part, l'activité phosphatase acide a été vérifiée *in vitro* en présence de 5 mM de différents substrats. Comme attendu (Tran et al., 2010b), le **tableau.XIV** montre que le PEP est le substrat préférentiel par rapport au hexoses Pi (G6P et F6P). Néanmoins, pour expliquer la différence de capacité catalytique entre le G6P et le F6P, les Km et Vmax ont été mesurés sur la protéine purifiée (**tableau.XV**). Les mesures montrent que le Vm est identique sur les deux substrats mais le Km est 3 fois plus élevé pour le F6P par rapport au G6P. Dans nos modèles, la PAP vacuolaire (V14) a donc été décrite comme une cinétique michaelienne irréversible avec une inhibition compétitive par le Pi. Dans le modèle 3, une compétition entre le G6P et le F6P comme substrats est en outre envisagée (V14 bis).

IV. ÉVALUATION ET OPTIMISATION DES MODÈLES

IV.A. CONCENTRATIONS EN SUCRES À L'ÉTAT STATIONNAIRE

a) Modèle 0

Nous avons évalué la validité du modèle en comparant les calculs des concentrations à l'état stationnaire avec les données expérimentales. (**figure.58**). En faisant entrer du glucose à 200mM, la concentration en saccharose total du modèle est trois fois plus importante que celle mesurée avec une valeur proche de 4 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$. Le glucose est, lui, deux fois plus concentré avec l'outil de prédiction où il atteint 10 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$. En revanche, dans notre modèle, le fructose s'accumule très peu comparé aux valeurs expérimentales. Enfin, avec une teneur de 8 $\mu\text{mol.gMF}^{-1}$, le G6P est également éloigné des valeurs expérimentales avec une concentration 20 fois plus importante que celle mesurée. Dans le cas où l'on remplace le glucose externe par du fructose à la même concentration, la tendance est très similaire (**figure.58**). L'écart entre les deux jeux de valeurs a été évalué par le calcul de la somme des carrés des écarts (SCE) entre la valeur calculée et la valeur expérimentale: **SCE** = $([\text{Glu}]_{\text{exp}} - [\text{Glu}]_{\text{COPASI}})^2 + ([\text{Fru}]_{\text{exp}} - [\text{Fru}]_{\text{COPASI}})^2 + ([\text{Suc}]_{\text{exp}} - [\text{Suc}]_{\text{COPASI}})^2 + ([\text{G6P}]_{\text{exp}} - [\text{G6P}]_{\text{COPASI}})^2$ (**équation 4**).

Les valeurs du score SCE sont de 211 et de 1800 respectivement pour la condition glucose et fructose externe. Plus ce score est bas, plus les données

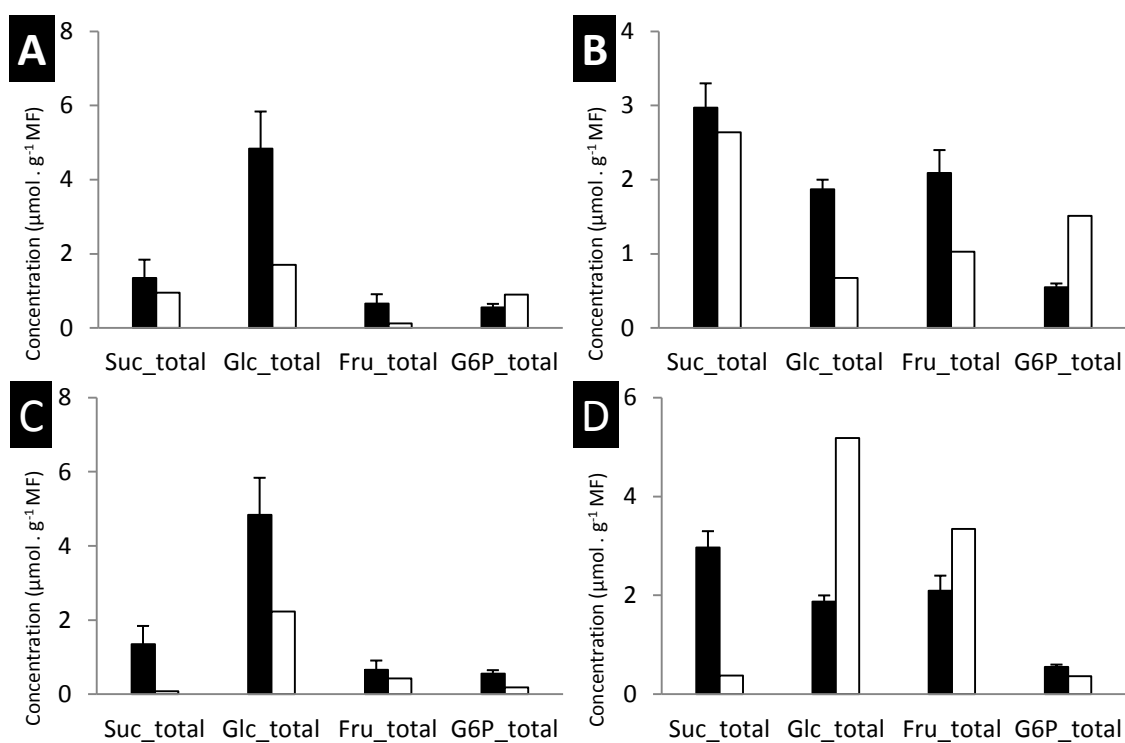


Figure 59. Concentration des sucres à l'état stationnaire (M1 & M2)

Les données expérimentales sont présentées en noir, les concentrations simulées en blanc. Les données proviennent de la simulation M1 en présence de glucose (A) ou de fructose (B). Les données proviennent de la simulation M2 en présence de glucose (C) ou de fructose (D). Pour être comparées aux valeurs dosées, les concentrations en métabolites calculées par le modèle ont été converties en $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$ en utilisant les fractions volumiques du cytosol et de la vacuole, et une densité tissulaire de $1,1\text{ g MF.ml}^{-1}$ correspondant à un rapport MF/MS de 10. Par exemple, $[\text{Suc total}] = ([\text{Suc}] \times (1 - \text{vol. vacuole}) + [\text{Suc}_{\text{vac}}] \times (\text{vol. vacuole})) / \text{densité tissulaire}$.

Glucose externe	non optimisé	optimisé	Fructose externe	non optimisé	optimisé
Modèle 0	211	-	Modèle 0	1800	-
Modèle 1	12,5	1,84	Modèle 1	4,5	0,7
Modèle 2	10,8	2,82	Modèle 2	19,9	3,4
Modèle 3	12,9	2,24	Modèle 3	13,4	2,7

Tableau XVI. Cohérence du modèle avant et après optimisation

Les scores SCE sont calculés avant et après optimisation comme décrit par l'équation 4.

simulées se reprochent des valeurs expérimentales. Les différences observées entre les valeurs calculées par le modèle et les valeurs mesurées ne sont pas étonnantes car le réseau M0 n'est pas représentatif des données expérimentales.

b) Modèle 1

Avec M1, la comparaison avec des quantités de sucres totaux à l'état stationnaire, montre une amélioration par rapport à la M0 (**figure.59**). En ce qui concerne la condition glucose, le score *SCE* passe de 211 (**tableau.XVI**) à 12,5. Sur fructose, le score *SCE* passe de 1800 à 4,5. Malgré une nette amélioration du modèle, les valeurs prédites par le modèle restent éloignées des valeurs expérimentales. Mis à part le saccharose, les concentrations calculées par le logiciel sont 2 à 4 fois plus faibles pour les hexoses, et 2 fois trop fortes pour le G6P dans la condition glucose externe.

c) Modèle 2

À l'état stationnaire avec entrée du glucose, les concentrations des trois sucres et du sucre phosphate sont très proches de celles observées dans le modèle 1 (**figure.59, C**). Avec du fructose externe, seul la concentration en G6P est bien Prédite (**figure.59, D**). Le score *SCE* calculé est de 10,8 en présence de glucose externe et de 19,9 en présence de fructose.

d) Modèle 3

Que ce soit avec une entrée de glucose ou de fructose, le modèle M3 reste très proche du M1 (**tableau.XVI & figure.60**).

En conclusion de cette partie, à partir d'un modèle M0 très simple, non compartimenté, avec seulement 9 réactions chimiques nous avons réussi à construire plusieurs versions (M1, M2 et M3) constituées de 2 compartiments et jusqu'à 16 réactions. Pourtant nous n'arrivons pas à faire converger les calculs et les données expérimentales. Il faut, à ce stade, remettre en cause le paramétrage des modèles. En effet, si certains paramètres proviennent directement de mesures sur notre matériel d'étude, d'autres paramètres proviennent de la bibliographie (*A.thaliana* ou d'autres organismes) alors que d'autres sont seulement estimées. Ces approximations pourraient expliquer les différences entre les données expérimentales et celles prédites par le modèle.

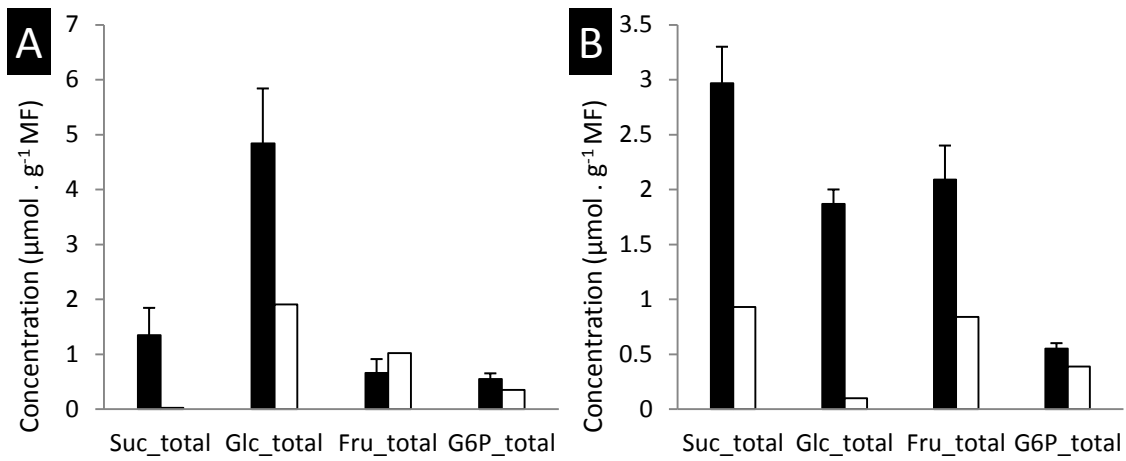


Figure 60. Concentration des sucres à l'état stationnaire (M3)

Les données expérimentales sont présentées en noir (■), les concentrations simulées en blanc (□). (A) Les données proviennent de la simulation M3 en présence de glucose. (B) Les données proviennent de la simulation M3 en présence de fructose.

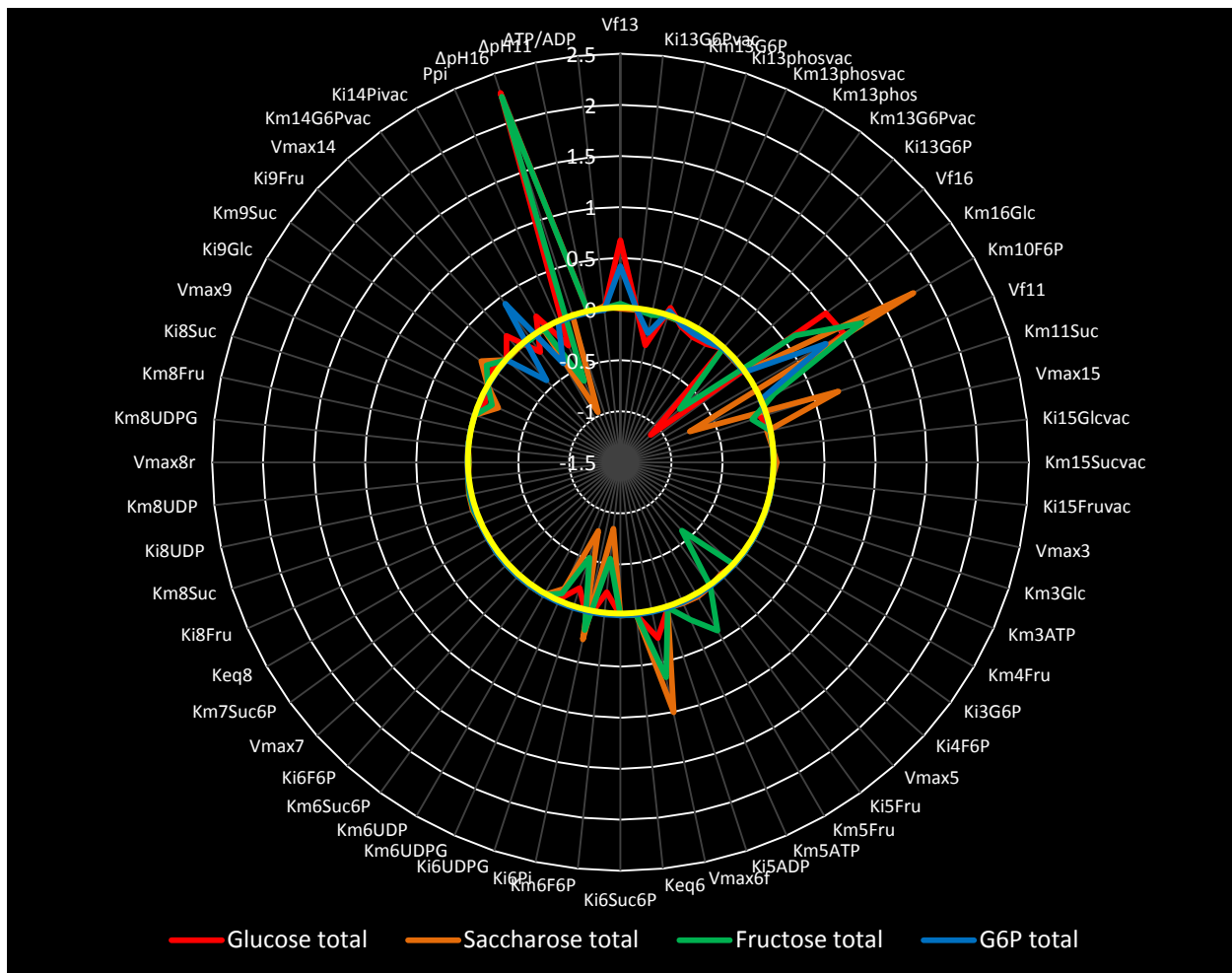


Figure 61. Exemple de résultats d'un test de sensibilité

Ce test de sensibilité a été généré à partir de la version M3 du modèle en condition fructose externe. Les cercles blanc représentent le score de sensibilité. Le cercle jaune (—) est égal à un score de 0. À l'extérieur du cercle nous trouvons les paramètres du modèle pour lesquels le test de sensibilité est effectué. Les paramètres sont classés par numéro de réaction. En couleur est représentée l'influence du paramètre sur la variable : Glucose total (—), saccharose total (—), fructose total (—) et G6P total (—).

Une solution est donc d'utiliser des outils d'optimisation pour affiner les paramètres définis des 4 versions.

IV.B. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES À OPTIMISER

L'optimisation d'un modèle est une approche combinatoire qui doit concilier deux principes opposés : **i)** étant donnée la complexité du réseau métabolique étudié, la convergence du modèle vers l'expérience dépend de l'ajustement d'un jeu de plusieurs paramètres. **ii)** la précision de l'ajustement d'un paramètre diminue en fonction du nombre total de paramètres à ajuster et augmente avec le nombre total de calculs de l'optimisation. Les paramètres à optimiser seront donc ceux qui sont inconnus ou estimés, mais également ceux ayant une forte influence sur le modèle (c'est à dire qu'une faible variation de ce paramètre peut avoir des conséquences importantes sur la solution calculée à l'état stationnaire). Ces paramètres contrôlants sont identifiés grâce au test de sensibilité. Le logiciel calcule le coefficient de sensibilité pour chaque paramètre, si celui-ci est proche de zéro alors le paramètre n'a que peu d'influence sur le modèle ; à l'inverse s'il est élevé, ce paramètre est contrôlant. La **figure 61** (obtenu à partir du modèle M2) montre que certains paramètres n'ont pas ou très peu d'influence sur la quantité des sucres prédite (V_{max3} , V_{max7} , K_{eq6} ou encore K_{i8Suc}). En revanche un paramètre tel que le ΔpH_{16} , possédant un score élevé, va agir positivement sur l'accumulation du glucose et du fructose total si sa valeur est augmentée. À l'inverse, le paramètre V_{f16} , avec un score très négatif, aura pour conséquence de diminuer la concentration en glucose et fructose total si l'on augmente sa valeur. Nous allons sélectionner, en fonction de la version du modèle, entre dix et quatorze paramètres à optimiser. Comme attendu, parmi les paramètres ayant le plus d'influence sur les résultats de la simulation figurent les vitesses d'entrée du glucose ou du fructose (**non montré**). Plutôt que d'inclure ces paramètres parmi ceux qui seront optimisés, nous avons préféré tester deux modèles par version, paramétrés dans chaque cas avec une vitesse d'entrée des sucres différente (entre 100 et 200 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) encadrant les valeurs expérimentales du chapitre précédent. L'évaluation de cette optimisation se fait par la méthode des "moindre carrés" entre les valeurs calculées par le simulateur et les valeurs mesurées expérimentalement en calculant le score *SCE*. Les

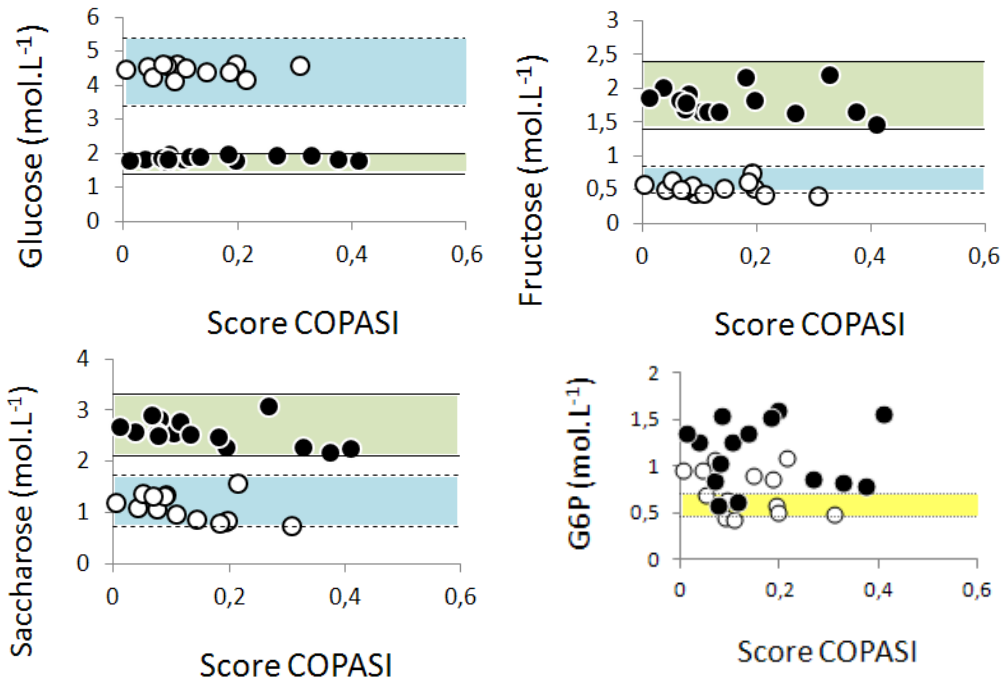


Figure 62. Exemple de l'effet d'un jeu de paramètre sur le score *SCE* et sur la teneur en sucres calculée à l'état stationnaire (M2)

En blanc (○), les valeurs de teneur en métabolites calculées pour le fichier glucose externe. En noir (●), les valeurs de teneur en métabolites totaux calculées pour le fichier fructose externe. En **bleu** les valeurs expérimentales attendues (glucose externe), en **vert**, les valeurs expérimentales attendues (fructose externe) et en **jaune** les valeurs expérimentales attendues (glucose et fructose confondu).

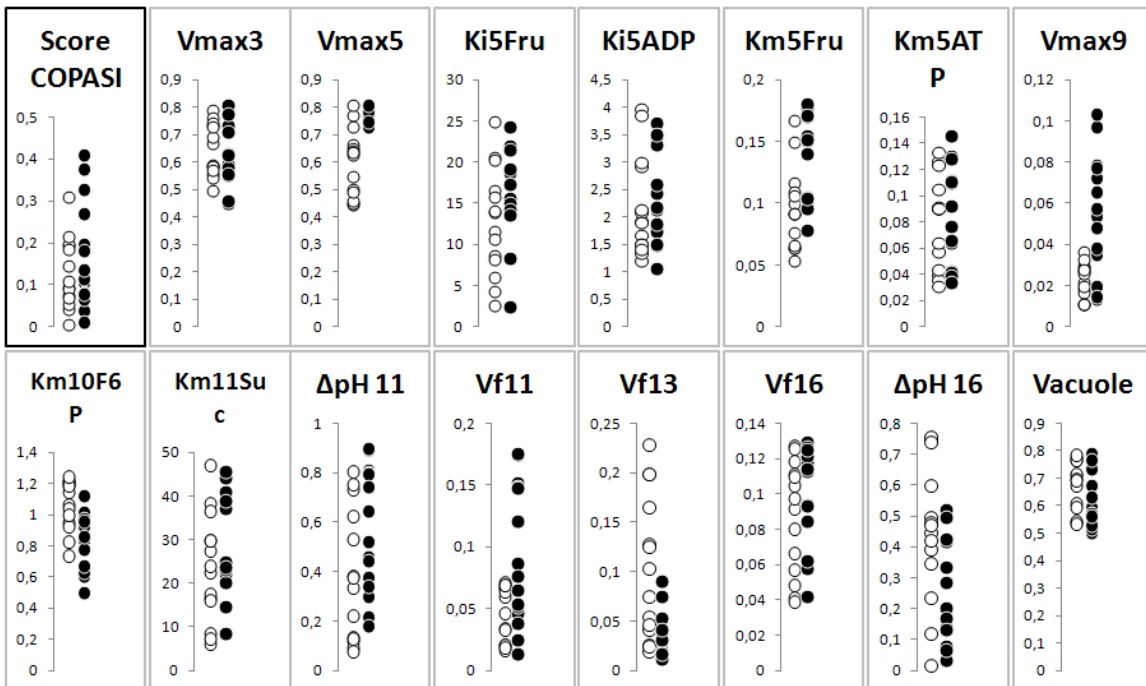


Figure 63. Exemple de résultats d'une optimisation (M2)

En blanc (○), les valeurs optimisées des paramètres du fichier glucose externe. En noir (●), les valeurs optimisées des paramètres du fichier fructose externe. Les V_{max} et V_f sont exprimés en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF, les K_i et K_m en mM, la vacuole en % du volume total de la cellule. Le ΔpH et le score *SCE* calculé par COPASI (ordonnée) n'ont pas d'unité. Le nombre de solutions compilées est de $n=15$.

valeurs des paramètres (K_m , V_{max} , K_i , etc.) à optimiser nécessitent d'être bornées. Cependant, si la donnée est totalement absente, comme pour les capacités des transporteurs, nous imposerons un intervalle relativement permissif. Nous avons utilisé la procédure "random search" par lequel le programme choisi une valeur au hasard, pour chacun des paramètres sélectionnés et dans l'intervalle précédemment fixé.

IV.D. LES SOLUTIONS À L'ÉTAT STATIONNAIRE ET DISPERSION DES VALEURS OPTIMISÉES

Nous avons généré entre 14 et 15 jeux de solutions indépendants pour chaque condition (glucose et fructose externe). Lorsque nous calculons l'état stationnaire pour chaque jeu de solution, nous retrouvons quel que soit le score des valeurs proches de celles mesurées expérimentalement (**figure. 62**). Les résultats sont relativement robustes et valident les contraintes que nous avons imposées. En revanche, le G6P est le sucre dont la valeur calculée varie le plus car il s'agit de la seule variable qu'il était difficile de contraindre faute de pouvoir obtenir suffisamment de solutions. La dispersion des valeurs pour chaque paramètre peut être importante. Dans les exemples qui vont suivre, les données ont été extraites à partir du modèle M2 (**figure.63**). La dispersion des solutions est variable d'un paramètre optimisé à un autre et d'un substrat à un autre. Par exemple, l'optimisation du ΔpH (servant au transport actif des hexoses et du saccharose) montre une grande permissivité sur glucose et sur fructose. C'est également le cas de la plupart des K_m et des K_i qui avaient été sélectionnés. En revanche, pour V_{max3} (glucokinase) et le volume vacuolaire, les valeurs sont moins dispersées sur les deux types de substrats, tout en confirmant le paramétrage initial provenant de nos mesures pour V_{max3} ($0,66 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) et de la littérature pour le volume vacuolaire (65% volume cellulaire). Cette étape d'optimisation renseigne aussi sur les capacités catalytiques des transporteurs vacuolaires du saccharose (V11), des hexoses (V16) et du G6P (V13). En dépit de la dispersion qui peut exister sur glucose (pour V13) ou fructose (pour V11), nous avons pu en tirer un ordre de grandeur compris entre $0,05$ et $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF. Enfin, d'autres paramètres sont plus contraignants sur une source de carbone plutôt qu'une autre. Par exemple, sur fructose uniquement, il est impossible de trouver des solutions optimisées en

Tableau XVII. Valeurs moyennes des paramètres optimisés

(A) En présence de fructose externe. (B) En présence de glucose externe. Le nombre de solutions pour calculer ces valeurs est compris entre 4 et 28. Pour chaque version, deux vitesses d'entrée des hexoses sont disponibles, une rapide (>>>) et une plus lente (>), paramétrées selon la valeur de Vmax1 ou Vmax2. Les symboles > et >>> correspondent à des vitesses d'entrée respectives de 0,1 et 0,2 $\mu\text{mol}.\text{hexoses}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{ MF}$. En grisé, les paramètres qui n'ont pas été optimisés pour la version correspondante du fichier. Le symbole (-) indique l'impossibilité de trouver une solution d'optimisation

A	V0	V1		V2		V3	
Vitesse entrée	>	>>>	>	>>>	>	>>>	
Nombre de scores		n= 11	n= 11	n= 4	n= 8	n= 11	n =15
Vf16	-	0,253	0,104	0,269	0,390	0,278	0,286
Vf11	-	0,058	0,059	0,051	0,080	0,036	0,061
Vf13	-			0,059	0,221	0,152	0,138
Km5Fru	-	0,123	0,110	0,184	0,157	0,152	0,199
Km5ATP	-	0,086	0,085	0,091	0,089	0,110	0,079
Km11Suc	-		31,059				32,033
Km10F6P	-	1,046	0,894	1,108	0,943	0,997	0,895
Vmax9	-	0,051	0,014	0,072	0,030	0,042	0,017
Vac	-	0,616	0,640	0,620	0,622	0,626	0,638
deltapH11	-	0,535	0,526	0,706	0,788	0,552	0,516
deltapH16	-	0,821	0,623	0,782	0,471	0,652	0,354
Km3Glu	-	0,050	0,307	0,061	0,072	0,057	0,266
Km6F6P	-	0,235	1,387	0,183	0,522	0,254	1,313
Vmax6f	-	0,389	0,341	0,415	0,369	0,397	0,372
PPi	-	0,003	0,006	0,003	0,006	0,003	0,010

B	V0	V1		V2		V3	
Vitesse entrée	>	>>>	>	>>>	>	>>>	
Nombre de scores		n= 11	n= 11	n= 28	n= 14	n= 22	n = 8
Vmax5	-		0,561		0,601		0,610
Ki5Fru	-		16,954		12,723		16,303
Ki5ADP	-		2,633		2,171		2,251
Vf16	-	0,294	0,089	0,297	0,087	0,396	0,103
Vf11	-	0,137	0,061	0,190	0,047	0,079	0,037
Vf13	-			0,258	0,102	0,311	0,040
Km5Fru	-	0,284	0,156	0,288	0,096	0,191	0,118
Km5ATP	-	0,077	0,094	0,100	0,080	0,099	0,083
Km11Suc	-	29,512	34,927	25,089	23,354	32,362	36,310
Km10F6P	-	1,003	1,068	1,019	1,066	1,029	0,957
Vmax9	-	0,043	0,033	0,025	0,023	0,039	0,035
Vac	-	0,592	0,572	0,650	0,671	0,609	0,571
Vmax3	-		0,525		0,646		0,506
deltapH11	-	0,393	0,451	0,599	0,378	0,562	0,444
deltapH16	-	0,752	0,712	0,525	0,447	0,454	0,309
PPi	-	0,005		0,004		0,004	
Vmax6f	-	0,389		0,368		0,325	
Km6F6P	-	0,579		0,384		0,791	
Km3Glu	-	0,377		0,290		0,413	

imposant une V_{max5} (fructokinase) inférieure à $0,7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$ alors que la valeur expérimentale mesurée est égale à $0,46 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$. D'autre part, les valeurs optimisées de V_{max9} (invertase neutre) sont comprises entre $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$ et $0,04 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$ sur glucose et entre $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$ et $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$ sur fructose, alors que l'activité spécifique mesurée est de $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$.

IV.E. VERS UN PARAMÉTRAGE MOYEN

Deux solutions issues de valeurs de paramètres très différents peuvent donner à l'état stationnaire des concentrations en sucres identiques. Mais, nous ne pouvons pas objectivement retenir un jeu de valeurs plutôt qu'un autre. On va donc construire un jeu de paramètres moyennés permettant de proposer un paramétrage plus générique. Nous avons regroupé dans un tableau les moyennes des paramètres optimisés pour chaque modèle (**tableau.XVII**). Cette procédure d'optimisation sur M0 n'a produit aucun jeu de paramètres permettant de calculer un score, que ce soit pour la condition glucose ou fructose. L'hypothèse est que ce modèle M0 est incohérent vis-à-vis des données expérimentales. Pour les versions plus complexes du modèle (M1, M2 et M3), une minorité de paramètres ne partagent pas de solutions communes pour les conditions fructose et glucose (**tableau.XVII**) (c'est le cas du K_{m3Glc} qui est 3 à 4 fois plus fort en présence de glucose externe). Certaines optimisations tendent à dicter la justesse de certaines de nos mesures, par exemple, l'activité spécifique de la SPS (V_{max6} , délicate à mesurer sur homogénat) serait sous-évaluée. Nous avons mesuré sur homogénat de racines une activité spécifique de $0,22 \mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF alors que l'optimisation propose une activité 40% plus importante (moyenne de $0,37 \mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF). La surestimation de l'activité spécifique de l'invertase acide (V_{max9}) est également envisagée car l'optimisation donne seulement 13% de l'activité mesurée expérimentalement. Cette différence n'est pas surprenante si l'activité invertasique neutre est surestimée à cause de l'abondance relative de l'invertase acide ayant une activité résiduelle à pH neutre. Ainsi, cette valeur est proche de l'activité invertase neutre mesurée sur le double mutant *inv3xinv4* déficient en invertase vacuolaire (**non montré**). Pour un même modèle, les paramètres optimisés peuvent varier en fonction de la nature de l'entrée du sucre (glucose ou fructose), ce qui nous

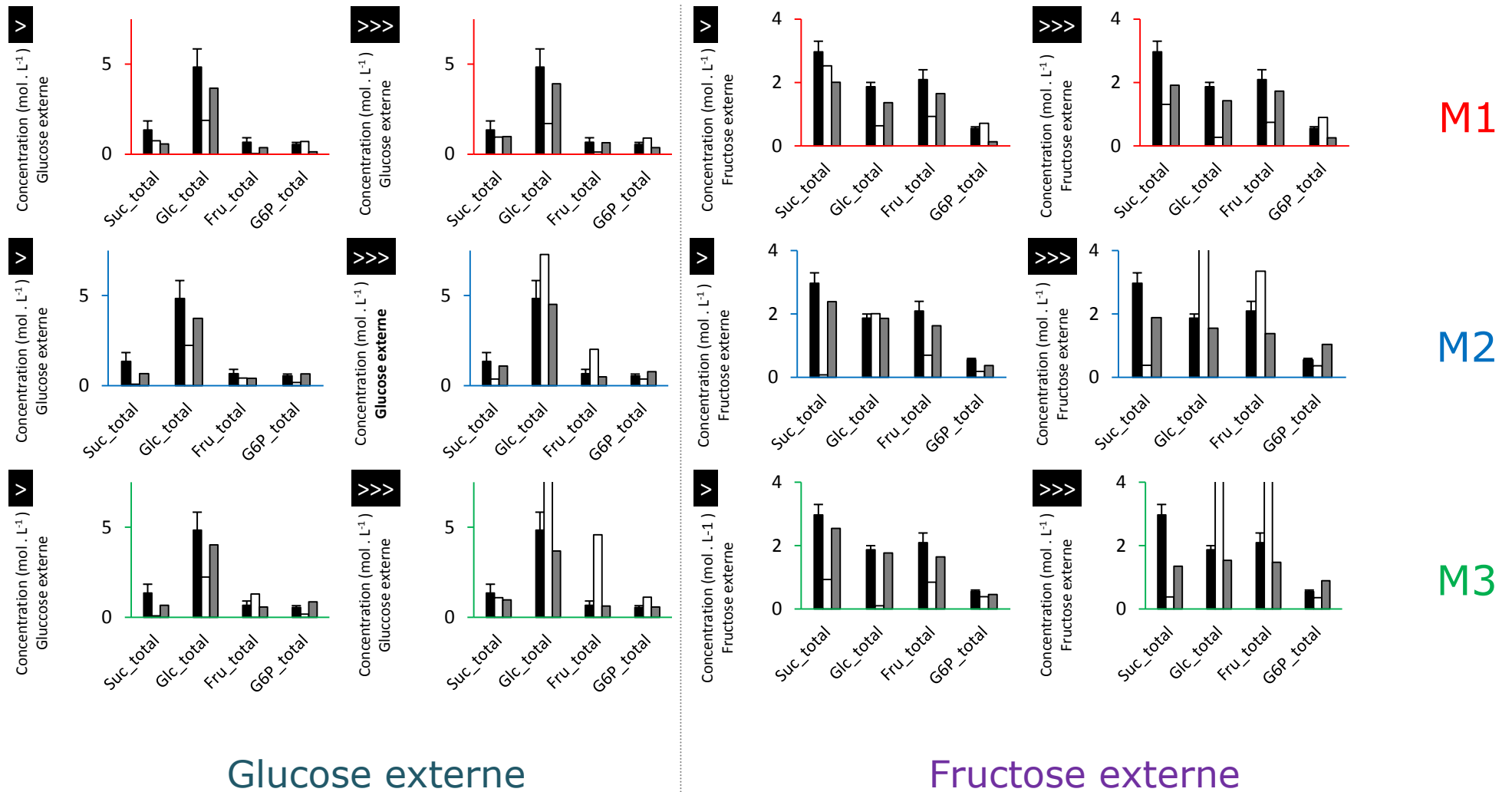


Figure 64. Concentrations des sucres à l'état stationnaire après optimisation

En Noir (■) les concentrations mesurées expérimentalement. En blanc (□) les concentrations prédites par COPASI avant optimisation. En gris (▒) les concentrations prédites par COPASI après optimisation. Les colonnes 1 et 2 correspondent aux simulations faisant entrer du glucose, les colonnes 3 et 4 à celles faisant entrer du fructose. Les lignes V1, V2 et V3 présentent l'ensemble des modèles dérivés des versions 1, 2 et 3. Le symbole > présente les résultats avec une entrée d'hexose à $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, le symbole >>> avec une entrée du sucre à $0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$.

oblige à travailler sur deux versions du fichier.

V. ANALYSE DES MODÈLES AVEC LES PARAMÈTRES OPTIMISÉS

V.A. ÉTAT STATIONNAIRE MÉTABOLIQUE

Pour évaluer les résultats de cette étape d'optimisation, pour chaque jeu de paramètres optimisés pour les versions M1, M2 et M3, les concentrations en sucres à l'état stationnaire sont calculées et les résultats sont présentés **figure 64**. À titre indicatif, la concentration en G6P total a été calculée pour chaque modèle. La version 0 étant impossible à optimiser, nous la mettons dorénavant de côté. Les résultats sur la version M1 sont encourageants mais restent perfectibles sur certains points (**figure.64**). En présence de glucose externe, les quantités en glucose total et en fructose total sont comparables aux valeurs dosées. Ce n'est pas le cas du G6P. La concentration en saccharose calculée se situe, elle, dans la limite basse des contraintes. En présence de fructose externe, la concentration calculée pour les quatre sucres est dans chaque cas légèrement trop basse, quelle que soit la vitesse d'entrée pour cette version M1. Dans les versions M2 et M3, l'optimisation de certains paramètres a permis de retrouver des concentrations très proches des mesures expérimentales à la condition de paramétrer le modèle avec une entrée des sucres à une vitesse de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF.

V.B. MODÉLISATION DES CINÉTIQUES DE MARQUAGE

L'état stationnaire métabolique étant validé pour les modèles M1, M2 et M3, nous allons les utiliser pour simuler des cinétiques de marquage. Pour cela, pour chaque version optimisée du modèle, les variables (concentrations en métabolites) sont remplacées par leur radioactivité spécifique (RAS). Toutes les équations de vitesse sont identiques aux précédentes, si ce n'est que les vitesses sont multipliées par les RAS des substrats respectifs. Les données précédemment générées à l'état stationnaire métabolique (paramètres et concentrations en intermédiaires) pour chaque version (M1, M2 et M3) sont réutilisées. Les concentrations en glucose, fructose, saccharose, G6P, SUC6P, F6P, etc. sont désormais des espèces fixes puisqu'à l'état stationnaire métabolique, leurs

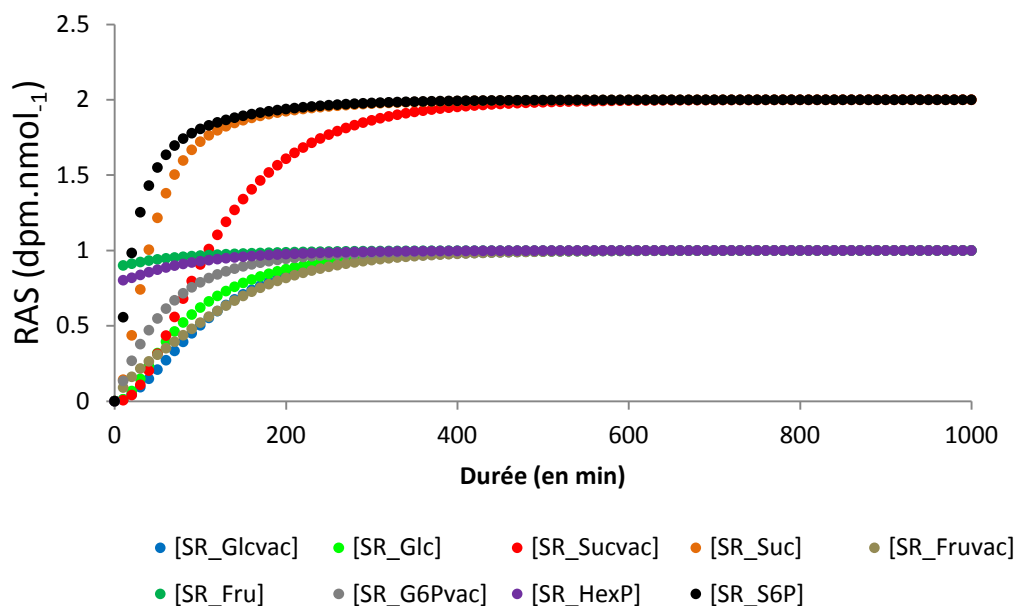
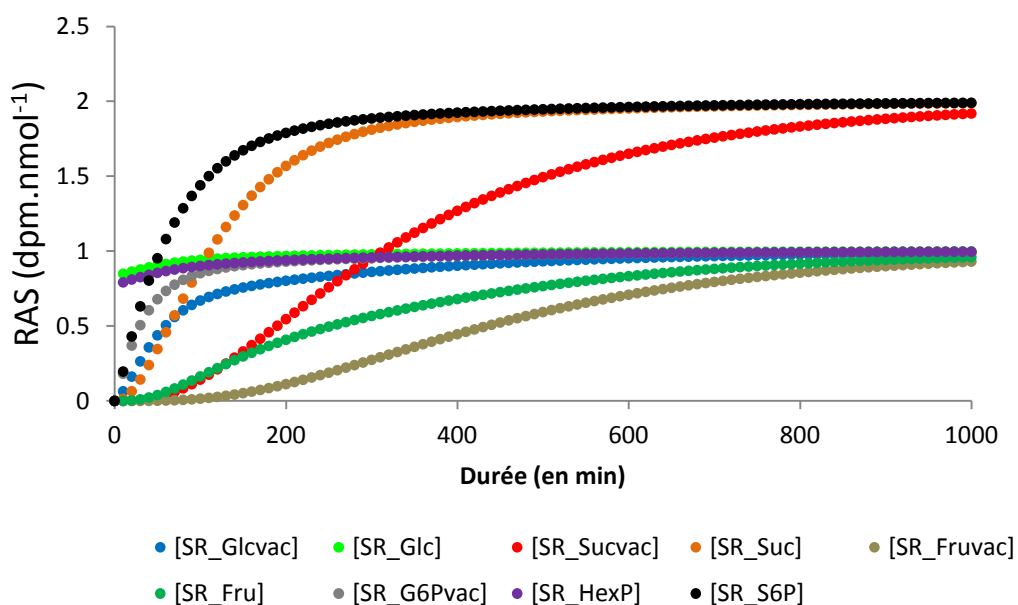
A**B**

Figure 65. Exemples de simulation de l'évolution de la RAS au cours du temps (M2)

Cinétique en présence de fructose externe (A) ou de glucose externe (B) pour une vitesse d'entrée des sucres de $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF. Ces cinétiques sont générées par COPASI. Nous trouvons en couleur la RAS des différents sucres dans le cytosol ([SR_Glc] ●, [SR_Suc] ●, [SR_Fru] ●, [SR_HexP] ● et [SR_S6P] ●) et dans la vacuole ([SR_Glcvac] ●, [SR_Sucvac] ●, [SR_Fruvac] ● et [SR_G6Pvac] ●).

concentrations ne varient plus. Les valeurs initiales (à t=0) des RAS des variables sont nulles, excepté pour le glucose et le fructose externe, dont la RAS est constante au cours du temps et est égale à 1. Deux simulations types sont représentées dans la **figure 65**. Avec entrée du fructose radioactif (**figure.65, A**), la simulation montre que l'ensemble des pools de sucres se marquent. Ainsi, la RAS du S6P et du saccharose cytosolique total et vacuolaire tendent bien vers 2, tout comme celles des hexoses et hexoses-Pi qui tendent vers 1. La cinétique nous renseigne, dans une certaine mesure, sur l'ordre de marquage des sucres : le pool de fructose cytosolique se marque le plus rapidement, suivi par les hexoses-Pi cytosoliques et le G6P vacuolaire. En léger décalage, se marquent le S6P, le saccharose puis les hexoses vacuolaires. En remplaçant le fructose externe par du glucose (**figure.65, B**), nous observons le phénomène inverse. Le glucose cytosolique est le premier sucre à se marquer, puis les hexoses-Pi cytosoliques, puis avec un léger retard, le S6P et le saccharose cytosolique. Enfin, de façon retardée, le saccharose et le fructose vacuolaires sont les derniers métabolites à se marquer. Les métabolites les plus proches du précurseur sont donc ceux qui se marquent le plus rapidement. Pour comparer ces simulations avec les cinétiques de marquages mesurées expérimentalement, il est nécessaire de calculer les radioactivités (dpm.mg⁻¹ MF) et les RAS (dpm.nmol⁻¹) associées au pool total de glucose, de saccharose, de fructose et de G6P. À titre d'exemple, les formules suivantes sont utilisées pour le saccharose :

$$\text{dpm_Suc}_{\text{tot}} = \frac{\text{RAS_Suc} \times [\text{Suc}] \times (1 - \text{vacuole}) + \text{RAS_Suc}_{\text{vac}} \times [\text{Suc}_{\text{vac}}] \times \text{vacuole}}{\text{densité tissulaire}}$$

$$\text{RAS_Suc}_{\text{tot}} = \frac{\text{dpm_Suc}_{\text{tot}}}{\text{Suc}_{\text{tot}}}$$

Avec les RAS (RAS_Suc, RAS_Suc_{vac} et RAS_Suc_{tot}) exprimées en dpm.nmol⁻¹ ; les concentrations ([Suc] et [Suc_{vac}]) exprimés en mM ; la densité tissulaire en gMF.ml⁻¹ ; la vacuole exprimé en fraction du volume cellulaire et dpm_Suc_{tot}, exprimé en dpm.mg⁻¹ MF.

Les cinétiques de marquage ainsi générées sont comparées avec les cinétiques expérimentales décrites dans le chapitre I (**figure.66**). Les RAS du saccharose simulées en présence de glucose ou de fructose se superposent bien aux données expérimentales dans la plupart des cas. Seule la version M2 du modèle propose un marquage de ce disaccharide un peu trop rapide. Le marquage du

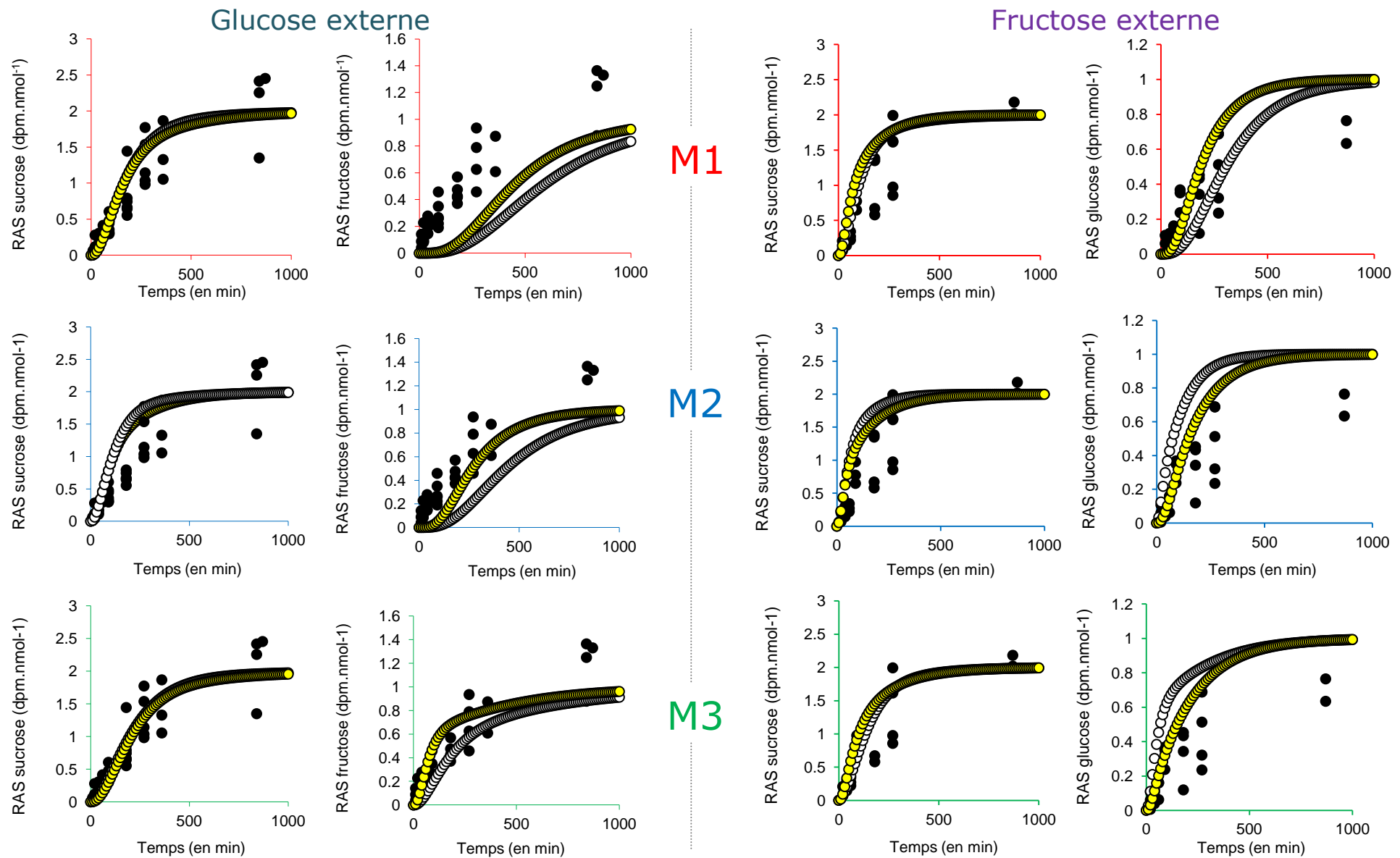


Figure 66. Comparaison de l'évolution de la RAS du glucose, du fructose et du saccharose total au cours du temps

En noir (●) sont représentées les données expérimentales (moyennées) obtenues sur des racines de Col0 en culture in vitro (cf chapitre II), en blanc (○) les données simulées par COPASI pour une vitesse d'entrée des sucres rapide (0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF), en jaune (●) les données simulées par COPASI pour une vitesse d'entrée des sucres plus lente (0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF). Les 2 premières colonnes présentent les RAS du saccharose, les 2 dernières les RAS des hexoses.

fructose en présence de glucose externe (**figure.66**, colonne 2) des versions M1 et M2 est très en retard comparé aux données expérimentales. Seul le modèle 3 arrive à bien représenter les valeurs expérimentales, notamment lorsque la vitesse d'entrée du glucose est de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$. La cinétique de marquage du glucose en présence de fructose externe (**figure.66**, colonne 4), bien qu'un peu rapide, semble correcte dans les versions M1, M2 et M3. Les simulations des cinétiques de marquage du G6P (**figure 67**), montrent que le marquage du G6P est trop rapide dans la première version de modèle (M1). Les deux autres modèles (M2 et M3) semblent plus conformes à la réalité expérimentale. Nous avons généré des graphiques pour l'ensemble des modèles : $\log_{\text{RASsimulation}} = f(\log_{\text{RASexperience}})$ comme décrit dans Colón et al. (2009) (**figure.68**). Le **tableau XVIII** regroupe les différents calculs de corrélation linéaire (pentes). Le modèle M3 engendre une amélioration bien visible comparé au modèle M2. L'ensemble de ces tests confirme que les versions M2 et M3 du modèle sont les plus proches de nos données de marquages que la M1, en particulier la version M3.

a) Importance de la sucrose synthase (SuSy) sur les cinétiques de marquage

Avec la version M2, la simulation de marquage du fructose, en présence de glucose externe, est très en retard comparé aux valeurs expérimentales. La version M3 palie ce retard de marquage en permettant la synthèse de fructose radioactif à partir du F6P, par l'action de la PAP vacuolaire. Nous avons testé une solution alternative permettant d'accélérer la synthèse de fructose en présence de glucose externe. En effet, dans ces conditions, la SuSy pourrait permettre la synthèse de fructose radioactif à partir du saccharose (**figure.69**, réaction V8). Des travaux menés sur la canne à sucres ont identifié 3 activités distinctes (*i.e.* SuSyA, B et C) (Schafer et al., 2005), que nous ne pouvons malheureusement pas faire correspondre aux deux séquences connues pour la canne à sucre (SUS1 et SUS2), ni aux six séquences connues pour *Arabidopsis thaliana*. À partir de leurs séquences nucléotidiques, Baud et collaborateurs (Baud et al., 2004) ont classé ces gènes en 3 paires (AtSUS1 et AtSUS4, AtSUS2 et AtSUS3, AtSUS5 et AtSUS6). Cette étude par paire a été justifiée par des paramètres enzymatiques et des phénotypes métaboliques proches (Bieniawska et al., 2007). Nous nommerons arbitrairement les 3 paires A, B et C. Les paramétrages SuSy A e

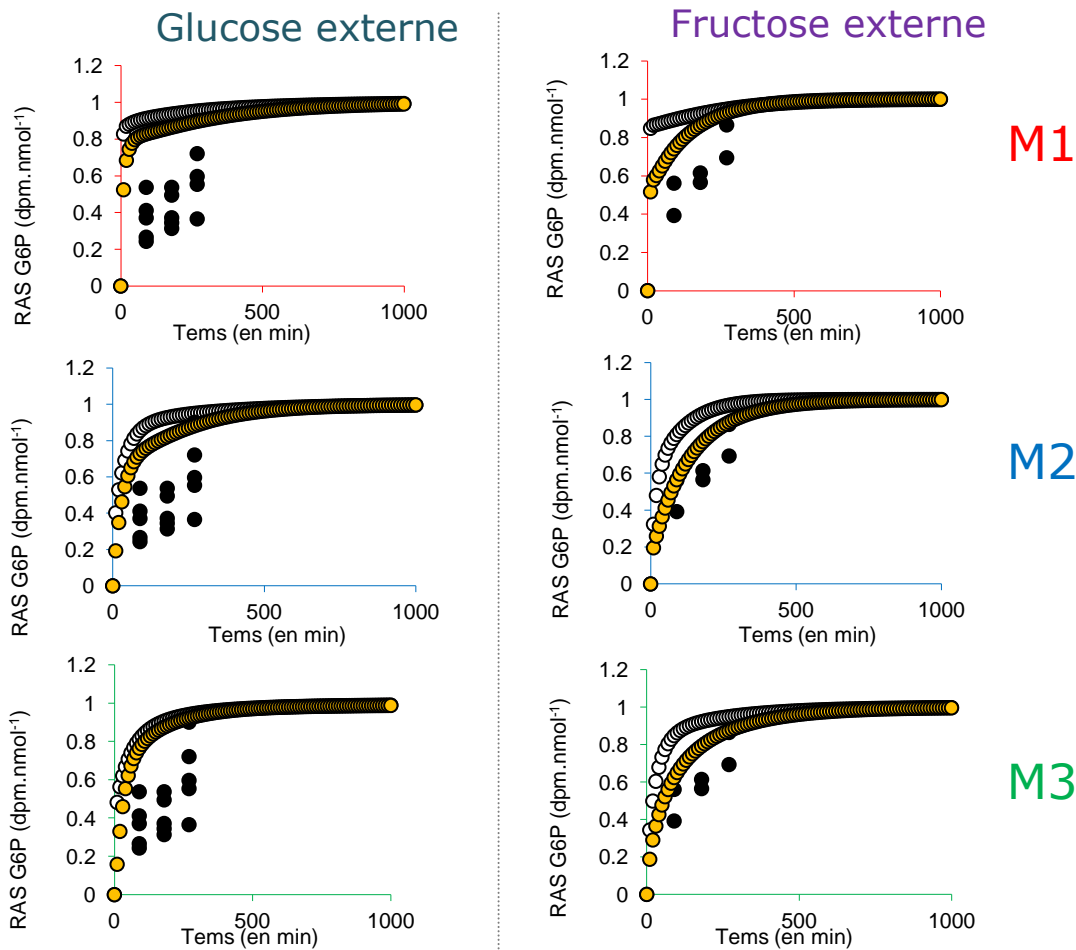


Figure 67. Comparaison de l'évolution de la RAS du G6P total au cours du temps

En noir (●) sont représentées les données expérimentales, en blanc (○) les données simulées par COPASI pour une vitesse d'entrée des sucres de $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$, en jaune (●) les données simulées par COPASI pour une vitesse d'entrée des sucres de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$.

Tableau XVIII. Comparaison des modèles M1, M2 et M3 avec les expériences

Les pentes sont calculées à partir des graphiques $\log_{\text{simulation}} = f(\log_{\text{expérience}})$. En violet, les versions qui donnent les valeurs de pente les plus près de 1 et les valeurs des ordonnées à l'origine les plus proches de 0. Le symbole > présente les résultats avec une entrée d'hexose de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$, le symbole >>> avec une entrée du sucre de $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$. La meilleure corrélation est celle qui donne une pente la plus proche de 1 et une intersection (b ou ordonnée à l'origine) proche de 0.

Fructose externe		M1		M2		M3		Glucose externe		M1		M2		M3	
Vitesse d'entrée		>>>	>	>>>	>	>>>	>	Vitesse d'entrée		>>>	>	>>>	>	>>>	>
Σ RAS	Pente	1,67	1,32	0,56	0,90	0,69	0,83	Σ RAS	Pente	2,62	2,70	2,28	2,10	1,59	1,46
	b	0,16	0,10	0,13	0,10	0,04	0,05		b	-0,36	-0,26	-0,22	-0,08	-0,07	0,00
	R ²	0,72	0,71	0,80	0,75	0,63	0,82		R ²	0,52	0,54	0,49	0,54	0,84	0,80
RAS Suc	Pente	0,87	0,72	0,58	0,58	1,00	0,85	RAS Suc	Pente	1,33	1,41	1,08	1,12	1,43	1,58
	b	0,07	0,12	0,17	0,15	0,01	0,07		b	0,01	0,00	0,11	0,10	-0,05	-0,08
	R ²	0,86	0,83	0,81	0,83	0,88	0,84		R ²	0,87	0,86	0,84	0,83	0,88	0,88
RAS Glu	Pente	1,97	1,59	0,48	0,99	0,48	0,80	RAS Fru	Pente	4,64	4,81	4,17	3,69	1,87	1,31
	b	-0,04	0,11	0,04	0,06	0,03	0,01		b	-0,29	-0,04	-0,12	0,10	-0,02	0,06
	R ²	0,74	0,72	0,71	0,73	0,71	0,73		R ²	0,88	0,83	0,87	0,81	0,83	0,73
RAS G6P	Pente	0,11	0,32	0,23	0,61	0,17	0,49	RAS G6P	Pente	0,03	0,08	0,08	0,16	0,11	0,14
	b	-0,01	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01		b	-0,02	-0,03	-0,01	-0,03	-0,01	-0,02
	R ²	0,83	0,788	0,73	0,77	0,78	0,79		R ²	0,41	0,51	0,41	0,48	0,41	0,42

SuSy B sont proches des valeurs utilisées jusque là. Seul le paramétrage SuSy C diffère significativement (**annexe.S3**). Nous avons alors utilisé ces trois paramétrages (Km et Vmax) de la SuSy dans les modèles M1, M2 et M3. La modification du paramétrage de la SuSy ne modifie pas significativement les teneurs en sucres totaux à l'état stationnaire (**non montré**). De plus, les cinétiques de marquages à partir du glucose exogène sont sensiblement identiques quel que soit le paramétrage de la SuSy (e.g. **figure.69**). Jouer sur le paramétrage de la saccharose synthase n'améliore pas le modèle.

b) Effet de la compartimentation et du métabolisme plastidial du G6P sur les cinétiques de marquage des sucres

Le principal défaut des versions 2 et 3 du modèle est la faible convergence en ce qui concerne le marquage du G6P total. Dans les cellules végétales autotrophes, on estime qu'une quantité non négligeable de G6P (et de F6P), pouvant aller de 10 à 30 % du pool total dans les feuilles (Stitt et al., 1985; Gerhardt et al., 1987), peut être compartimentée dans les chloroplastes. Dans les tubercules de pommes de terre, où les amyloplastes occupent seulement 15% du volume cellulaire, le pourcentage de G6P dans ces organelles pourrait aller jusqu'à plus de 70% du pool total (Farré et al., 2001). Dans les racines, le volume occupé par les amyloplastes est plus faible mais non négligeable (moins de 10% dans les racines primaires de blé) (Moore, 1985). L'objectif est donc ici d'analyser l'influence du métabolisme plastidial sur les cinétiques de marquage, et notamment sur celles du G6P total. Dans les versions M1, M2 et M3 du modèle, le compartiment plastidial, occupant 10 % du volume cellulaire, a été rajouté auquel a été associé un échangeur de G6P/Pi (V18) et un flux de consommation du G6P plastidial (Vpp) correspondant à la voie des pentose-phosphates et à la glycolyse plastidiale (**figure.70**). Les nouveaux modèles ainsi construits ont été optimisés pour obtenir un flux de sortie Vpp (voie des pentoses phosphates) qui ne devait pas excéder 10% du flux total de consommation d'hexose (Alonso et al., 2005). La version M1+plaste n'a pu être optimisée que pour le glucose externe. Pour les versions optimisées, la vitesse maximum (Vf18) de l'échangeur G6P/Pi plastidial est en moyenne égale à $0,31 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF, associée à un flux de sortie du G6P (Vpp) variant entre 1,4 et 7,6 % du flux d'entrée d'hexoses. La **figure 71** compile les cinétiques de marquage des sucres et du G6P total obtenues avec ou sans le plaste. Dans cette configuration, le G6P se

Figure 68. Exemple d'un graphique logsimulation = f(logexpérience)

Version 3 en présence de fructose externe à une vitesse d'entrée de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$. La meilleure conciliation correspond à une pente égale à 1 et à l'ordonnée à l'origine égale à 0

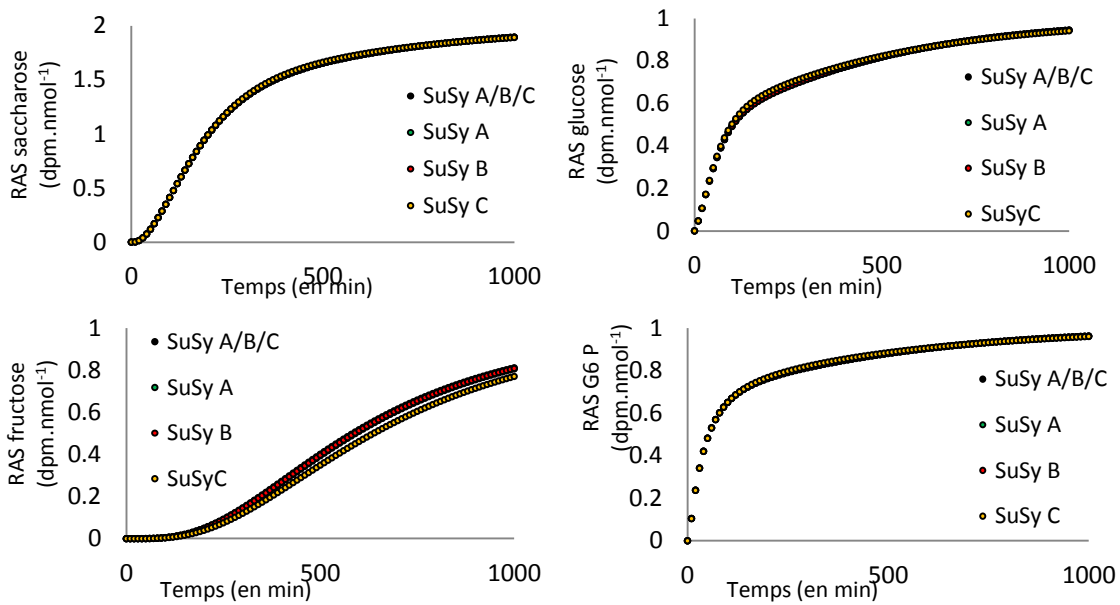
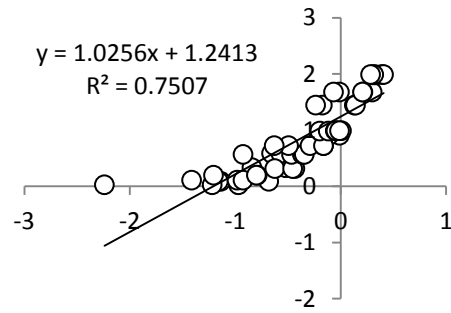


Figure 69. Comparaison de l'évolution de la RAS en fonction du paramétrage de la SuSy
L'exemple donné est celui de la version M3 du modèle en présence de glucose externe.

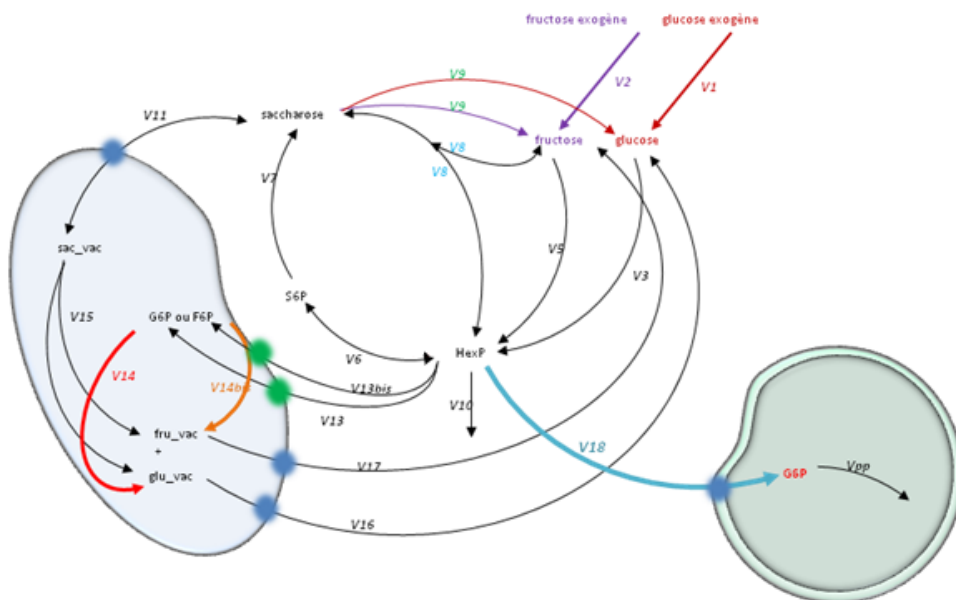


Figure 70. Représentation schématique du réseau métabolique étudié : rôle du plaste dans la version 3 du modèle

V18 = flux d'entrée du G6P dans le plaste ; Vpp = flux de sortie vers la voie des pentoses phosphates. Dans les versions 1 et 2 du modèle, nous avons rajouté le flux d'entrée du G6P dans le plaste V18 ainsi que le flux de consommation du G6P plastidial (Vpp).

marque tout aussi rapidement que dans la version M1 du modèle en absence de plaste. Avec la version M2 + plaste, en présence de fructose ou de glucose externe, les cinétiques de marquage sont comparables. Enfin, la version M3 + plaste présente des cinétiques de marquages accélérées pour les 3 sucres (saccharose, glucose et G6P) en présence de fructose. Pour la condition glucose externe, il n'y a pas de différence notable. L'ajout du compartiment plastidial n'a donc pas modifié significativement les cinétiques de marquage des sucres. Là où on aurait pu penser ralentir la vitesse de marquage du G6P par la présence d'hexoses phosphates dans le plaste, il n'en est rien. Ceci peut être dû à la combinaison de deux phénomènes: **i)** un échange rapide entre le pool de G6P plastidial avec le pool cytosolique et **ii)** une faible abondance du G6P plastidial par rapport aux autres pools. Par exemple, dans la version M1 (qui ne comporte pas de G6P vacuolaire), le G6P plastidial compte pour environ 5% du pool total. Dans les versions M2 et M3, le G6P plastidial représente 4 %, contre environ 80 % pour la vacuole (pourcentages calculés à l'état stationnaire).

V.C. EXPLOITATION DU MODÈLE

Les potentialités offertes par les modèles, et plus particulièrement par la version M3, sont multiples. En particulier, il est possible. **i)** d'établir la carte des flux à l'état stationnaire. **ii)** d'effectuer une analyse du contrôle cinétique portées par certaines enzymes vis-à-vis de certains flux et/ou certaines concentrations. En plus du contrôle par la quantité d'enzymes en elle-même, il est possible que les activités hydrolytiques vacuolaires soient fortement régulées par la rétro-inhibition de leur(s) produit(s) et par l'approvisionnement en substrat par les transporteurs. **iii)** de prédire les conséquences métaboliques de la perte partielle ou totale de l'activité de certaines enzymes.

i) Carte des flux

Elle a été établie à partir de la version M3 du modèle (**figure.72**). Les flux sont calculés pour une vitesse d'entrée de glucose et de fructose de 0,1 et 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF. Sur cette carte, nous voyons que certaines réactions sont dépendantes d'autres voies en amont. Par exemple, la vitesse d'entrée de l'hexose est égale à la vitesse de sortie par la PFK ($V_{10} = V_2$). C'est également le cas de l'invertase acide dont la vitesse de réaction est égale au flux d'entrée du

Glucose externe

Fructose externe

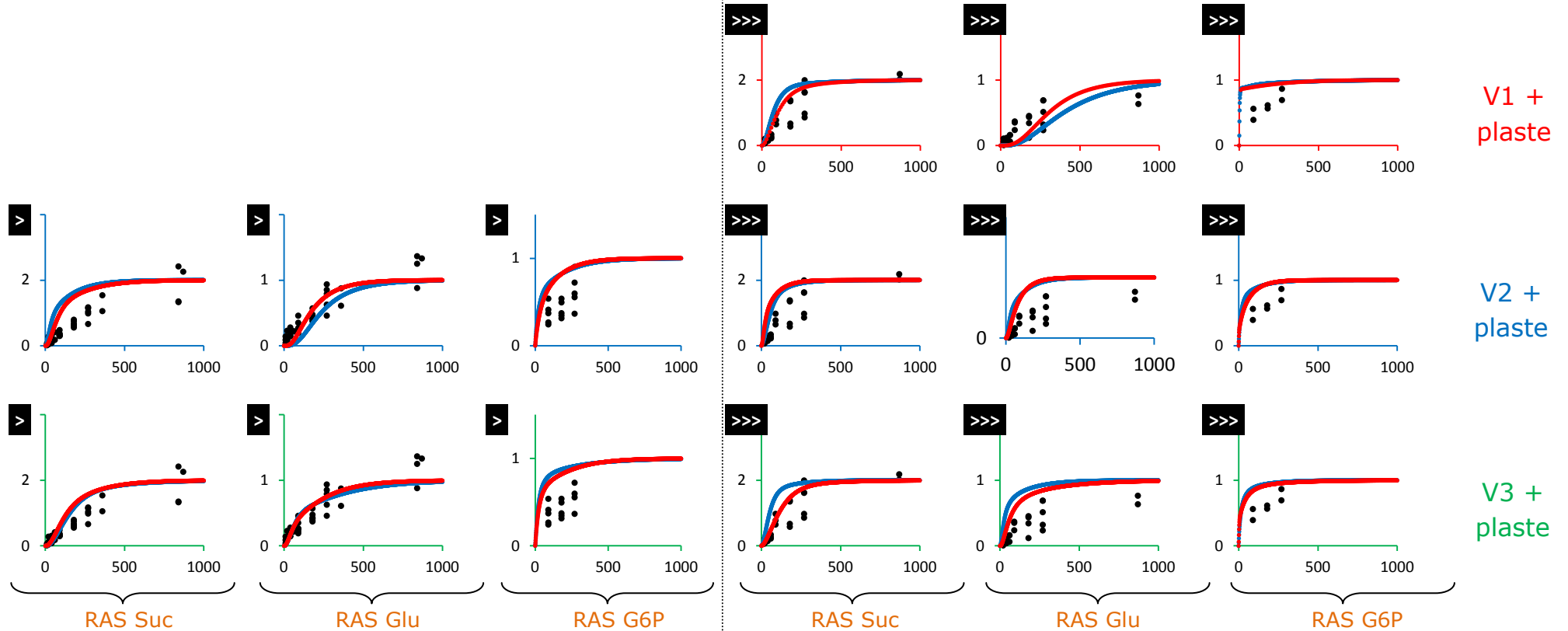


Figure 71. Rôle du plaste dans l'évolution de la RAS des sucres au cours du temps

En noir (●) sont représentées les données expérimentales, en rouge (●) les données simulées par COPASI en absence du plaste, en bleu (●) les données simulées par COPASI en présence du plaste. Les symboles > et >>> correspondent à des vitesses d'entrée des hexoses de 0,1 et 0,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g MF}$, respectivement. En ordonné les RAS exprimées en dpm.nmol^{-1} ; Les RAS correspondante des abscisses est présenté en orange sous les graphiques. En abscisse, le temps exprimé en minutes.

saccharose dans la vacuole ($V11 = V15$). L'activité phosphatase acide vacuolaire, hydrolysant le G6P ou le F6P, est dans le même cas de figure par rapport à l'échangeur GPT ($V14 = V13$ et $V14bis = V13bis$). Et enfin, le flux de la S6Pase est identique à celui de la SPS ($V7 = V6$). Cependant, nous pouvons noter que les vitesses de phosphorylation du glucose et du fructose par la gluco- et la fructokinase, respectivement, sont nettement plus élevées que les vitesses d'entrée de chacun de ces deux sucres ($V3 > V2$ et $V5 > V2$ sur glucose et fructose, respectivement) (**figure.72**). Ce déséquilibre, qui est observé quel que soit le flux d'entrée imposé, indique qu'une part non négligeable des hexoses phosphorylés a une origine endogène et met en évidence l'existence de cycles. En effet, nous avons vu dans l'introduction que le métabolisme du saccharose des "tissus puits" était caractérisé par l'existence de plusieurs cycles de substrat, liés à la coexistence des enzymes de synthèse et de clivage du saccharose. Dans le réseau métabolique de la **figure 72**, on peut identifier trois cycles du saccharose et un nouveau cycle, le cycle des hexoses Pi :

a) Le cycle de la PAP vacuolaire. Ce cycle met en jeu la phosphorylation du fructose ou du glucose dans le cytoplasme, l'entrée du F6P ou du G6P dans la vacuole et leur hydrolyse par la PAP acide. La carte de flux nous permet de calculer le pourcentage d'hydrolyse des hexoses-Pi (G6P + F6P) par la PAP vacuolaire en faisant le rapport suivant : $\%_{hydrolyse_HexP} = (V14 + V14bis) / (V3 + V5) \times 100$. Ce pourcentage est de 15% et 16% en faisant entrer du fructose pour des vitesses respectives de 0,1 et 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF. Sur glucose et pour les mêmes vitesses d'entrée, ce pourcentage est respectivement égal à 25% pour une vitesse d'entrée de 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF et de 7,4% pour une vitesse de 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF. Pour discriminer le cycle du F6P et celui du G6P, nous pouvons établir les pourcentages suivants : $\%_{hydrolyse_G6P} = (V14) / (V3) \times 100$ et $\%_{hydrolyse_F6P} = (V14bis) / (V5) \times 100$. Le G6P est hydrolysé à hauteur de 41 à 73% sur fructose externe et de 10 à 19% sur glucose externe. Le F6P est, lui, hydrolysé à hauteur de 5 à 7% sur fructose externe et de 43 à 61% sur glucose externe. Ces valeurs sont légèrement plus élevées que celles calculées par la méthode discrète (cf. chapitre II): 25% vs. 41-73% pour le G6P sur fructose et 33% vs. 43-61% pour le F6P sur glucose (cf. chapitre II). Pour chaque hexose Pi, l'intensité des cycles de substrat varie donc en fonction de la source de

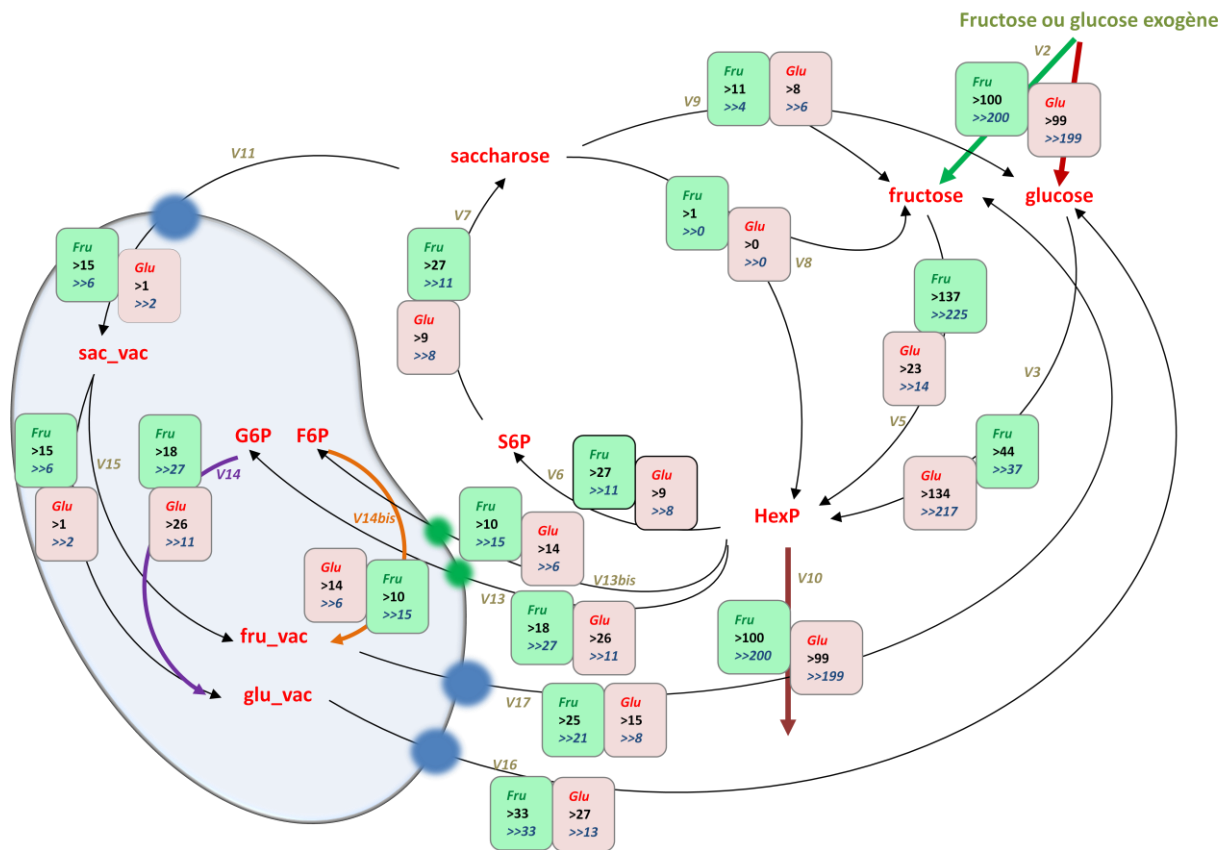


Figure 72. Carte de flux de la version 3 du modèle du métabolisme des sucres dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*

La carte est construite à partir de la version 3 du modèle. Les flux sont ceux qui ont été calculés à l'état stationnaire par COPASI. Les flux sont exprimés en $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF. Dans les encadrés vert les flux calculés en faisant entrer du fructose ; dans les encadrés rouge les flux calculés en faisant entrer du glucose. Dans les encadrés, en noir et précédé du signe > les flux calculés pour une vitesse d'entrée de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF, en bleu et précédé du signe >> les flux calculés pour une vitesse d'entrée de $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

carbone externe. Ainsi, pour le F6P, le cycle d'hydrolyse est plus important sur glucose et, inversement, pour le G6P, sur fructose externe.

b) Le cycle de l'invertase acide. Ce cycle met en jeu la synthèse cytoplasmique du saccharose, son transport dans la vacuole et son hydrolyse par l'invertase acide. Dans ce cas, le pourcentage de saccharose impliqué dans ce cycle est égal à $(V15) / (V6) \times 100$. Le saccharose est hydrolysé par ce cycle à la hauteur de 55% en présence de fructose externe et de 11 à 25%, sur glucose externe. L'amplitude du cycle de l'invertase acide est donc plus élevée sur fructose que sur glucose externe.

c) Le cycle de l'invertase neutre. Ce cycle, entièrement cytoplasmique, met en jeu la synthèse du saccharose et son hydrolyse par l'invertase neutre. Dans ce cas, le pourcentage de saccharose impliqué dans ce cycle est égal à $(V9) / (V6) \times 100$. Le saccharose est hydrolysé par ce cycle à la hauteur de 36 à 65% sur fructose externe et de 75 à 88% sur glucose externe. Contrairement au cycle précédent, l'amplitude du cycle de l'invertase neutre est plus élevée sur glucose que sur fructose externe. On en déduit qu'en présence de fructose, le cycle de substrat du saccharose implique préférentiellement l'invertase acide alors qu'en présence de glucose, le cycle se déroule principalement dans le cytosol. Remarquons enfin, qu'à une vitesse de $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gMF}^{-1}$, les cycles du saccharose représentent 9% $((1+8)/100 \times 100)$ et 26% $((15+11)/100 \times 100)$ des hexoses consommés par les racines sur glucose et fructose, respectivement. Ces valeurs sont peu éloignées des 15 et 30% calculés par la méthode discrète (cf. chapitre II).

d) Le cycle de la SuSy. Ce cycle, entièrement cytoplasmique, implique la synthèse du saccharose par la SPS et son clivage par la SuSy. L'intensité de ce cycle, que l'on quantifie par le rapport $V8 / V6 \times 100$, est proche de zéro quel que soit le substrat externe considéré. Ce fait résulte de l'activité quasiment nulle de la SuSy dans nos conditions de nutrition carbonée (apport d'hexose). Cette très faible activité de la SuSy est conforme à ce que nous avons conclu à partir des marquages isotopiques des résidus glucosyl et fructosyl du saccharose (cf. **figure.18**, chapitre II).

ii) Analyse du contrôle cinétique

L'approche MCA (Metabolic Control Analysis) permet de quantifier l'effet de changements des niveaux d'enzymes ou de métabolites sur les flux en prenant

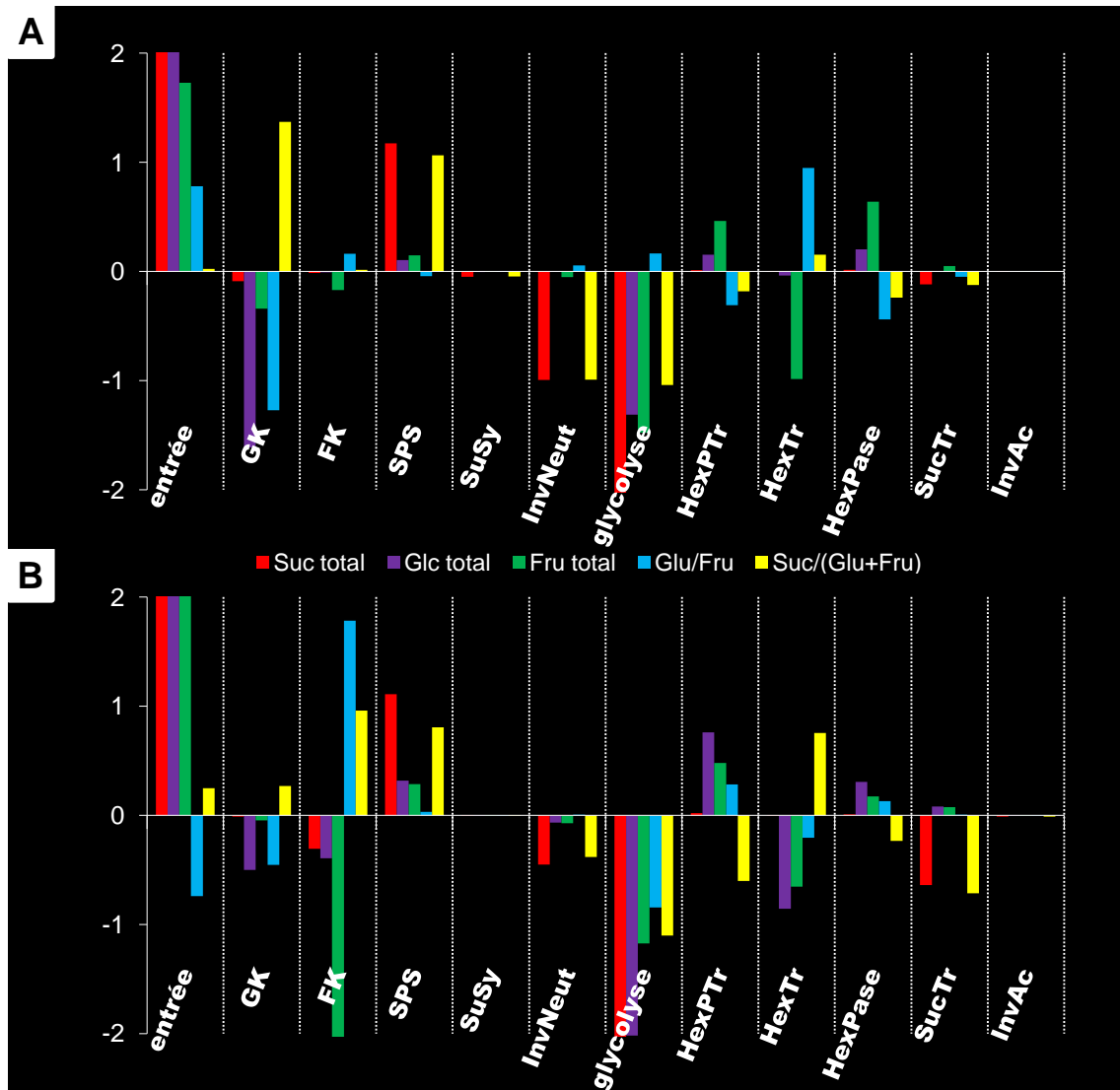


Figure 73. Coefficients de contrôle des concentrations en sucres

Les coefficients de contrôle ont été calculés en utilisant COPASI à partir de la version 3 du modèle, avec un flux d'entrée égal à $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF de glucose externe (A) ou de fructose externe (B). En rouge le saccharose total, en violet le glucose total, en vert le fructose total, en bleu le rapport Glu/Fru et en jaune le rapport $\text{Sac}/(\text{Glu}+\text{Fru})$. GK = glucokinase ; FK = fructokinase ; SPS = saccharose phosphate synthase ; SuSy = saccharose synthase ; InvNeut = invertase neutre ; HexPtr = transporteurs d'hexoses phosphates ; HexTr = transporteur d'hexoses ; HexPase = activité hexose Pi phosphatase ; SucTr = transporteur de saccharose ; InvAc = invertase acide ; entrée = flux d'entrée de l'hexose externe

en compte l'ensemble du système. L'objectif est d'observer à quel(s) niveau(x) les variables du réseau (flux et concentrations) sont régulées. Nous avons procédé à l'analyse des coefficients de contrôle sur le modèle le plus convaincant (M3) avec une vitesse d'entrée du glucose ou du fructose égale à $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF (**figure.73**) (définition, **annexe.S4**). Nous nous sommes intéressés à l'influence de certaines activités sur les niveaux d'accumulation des trois sucres majoritaires de la racine d'*Arabidopsis* (glucose, fructose et saccharose). Parallèlement à cet aspect quantitatif des réserves en carbone, nous nous sommes également intéressés à un aspect qualitatif, c'est-à-dire à la répartition des différentes espèces de sucres, *i.e.* le rapport glucose / fructose et le rapport saccharose / (glucose+fructose). En effet, dans le monde végétal, la répartition des sucres entre mono- (glucose et fructose) et disaccharides (saccharose) varie énormément en fonction des espèces, des tissus et des conditions environnementales. De manière générale, les deux paramètres les plus influents sont en toute logique l'entrée du sucre dans le réseau et sa sortie par la glycolyse. En présence de glucose externe (**figure.73, A**), la glucokinase contrôle négativement et fortement la concentration en glucose total, et par conséquent les rapports de sucres où il intervient. La fructokinase n'a en revanche que très peu d'influence sur les teneurs en sucres. En présence de fructose externe (**figure.73, B**), nous observons l'inverse, *i.e.* un rôle négligeable de la glucokinase et une influence négative importante de la fructokinase sur la teneur en fructose total. La SPS contrôle positivement et fortement la teneur en saccharose dans les deux conditions, de même que le rapport saccharose sur hexoses. L'absence d'influence de la SuSy n'est pas surprenante. La modulation de la SuSy n'avait en effet pas modifié les cinétiques de marquage des sucres (*cf.* § IV.B.). L'invertase neutre contrôle la concentration en saccharose (glucose et fructose externe) et, dans une moindre mesure les hexoses en présence de fructose externe. Les transporteurs d'hexoses contrôlent positivement et fortement la teneur en fructose uniquement (**figure.73, A**) ou celles en fructose et en glucose (**figure.73, B**) et de fait, contrôlent la répartition des différents sucres. Enfin, il est important de constater que l'activité hexose-Pi-phosphatase est peu contrôlante en condition fructose et favorise l'accumulation du fructose en présence de glucose externe. Les autres étapes n'ont que peu d'incidence sur les concentrations en sucres. En dernier lieu, par analogie aux travaux sur la canne à sucre (Rohwer and Botha, 2001),

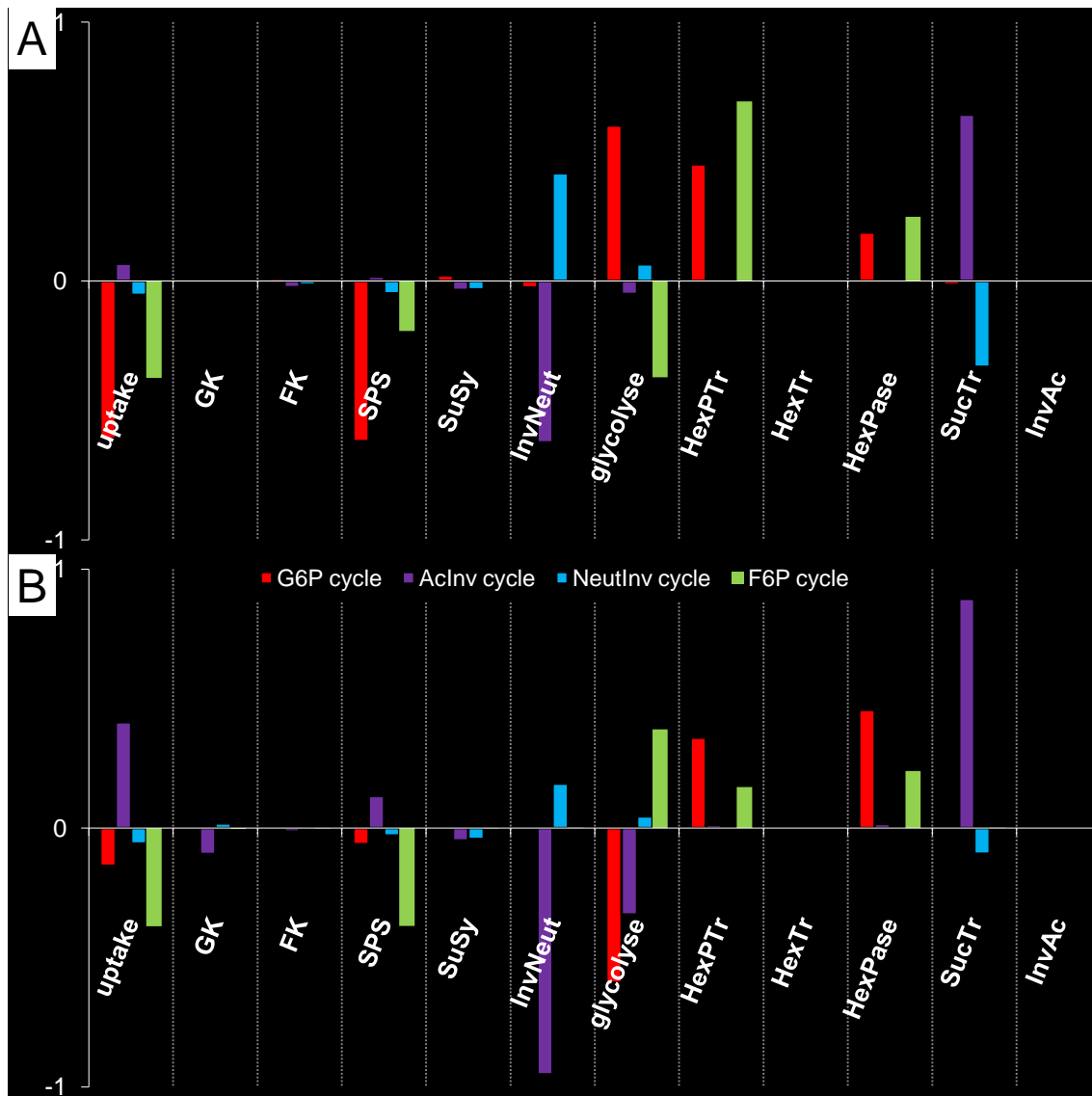


Figure 74. Coefficients de contrôle des cycles de substrat

Les coefficients de contrôle ont été calculés en utilisant COPASI à partir de la version 3 du modèle, avec un flux d'entrée égal à $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF de fructose externe (A) ou de glucose externe (B). En rouge le cycle PAP_G6P, en violet le cycle invertase_acide, en bleu le cycle invertase_neutre et en vert le cycle PAP_F6P. GK = glucokinase ; FK = fructokinase ; SPS = saccharose phosphate synthase ; SuSy = saccharose synthase ; InvNeut = invertase neutre ; HexPtr = transporteurs d'hexoses phosphates ; HexTr = transporteur d'hexoses ; HexPase = activité hexose phosphatase ; SucTr = transporteur de saccharose ; InvAc = invertase acide ; entrée = flux d'entrée de l'hexose externe

nous avons analysé les coefficients de contrôle des cycles futiles précédemment énumérés (le cycle de la PAP, le cycle de l'invertase acide et le cycle de l'invertase neutre). La **figure 74** représente les coefficients de contrôle de ces différents cycles de substrat en présence de fructose externe et de glucose externe (définition, **annexe.S4**). Cette analyse montre que deux protéines vacuolaires jouent un rôle important dans le contrôle cinétique de ces cycles de substrat : l'échangeur hexose-Pi/Pi et la PAP vacuolaire contrôlent positivement les cycles des hexose-Pi. Inversement, la SPS contrôle négativement ces mêmes cycles. Le transporteur du saccharose contrôle positivement le cycle du saccharose vacuolaire et négativement celui du cytosol. Enfin, les transporteurs d'hexoses n'exercent aucune contrainte cinétique sur ces cycles. Remarquons que l'invertase vacuolaire, contrairement à l'invertase neutre, ne contrôle pas l'intensité des cycles du saccharose.

iii) Outil prédictif

La construction de ce modèle nous permet de visualiser les réponses à des perturbations génétiques ou environnementales. Nous pouvons ainsi simuler l'effet d'une mutation ou d'une modulation d'activité enzymatique sur les concentrations et les flux à l'état stationnaire. Toujours à partir de la version M3 du modèle et pour des vitesses d'entrée de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF, nous avons modulé la V_{max} de l'hexose phosphatase (PAP), de l'invertase acide (INVac) et de l'échangeur hexose-Pi/Pi (GPT).

■ Modulation de l'activité PAP

Une sur-expression de la phosphatase acide ($V_{\text{max}14}$) induit une accumulation de glucose et de fructose et une diminution du G6P (**figure.75**). En revanche, la diminution d'un facteur 5 de l'activité (correspondant à la baisse mesurée entre le sauvage et le mutant *pap26*) n'induit que peu de variation des hexoses par rapport au G6P, qui augmente de façon importante. Ce dernier point est en accord avec les données du mutant *pap26*, les teneurs en sucres ne sont pas significativement différentes du sauvage alors que la teneur en G6P total augmente significativement, surtout sur fructose externe (*cf.* chapitre II). Dans les deux cas, la sur- ou sous-expression de la PAP ne produit que peu d'effet sur les flux.

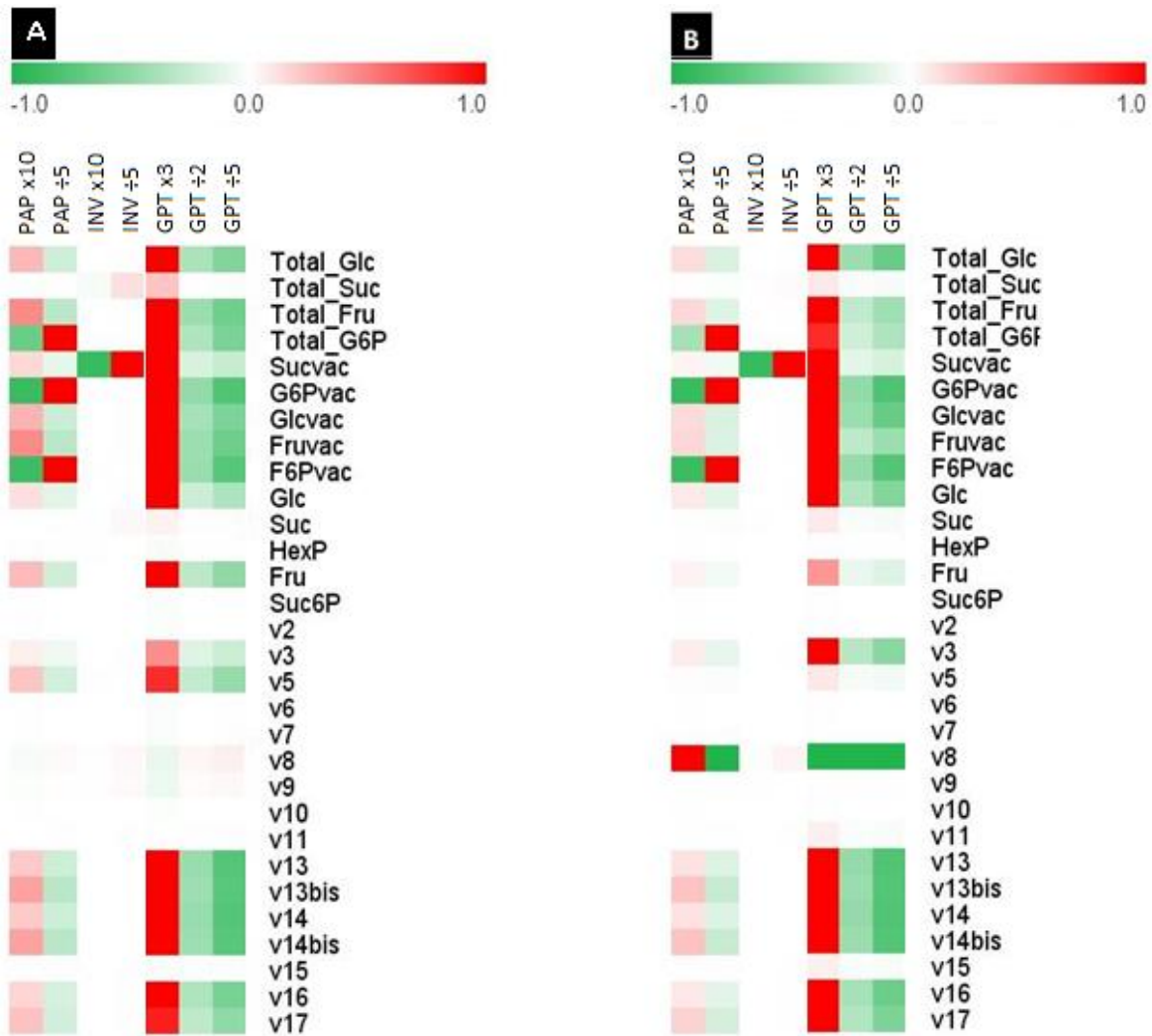


Figure 75. Effet de la modulation de la phosphatase acide (PAP), de l'échangeur hexose-Pi/Pi (GPT) et de l'invertase acide (INV) sur les concentrations en sucres et sur les flux

(A) Entrée du glucose à une vitesse de 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF. (B) Entrée du fructose à une vitesse de 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF. Les données calculées par COPASI sont visualisées à l'aide du logiciel TMEV4. Les changements de concentrations et de flux sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à la situation initiale. En vert sont visualisées les diminutions (concentrations ou flux), en rouge les augmentations.

■ Modulation de l'activité invertasique acide

La modulation de l'activité invertase joue principalement sur la concentration en saccharose vacuolaire: en effet, la surexpression de l'invertase acide (Vmax15) ne modifie que peu les teneurs intracellulaires en hexoses. En outre, la diminution d'un facteur 20 de l'activité (correspondant à la baisse mesurée entre le sauvage et le mutant *inv3inv4*) ne modifie que peu les teneurs intracellulaires en sucres, excepté sur glucose, où le saccharose augmente. Comme pour la PAP, dans les deux cas, sur- ou sous-expression de l'invertase acide ne produit que peu d'effet sur les flux (**figure.75**).

■ Modulation de l'échangeur GPT : un lien étroit avec la PAP

Lorsque l'on sur-exprime GPT (Vf13), les flux de la phosphatase acide (V14 et V14bis) augmentent davantage que lorsque l'on sur-exprime la PAP. Si l'on simule une sous-expression de GPT de 50%, le flux de la PAP (V14 et V14bis) diminue autant que lorsque l'on simule une chute de 20% de l'activité phosphatase acide. Enfin, si la chute du transporteur atteint 80%, les flux de la phosphatase acide (V14 et V14bis) sont fortement altérés, bien plus qu'avec une baisse de 80% de la PAP. Ces résultats sont en accord avec l'analyse du contrôle des flux, à savoir que le transport d'hexoses phosphates contrôle fortement l'activité phosphatase acide puisque le transporteur GPT alimente directement la PAP en substrats. Les métabolites F6P et G6P s'accumulent dans la vacuole lorsque la PAP est sous-exprimée alors qu'ils sont absents lors de la sous-expression du transporteur GPT. Le flux d'hydrolyse de l'activité phosphatase vacuolaire diminue dans les deux cas.

VI. DISCUSSION

La description détaillée d'un réseau est primordiale pour simuler au mieux un comportement biologique. Dans la description, nous entendons le devenir des différentes espèces impliquées mais également le paramétrage des équations de vitesse des réactions. Nous avons constaté que la moindre approximation dans le paramétrage du modèle pouvait avoir des conséquences importantes sur les simulations. Enfin, les outils de sensibilité et d'optimisation nous ont été importants pour affiner le paramétrage des modèles. Cette phase d'optimisation nous a montré que trois réseaux, avec des degrés de complexité différents, étaient capables de rendre compte des teneurs en glucose, saccharose, fructose

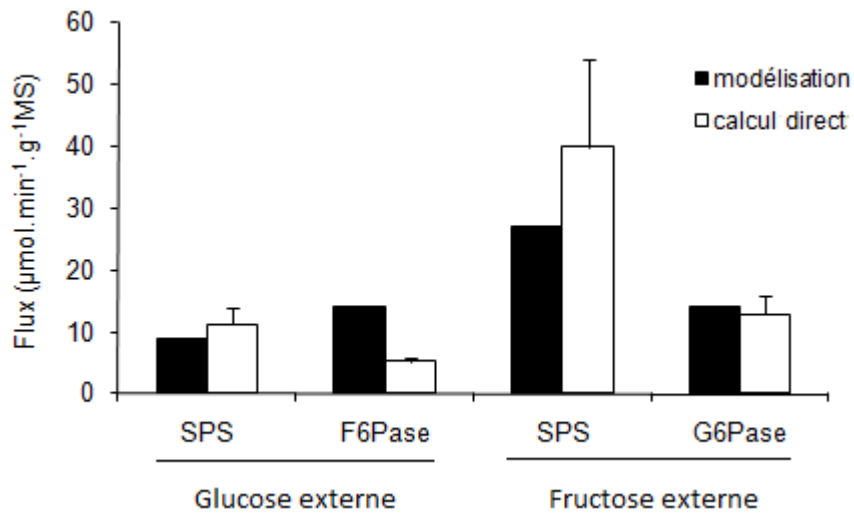


Figure 76. Comparaison entre les flux calculés par le modèle cinétique et ceux calculés par la méthode par intervalles.

Les flux calculés par la méthode par intervalle (Alonso, 2003) proviennent tableau VIII (exprimés en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) divisés par une valeur du rapport MF/MS égale à 10. Le flux calculé par la simulation (*figure. 72*) est issu du modèle M3 en utilisant une vitesse d'entrée des sucres de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$.

et G6P mesurées sur les racines en culture sur glucose ou fructose. Cependant, deux versions du modèle n'ont pas été satisfaisantes pour simuler les expériences de marquage. Ainsi, le réseau métabolique minimum qui rend compte à la fois des concentrations des métabolites à l'état stationnaire et de la cinétique de marquage de ces mêmes métabolites est un réseau qui implique non seulement l'entrée et l'hydrolyse du saccharose dans la vacuole mais également l'entrée et l'hydrolyse du G6P et du F6P dans ce même compartiment (Version M3). Ce travail de modélisation illustre l'importance de confronter les modèles à plusieurs jeux de données expérimentales indépendants. L'ajout du compartiment plastidial dans le modèle, associé à l'échangeur hexose-Pi / Pi, le métabolisme des l'hexoses-Pi vers l'amidon, la voie des pentose-Pi et la glycolyse plasidiale, n'ont pas amélioré les solutions du modèle. Ces observations seront à approfondir par des expériences de fractionnement non aqueux, méthode en cours de mise au point dans le laboratoire. Cette méthodologie pourrait permettre d'étudier la répartition (y compris des marquages) des hexoses-phosphates dans la vacuole, le plaste et le cytosol chez le sauvage et les mutants *pap26*, *gpt2* et *tmt1/2*.

Dans le chapitre II, les limites de la méthode de calcul des flux par intervalles ont été discutées. La **figure 76** montre néanmoins une bonne cohérence entre les valeurs des flux calculées par le modèle (M3) et celles calculées au chapitre II (méthode discrète). En revanche, l'analyse globale du réseau par la modélisation cinétique est plus poussée car le modèle donne notamment accès à des flux (*e.g.* flux d'échanges entre la vacuole et le cytosol, flux G6P- et F6Pase) que les calculs directs occultaient complètement.

■ Le rôle des transporteurs vacuolaires

Parmi les apports de la modélisation cinétique, figurent les capacités catalytiques des transporteurs du tonoplaste. Pour les modèles compartimentés (M1, M2 et M3), les V_{max} des transporteurs des hexoses ($V_{f16}=V_{f17}$), du saccharose (V_{f11}) et des hexoses-phosphates (V_{f13}) sont les suivantes: 53 ± 18 , 266 ± 104 et 160 ± 90 $\text{nmole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{gMF}^{-1}$. Le modèle nous a également permis de mettre en avant le contrôle important exercé par les transporteurs vacuolaires sur les teneurs en sucres totaux et sur certains flux, ceci quelle que soit la source de carbone (glucose ou fructose externe). Ainsi, le coefficient de contrôle du flux de

l'invertase acide par le transporteur de saccharose se situe entre 0,6 et 0,7 ; celui du flux de la phosphatase acide par l'échangeur hexose-Pi/ Pi se situe entre 0,7 et 0,8, quel que soit le substrat (G6P ou F6P). Ce contrôle exercé par les transporteurs limite la fourniture en substrats aux hydrolases vacuolaires. En effet, l'invertase acide est peu sensible à la rétro-inhibition exercée par le glucose et le fructose vacuolaire : les élasticités (définition, **annexe.S4**) de l'enzyme vis-à-vis de ces deux métabolites sont proches de 0 (-0,05 et -0,26). En revanche, l'élasticité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat, le saccharose, est très élevée, proche de l'unité (0,96 à 0,99), dénotant un contrôle important de l'invertase acide par la disponibilité en substrat. La même analyse vaut pour la phosphatase acide. À l'état stationnaire, cette enzyme est peu sensible à la rétro-inhibition exercée par le phosphate vacuolaire (les élasticités de l'enzyme vis-à-vis du Pi se situent entre -0,07 et -0,17), et à la compétition entre le G6P et le F6P (les élasticités de la G6P- et de la F6Pase vis-à-vis du F6P et du G6P, respectivement, se situent entre -0,01 et -0,03). En revanche, comme l'invertase acide, l'hexose-6-Pi phosphatase est contrôlée par la disponibilité en son substrat, le G6P ou le F6P (les élasticités de la G6P- et de la F6Pase vis-à-vis du G6P et du F6P, respectivement, se situent entre 0,96 et 0,99). Dans ce contexte, le fort contrôle porté par l'échangeur hexose-Pi / Pi sur le flux de la PAP est en accord avec nos mesures *in organello* qui ont montré que la vitesse de synthèse de glucose était égale à environ 25% de la Vmax de la PAP (*cf.* chapitre I). L'ensemble de ces données suggèrent que les capacités de stockage des hexoses dans la vacuole dépendent assez peu de la quantité d'enzymes hydrolytiques présentes dans la vacuole et assez peu des régulations cinétiques de ces mêmes enzymes. En revanche, c'est la capacité des transports tonoplastiques qui contrôle de façon importante le contenu vacuolaire en sucres. Ceci nous invite donc à nous intéresser à l'avenir aux lignées d'*Arabidopsis thaliana* sur-exprimant les transporteurs putatifs de sucrose et de monosaccharides. Le modèle a mis en avant qu'en jouant sur l'abondance d'un transporteur ou d'une activité enzymatique, l'ensemble des flux et des concentrations en sucres totaux étaient affectés. Sur la collection de mutants (*e.g. gpt2, inv3inv4 et pap26inv3inv4*), il serait intéressant de procéder à un phénotypage enzymatique complet, de paramétrer les Vmax dans le modèle avec ces valeurs et de confronter les simulations aux résultats des dosages et des marquages isotopiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I. RAPPEL DES OBJECTIFS, METHODOLOGIES MISES EN ŒUVRE ET PRINCIPAUX RÉSULTATS

L'objectif de cette thèse était d'étudier le rôle de la protéine PAP26 dans le métabolisme et le stockage des sucres dans la vacuole. Notre hypothèse de départ est que la protéine PAP26 pourrait intervenir *via* son activité phosphatase dans un cycle de substrat vacuolaire impliquant le glucose-6-phosphate et le glucose. Pour vérifier cette hypothèse, notre travail s'est déroulé en trois parties: **i)** nous avons dans un premier temps identifié chez *Arabidopsis thaliana* le ou les porteurs de l'activité G6Pase et PEPase acide *in vivo* (plantule) et *in organello* (vacuoles isolées). La purification de vacuoles à partir de jeunes feuilles d'*Arabidopsis thaliana* a été essentielle dans ce travail. Nous avons montré que chez le mutant *pap26*, l'activité glucose-6-phosphatase, mesurée *in vitro* et *in organello*, chute de manière importante. Nous avons relié ces résultats à notre hypothèse en démontrant que chez le mutant *gpt2*, le transport tonoplastique des hexoses phosphates (G6P et F6P) diminue de façon significative. **ii)** Par une approche de marquage isotopique (précurseur [U-¹⁴C]-Glucose ou [U-¹⁴C]-Fructose), nous avons mis en évidence l'existence d'une activité hexose-6-Pi phosphatase sur des racines excisées en culture. En effet, une part importante du glucose et du fructose ne provient pas de l'hydrolyse du saccharose et PAP26 est en partie responsable de cette synthèse. **iii)** Enfin, les résultats des deux premiers points nous ont permis de construire, par une approche originale combinant un double jeu de données expérimentales (réseau métabolique à l'état stationnaire & marquages isotopiques), un modèle cinétique *in silico* qui rend compte des expériences de marquage. La confrontation du modèle avec deux jeux de données expérimentales (concentrations à l'état stationnaire et cinétiques de marquage) a permis de confirmer l'existence d'une activité hydrolytique sur les hexoses-phosphates vacuolaires.

II. DONNÉES EXPERIMENTALES VS. MODÉLISATION *IN SILICO* : DEUX APPROCHES COMPLÉMENTAIRES

Dans le chapitre II, nous avons vu qu'il était critiquable de calculer des vitesses unidirectionnelles de synthèse et de dégradation par la méthode de discrétisation

utilisée classiquement, en cause la compartimentation des voies métaboliques étudiées. Le modèle donne accès aux marquages des composés dans chaque compartiment, ce qui n'est pas le cas de la méthode discrète. Nous n'avons pas vu de différences importantes sur la teneur en sucres entre le mutant *pap26* et le sauvage Col0 ; ces résultats ont été confirmés par le modèle qui semble valider l'idée que la quantité des enzymes hydrolytiques n'est que peu influente sur les capacités de stockage des hexoses dans la vacuole. En revanche, les étapes de transports des hexoses-Pi et du saccharose contrôlent de manière importante les flux des enzymes hydrolytiques (*i.e.* invertase et phosphatase acide) et, par voie de conséquence, le contenu en sucres de la vacuole dans le modèle *in silico*.

III. PERSPECTIVES ET VALORISATIONS

L'approche *in silico* développée dans ce travail de thèse a permis de valider la construction d'un modèle robuste rendant compte des concentrations et des marquages des sucres intracellulaires et, dans une moindre mesure, du G6P. Des données de marquages générées à partir de racines en culture de plusieurs mutants (*gpt2*, *sut4*, *inv3*, *inv4*, *inv3xinv4*, *pap26xinv3*) sont d'ores et déjà disponibles. Dans l'immédiat, il serait intéressant de compléter ces données en mesurant les cinétiques de marquage du précurseur G6P chez ces mutants. De cette façon, nous pourrions appliquer la méthode de calcul des flux de synthèse et d'hydrolyse du saccharose, glucose et fructose. Nous envisageons également de procéder au phénotypage des activités enzymatiques impliquées dans le réseau chez ces mutants et les intégrer au modèle *in silico*.

L'étape de modélisation présente certaines contraintes techniques liées aux étapes de comparaison entre les valeurs calculées par le modèle et les données expérimentales. En effet, après l'étape d'optimisation, les données simulées à l'état stationnaire métabolique (*i.e.* concentrations) doivent être exportées dans un second modèle pour générer les cinétiques de marquages. Ce travail se fait entièrement à la main, ce qui augmente le temps de l'utilisateur passé sur le logiciel. La prochaine étape consistera à automatiser cet échange d'informations entre les différents fichiers afin de minimiser la présence de l'utilisateur et ainsi permettre au logiciel de travailler sans interruptions pendant plusieurs jours. La première étape de cette automatisation a été démarrée en créant avec des étudiants, dans le cadre d'un projet du master Bioinformatique, une interface

graphique au logiciel PySCeS. L'objectif est de créer des boucles automatiques d'optimisation qui sont absentes dans le logiciel COPASI.

Cette approche *in silico* est actuellement appliquée au modèle du fruit de tomate utilisé dans le laboratoire. La construction du modèle n'a pas à être beaucoup retravaillée, en revanche le paramétrage doit être reconsidéré (K_m , V_{max} , etc.). L'objectif est de développer une nouvelle approche ciblée sur certains gènes candidats en sur- ou sous-exprimant certaines activités catalytiques ou de transports. Nous cherchons à modéliser l'effet de variations d'activités enzymatiques sur la teneur en saccharose, glucose et fructose au cours du développement du fruit de tomate (e.g phases d'expansion cellulaire et de mûrissement). À la différence des racines d'*Arabidopsis thaliana*, le marquage du péricarpe de tomate s'est avéré techniquement très difficile (Henri, 2008). Pour contourner ce problème, l'idée est de comparer les concentrations en métabolites prédites par le modèle avec celles qui seront mesurées dans le compartiment vacuolaire, cytosolique et plastidial après avoir effectué un fractionnement non aqueux du fruit de tomate. Le modèle décrivant le métabolisme des sucres dans le fruit de tomate pourra également être à court terme affiné en incluant l'homologue de la PAP26 d'*A.thaliana* dont on sait qu'il est co-induit avec l'invertase acide pendant la phase de mûrissement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau XIX. Gènes étudiés, mutants et amorces associées

Pour chaque gène étudié, le numéro d'accèsion provient du site du TAIR (The Arabidopsis Information Resource ; <http://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Les amorces sens et antisens sont générées à partir de l'outil iSct Primers disponible sur le site t-DNA express (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

Gène	Accession	"Germplasm"	amorce sens (LP)	amorce antisens (RP)
INV3	AT1G62660	SALK_006934	CAAAAGCACTTTCAAAAAGTATG	TGCTTCTAAAGATTTCTTTGACC
		SALK_076378	TGGAACAATACTATTTTGTCTG	CCTTATAGAACAATGGACCTGGAC
		SALK_038823	CACCACAATAAAGTACGACGTTTC	AAGTTCATCTTGCAGTCTATTCCG
INV4	AT1G12240	SALK_100813	GATTTTGTCTGCGTGAACCTTTTACC	ATACCCAATTTTCTCTCTCCAGC
		SALK_139119	TGGTTTCACAGATGAACCATTAAC	CATACTATTGTTCCATTCAAACGC
		SALK_139119	TCTGCAGCTGCTGACTAAAATTC	AGCACAGTAATAACCATCTCTCCC
PAP26	AT5G34850	GABI_144B01	CTTCATGATTTCTGCAGACC	TTAAGACCCAATCCATTTCCC
		SALK_152821	TTGAGGAGTGGTTTGTCCAAC	TGGACTTCTCAATTCACACCC
PAP17	AT3G17790	SALK_046785	ATTGTAATAACACCGGAGGGC	CTAAAACCCCCAAAGCTTTTG
		SALK_097940	ATTGTAATAACACCGGAGGGC	CTAAAACCCCCAAAGCTTTTG
PAP12	AT2G27190	GABI_151C09	AAAGCTAGCTTCTCGAAACGC	ATGAGATGAATCCGGGAAAAG
PAP10	AT2G16430	SAIL_430_D05	ACCCTCATTGTTTACCTTCC	TAGCACAAAAAGCACAAAGC
PAP7	AT2G01880	SAIL_786_A02	GATCAGATGGAACCGACTGAC	TCTTTTGGACAATGAGGATCG
TMT1	AT1G20840	SAIL_296_E01	CGAAACTTTTTGTTGCAATAATTG	CAGAAATGTAAACAGGGACAAGTG
		GABI_485F07	CGTTCGAGAATCTGAGGAGTG	TCTCACGGTGTTTTATTTGCC
TMT2	AT4G35300			
TMT3	AT3G51490			
VGT1	AT3G03090	SALK_126495	TGGACTAAATTTTCAAGGAAGGAG	AATGTAGCTTCTTTGTCTTACCC
		SALK_126700	AGGACAAAGAAATTTGCTTACGAC	AGACAGAAAGGTTTCAAATGGAG
GPT2	AT1G61800	GABI_950D09	TAAACCATCCTCACTGCTTCG	CATGATGTTGTTGCTTGATGG
SUT4	AT1G09960	WiscDsLox450E10	GAGAAGATCCCGAACTGGAAC	ATACGTATTGAATCCCTGGGC

Tableau XX. Séquences des amorces d'amplification de la bordure gauche (5' → 3') des t-DNA

	Lmutant (5' → 3')	Séquence
WiscDsLox	Lp745	AACGTCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC
GABI_Kat	GABI-8409-LB	ATATTGACCATCATACTCATTGC
SAIL	LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
	LB3	TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACAC
SALK	LBb1.3	ATTTTGGCCGATTTTCGGAAC
	LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG

I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET CONDITIONS DE CULTURE

I.A. VARIÉTÉ ET TRANSFORMANTS D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

■ Variété sauvage

Le matériel biologique utilisé au cours de cette thèse est l'écotype Columbia d'*Arabidopsis thaliana* (Col0). Les graines ont été fournies par le Dr Véronique Germain (LBMS, UMR 5200 CNRS, Villenave d'Ornon).

■ Mutants d'insertions

Afin de travailler sur des individus « perte de fonction » pour les gènes considérés, nous avons utilisé des mutants d'insertions t-DNA dont le fonds génétique est de type Col0. Les mutants *tmt1*, *tmt1,2*, *tmt1,2,3* et *tmt1,2 x vHT6* ont été gracieusement fournis par le Dr Fatma Ouaked-Lecourieux (CNRS, ISVV, Villenave d'Ornon). Les autres ont été commandés via le site internet de l'ABRC ("Arabidopsis Biological Resource Center") par l'intermédiaire du TAIR ("The Arabidopsis Information Resource" ; (<http://www.arabidopsis.org>)). Les graines sont directement accessibles à partir du numéro d'accèsion du gène (e.g. AT1G62660) sous l'onglet "Germplasm". En fonction des mutants, les insertions appartiennent à différentes lignées ; celles que nous avons utilisées dans cette étude sont les suivantes :

- SALK (résistance à la Kanamycine)
- GABI-KAT (résistance à al Sulfadiazine)
- SAIL (résistance au glufosinate)
- Wisconsin DsLox (résistance au glufosinate)

Les mutants utilisés sont regroupés dans le **tableau XIX**.

I.B. STÉRILISATION DES GRAINES

Les graines sont placées dans une solution de Javel à 4,8% en présence de Triton-X 100 0,2%. Incuber les graines 10 minutes puis laver 5 fois les graines avec de l'eau filtrée à 0,22µm (~1,5mL). Laisser les graines dans un volume d'eau filtré (~1,5mL) puis placer les graines stériles à l'obscurité à 4°C pendant 48H au minimum avant de les placer en chambre de culture (vernalisation).

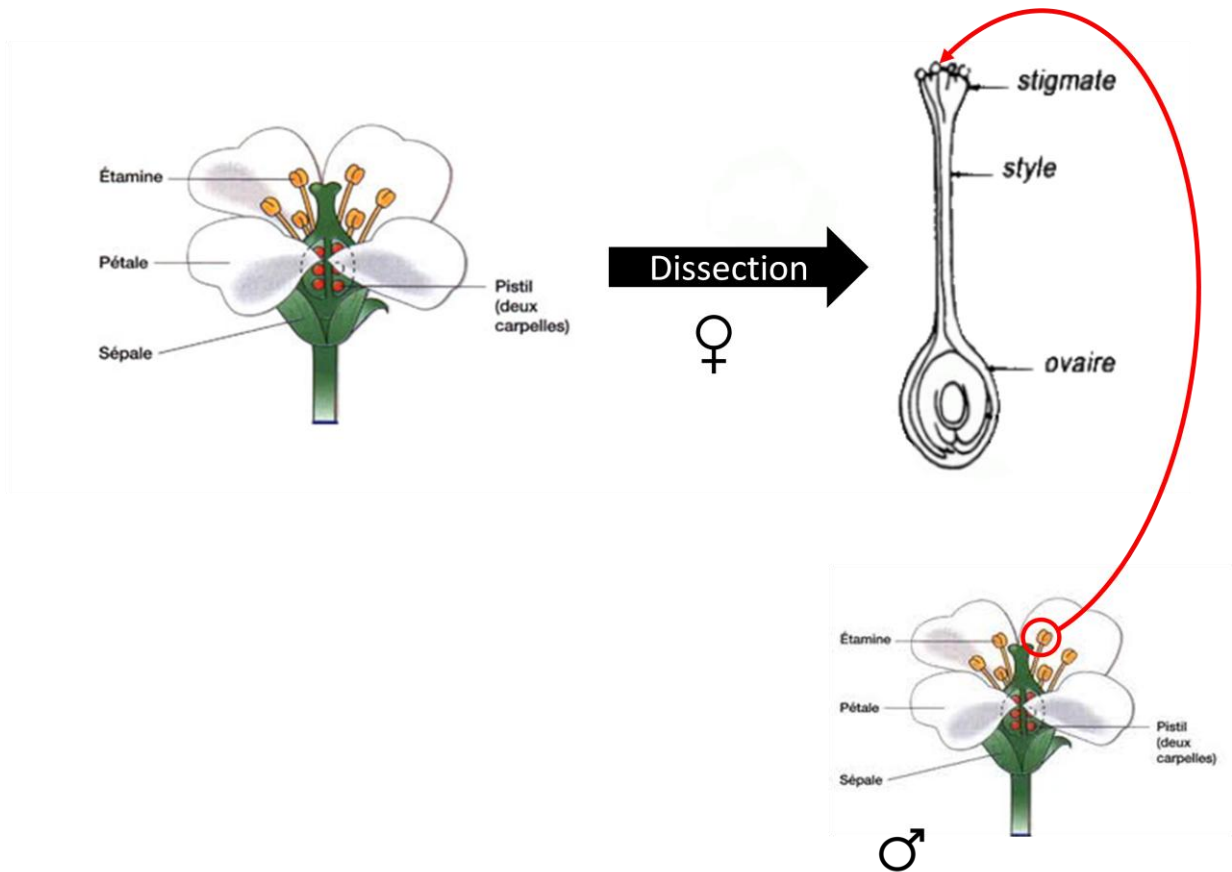


Figure 77. Principe de fécondation entre deux individus d'*Arabidopsis thaliana*

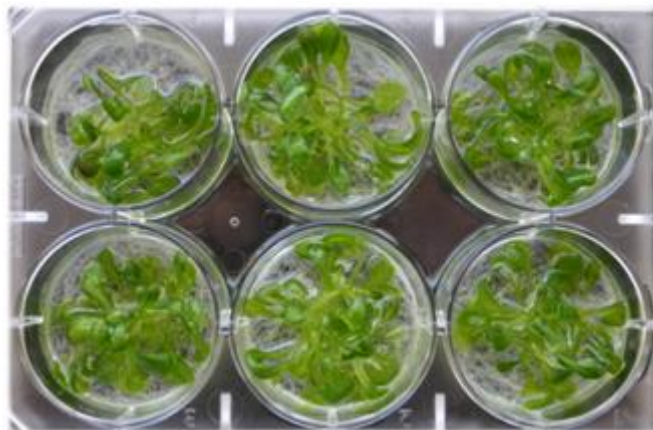


Figure 78. Culture hydroponique de Col0 à 20 jours
Milieu MS^{1/2} complet + glucose 100mM avec changement tous les deux jours.

I.C. CHAMBRE DE CULTURE

Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont cultivées dans une chambre phytotronique sous une thermopériode de 25°C/20°C, sous une photopériode 14h/10h (jour/nuit) et une irradiance de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$.

I.D. CROISEMENTS DES MUTANTS

Les croisements sont possibles environ 3 semaines après la germination. Les plantes sont cultivées dans un mélange terreau/vermiculite en proportion 3/1 (v/v). Il est indispensable que les premières siliques soient apparues et qu'il y ait certaines fleurs à anthèse. Sous la lampe binoculaire, disséquer une fleur au stade bourgeon floral (au tout début c'est-à-dire lorsque les pétales ressortent à peine des sépales, visuellement, un point blanc sur les sépales). L'objectif est de libérer le style en supprimant sépales, pétales et étamines (**figure.77**). Il faut impérativement et sans endommager la tige (ne pas écraser trop fort entre ses doigts) libérer le stigmate (le bout du style). Quand la fleur est bien disséquée, on choisit une fleur à anthèse de l'autre lignée à croiser. Pour reconnaître ce stade, les pétales seront à 90°. On vient tapoter les étamines chargées de pollen sur le style découvert de la fleur disséquée. Nous devons voir des granules jaunes/marron s'y coller. Ne pas oublier d'arracher les autres fleurs et siliques du bouquet floral afin d'éviter toute confusion.

I.E. CONDITIONS DE CULTURE

■ Culture en terre

Après vernalisation les graines sont cultivées en terre dans un mélange terreau/vermiculite en proportion 3/1 (v/v) et régulièrement traitées avec du VectoBac® à 0,5% afin de prévenir toute contamination par des larves de Sciarides.

■ Culture sur milieu solide complet

Après vernalisation les graines sont mises à germer sur un milieu MS $\frac{1}{2}$ solidifié avec 0,8% de phytoAgar HP696 à pH 6. Afin de faciliter la germination et le développement des graines, du saccharose à 1% est rajouté au milieu avant

Tableau XXI. Composition des milieux de culture Murashige & Skoog

Les données du tableau correspondent à des mg/1000mL. La concentration en fer de 2µM est choisie selon (Thibaud et al., 2010)

	Milieu complet (MS)	Milieu dépourvu de P	Milieu carencé en P	Milieu carencé en Fer
Boric Acid	6,2	6,2	6,2	6,2
Calcium Chloride anhydrous	332,2	332,2	332,2	332,2
Cobalt Chloride-6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
Cupric Sulfate-5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	37,26	37,26	37,26	37,26
Ferrous sulfate-7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	2,78
Magnesium Sulfate, anhydrous	180,7	330	330	180,7
Manganese Sulfate-H ₂ O	16,9	16,9	16,9	16,9
Molybdic Acid (Sodium Salt)-2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25
Potassium Iodide	0,83	0,83	0,83	0,83
Potassium Phosphate, Monobasic	170	0	34	170
Zinc Sulfate-7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6
Potassium nitrate	1900	1900	1900	1900
Ammonium nitrate	1650	1650	1650	1650

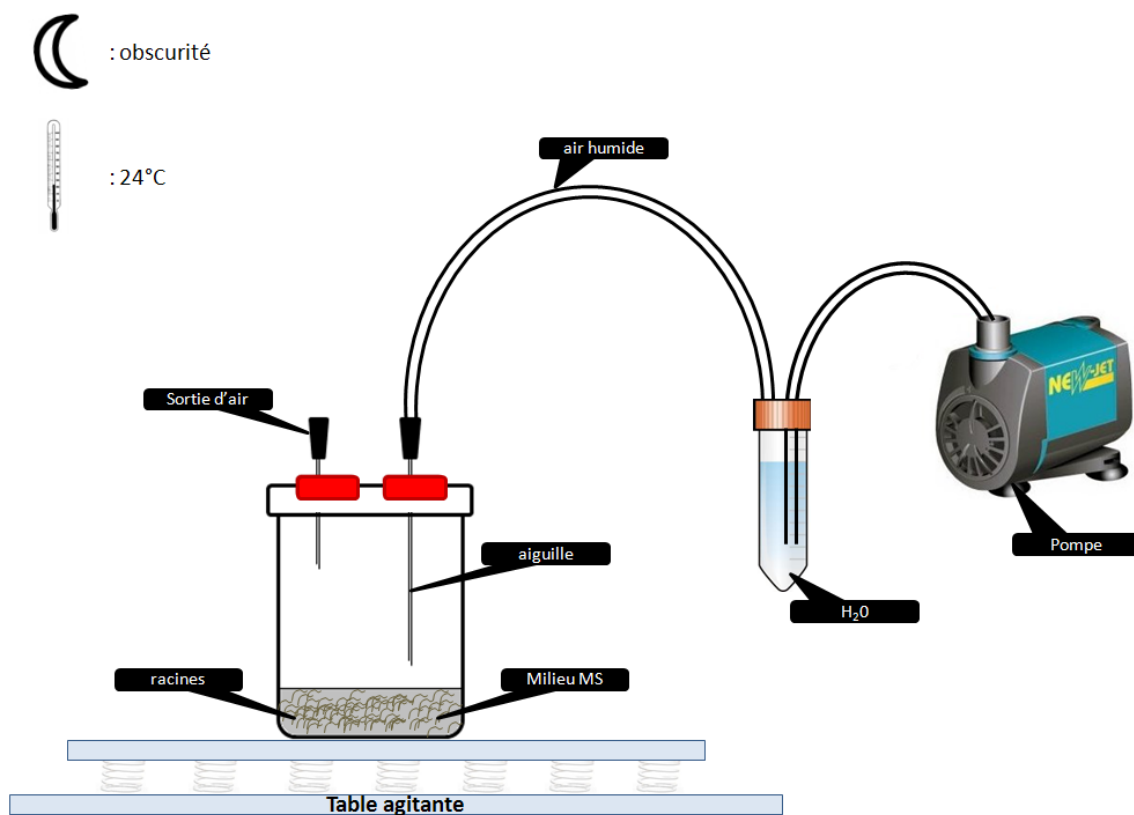


Figure 79. Montage utilisé dans la culture de racines d'*Arabidopsis thaliana*

stérilisation à l'autoclave (120°C pendant 20min). En fonction de l'objectif final, les graines sont semées à une densité allant de ~6 à ~70 graines/cm², le tout en condition stérile (Zhai et al., 2009). Un milieu MS½ modifié sera utilisé en fonction de la carence voulue (**tableau.XXI**).

■ Culture de plantules en milieu liquide

Après vernalisation, les graines sont mises à germer dans des boites 6 puits à une densité de 5 graines /3mL /puits. Le milieu de culture liquide complet est celui proposé dans le **tableau XXI** complémenté avec du glucose à 100mM. Les boites sont scellées avec du Scotch Millipore M3. Les boites sont déposées sur table agitante (80 rpm) en chambre de culture. Dès le 12^{ème} jour, le milieu est remplacé tous les deux jours par du milieu frais et stérile. Dès lors qu'il y a une carence à étudier, les graines sont mises à germer sur un milieu complet pendant 7 jours selon le principe évoqué dans le point précédent. À cette date, le milieu complet est remplacé par le milieu modifié tous les deux jours. Ce milieu modifié correspond à ceux présentés dans la **figure 78** ou au milieu complet MS½ + osmoticum (combinaisons mannitol/glucose ou fructose selon les résultats décrits dans la **figure 77** du premier chapitre), le tout en condition stérile.

■ Culture de tissu racinaire

Les plantules sont cultivées 20 jours en hydroponie selon la méthode décrite en amont puis les racines sont séparées des parties vertes de la plante sous hotte stérile. Elles sont successivement rincées dans de l'eau stérile et du milieu d'incubation, stérile également ; les racines sont ensuite immergées dans un milieu de culture MS stérile complémenté avec 200mM de glucose ou de fructose (Brouquisse et al., 1991; Bozzo et al., 2004; Jaquinod et al., 2007). Le volume nécessaire pour recouvrir totalement les racines et éviter l'évaporation est de 20mL. Le système de culture est scellé sous hotte et un apport constant d'O₂ humide par un système de pompes est mis en place dans une salle d'incubation thermostatée à 25°C (**figure.79**). L'entrée d'air humide se fait à travers un filtre 0,22µm, la sortie à travers un filtre 0,45µm.

I.F. PRÉPARATION DE PROTOPLASTES ET DE VACUOLES

■ Production de protoplastes de feuilles

Faire pousser des graines (~ 70 graines/cm²) sur milieu MS $\frac{1}{2}$ complet + saccharose à 1% pendant 10 à 12 jours. À l'aide d'une lame de rasoir, "raser" littéralement la partie aérienne des jeunes pousse et les hacher dans une boîte de Pétri, toujours à l'aide de la lame rectangulaire. Placer cet homogénat de feuilles dans 10mL de **tampon de digestion** (Baldet et al., 1993; Marquès et al., 2004). Placer sur table agitante (80 rpm), toujours à la lumière et à température ambiante pendant 3 à 4H. Effectuer des contrôles fréquents pour vérifier l'avancement de la digestion. Passé ce délai, diluer la suspension de digestion dans 10mL de **tampon CPW** modifié (Frearson et al., 1973). Filtrer la solution avec une toile en nylon (100 μ m) dans un tube de 50mL. Centrifuger 10 minutes à 400g à 4°C, éliminer le surnageant et le reprendre dans 2mL de **tampon CPW**. Préparer le gradient suivant dans un tube Corex en verre 15mL : **tampon percoll 25%** / **tampon sorbitol** (2,5v/1v). Déposer le mix de 2mL de tampon de vacuole (1v) à la surface. Centrifuger 10 minutes à 100g à 4°C. Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 10mL de **tampon CPW** pour rincer les protoplastes ; centrifuger 10 minutes à 200g à 4°C. Supprimer le surnageant et compléter avec 800 μ L de **tampon CPW** (le volume total tampon + protoplastes avoisine les 1 mL) (Zhai et al., 2009).

- **tampon de digestion** : mannitol 0,4M ; KCl 20mM ; Mes 20mM (pH 5,8 avec KOH); Cellulase Onizuka 410 2% (p/v) ; Macérozyme R10 0,4% (p/v) ; Pectolyase Y23 0,2% (p/v). Placer 10 minutes à 55°C, faire refroidir (plonger dans de l'eau glacée) et rajouter du CaCl₂ 10mM et de la BSA 0,1% (p/v) .
- **tampon CPW** : mannitol 0,63M ; KH₂PO₄ 0,2mM ; KNO₃ 1mM ; CaCl₂ 5,5mM ; MgSO₄ 2mM ; Mes 20mM (pH 5,8 avec KOH).
- **tampon sorbitol** : sorbitol 0,5M ; DTT 1mM ; KCl 30mM ; BSA 0,1% (p/v) ; Hepes 20mM (pH 7,2 avec KOH).
- **tampon percoll 25%** : tampon sorbitol/percoll 100% (3 v / 1 v)

■ Production de protoplastes de racines

Les graines sont mises à germer sur un milieu liquide MS $\frac{1}{2}$ + glucose 1% sur une toile de Culture (280 μ m). Au bout de 6 jours, les racines des plantules

dépassant de la grille sont séparées des feuilles, hachées puis digérées à l'aide du **tampon de digestion** (Bargmann and Birnbaum, 2010).

■ Isolement des vacuoles

À suivre directement après la purification des protoplastes pour une efficacité maximale. Les étapes suivantes se déroulent à 12°C (centrifugation) dans un tube en verre Corex 15mL, les tampons restent à 4°C. Les protoplastes sont repris dans 800µL de **tampon CPW**. Selon les besoins, colorer avec 5µL d'une solution de rouge neutre (rouge de toluidine) préparé en saturant du **tampon CPW** (centrifuger avant utilisation pour éviter les débris). Recouvrir la suspension de protoplastes par les solutions suivantes, en respectant les proportions indiquées : **tampon de lyse** (3v), **tampon 4%** (1,7v) et **tampon de vacuole** (1v). Centrifuger 25 minutes à 1000g (Fontes et al., 2010). Attendre environ 3 minutes avant de prélever les vacuoles dans la couche supérieure.

- **tampon de lyse** : mannitol 0,2M ; Ficoll 10% (p/v) ; EDTA 15mM ; Mops 10mM (pH 8 avec KOH). Rajouter la BSA 0,1% (p/v) et le DTT 2mM.
tampon de vacuole : mannitol 0,5M ; Mops 10mM (pH à 7,5 avec KOH) ; cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Sciences, Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail ; 1 pastille pour 15mL).
- **tampon 4%** : tampon de lyse à 0% Ficoll / tampon de vacuole (1v/1,5v).

II. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

II.A. CHOIX DES AMORCES

Les amorces sens et antisens sont générées à partir de l'outil iSct Primers disponible sur le site t-DNA express (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) (cf. **tableau.XIX**). À partir des références des "Germplasm" (e.g. SALK_006934, GABI_950D09) le logiciel calcule automatiquement le couple d'amorces notées LP et RP. Il est possible de choisir la taille de la séquence, le TM des amorces (température optimale d'hybridation) ou encore le pourcentage en GC. La séquence de ces amorces est par la suite comparée à la séquence nucléotidique du gène correspondant (ADNg) afin de vérifier la bonne hybridation entre le gène et les amorces. Les amorces amplifiant la bordure gauche LB (5' → 3') de l'insert du t-DNA sont récupérées dans la documentation du site tDNA

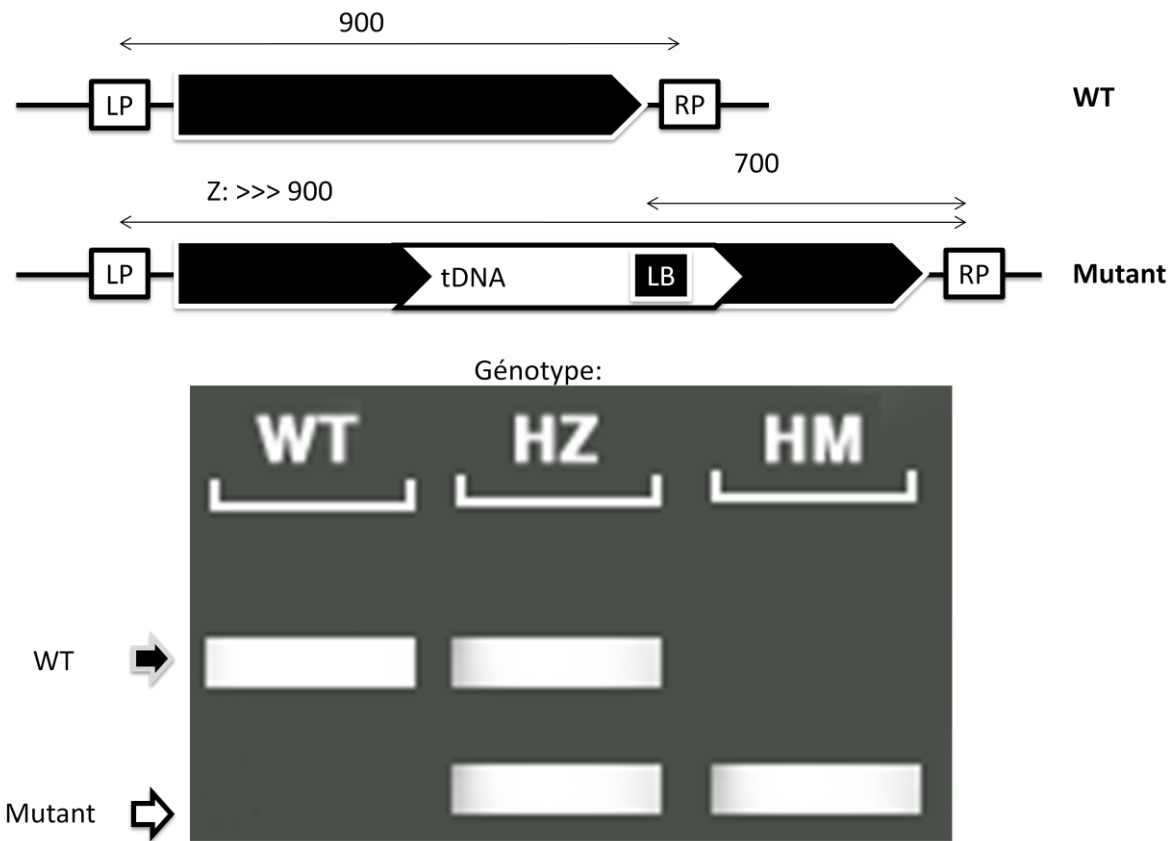


Figure 80. Principe de la sélection des mutants homozygotes par PCR (Polymerase Chain Reaction)

(A), Allèle sauvage et allèle mutant dans laquelle est inséré le t-DNA. (B), Résultat théorique de la réaction de PCR. Les allèles sauvages (WT) d'une taille d'environ 900pb migrent moins loin que les allèles mutants plus petits (taille d'environ 700pb). Le couple d'amorces LP/RP amplifiant le gène sauvage ne fonctionne pas lorsque le t-DNA est présent car la durée d'élongation du cycle PCR est trop courte.

express (SALK et SAIL), sur le site internet dédié aux ressources concernant GABI_Kat (<http://www.gabi-kat.de/duplofaq/confirmation-strategy.html>) ainsi que dans la littérature (WiscDsLox) (Woody et al., 2007) (**tableau.XX**).

II.B. VÉRIFICATION DE L'HOMOZYGOTIE

Les graines de mutants sont mises à germer sur milieux MS^{1/2} + saccharose 100mM à une densité d' ~6 graines/cm² comme précisé en amont. Les insertions de t-DNA dans les mutants sont vérifiées par PCR directement sur un fragment de feuille âgée d'environ 10 jours ce qui évite l'étape d'extraction d'ADN. Deux enzymes taq ont été utilisées, la Phire-taq® et la Terra-taq®. Nous amplifions l'ADN à l'aide de deux jeux d'amorces, LP/RP et LB/RP. Le couple LP/RP permet d'amplifier un fragment sauvage du gène d'intérêt alors que le couple LB/RP amplifie un morceau de l'insert t-DNA et du gène d'intérêt (**figure.80**). Il est important de travailler sur un temps d'élongation permettant d'amplifier une taille d'environ 1Kb. Le t-DNA étant inséré au milieu du gène, la taille du fragment t-DNA + gène est très supérieure à 1Kb, donc si nous travaillons sur un temps d'élongation court, le couple d'amorces LP/RP ne pourra pas amplifier le t-DNA + gène chez le mutant d'insertion.

II.C. CYCLES PCR

La T_m utilisée est de 60°C, le volume de réaction est de 25µL, le nombre de cycles varie entre 30 (Phire-taq) et 32 (Terra-taq) :

- Dénaturation initiale 95°C (phire-taq) ou 98°C (Terra-taq)
 - o Dénaturation 98°C 10 sec
 - o Hybridation 60°C 15 sec
 - o Elongation 68°C 60 sec
- Extension finale 72°C 60sec
- Maintien à 4°C "∞"

(http://www.finnzymes.com/pcr/phire_hot_start_dna_polymerase.html
& <http://www.clontech.com>)

II.D. CONFIRMATION DE L'HOMOZYGOTIE

Après avoir génotypé les mutants homozygotes (*cf.* II.B.), nous avons validé l'insertion du t-DNA sur le gène ciblé par séquençage. Les séquences nucléotidiques amplifiées par PCR sont purifiées sur colonnes (Wizar®SV Gel and PCR Clean-Up System) et envoyées à séquencer avec les amorces (5' → 3') de l'insert (LB) chez Beckman Coulter Genomics. La présence de l'insert et du gène peut ensuite être vérifiée.

III. ANALYSES MÉTABOLIQUES ET ENZYMATIQUES

III.A. RESPIRATIONS DES RACINES

Les mesures de consommation d'O₂ sont systématiquement effectuées sur environ 20mg poids frais de racines ; ces racines proviennent, soit de culture hydroponique de plantules âgées de 12 à 20 jours (*cf.* I.E.), soit de tissu racinaire en culture (*cf.* I.E.). Le matériel utilisé est un oxymètre (StrathKelvin Instrument, model 782) couplé à une électrode (EH100) et à une chambre de mesure en verre (RC300) du même constructeur). Les données sont enregistrées et analysées à l'aide du logiciel Oxygen system® du constructeur. La chambre de mesure, thermostatée à 25°C, est remplie avec 1,5mL de milieu d'incubation, saturé par l'air ambiant (21 % O₂) et calibré à 240 nmol O₂.mL⁻¹, sous agitation constante à l'aide d'un électro-aimant. Lorsque la dérivée de la consommation d'O₂ est stable, les racines sont enlevées de la cuve de mesure, rincées à l'eau, tamponnées sur du papier absorbant puis pesées. Un minimum de 3 mesures par tapis est effectué.

III.B. EXTRACTION DES TISSUS ET SÉPARATION DE COMPOSÉS INTRACELLULAIRES

■ Extraction des composés hydrosolubles

Après prélèvement, pesée, congélation dans l'azote liquide et conservation à -80°C, les échantillons sont lyophilisés et pesés. L'extraction éthanolique et à chaud des composés hydrosolubles est faite comme décrit dans (Stitt and ap Rees, 1978). Les volumes utilisés sont de 3mL pour un poids sec compris entre 15 et 50mg MS. Les tissus sont recouverts d'une solution éthanolique à 80% (v/v) à 80°C et conservés à cette température pendant 15 minutes. Le surnageant est récupéré. Cette opération est répétée avec une solution éthanolique à 50%, puis avec de l'eau milliQ, toujours à 80°C. Un dernier rinçage

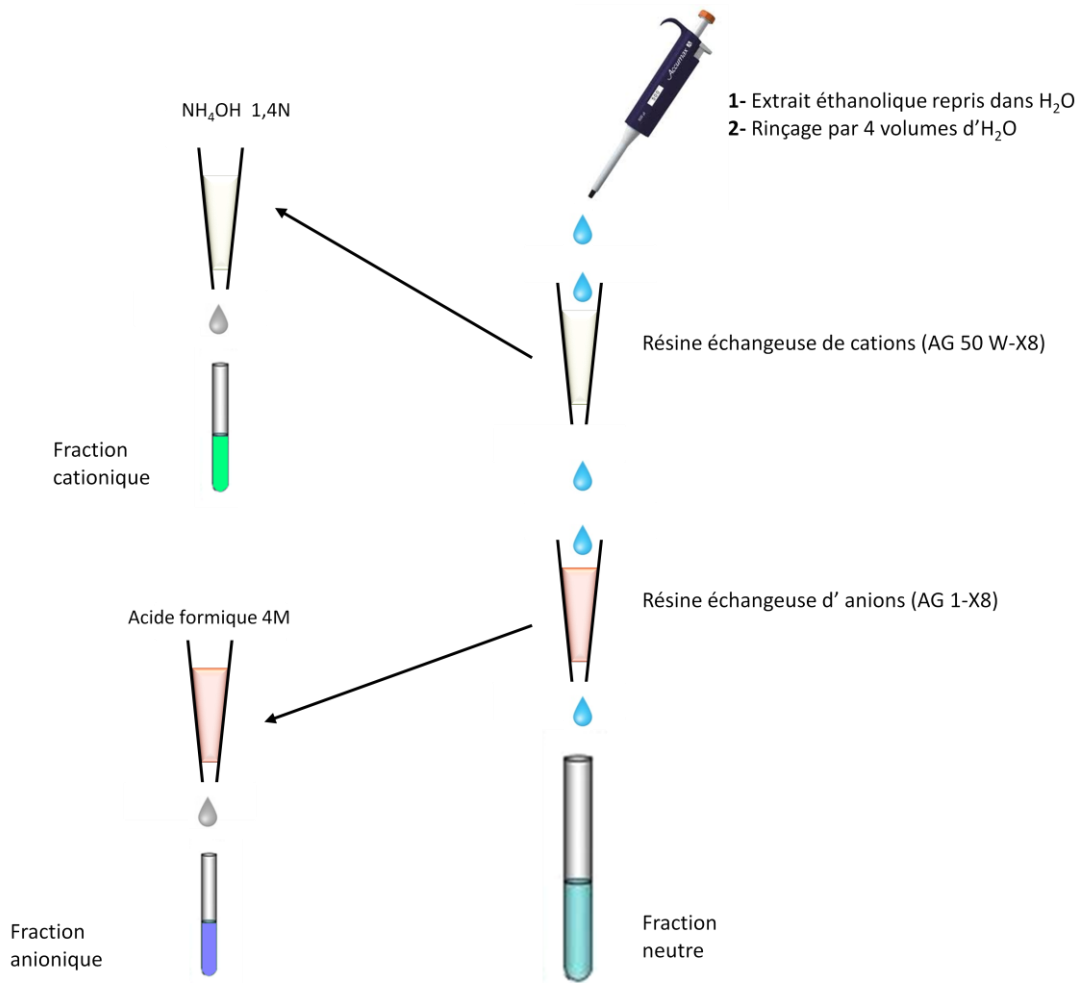


Figure 81. Séparation des fractions neutre, anionique et cationique des composés hydrosolubles

avec de l'eau milliQ à 80°C sans incubation est également effectué pour bien rincer la fraction insoluble de l'extrait racinaire. Les surnageants sont rassemblés et évaporés au speedvac. Les résidus secs sont repris dans un volume d'H₂O déterminé en fonction du poids de matière sèche à raison de 1mL pour 0,1g de matière sèche, soit 1mL pour 1g de matière fraîche.

■ Séparation des fractions neutre, anionique et cationique des composés hydrosolubles.

Les résidus secs des surnageants hydroalcooliques sont repris dans 500µL d'H₂O. Les composés solubles sont successivement passés sur résines cationique et anionique. Les deux résines sont rincées par 4 volumes d'eau milliQ. Cet effluent contenant les composés non retenus constitue *la fraction neutre* composé principalement de sucres solubles.

- La fraction cationique : Cette fraction est collectée par passage de l'extrait sur une résine échangeuse de cations (AG 50 W-X8, forme H⁺) et élution par 4 volumes d'une solution d'ammoniac (NH₄OH) 1,4 N.
- La fraction anionique : Cette fraction est purifiée par passage de l'extrait sur une résine échangeuse d'anions (AG 1-X8, forme formate) et élution par 4 volumes d'acide formique 4 M.

Enfin, ces trois fractions sont asséchées au speedvac (Alonso, 2003)(**figure.81**).

III.C. SÉPARATION ET DOSAGE DU SACCHAROSE, GLUCOSE ET FRUCTOSE PAR HPLC

La fraction neutre est reprise dans un volume d'H₂O milliQ équivalent à 50mg MS.mL⁻¹ puis centrifugée à 6000g pendant 4 minutes. Les sucres solubles sont analysés sur une colonne Aminex HPX-87C Column, 300 x 7,8 mm, équipée d'une précolonne Micro-Guard® Carbo-C Refill, 30 x 4,6, mm, chauffées à 80°C, à un débit d'eau milliQ de 0,5 mL.min⁻¹. Pour le dosage du saccharose, du glucose et du fructose, la détection des sucres en sortie de colonne se fait par réfractométrie. La quantification est réalisée à partir de l'aire du pic après une standardisation externe à l'aide du logiciel Millenium Chromatography manager. Pour la détermination de la radioactivité spécifique de ces mêmes sucres, un collecteur de fractions est branché en fin de colonne (cf. V-B). Le volume d'injection peut varier de 10 à 100 µL en fonction des échantillons et de l'analyse en fin de colonne (réfractomètre ou collecteur).

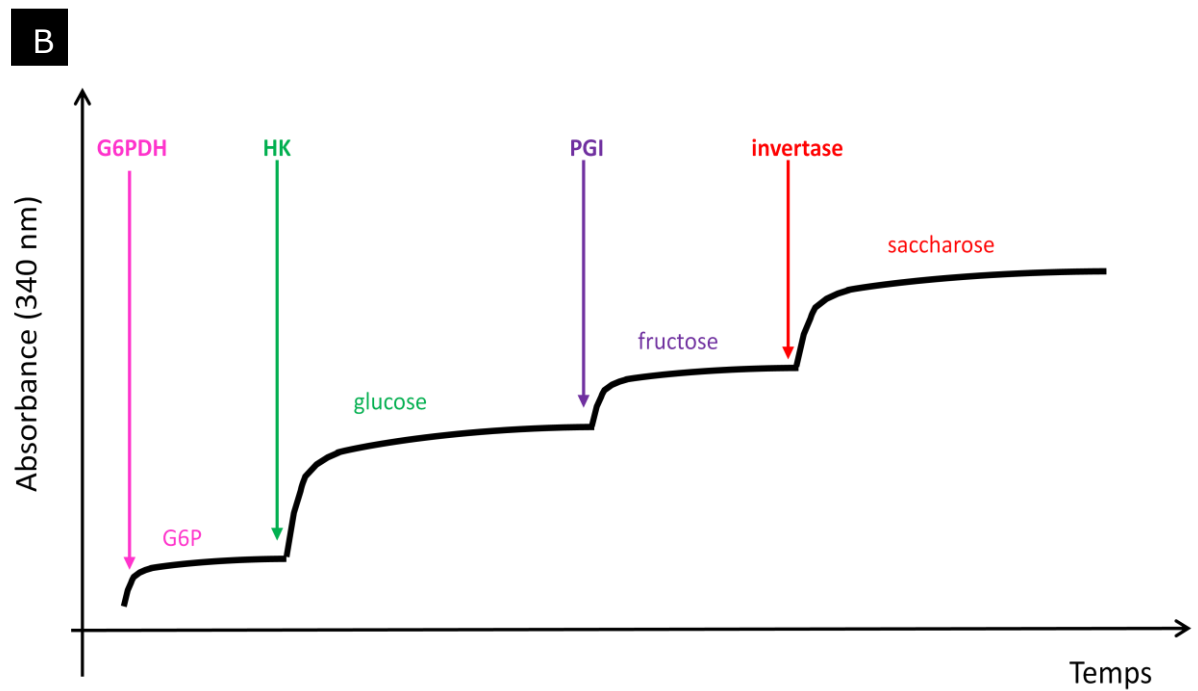
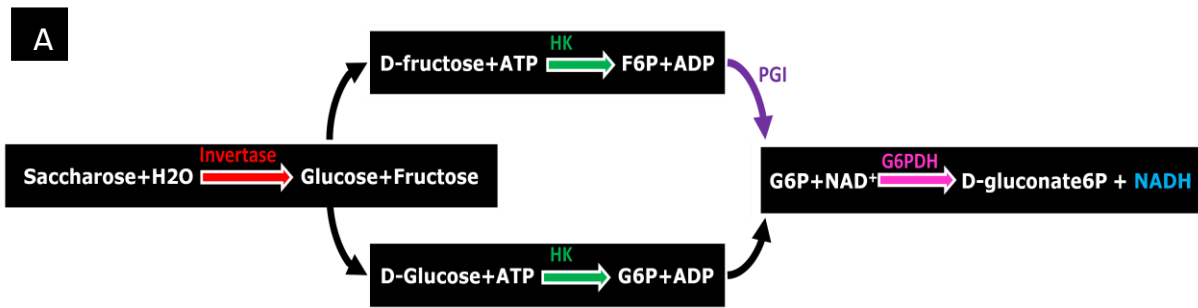


Figure 82. Principe des dosages des sucres par la méthode enzymatique

(A) Enzymes mises en jeu dans ce protocole de dosage. (B) Sucre dosé en fonction de la nature de l'enzyme ajoutée au mix.

III.D. DOSAGES ENZYMATIQUE DES MÉTABOLITES

■ Dosage du G6P, du glucose, du fructose et du saccharose par la méthode enzymatique

Au spectrophotomètre, ajouter dans une cuve 10 à 100 μL d'essai; ATP 1mM ; NAD^+ 1mM ; MgCl_2 1mM ; **tampon PiK** QSP 1000 μL . Bien agiter puis lire la DO à 340nm en mode cinétique. Le dosage du G6P se fera par l'addition de 1 U de G6PDH à NAD^+ , le dosage du glucose, par l'ajout de 2U d'hexokinase (HK), le dosage du fructose, par l'ajout de 1U de phosphoglucoisomérase (PGI) et le dosage du saccharose par l'ajout de 10 μL d'une solution d'invertase saturée (dans 1mL de tampon, rajouter l'enzyme jusqu'à ce qu'elle ne se dissolvent plus). Les quantités de sucres sont déduites en utilisant un coefficient d'extinction molaire du NADH de 6,2 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**Figure.82**).

- **tampon PiK** : EDTA 1 mM ; K_2HPO_4 25mM ; KH_2PO_4 25mM (pH 7,5 avec KOH).

■ Extraction perchlorique et dosage de l'ATP et de l'ADP

L'extraction acide est réalisée à 0-4°C à partir d'environ 50 mg de poudre de matière fraîche auxquels 400 μl d'un mélange d'acide perchlorique (PCA) / EDTA (1 M/25 mM) sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés à 16000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est neutralisé en ajoutant un mélange KOH/Mops (3 M/0,3 M) jusqu'à une valeur de pH comprise entre 5,5 et 6,5 puis centrifugé à 16000 g pendant 10 min à 4°C. Le dosage doit être réalisé extemporanément sur le surnageant pour éviter toute dégradation de l'ATP. Il est effectué grâce au kit ATPlite 1 step (PerkinElmer) contenant la luciférine-luciférase (réactif AMR). Plusieurs répliquas technologiques sont réalisés en utilisant différents volumes de surnageant. Le mélange réactionnel contenant l'extrait contient 50 μl (QSP) de **tampon Tris** 0,1 M Tris-acétate (pH 7,7 avec KOH), 2 mM EDTA et 50 μl d'AMR. Pour l'ATP, la réaction est la suivante: $\text{AMR} + \text{ATP}_1 \rightarrow \text{AMR} + \text{AMP} + \text{PPi} + h\nu_1$. Pour la somme ATP+ADP, deux réactions successives sont générées :

(1) $\text{ADP} + \text{PEP} \rightarrow \text{ATP}_2 + \text{pyruvate}$

en présence de 0,5 unité de pyruvate kinase pendant 15 min pour transformer tout l'ADP en ATP dans 50 μl qsp de tampon 0,1 M Tris-acétate, 2 mM EDTA (pH 7,7 avec KOH).

(2) $\text{AMR} + \text{ATP}_{1+2} \rightarrow \text{AMR} + \text{AMP} + \text{PPi} + h\nu_{1+2}$

en présence de 50 µl d'AMR. L'émission de lumière par la luciférine ($h\nu_1$ et $h\nu_{1+2}$) est mesurée pendant 10 secondes au luminomètre (BioOrbit). Les concentrations sont déduites de gammes étalons en ATP de 5 à 100 pmoles.

III.E. DOSAGES COLORIMÉTRIQUES

■ Dosage du phosphate inorganique (Pi)

Placer les échantillons à doser en présence de **réactif molybdate** puis, placer 30 minutes à l'obscurité sous agitation constante et lire la DO à 610 nm. En parallèle, une courbe étalon de Pi (1 à 10 nmol de PiK ou 50 à 400 nmol de PiK, selon la sensibilité du réactif) est préparée.

- **réactif molybdate**: selon la quantité de Pi présent dans l'essai, deux types de réactifs sont utilisés. Le premier, de plus faible sensibilité (Sumner, 1944), consiste à ajouter à l'essai (QSP 3 mL) le mélange réactionnel suivant : 0,75 N H₂SO₄, 0,66 % (p/v) heptamolybdate d'ammonium, 0,8 % sulfate ferreux (préalablement dissous dans 7,5 N d'H₂SO₄). Le second, de plus forte sensibilité (Cogan et al., 1999), consiste à ajouter à l'essai (QSP 0,8 mL) les deux réactifs suivants : 172 µL de 28 mM heptamolybdate d'ammonium (dissous dans 2,1 N d'H₂SO₄) et 128 µL de 0,75 mM vert malachite (dissous dans de l'eau milliQ contenant 0,35 % (v/v) de Nonidet NP40).

■ Dosage des protéines

Les protéines sont dosées à l'aide du réactif Coomassie Plus - The Better Bradford™ Assay Reagent (Pierce). La gamme étalon est obtenue par dilution sériée d'une solution mère de BSA à 2mg.mL⁻¹. La lecture est effectuée à 595nm au lecteur microplaque "Thermo Labsystems Multiskan Ascent".

III.F. DOSAGES DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

Une unité internationale (1Ui) représente la transformation d'une µmole de substrat ou la production d'une µmole de produit par minute. Quel que soit le protocole de dosage, la proportionnalité de l'activité mesurée en fonction du volume d'essai a été vérifiée.

■ Préparation des échantillons

À partir d'environ 200mg de matière fraîche, broyer finement les tissus au broyeur à bille (Retsch MM300 Tissue lyser ; préférer les tubes 2mL à fond rond à vis + 1 bille de tungstène). Procéder en 3 étapes successives (3 x 60 sec à 30Hz) en replongeant à chaque pause les échantillons dans de l'azote liquide. Rajouter le **tampon d'homogénéisation** à 4°C (1mL pour 200mg MF) ; incubé dans la glace pendant 1 minute puis centrifuger à 2000g pendant 5 minutes, toujours à 4°C.

- **tampon d'homogénéisation**: EDTA 10mM ; Triton X100 1% (v/v) ; BSA 1% (p/v); Tris 50mM (pH 7,5 avec KOH). Les composés qui suivent sont à rajouter le jour même de l'expérience : DTT 2,6mM et cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Sciences, cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail ; 1 pastille pour 15mL).

■ Activité phosphatase acide et neutre

Le volume d'essai (5 à 100 µl) est incubé dans 1 mL QSP de **tampon acide** ou le **tampon neutre**. Placer au bain Marie à 25°C et démarrer par l'addition du substrat (5mM de G6P, de F6P ou d'ATP). Prélever à 5, 10, 20 et 40 minutes 180 µL de la solution et la placer dans un tube 0,5mL contenant 20µL de PCA à 35% (v/v) afin de bloquer la réaction, agiter. L'activité phosphatase est quantifiée en mesurant la quantité de Pi apparue. Pour cela, centrifuger les tubes à 2000g pendant 5 minutes, prélever 40µL du surnageant et rajouter 200µL de **réactif molybdate de sensibilité appropriée**.

- **tampon acide**: EDTA 1mM, MgCl₂ 1 mM, acétate d'ammonium 50mM (pH 5 avec KOH).
- **tampon neutre**: EDTA 1mM ; MgCl₂ 10mM ; Hepes 50mM (pH 7,5 avec KOH).

■ Activité invertase acide et neutre

Prélever 50 à 100 µL d'essai dans du **tampon acide** ou du **tampon neutre** (QSP = 1000 µL). Placer au bain Marie à 25°C, démarrer la réaction en ajoutant 8 mM saccharose et prélever à 5, 10, 20 et 40 minutes 180µL de la solution et la placer dans un tube contenant 50µL de 500mM de NaOH afin de stopper la réaction, bien agiter. La méthode étant basée sur un dosage enzymatique, l'essai

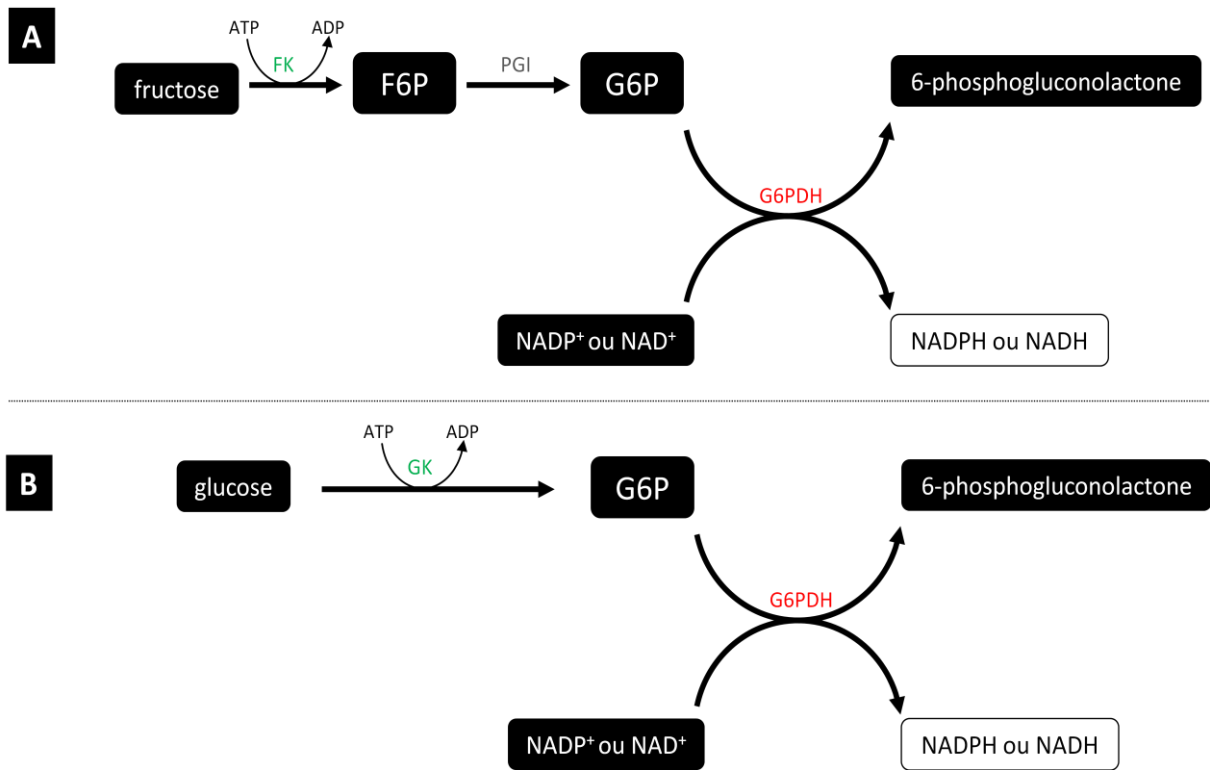


Figure 83. Principe du dosage de l'activité fructokinase (A) et glucokinase (B)

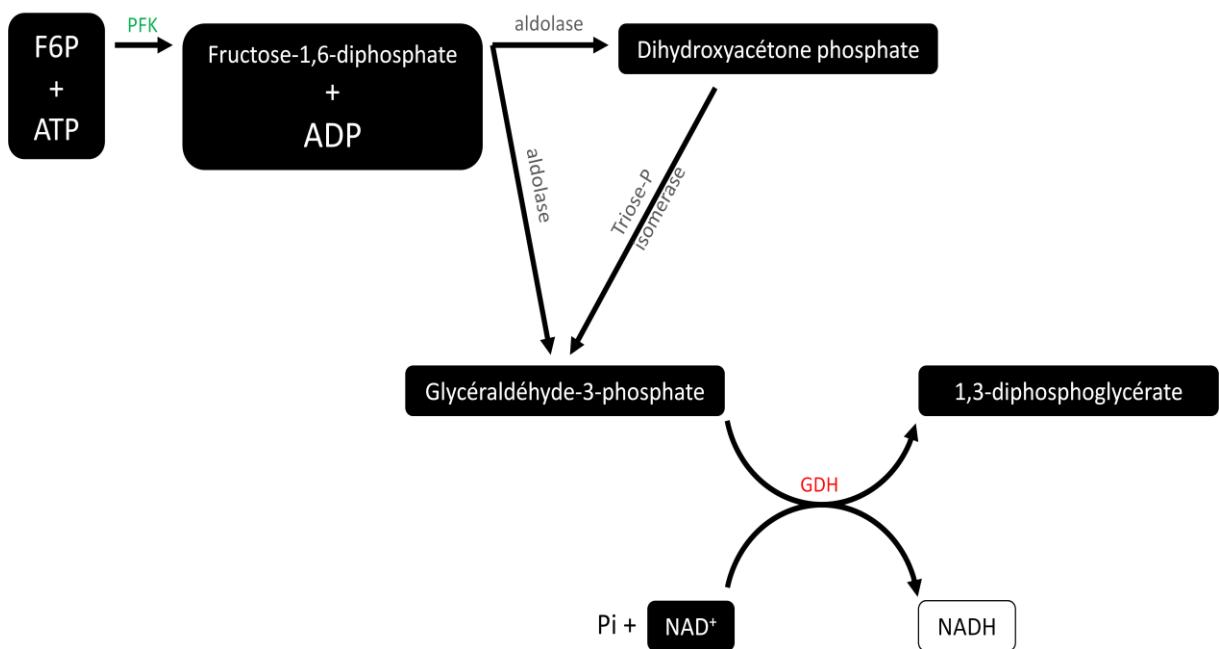


Figure 84. Principe du dosage de l'activité phosphofructokinase

est neutralisé avant dosage avec 50 μ L de 500mM d'HCl. Centrifuger les tubes à 2000g pendant 5 minutes, prélever 20 μ L du surnageant pour y doser le glucose et le fructose apparu selon le protocole décrit en amont.

■ Activité PEP phosphatase acide

Prélever 10 à 100 μ L d'essai, rajouter du MgCl₂ 1 mM ; de la lactate déshydrogénase (LDH) 0,5U ; NADH 100 μ M. Compléter avec du **tampon acide** à QSP = 600 μ L. Démarrer la réaction pour l'ajout de 4 mM de PEP et suivre la disparition du NADH à 340nm au spectrophotomètre (SAFAS, Monaco) thermostaté à 25°C. L'activité est calculée à partir des pentes initiale du graphe $DO_{340nm} = f^\circ(\text{temps})$ et en utilisant un coefficient d'extinction molaire du NADH de 6,2 mM⁻¹.cm⁻¹.

■ Activités gluco- (GK) et fructokinase (FK)

Prélever 10 ou 20 μ L d'essai, rajouter du MgCl₂ 1 mM, du glucose (activité glucokinase) ou du fructose (activité fructokinase) 2mM ; glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) 1U ; NADP⁺ 0,5mM ; PGI 1U (activité fructokinase). Compléter avec du **tampon neutre** à QSP = 450 μ L. Démarrer la réaction par l'ajout de 1 mM d'ATP et suivre l'apparition du NADPH à 340nm au spectrophotomètre (SAFAS, Monaco) thermostaté à 25°C. L'activité est calculée à partir des pentes initiale du graphe $DO_{340nm} = f^\circ(\text{temps})$ et en utilisant un coefficient d'extinction molaire du NADPH de 6,2 mM⁻¹.cm⁻¹. (**figure.83**).

■ Activité phosphofructokinase (PFK)

Prélever 10 à 20 μ L d'essai, rajouter du F6P 5mM ; aldolase 1U ; triose phosphate isomérase 1U ; glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GDH) 2U ; NADH 100 μ M. Compléter avec du **tampon neutre** QSP = 500 μ L (**figure.84**). Démarrer la réaction pour l'ajout de 1 mM d'ATP et suivre la disparition du NADH à 340 nm (cf. IV-I).

■ Activité saccharose synthase (SUSY) et saccharose phosphate synthase (SPS)

A 10 ou 20 μ L d'essai , rajouter du MgCl₂ 1 mM ; G6P 17,5mM (activité SPS) ; pyruvate kinase 1U ; lactate déshydrogénase 1U ; NADH 0,2mM ; PEP 2mM ; UDPG 2mM (activité SuSy) ou 30mM (activité SPS). Compléter avec du **tampon neutre** à QSP = 500 μ L. Enregistrer le cinétique pendant quelques minutes puis

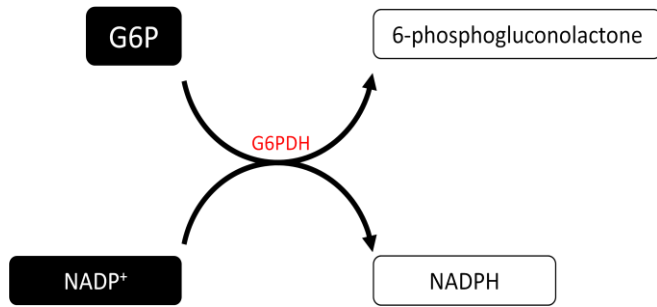
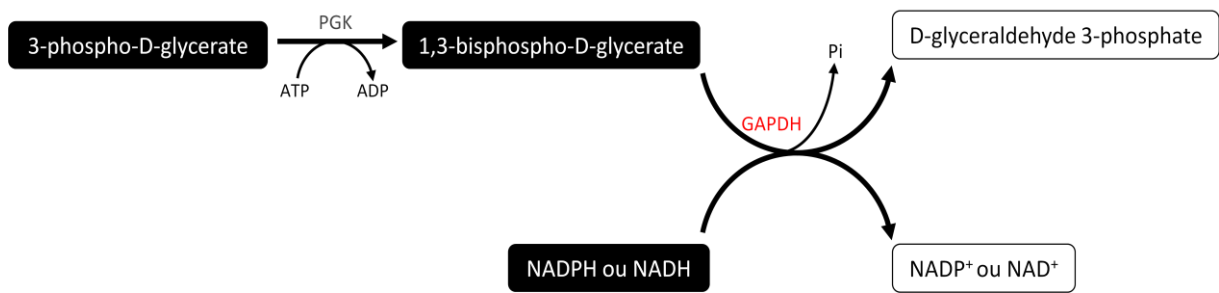
A**B**

Figure 85. Principe du dosage de l'activité G6PDH (A) et GAPDH (B)

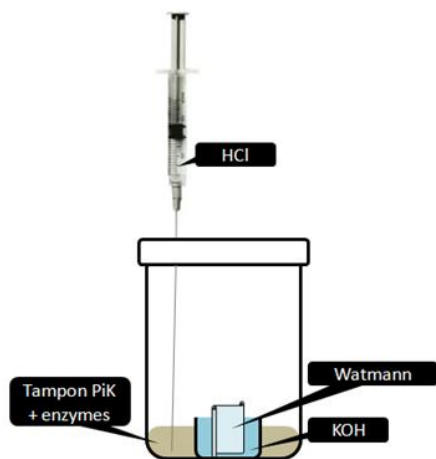
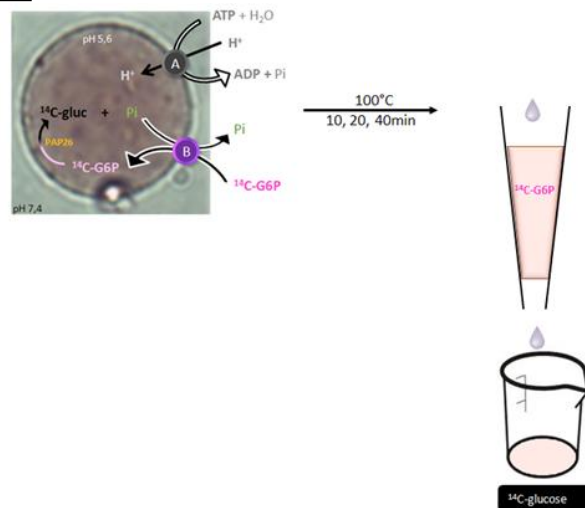
A**B**

Figure 86. Détermination de la RAS du G6P (A) et de l'activité G6Pase sur vacuoles isolées (B)

démarrer la réaction pour l'ajout de 0,1 mM de fructose (activité Susy) ou 5 mM de F6P (activité SPS) et suivre la disparition du NADH à 340 nm (cf. IV-I).

■ Activité α -mannosidase

Mélanger 5 à 10 μ L d'essai à QSP = 50 μ L de **tampon citrate** dans une microplaque protégée de la lumière. Démarrer la réaction par l'ajout de 0,5 mM 4-méthylumbelliferyl- α -mannopyranoside (MUM) (préparée extemporanément dans l'eau chaude). Agiter et incuber à 25°C ; à plusieurs temps (t=0min, 5min, 10min, 20min, 40min, 60min), rajouter 130 mM de Na₂CO₃ pour stopper la réaction. Agiter puis déterminer la fluorescence de la 4-méthylumbellifère (MU) à l'aide d'un spectrofluorimètre (SAFAS Xenius XC, Monaco). En parallèle, une gamme étalon de MU est construite (2, 20, 50 et 100 μ M). Les réglages de l'appareil sont les suivants : λ excitation = 360nm ; λ émission = 450nm. La tension du tube photomultiplicateur (PM) est ajustée sur la plus haute concentration de la gamme de MU (Mora-Montes et al., 2004).

- **tampon citrate**: Citrate 100mM (pH 4,5 avec KOH).

■ Activité glucose-6-phosphate déshydrogenase (G6PDH)

Rajouter au volume d'essai (10 à 100 μ L) du MgCl₂ 1mM et NADP⁺ 0,5mM. Compléter avec du **tampon PiK** à QSP = 500 μ L. Démarrer la réaction par l'ajout de 5 mM de G6P et suivre l'apparition du NADPH à 340nm (cf. IV-L) (**figure.85**).

■ Activité glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) a NADP⁺ et a NAD⁺

Rajouter au volume d'essai (10 à 100 μ L) du MgCl₂ 1mM ; ATP 5 mM ; NADPH 100 μ M (GAPDH à NADP⁺) ou NADH 100 μ M (GAPDH à NAD⁺); triose-P isomérase 1U ; phosphoglycérate kinase (PGK) 10 U. Compléter avec du **tampon PiK** à QSP = 500 μ L. Démarrer la réaction par l'ajout de 2 mM de 3-phosphoglycérate et suivre l'apparition de NADPH (GAPDH à NADP⁺) ou de NADH (GAPDH à NAD⁺) à 340nm au spectrophotomètre (SAFAS, Monaco) thermostaté à 25°C. L'activité est calculée à partir des pentes initiale du graphe $DO_{340nm} = f^\circ$ (temps) et en utilisant un coefficient d'extinction molaire du NADPH et du NADH égal à 6,2 mM⁻¹.cm⁻¹ (**figure.85**).

■ Marquage de tissu racinaire en culture

Les racines sont cultivées 24H avec un milieu MS complétement avec du 200 mM de glucose ou de fructose froid afin de les acclimater au stress de coupe. A différents temps (J+1 , J+2 ou J+3), les racines sont prélevées et placées dans 10mL de milieu MS complétement avec 200mM de [U-¹⁴C] glucose ou de [U-¹⁴C] fructose à une valeur de RAS entre 30 à 80 dpm.nmol⁻¹. Les prélèvements se font ensuite entre 10 minutes et 24H. Pour les temps supérieurs à 4H, le CO₂ est piégé dans de la potasse. Les racines sont rincées avec du milieu froid glacé et de l'eau glacé et congelées dans l'azote liquide en trois parties aliquotes. Dans toutes les analyses, les radioactivités seront normalisées à la RAS du précurseur au moment de l'incubation pour comparer les expériences entre elles.

■ Détermination de la RAS du saccharose, du glucose et du fructose

La radioactivité spécifique (ou RAS) d'un métabolite est la quantité de radioactivité par mole de ce métabolite. Les sucres sont séparés et quantifiés par HPLC (*cf.* IV.E.). Cinquante microlitres d'extraits (*cf.* IV.D) sont injectés puis les trois sucres sont collectés en sortie de colonne par un collecteur. Le rendement de collecte est calculé par l'injection d'une solution de sucre de RAS connue. La radioactivité est quantifiée au compteur à scintillation en utilisant le liquide à scintillation Ultima Gold®, Perkin Elmer).

■ Détermination de la RAS du G6P

Dans un premier temps le G6P est dosé enzymatiquement selon la méthode décrite en IV.B. Dans un second temps, la concentration en G6P dans les extraits à doser est amenée à la valeur de 0,5 mM par l'ajout de G6P froid. Les essais sont placés dans un **tampon PiK** (QSP 0,5 mL) avec de la glucose-6-phosphate déshydrogénase à NADP⁺ (G6PDH) 3U, de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (PGDH) 2U et du NADP 3mM. Au centre d'une fiole de 30mL fermée hermétiquement se trouve un récipient contenant un fragment de papier Watmann imbibé d'une solution de KOH à 2% . Incuber 1H45 puis injecter dans le milieu réactionnel à l'aide d'une seringue une solution de HCl (100mM final). L'acidification entraîne la libération du CO₂ radioactif qui se trouve désormais piégé dans le KOH du papier Watmann. Ce dernier est récupéré et le récipient central est rincé et la radioactivité est quantifiée au compteur à scintillation. Le

rendement de la décarboxylation (de l'ordre de 60 à 70%) est déterminé en utilisant des solutions standards de [U-14C] G6P et en mesurant la production de NADPH au spectrophotomètre à partir d'une solution étalon de G6P. Le CO₂ radiomarqué doit être multiplié par 6 pour calculer la RAS du [U-14C] G6P.

■ Activité G6Ppase sur vacuoles intactes

Compléter la suspension de vacuoles isolées à 1,5mL avec du **tampon sorbitol**, rajouter de l'ATP 5mM. Démarrer la réaction en ajoutant 5 mM de [U-14C]-G6P 100 dpm.nmol⁻¹. Prélever 500µL à 10, 20 et 40 minutes et bloquer la réaction en plaçant les 10 minutes à 100°C. Déposer les prises d'essais sur une colonne échangeuse d'anions (AG 1-X8) et laver la colonne avec 4 volumes d'eau. Le ¹⁴C-G6P est piégé dans la colonne, le ¹⁴C-glucose est récupéré en sortie de colonne ; évaporer au speedvac la fractions récoltée puis reprendre dans 200µL d'eau. Quantifier la radioactivité au compteur à scintillation (**figure.86**).

- **tampon sorbitol**: Sorbitol 0,5M ; DTT 1mM ; KCl 30mM ; BSA 0,1% (p/v) ; Hepes 200mM (pH 7,2 avec KOH).

IV. TRAITEMENT DES DONNÉES PAR INFORMATIQUE

■ Tests statistiques

Les écarts des valeurs expérimentales correspondent aux écarts types ou aux écarts moyens. Le type d'écart utilisé est systématiquement précisé, ainsi que le nombre de mesures pour les calculer. Les tests statistiques présentés sont des test de Student calculés à partir des formules Excel 2007.

■ Régressions mathématiques

Les régressions linéaires et non linaires sont faites en utilisant la fonction SOLVEUR d'EXCEL 2007 ou en utilisant le logiciel Kaleidagraph. Dans ce dernier cas, les erreurs sur les paramètres sont calculées.

■ Modélisation : utilisation du logiciel COPASI

L'élément "Steady-state" permet de calculer les concentrations des espèces à l'état stationnaire métabolique. Les résultats concernent uniquement les espèces qui ont été définies comme étant des variables, c'est-à-dire dont l'option "Simulation Type" est renseignée avec le paramètre "Reactions".

ii) L'élément "Sensitivities" permet d'effectuer des tests de sensibilité du modèle. Elle consiste à mettre en évidence les paramètres fixes du modèle (V_{max} , K_m , K_{eq} , K_i , cofacteurs, *etc.*) qui ont le plus d'influence sur les variables calculées à l'état stationnaire.

iii) L'élément "Optimization" permet quant à lui, grâce à l'ajustement de certains paramètres, de faire converger les concentrations calculées par le modèle à l'état stationnaire vers les valeurs de ces mêmes concentrations obtenues expérimentalement.

iv) L'élément "Time-course" permet de calculer les concentrations des espèces en fonction du temps. Nous utiliserons cet outil pour simuler les cinétiques de marquage de certains métabolites à partir d'un précurseur radioactif et ceci à l'état stationnaire métabolique. Cette simulation nécessite de modifier sensiblement le paramétrage du modèle : les concentrations des espèces chimiques sont fixes et égales aux valeurs déterminées par l'outil "steady-state" et les variables du modèle deviennent les radioactivités spécifiques de ces mêmes espèces.

v) L'élément "Metabolic Control Analysis" permet de calculer, à l'état stationnaire considéré, les coefficients d'élasticité des enzymes et surtout les coefficients de contrôle des flux ainsi que les coefficients de contrôle des concentrations. Cet outil analytique permet de mettre en évidence l'étape (ou les étapes) enzymatique(s) qui contrôle(nt) particulièrement tel flux métabolique ou tel pool de métabolite, selon le formalisme qui est détaillé en annexe S7.

a. L'outil d'optimisation en détail

Le choix des paramètres à ajuster (K_m , K_i , V_{max} ,...) se fera en fonction des résultats du test de sensibilité et de l'état des connaissances sur les paramètres considérés. La méthode des moindres carrés a été utilisée pour minimiser le score entre les valeurs prédites par le modèle et des valeurs mesurées expérimentalement. À chaque itération, le logiciel choisit de façon aléatoire la valeur du paramètre à l'intérieur d'un intervalle prédéfini par l'utilisateur. En fonction du modèle et de la capacité de calculs de l'ordinateur, les solutions peuvent sortir très rapidement (quelques secondes) ou non (plusieurs jours avec la possibilité de ne jamais trouver de solutions). La limitation de cet outil d'optimisation est le nombre de paramètres à optimiser. Plus celui-ci est grand, plus la résolution est longue et combinatoire. Dans la mesure du possible, nous

avons multiplié les itérations (jusqu'à plusieurs millions) afin de définir un jeu de paramètres moyens respectant les contraintes imposées, et donc s'approchant de la situation expérimentale.

- Alonso, A.P.** (2003). Métabolisme des sucres dans les pointes de racines de maïs. Influence des cycles de substrat dans la répartition des flux de carbone. Thèse de l'Université de Bordeaux II.
- Alonso, A.P., Raymond, P., Rolin, D., and Dieuaide-Noubhani, M.** (2007a). Substrate cycles in the central metabolism of maize root tips under hypoxia. *Phytochemistry* **68**, 2222-2231.
- Alonso, A.P., Vigeolas, H., Raymond, P., Rolin, D., and Dieuaide-Noubhani, M.** (2005). A new substrate cycle in plants. Evidence for a high glucose-phosphate-to-glucose turnover from in vivo steady-state and pulse-labeling experiments with [¹³C]glucose and [¹⁴C]glucose. *Plant Physiology* **138**, 2220-2232.
- Alonso, A.P., Raymond, P., Hernould, M., Rondeau-Mouro, C., de Graaf, A., Chourey, P., Lahaye, M., Shachar-Hill, Y., Rolin, D., and Dieuaide-Noubhani, M.** (2007b). A metabolic flux analysis to study the role of sucrose synthase in the regulation of the carbon partitioning in central metabolism in maize root tips. *Metabolic Engineering* **9**, 419-432.
- Aluri, S., and Büttner, M.** (2007). Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2537-2542.
- Baldet, P., Alban, C., Axiotis, S., and Douce, R.** (1993). Localization of free and bound biotin in cells from green pea leaves. *Arch Biochem Biophys* **303**, 67-73.
- Bargmann, B.O.R., and Birnbaum, K.D.** (2010). Fluorescence activated cell sorting of plant protoplasts. *Journal of Visualized Experiments*.
- Baud, S., Vaultier, M.N., and Rochat, C.** (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. *J Exp Bot* **55**, 397-409.
- Bayle, V., Arrighi, J., Creff, A., Nespoulous, C., Vialaret, J., Rossignol, M., Gonzalez, E., Paz-Ares, J., and Nussaume, L.** (2011). Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell* **23**, 1523-1535.
- Benkeblia, N., Shinano, T., and Osaki, M.** (2007). Metabolite profiling and assessment of metabolome compartmentation of soybean leaves using non-aqueous fractionation and GC-MS analysis. *Metabolomics* **3**, 297-305.
- Bieniawska, Z., Paul Barratt, D.H., Garlick, A.P., Thole, V., Kruger, N.J., Martin, C., Zrenner, R., and Smith, A.M.** (2007). Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *Plant Journal* **49**, 810-828.
- Bozzo, G.G., Raghothama, K.G., and Plaxton, W.C.** (2002). Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *European Journal of Biochemistry* **269**, 6278-6286.
- Bozzo, G.G., Raghothama, K.G., and Plaxton, W.C.** (2004). Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Biochemical Journal* **377**, 419-428.
- Bret-Harte, M.S., and Silk, W.K.** (1994). Nonvascular, Symplasmic Diffusion of Sucrose Cannot Satisfy the Carbon Demands of Growth in the Primary Root Tip of Zea mays L. *Plant Physiol* **105**, 19-33.
- Briskin, D.P., Thornley, W.R., and Wyse, R.E.** (1985). Membrane Transport in Isolated Vesicles from Sugarbeet Taproot. *Plant Physiology* **78**, 871-875.
- Brouquisse, R., James, F., Raymond, P., and Pradet, A.** (1991). Study of glucose starvation in excised maize root tips. *Plant Physiology* **96**, 619-626.
- Brouquisse, R., Evrard, A., Rolin, D., Raymond, P., and Roby, C.** (2001). Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maize root tips. Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties. *Plant Physiology* **125**, 1485-1498.
- Brouquisse, R., Rolin, D., Cortès, S., Gaudillère, M., Evrard, A., and Roby, C.** (2007). A

metabolic study of the regulation of proteolysis by sugars in maize root tips: effects of glycerol and dihydroxyacetone. *Planta* **225**, 693-709.

- Buttner, M.** (2007). The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **581**, 2318-2324.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T., and Raikhel, N.V.** (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16**, 3285-3303.
- Chance, B.** (1943). The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase. 1943. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **73**, 3-23.
- Cho, J.I., Burla, B., Lee, D.W., Ryoo, N., Hong, S.K., Kim, H.B., Eom, J.S., Choi, S.B., Cho, M.H., Bhoo, S.H., Hahn, T.R., Neuhaus, H.E., Martinoia, E., and Jeon, J.S.** (2010). Expression analysis and functional characterization of the monosaccharide transporters, OstMTs, involving vacuolar sugar transport in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol* **186**, 657-668.
- Claeyssen, E., and Rivoal, J.** (2007). Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* **68**, 709-731.
- Cogan, E.B., Birrell, G.B., and Griffith, O.H.** (1999). A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates. *Anal Biochem* **271**, 29-35.
- Colón, A.M., Sengupta, N., Rhodes, D., Dudareva, N., and Morgan, J.** (2009). A kinetic model describes metabolic response to perturbations and distribution of flux control in the benzenoid network of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* **62**, 64-76.
- Colón, A.M., Sengupta, N., Rhodes, D., Dudareva, N., and Morgan, J.** (2010). A kinetic model describes metabolic response to perturbations and distribution of flux control in the benzenoid network of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* **62**, 64-76.
- Conde, C., Agasse, A., Glissant, D., Tavares, R., Geros, H., and Delrot, S.** (2006). Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiology* **141**, 1563-1577.
- Cornish-Bowden, A., Jamin, M., and Saks, V.** (2005). *Cinétique enzymatique*. Edition EDP Sciences, Ouvrages Grenoblme Sciences.
- Curien, G., Bastien, O., Robert-Genthon, M., Cornish-Bowden, A., Cardenas, M.L., and Dumas, R.** (2009). Understanding the regulation of aspartate metabolism using a model based on measured kinetic parameters. *Molecular Systems Biology* **5**.
- da-Silva, W.S., Rezende, G.L., and Galina, A.** (2001). Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1191-1201.
- Del Pozo, J.C., Allona, I., Rubio, V., Leyva, A., De La Pena, A., Aragoncillo, C., and Paz-Ares, J.** (1999). A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant Journal* **19**, 579-589.
- Dietz, K.J., Jäger, R., Kaiser, G., and Martinoia, E.** (1990). Amino acid transport across the tonoplast of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts: Uptake of alanine, leucine, and glutamine. *Plant Physiology* **92**, 123-129.
- Dieuaide-Noubhani, M., Raffard, G.r., Canioni, P., Pradet, A., and Raymond, P.** (1995). Quantification of Compartmented Metabolic Fluxes in Maize Root Tips Using Isotope Distribution from ¹³C- or ¹⁴C-Labeled Glucose. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 13147-13159.
- Doll, S., Rodier, F., and Willenbrink, J.** (1979). Accumulation of sucrose in vacuoles isolated from red beet tissue. *Planta* **144**, 407-411.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S.W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E., and Schmidt, U.G.** (2006). Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196-207.
- Etxeberria, E., Pozueta-Romero, J., and Gonzalez, P.** (2012). In and out of the plant storage vacuole. *Plant Science* **190**, 52-61.
- Etxeberria, E., Gonzalez, P., Tomlinson, P., and Pozueta-Romero, J.** (2005). Existence of two parallel mechanisms for glucose uptake in heterotrophic plant cells. *J Exp Bot* **56**, 1905-1912.
- Fang, Z., Shao, C., Meng, Y., Wu, P., and Chen, M.** (2009). Phosphate signaling in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. *Plant Science* **176**, 170-180.

- Farré, E.M., Fernie, A.R., and Willmitzer, L.** (2008). Analysis of subcellular metabolite levels of potato tubers (*Solanum tuberosum*) displaying alterations in cellular or extracellular sucrose metabolism. *Metabolomics* **4**, 161-170.
- Farré, E.M., Tiessen, A., Roessner, U., Geigenberger, P., Trethewey, R.N., and Willmitzer, L.** (2001). Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiology* **127**, 685-700.
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thevenot, P., Lemoine, R., Romieu, C., and Delrot, S.** (1999). Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol* **120**, 1083-1094.
- Fontes, N., Silva, R., Vignault, C., Lecourieux, F., Geros, H., and Delrot, S.** (2010). Purification and functional characterization of protoplasts and intact vacuoles from grape cells. *BMC Research Notes* **3**.
- Frearson, E.M., Power, J.B., and Cocking, E.C.** (1973). The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Developmental Biology* **33**, 130-137.
- Geigenberger, P., and Stitt, M.** (1993). Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* **189**, 329-339.
- Gerhardt, R., Stitt, M., and Heldt, H.W.** (1987). Subcellular Metabolite Levels in Spinach Leaves : Regulation of Sucrose Synthesis during Diurnal Alterations in Photosynthetic Partitioning. *Plant Physiol* **83**, 399-407.
- Gonzali, S., Pistelli, L., De Bellis, L., and Alpi, A.** (2001). Characterization of two *Arabidopsis thaliana* fructokinases. *Plant Science* **160**, 1107-1114.
- Harbron, S., Foyer, C., and Walker, D.** (1981). The purification and properties of sucrose-phosphate synthetase from spinach leaves: The involvement of this enzyme and fructose biphosphatase in the regulation of sucrose biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics - ARCH BIOCHEM BIOPHYS* **212**, pp. 237-246.
- Hayman, A.R., and Cox, T.M.** (1994). Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1294-1300.
- He, F., Huang, F., Wilson, K.A., and Tan-Wilson, A.** (2007). Protein storage vacuole acidification as a control of storage protein mobilization in soybeans. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1059-1070.
- Heineke, D., Wildenberger, K., Sonnewald, U., Willmitzer, L., and Heldt, H.W.** (1994). Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: Studies with transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplast. *Planta* **194**, 29-33.
- Henri, R.** (2008). Mise en place d'une approche de fluxomique chez le fruit de tomate. Etude de transformants surexprimant des hexokinases. Thèse de l'Université de Bordeaux
- Hoops, S., Gauges, R., Lee, C., Pahle, J., Simus, N., Singhal, M., Xu, L., Mendes, P., and Kummer, U.** (2006). COPASI - A COMplex PATHway Simulator. *Bioinformatics* **22**, 3067-3074.
- Hurley, B.A., Tran, H.T., Marty, N.J., Park, J., Snedden, W.A., Mullen, R.T., and Plaxton, W.C.** (2010). The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology* **153**, 1112-1122.
- Isayenkov, S., Isner, J.C., and Maathuis, F.J.M.** (2010). Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signalling. *FEBS Letters* **584**, 1982-1988.
- Jaquinod, M., Villiers, F., Kieffer-Jaquinod, S., Hugouvieux, V., Bruley, C., Garin, J., and Bourguignon, J.** (2007). A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Molecular and Cellular Proteomics* **6**, 394-412.
- Jauh, G.-Y., Fischer, A.M., Grimes, H.D., Ryan, C.A., and Rogers, J.C.** (1998). γ -Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 12995-12999.
- Jauh, G.Y., Phillips, T.E., and Rogers, J.C.** (1999). Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**, 1867-1882.

- Jeong, S.W., Das, P.K., Jeoung, S.C., Song, J.Y., Lee, H.K., Kim, Y.K., Kim, W.J., Park, Y.I., Yoo, S.D., Choi, S.B., and Choi, G.** (2010a). Erratum to Ethylene suppression of sugar-induced anthocyanin pigmentation in arabidopsis (*Plant Physiology*, (2010), 154, 1514-1531)). *Plant Physiology* **155**, 1047.
- Jeong, S.W., Das, P.K., Jeoung, S.C., Song, J.Y., Lee, H.K., Kim, Y.K., Kim, W.J., Park, Y.I., Yoo, S.D., Choi, S.B., and Choi, G.** (2010b). Ethylene suppression of sugar-induced anthocyanin pigmentation in arabidopsis. *Plant Physiology* **154**, 1514-1531.
- Jiang, L., Phillips, T.E., Hamm, C.A., Drozdowicz, Y.M., Rea, P.A., Maeshima, M., Rogers, S.W., and Rogers, J.C.** (2001). The protein storage vacuole: A unique compound organelle. *Journal of Cell Biology* **155**, 991-1002.
- Junker, B.H., Lonien, J., Heady, L.E., Rogers, A., and Schwender, J.** (2007). Parallel determination of enzyme activities and in vivo fluxes in *Brassica napus* embryos grown on organic or inorganic nitrogen source. *Phytochemistry* **68**, 2232-2242.
- Kaida, R., Hayashi, T., and Kaneko, T.S.** (2008). Purple acid phosphatase in the walls of tobacco cells. *Phytochemistry* **69**, 2546-2551.
- Kaiser, G., and Heber, U.** (1984). Sucrose transport into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* **161**, 562-568.
- Kaiser, G., Martinoia, E., Schmitt, J.M., Hinch, D.K., and Heber, U.** (1986). Polypeptide pattern and enzymic character of vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Planta* **169**, 345-355.
- Kammerer, B., Fischer, K., Hilpert, B., Schubert, S., Gutensohn, M., Weber, A., and Flügge, U.L.** (1998). Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: The glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **10**, 105-117.
- Klabunde, T., Strater, n., Krebs, B., and Witzel, H.** (1995). Structural relationship between the mammalian Fe(III)-Fe(II) and the Fe(III)-Zn(II) plant purple acid phosphatases. *FEBS Letters* **367**, 56-60.
- Koch, K.** (2004). Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 235-246.
- Krueger, S., Givalisco, P., Krall, L., Steinhauser, M.C., Büssis, D., Usadel, B., Flügge, U.I., Fernie, A.R., Willmitzer, L., and Steinhauser, D.** (2011). A topological map of the compartmentalized *Arabidopsis thaliana* leaf metabolome. *PLoS ONE* **6**.
- Kuang, R., Chan, K.H., Yeung, E., and Lim, B.L.** (2009). Molecular and biochemical characterization of AtPAP15, a purple acid phosphatase with phytase activity, in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151**, 199-209.
- Kühn, C., and Grof, C.P.L.** (2010). Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 288-298.
- Kunz, H.H., Häusler, R.E., Fettke, J., Herbst, K., Niewiadomski, P., Gierth, M., Bell, K., Steup, M., Flügge, U.I., and Schneider, A.** (2010). The role of plastidial glucose-6-phosphate/phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis. *Plant Biology* **12**, 115-128.
- Lee, R.B., and Ratcliffe, R.G.** (1993). Subcellular Distribution of Inorganic Phosphate, and Levels of Nucleoside Triphosphate, in Mature Maize Roots at Low External Phosphate Concentrations: Measurements with ³¹P-NMR. *Journal of Experimental Botany* **44**, 587-598.
- Lee, R.B., Ratcliffe, R.G., and Southon, T.E.** (1990). ³¹P NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: Relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. *Journal of Experimental Botany* **41**, 1063-1078.
- Lemoine, R., Burkle, L., Barker, L., Sakr, S., Kuhn, C., Regnacq, M., Gaillard, C., Delrot, S., and Frommer, W.B.** (1999). Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Lett* **454**, 325-330.
- Li, D., Zhu, H., Liu, K., Liu, X., Leggewie, G., Udvardi, M., and Wang, D.** (2002). Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 27772-27781.
- Liang, C., Tian, J., Lam, H.M., Lim, B.L., Yan, X., and Liao, H.** (2010). Biochemical and molecular characterization of PvPAP3, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization. *Plant Physiol* **152**, 854-865.
- Lim, H., Cho, M.H., Jeon, J.S., Bhoo, S.H., Kwon, Y.K., and Hahn, T.R.** (2009). Altered expression of pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase affects

- the growth of transgenic Arabidopsis plants. *Molecules and Cells* **27**, 641-649.
- Link, M., Rausch, T., and Greiner, S.** (2004). In Arabidopsis thaliana, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Letters* **573**, 105-109.
- Lunn, J.E., and ap Rees, T.** (1990). Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase in seeds of Pisum sativum. *Biochem J* **267**, 739-743.
- Maeshima, M.** (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**, 37-51.
- Marquès, L., Cossegal, M., Bodin, S., Czernic, P., and Lebrun, M.** (2004). Heavy metal specificity of cellular tolerance in two hyperaccumulating plants, Arabidopsis halleri and Thlaspi caerulescens. *New Phytologist* **164**, 289-295.
- Martinoia, E., Massonneau, A.s., and Frangne, N.** (2000). Transport Processes of Solutes across the Vacuolar Membrane of Higher Plants. *Plant and Cell Physiology* **41**, 1175-1186.
- Martinoia, E., Maeshima, M., and Neuhaus, H.E.** (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**, 83-102.
- Martinoia, E., Meyer, S., De Angeli, A., and Nagy, R.** (2012). Vacuolar transporters in their physiological context. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 183-213.
- Matic, S., Åkerlund, H.E., Everitt, E., and Widell, S.** (2004). Sucrose synthase isoforms in cultured tobacco cells. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 299-306.
- Matile, P.** (1987). THE SAP OF PLANT CELLS. *New Phytologist* **105**, 1-26.
- Matsuda, F., Morino, K., Miyashita, M., and Miyagawa, H.** (2003). Metabolic Flux Analysis of the Phenylpropanoid Pathway in Wound-Healing Potato Tuber Tissue using Stable Isotope-Labeled Tracer and LC-MS Spectroscopy. *Plant and Cell Physiology* **44**, 510-517.
- McKenzie, M.J., Greer, L.A., Heyes, J.A., and Hurst, P.L.** (2004). Sugar metabolism and compartmentation in asparagus and broccoli during controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology* **32**, 45-56.
- McNeil, S.D., Nuccio, M.L., Rhodes, D., Shachar-Hill, Y., and Hanson, A.D.** (2000a). Radiotracer and computer modeling evidence that phospho-base methylation is the main route of choline synthesis in tobacco. *Plant Physiol* **123**, 371-380.
- McNeil, S.D., Nuccio, M.L., Rhodes, D., Shachar-Hill, Y., and Hanson, A.D.** (2000b). Radiotracer and Computer Modeling Evidence that Phospho-Base Methylation Is the Main Route of Choline Synthesis in Tobacco. *Plant Physiology* **123**, 371-380.
- McNeil, S.D., Rhodes, D., Russell, B.L., Nuccio, M.L., Shachar-Hill, Y., and Hanson, A.D.** (2000c). Metabolic modeling identifies key constraints on an engineered glycine betaine synthesis pathway in tobacco. *Plant Physiology* **124**, 153-162.
- Meyerowitz, E.M.** (2001). Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant Physiology* **125**, 15-19.
- Mishra, B.S., Singh, M., Aggrawal, P., and Laxmi, A.** (2009). Glucose and auxin signaling interaction in controlling arabidopsis thaliana seedlings root growth and development. *PLoS ONE* **4**.
- Misson, J., Raghothama, K.G., Jain, A., Jouhet, J., Block, M.A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., Dumas, P., Nacry, P., Herrerra-Estrella, L., Nussaume, L., and Thibaud, M.-C.** (2005). A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11934-11939.
- Moore, R.** (1985). A Morphometric Analysis of the Redistribution of Organelles in Columella Cells in Primary Roots of Normal Seedlings and Agravitropic Mutants of Hordeum vulgare. *Journal of Experimental Botany* **36**, 1275-1286.
- Mora-Montes, H.M., Lopez-Romero, E., Zinker, S., Ponce-Noyola, P., and Flores-Carreón, A.** (2004). Hydrolysis of Man9GlcNAc2 and Man8GlcNAc2 oligosaccharides by a purified a-mannosidase from Candida albicans. *Glycobiology* **14**, 593-598.
- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Pant, B.D., Bläsing, O., Usadel, B., Czechowski, T., Udvardi, M.K., Stitt, M., and Scheible, W.R.** (2007). Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. *Plant, Cell and Environment* **30**, 85-112.
- Mounet, F.** (2009). Gene and metabolite regulatory... *Plant physiologie* **149**.

- Nägele, T., Henkel, S., Hormiller, I., Sauter, T., Sawodny, O., Ederer, M., and Heyer, A.G.** (2010). Mathematical modeling of the central carbohydrate metabolism in arabidopsis reveals a substantial regulatory influence of vacuolar invertase on whole plant carbon metabolism. *Plant Physiology* **153**, 260-272.
- Neuhaus, H.E.** (2007). Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett* **581**, 2223-2226.
- Nguyen-Quoc, B., and Foyer, C.H.** (2001). A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J Exp Bot* **52**, 881-889.
- Niewiadomski, P., Knappe, S., Geimer, S., Fischer, K., Schulz, B., Unte, U.S., Rosso, M.G., Ache, P., Flügge, U.I., and Schneider, A.** (2005). The Arabidopsis plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* **17**, 760-775.
- Nishimura, M.** (1982). pH in Vacuoles Isolated from Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol* **70**, 742-744.
- Olczak, M., Morawiecka, B., and Waiřtorek, W.** (2003). Plant purple acid phosphatases - Genes, structures and biological function. *Acta Biochimica Polonica* **50**, 1245-1256.
- Oparka, K.J.** (1990). What is Phloem unloading? *Plant Physiol* **94**, 393-396.
- Otegui, M.S., Capp, R., and Staehelin, L.A.** (2002). Developing seeds of Arabidopsis store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **14**, 1311-1327.
- Overlach, S., Diekmann, W., and Raschke, K.** (1993). Phosphate translocator of isolated guard-cell chloroplasts from *Pisum sativum* L. transports glucose-6-phosphate. *Plant Physiology* **101**, 1201-1207.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., and Rogers, J.C.** (1996). Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**, 563-572.
- Pettersson, G., and Ryde-Pettersson, U.** (1988). A mathematical model of the Calvin photosynthesis cycle. In *European Journal of Biochemistry*, pp. 661-672.
- Poolman, M.G., Fell, D.A., and Thomas, S.** (2000). Modelling photosynthesis and its control. *Journal of Experimental Botany* **51**, 319-328.
- Preisser, J., Sprügel, H., and Komor, E.** (1992). Solute distribution between vacuole and cytosol of sugarcane suspension cells: Sucrose is not accumulated in the vacuole. *Planta* **186**, 203-211.
- Quick, W.P., and Neuhaus, H.E.** (1996). Evidence for two types of phosphate translocators in sweet-pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit chromoplasts. *Biochemical Journal* **320**, 7-10.
- Ratcliffe, R.G., and Shachar-Hill, Y.** (2006). Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks. *Plant Journal* **45**, 490-511.
- Rausch, T., and Greiner, S.** (2004). Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1696**, 253-261.
- Reinders, A., Sivitz, A., Starker, C., Gantt, J., and Ward, J.** (2008). Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **68**, 289-299.
- Roberts, J.K., Wemmer, D., Ray, P.M., and Jardetzky, O.** (1982). Regulation of Cytoplasmic and Vacuolar pH in Maize Root Tips under Different Experimental Conditions. *Plant Physiol* **69**, 1344-1347.
- Roberts, J.K.M.** (1990). Observation of uridine triphosphate: glucose-1-phosphate uridylyltransferase activity in maize root tips by saturation transfer ³¹P-NMR. Estimation of cytoplasmic PP(i). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1051**, 29-36.
- Roberts, J.K.M., Ray, P.M., Wade-Jardetzky, N., and Jardetzky, O.** (1980). Estimation of cytoplasmic and vacuolar pH in higher plant cells by ³¹P NMR. *Nature* **283**, 870-872.
- Rohwer, J.M., and Botha, F.C.** (2001). Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of in vitro kinetic data. *Biochemical Journal* **358**, 437-445.
- Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E.J., Raymond, P., and Rolin, D.** (2002). The metabolic architecture of plant cells: Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 43948-43960.
- Rottenberg, H., Grunwald, T., and Avron, M.** (1972). Determination of pH in chloroplasts. I. Distribution of (¹⁴ C) methylamine. *Eur J Biochem* **25**, 54-63.
- Roycewicz, P., and Malamy, J.E.** (2012). Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on Arabidopsis root and shoot system growth in laboratory assays. *Philosophical Transactions of the Royal*

- Society B: Biological Sciences **367**, 1489-1500.
- Ruan, Y.L., Jin, Y., and Huang, J.** (2009). Capping invertase activity by its inhibitor: Roles and implications in sugar signaling, carbon allocation, senescence and evolution. *Plant Signaling and Behavior* **4**, 983-985.
- Saftner, R.A., Daie, J., and Wyse, R.E.** (1983). Sucrose Uptake and Compartmentation in Sugar Beet Taproot Tissue. *Plant Physiology* **72**, 1-6.
- Saint-Jore-Dupas, C., Nebenführ, A., Boulaflous, A., Follet-Gueye, M.L., Plasson, C., Hawes, C., Driouich, A., Faye, L., and Gomord, V.** (2006). Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway. *Plant Cell* **18**, 3182-3200.
- Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., and Prado, F.E.** (1980). A regulatory invertase from sugar cane leaf-sheaths. *Phytochemistry* **19**, 1637-1642.
- Sauer, N., and Stadler, R.** (1993). A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant J* **4**, 601-610.
- Schafer, W.E., Rohwer, J.M., and Botha, F.C.** (2005). Partial purification and characterisation of sucrose synthase in sugarcane. *J Plant Physiol* **162**, 11-20.
- Schallau, K., and Junker, B.H.** (2010). Simulating plant metabolic pathways with enzyme-kinetic models. *Plant Physiology* **152**, 1763-1771.
- Schenk, G., Mitic, N., Hanson, G.R., and Comba, P.** (2012). Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. *Coordination Chemistry Reviews*.
- Schmidt, U.G., Endler, A., Schelbert, S., Brunner, A., Schnell, M., Neuhaus, H.E., Marty-Mazars, D., Marty, F., Baginsky, S., and Martinoia, E.** (2007). Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiology* **145**, 216-229.
- Schneider, S., Hulpke, S., Schulz, A., Yaron, I., Holl, J., Imlau, A., Schmitt, B., Batz, S., Wolf, S., Hedrich, R., and Sauer, N.** (2011). Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biol* **14**, 325-336.
- Schuldiner, S., Rottenberg, H., and Avron, M.** (1972). Determination of pH in chloroplasts. 2. Fluorescent amines as a probe for the determination of pH in chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* **25**, 64-70.
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E., Poschet, G., Buttner, M., Schneider, S., Sauer, N., and Hedrich, R.** (2011). Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant J* **68**, 129-136.
- Shiratake, K.** (2007). Genetics of sucrose transporter in plants. *Genes, Genomes and Genomics* **1**, 73-80.
- Shiratake, K., Kanayama, Y., and Yamaki, S.** (1997). Characterization of hexose transporter for facilitated diffusion of the tonoplast vesicles from pear fruit. *Plant and Cell Physiology* **38**, 910-916.
- Srivastava, N.K., and Srivastava, A.K.** (2011). Allocation of different ¹⁴C substrates into primary metabolites in relation to total alkaloid accumulation into *Catharanthus roseus* plants. *Journal of Medicinal Plant Research* **5**, 4747-4753.
- Stefanovic, A., Arpat, A.B., Bligny, R., Gout, E., Vidoudez, C., Bensimon, M., and Poirier, Y.** (2011). Over-expression of PHO1 in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *The Plant Journal* **66**, 689-699.
- Stitt, M., and ap Rees, T.** (1978). Pathways of carbohydrate oxidation in leaves of *Pisum sativum* and *Triticum aestivum*. *Phytochemistry* **17**, 1251-1256.
- Stitt, M., Wirtz, W., Gerhardt, R., Heldt, H.W., Spencer, C., Walker, D., and Foyer, C.** (1985). A comparative study of metabolite levels in plant leaf material in the dark. *Planta* **166**, 354-364.
- Streb, S., Egli, B., Eicke, S., and Zeeman, S.C.** (2009). The debate on the pathway of starch synthesis: A closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localized pathway. *Plant Physiology* **151**, 1769-1772.
- Sturm, A.** (1999). Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. *Plant Physiology* **121**, 1-8.

- Sumner, J.B.** (1944). A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* **100**, 413-414.
- Taiz, and Zeiger.** (2002). *Plant Physiology Third Edition*.
- Tang, X., Ruffner, H.P., Scholes, J.D., and Rolfe, S.A.** (1996). Purification and characterisation of soluble invertases from leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **198**, 17-23.
- Thibaud, M.C., Arrighi, J.F., Bayle, V., Chiarenza, S., Creff, A., Bustos, R., Paz-Ares, J., Poirier, Y., and Nussaume, L.** (2010). Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **64**, 775-789.
- Thom, M., Komor, E., and Maretzki, A.** (1982). Vacuoles from Sugarcane Suspension Cultures : II. CHARACTERIZATION OF SUGAR UPTAKE. *Plant Physiology* **69**, 1320-1325.
- Tiessen, A., Hendriks, J.H.M., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, E.M., and Geigenberger, P.** (2002). Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* **14**, 2191-2213.
- Timmers, A.C.J., Tirlapur, U.K., and Schel, J.H.N.** (1995). Vacuolar accumulation of acridine orange and neutral red in zygotic and somatic embryos of carrot (&i&t;Daucus carota&t;/i&t; L.). *Protoplasma* **188**, 236-244.
- Tohge, T., Ramos, M.S., Nunes-Nesi, A., Mutwil, M., Giavalisco, P., Steinhauser, D., Schellenberg, M., Willmitzer, L., Persson, S., Martinoia, E., and Fernie, A.R.** (2011). Toward the storage metabolome: Profiling the barley vacuole. *Plant Physiology* **157**, 1469-1482.
- Tran, H.T., Hurley, B.A., and Plaxton, W.C.** (2010a). Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science* **179**, 14-27.
- Tran, H.T., Qian, W., Hurley, B.A., She, Y.M., Wang, D., and Plaxton, W.C.** (2010b). Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **33**, 1789-1803.
- Uys, L., Botha, F.C., Hofmeyr, J.H.S., and Rohwer, J.M.** (2007). Kinetic model of sucrose accumulation in maturing sugarcane culm tissue. *Phytochemistry* **68**, 2375-2392.
- Veljanovski, V., Vanderbeld, B., Knowles, V.L., Snedden, W.A., and Plaxton, W.C.** (2006). Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiol* **142**, 1282-1293.
- Villiers, F.** (2008). Etude protéomique des vacuoles d'*Arabidopsis thaliana*, en vue de l'identification d'acteurs protéiques impliqués dans la detoxication du cadmium. Thèse, UMR CNRS 5168 – INRA 1200 – CEA – UJF, CEA – Grenoble.
- Wang, L.T., Wang, A.Y., Hsieh, C.W., Chen, C.Y., and Sung, H.Y.** (2005). Vacuolar invertases in sweet potato: molecular cloning, characterization, and analysis of gene expression. *J Agric Food Chem* **53**, 3672-3678.
- Weise, A., Barker, L., Kuhn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B., and Ward, J.M.** (2000). A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**, 1345-1355.
- Wiechert, W.** (2001). ¹³C metabolic flux analysis. *Metab Eng* **3**, 195-206.
- Winter, H., Robinson, D.G., and Heldt, H.W.** (1993). Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta* **191**, 180-190.
- Woody, S.T., Austin-Phillips, S., Amasino, R.M., and Krysan, P.J.** (2007). The WiscDsLox T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *J Plant Res* **120**, 157-165.
- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E., and Neuhaus, H.E.** (2006). Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell* **18**, 3476-3490.
- Yamaki, S.** (1987). ATP-promoted sorbitol transport into vacuoles isolated from apple fruit. *Plant and Cell Physiology* **28**, 557-564.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., and Sheen, J.** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* **2**, 1565-1572.
- Zhai, Z., Jung, H.I., and Vatamaniuk, O.K.** (2009). Isolation of protoplasts from tissues of 14-

day-old seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *J Vis Exp* **17**.

Zhang, Q., Wang, C., Tian, J., Li, K., and Shou, H. (2010). Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signalling. *Plant Biology* **13**, 7-15.

Zhang, W., Gruszewski, H.A., Chevone, B.I., and Nessler, C.L. (2008). An arabidopsis purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiology* **146**, 431-440.

Zhu, H., Qian, W., Lu, X., Li, D., Liu, X., Liu, K., and Wang, D. (2005). Expression patterns of purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis* organs and functional analysis of AtPAP23 predominantly transcribed in flower. *Plant Molecular Biology* **59**, 581-594.

Zoccarato, F., Cavallini, L., and Alexandre, A. (1999). The pH-Sensitive Dye Acridine Orange as a Tool to Monitor Exocytosis/Endocytosis in Synaptosomes (Blackwell Science Ltd.), pp. 625-633.

ANNEXES

I. DONNÉES COMPLÉMENTAIRES

Annexe S1. Equations différentielles correspondant à chaque modèle

Equations différentielles de la version M0 du modèle :

$$d[\text{HexP}]/dt = -1*v_{10} + 1*v_3 + 1*v_5 - 2*v_6 - 1*v_8$$

$$d[\text{Glc}]/dt = 1*v_2 - 1*v_3 + 1*v_9$$

$$d[\text{Suc}]/dt = 1*v_7 + 1*v_8 - 1*v_9$$

$$d[\text{Fru}]/dt = 1*v_1 - 1*v_5 - 1*v_8 + 1*v_9$$

$$d[\text{Suc6P}]/dt = 1*v_6 - 1*v_7$$

Equations différentielles de la version M1 du modèle :

$$d([\text{HexP}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{10}*\text{cytosol} + 1*v_3*\text{cytosol} + 1*v_5*\text{cytosol} - 2*v_6*\text{cytosol} - 1*v_8*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Glc}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{16}*1 + 1*v_2*1 - 1*v_3*\text{cytosol} + 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Glcvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{16}*1 + 1*v_{15}*\text{vacuole}$$

$$d([\text{Suc}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{11}*1 + 1*v_7*\text{cytosol} + 1*v_8*\text{cytosol} - 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Sucvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{11}*1 - 1*v_{15}*\text{vacuole}$$

$$d([\text{Fruvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{15}*\text{vacuole} + 1*v_{17}*1$$

$$d([\text{Fru}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{17}*1 + 1*v_1*1 - 1*v_5*\text{cytosol} - 1*v_8*\text{cytosol} + 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Suc6P}]*\text{cytosol})/dt = 1*v_6*\text{cytosol} - 1*v_7*\text{cytosol}$$

Equations différentielles de la version M2 du modèle :

$$d([\text{HexP}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{13}*1 - 1*v_{10}*\text{cytosol} + 1*v_3*\text{cytosol} + 1*v_5*\text{cytosol} - 2*v_6*\text{cytosol} - 1*v_8*\text{cytosol}$$

$$d([\text{G6Pvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{13}*1 - 1*v_{14}*\text{vacuole}$$

$$d([\text{Glc}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{16}*\text{cytosol} + 1*v_2*1 - 1*v_3*\text{cytosol} + 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Glcvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{16}*1 + 1*v_{15}*\text{vacuole} + 1*v_{14}*\text{vacuole}$$

$$d([\text{Suc}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{11}*1 + 1*v_7*\text{cytosol} + 1*v_8*\text{cytosol} - 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Sucvac}]*\text{cytosol})/dt = 1*v_{11}*1 - 1*v_{15}*\text{vacuole}$$

$$d([\text{Fruvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{15}*\text{vacuole} + 1*v_{17}*1$$

$$d([\text{Fru}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{17}*1 + 1*v_1*1 - 1*v_5*\text{cytosol} - 1*v_8*\text{cytosol} + 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Suc6P}]*\text{cytosol})/dt = 1*v_6*\text{cytosol} - 1*v_7*\text{cytosol}$$

Equations différentielles de la version M3 du modèle :

$$d([\text{HexP}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{13}\text{bis}*1 - 1*v_{13}*1 - 1*v_{10}*\text{cytosol} + 1*v_3*\text{cytosol} + 1*v_5*\text{cytosol} - 2*v_6*\text{cytosol} - 1*v_8*\text{cytosol}$$

$$d([\text{G6Pvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{13}*1 - 1*v_{14}*\text{vacuole}$$

$$d([\text{F6Pvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{13}\text{bis}*1 - 1*v_{14}\text{bis}*vacuole$$

$$d([\text{Glc}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{16}*1 + 1*v_2*1 - 1*v_3*\text{cytosol} + 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Glcvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{16}*1 + 1*v_{15}*\text{vacuole} + 1*v_{14}*\text{vacuole}$$

$$d([\text{Suc}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{11}*1 + 1*v_7*\text{cytosol} + 1*v_8*\text{cytosol} - 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Sucvac}]*\text{cytosol})/dt = 1*v_{11}*1 - 1*v_{15}*\text{vacuole}$$

$$d([\text{Fruvac}]*\text{vacuole})/dt = 1*v_{15}*\text{vacuole} + 1*v_{17}*1 + 1*v_{14}\text{bis}*vacuole$$

$$d([\text{Fru}]*\text{cytosol})/dt = -1*v_{17}*1 + 1*v_1*1 - 1*v_5*\text{cytosol} - 1*v_8*\text{cytosol} + 1*v_9*\text{cytosol}$$

$$d([\text{Suc6P}]*\text{cytosol})/dt = 1*v_6*\text{cytosol} - 1*v_7*\text{cytosol}$$

Annexe S2. Paramétrage initial des modèles

Reaction / Parameter	Initial model value	References & Range/values	Organism / culture
Reactions 1 and 2 : Glucose & fructose diffusion and uptake Glcex -> Glc or Fruex -> Fru D1	0.0005-0.001	[a]; [b] 0.0033[§] 0.0046[u]	Tobacco leaf [§] <i>Petunia hybrida</i> / 2 day-old Corollas [u]
Reaction 3: Glucokinase Glc + ATP -> G6P + ADP Vmax3 Km3Glc Km3ATP Ki3G6P	0.65*(this study) 0.02 0.25 4	[c]; [d]; [e] 0.197[a] [0.03-0.13] [a]; 0.07[b]; [0.02-0.13] [β] [0.1-0.56] [a]; 0.25[b] 4 [β]. [a] & [b]	Plant hexokinase / various [β] Sugar cane / culm tissue & cell culture [a] Sugar cane / culm tissue [b] Mays / no Ki [β]
Reaction 5: Fructokinase Fru + ATP -> F6P + ADP Vmax5 Km5Fru Km5ATP Ki5ADP Ki5Fru	0.45*(this study) 0.077 0.13 2 12	[c]; [d] [0.04-0.22] [a]; [0.028-0.074] [b] [0.046-0.67] [a]; [0.14-0.18] [b] [1-5] [a]; [0.05-1] [e]; >10[d] [1-21] [a]; 0.016 [b]; [2-25] [e]; >5[d]	Maize / roots [e] Sugar cane / culm tissue & cell culture [a] Sugar cane / culm tissue [b] <i>Arabidopsis thaliana</i> / various organs
Reaction 6: Sucrose-6-phosphate synthase UDPG + F6P = Suc6P + UDP Keq6 Vmax6f Vmax6r Km6F6P Km6UDPGlc Km6UDP Km6Suc6P Ki6Pi Ki6F6P Ki6UDPGlc Ki6Suc6P	10 0.21*(this study) 0.11 0.6 1.8 0.3 0.1 3 0.4 1.4 0.07	[b]; [c] [5-10] [a] [λ] Vf/Vr = 1.9[a] [0.3-2] [a]; [0.7-0.9] [θ] [1.2-3] [a]; [6.2-8] [θ] 0.3 (estimate) [a] 0.1 (estimate) [a] [0.2-85] [a] 0.4 (estimate)[a] 1.4 (estimate) [a]; [9.1-9.7] [θ] 0.07 (estimate) [a]	Sugar cane / culm tissue & cell culture [a] <i>Spinacia oleracea</i> / leaves [θ] <i>Pisum sativum</i> L / seeds [λ]
Reaction 7: Sucrose-6-phosphatase Suc6P + H ₂ O -> Suc + Pi Vmax7 Km7Suc6P	0.21 0.1	[b]; [c] = v _{max6} [0.045-0.15][a]	Sugar cane / culm tissue & cell culture [a]

Reaction 8: Sucrose synthase Suc + UDP = UDPG + Fru Keq8 Vmax8f Vmax8r Km8Suc Km8UDP Km8UDPGlc Km8Fru Ki8Suc Ki8Fru Ki8UDP	0.5 0.077 0.31*(this study) 50 0.4 0.3 15 40 4 0.3	0.5 [b]; [0.15-0.56] [s]; [0.3-0.6] [z] $V_f/V_r = 0.25[s]$ [10-400] [b]; [33.6-38.2] [s]; [22-30] [z] [0.1-1.7] [b]; $\approx 0.0019 [s]$; [0.0076-0.032] [z] [0.1-5] [b]; [0.42-0.45] [z]; [0.209-0.259] [s]; [1.6-8] [b]; [5.8-7.1] [s]; [1.05-2.65] [z] 40[b] 4 [b]; [3.9-4.1] [s] 0.3 [b]	Sugar cane / culm tissue [b] Sugar cane / culm tissue [b] Sugar Cane / leaf roll tissue [s] <i>Nicotiana tabacum</i> L. / cell culture [z]
Reaction 9: Neutral invertase Suc + H₂O → Glc + Fru Vmax9 Km9Suc Ki9Fru Ki9Glc	0.34 *(this study) 10 15 15	[b]; [c] 0.372[a] 10[a] 15[a] [?] 15[a] [?]	Sugar cane / culm tissue & cell culture [a]
Reaction 10: Glycolysis F6P → glycolysis Vmax10 Km10F6P	0.69*(this study) 0.76	0.758 [b]	Sugar cane / culm tissue [b]
Reaction 11: Vacuolar sucrose carrier Suc = Sucvac Keq11 = $10e^{(\Delta pH)}$ Vf11 Vr11 Km11Suc Km11Sucvac	10 0.07 \$ 0.07 \$ 12 12	[f] 1.65 < ΔpH < 1.93 (this study) [10.9-12.2] [h]; 21 [g] [10.9-12.2] [h]; 21 [g]	<i>Arabidopsis thaliana</i> / leaves [h] <i>Vicia faba</i> / mesophyll protoplasts [g]
Reaction 13: G6P/Pi translocator G6P + Pivac = G6Pvac + Pi Keq13 = $10e^{(\Delta pH)}$ Vf13 Vr13 Km13G6P Ki13Pivac Ki13G6Pvac	10 0.025 £, \$ 0.04 £, \$ 0.7 0.6 1.1	[i]; [j]; [k] 1.65 < ΔpH < 1.93 (this study) Estimate $V_f/V_r = 0.625[\&]$ [0.6-0.8] [l] [0.5-0.7] [l] [1-1.2] [l]; [0.-0.33] [m]	Maize / 14 days-old endosperm [l] <i>Pisum sativum</i> L. / guard-cell chloroplasts [m] <i>Capsicum annuum</i> L. / fruits [&]

Reaction 14: Vacuolar purple acid phosphatase G6Pvac + H₂O → Glcvac + Pivac Vmax14 Km14G6Pvac Km14F6Pvac KiPivac	0.84*(this study) 2.5 2.5 1	[c]; [d] [0.9-1.1] (this study) [2.6-3.4] (this study) [0.42-1.6] [n]; [1.2-1.3] [v]	<i>Lycopersicon esculentum</i> / cell culture [n & v]
Reaction 15: Vacuolar acid invertase Sucvac + H₂O → Glc + Fru Vmax15 KiGlcvac KiFruvac KiFruvac Km15Sucvac	4.3* 15 15 10	[c]; [d]; [e] this study 15[a]; 37[y] 15[a]; 32.25[y][?] 4.16[y][?] [7.97-10.1] [w]; [5-12] [x]; [11.3-19.9][φ]	Sugar cane / culm tissue & cell culture [a] Sugarcane / leaf sheaths [y] <i>Ipomoea batatas</i> L. / shoots & roots [w] <i>Arabidopsis thaliana</i> / leaves [x & φ] Various plants [?]
Reactions 16 & 17: Vacuolar glucose & fructose carrier Keq16 = Keq17=10e ^(ΔpH) Vf16 = Vf17 Vr16 = Vr17 Km16Glc = Km17Fru Km16Glcvac = Km17Fruvac	10 0.07 \$ 0.07 \$ 3.7 3.7	[f]; [o] 1.5-1.65 < ΔpH < 1.93-2 (this study) [ж] 3.7[p] 3.7[p]	Yeast : heterologous expression [p] [ж]

Km unit is mM. Vmax unit is $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ FW and diffusion coefficient (D1) is expressed in min^{-1}

* To convert the specific activity of enzymes ($\text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$), a tissue density value of 1.1 g fresh weight per mL of cell was used corresponding to the FW/DW ratio of 10.

\$ For the vacuolar transport. when needed. the Vmax was estimated using a vacuolar volume fraction of 0.8 μL per μL of cell. a vacuolar volume of 16.2 μL per 10^6 vacuoles and a vacuolar protein content of 10 μg per μL of vacuole (see references [f. q. r]).

£ Transport capacity has not been measured but protein has been detected in the vacuolar proteome (see references [i. j]).

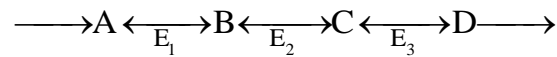
References used are as follows: [a](Rohwer and Botha, 2001). [b] (Uys et al., 2007). [c] (Alonso et al., 2005). [d] (Gonzali et al., 2001). [e] (da-Silva et al., 2001). [f] (Thom et al., 1982). [g] (Kaiser and Heber, 1984). [h] (Weise et al., 2000) . [i] (Jaquinod et al., 2007) . [j] (Schmidt et al., 2007) . [k] (Quick and Neuhaus, 1996) . [l] (Kammerer et al., 1998). [m] (Overlach et al., 1993). [n] (Bozzo et al., 2004). [o](Wormit et al., 2006). [p] (Aluri and Büttner, 2007). [r] (Dietz et al., 1990). [s] (Schafer et al., 2005). [u] (Colón et al., 2009) . [v] (Bozzo et al., 2002). [w] (Wang et al., 2005). [x] (Tang et al., 1996). [y] (Sampietro et al., 1980) [z] (Matic et al., 2004). [θ] (Harbron et al., 1981). [φ] (Nägele et al., 2010). [β] (Claeyssen and Rivoal, 2007) . [λ] (Lunn and ap Rees, 1990). [∞] (Quick and Neuhaus, 1996). [?] (Sturm, 1999). [S] (McNeil et al., 2000a)

Annexe S3. Paramètres cinétiques de la SuSy utilisés dans les différentes versions du modèle
 Selon (Rohwer and Botha, 2001; Schafer et al., 2005; Uys et al., 2007). Les Km et Ki sont exprimés en mM.

	SuSy A/B/C	SuSy A	SuSy B	SuSy C
KmSuc	50	22,51	70,55	25,9
KmUDP	0,4	0,58	0,14	0,00191
KmUDP-G	0,3	6,67	0,82	0,234
KmFru	15	12,29	18,08	6,49
KiUDP	0,3	0,3	0,3	0,0871
KiSuc	40	40	40	1390
KiFru	4	4	4	3,1

Annexe S4. Théorie du contrôle

Considérons la voie métabolique suivante traversée par un flux métabolique J :



La quantification du contrôle exercé par une étape enzymatique dans un réseau métabolique donné passe par la définition de paramètres (de deux types):

1) Les paramètres globaux, définis au niveau du réseau entier :

✘ Le **coefficient de contrôle du flux J** par une enzyme E_i :

$$C_{E_i}^J = \left| \frac{dJ}{dE_i} \frac{E_i}{J} \right|_{ss} = \left| \frac{dJ}{dv_i} \frac{v_i}{J} \right|_{ss} = \left| d \ln J / d \ln v_i \right|_{ss}$$

Ce paramètre mesure l'influence d'une variation de la quantité (ou de l'activité v) de l'enzyme E_i sur la grandeur du flux métabolique J traversant la voie métabolique à l'état stationnaire ss. L'expression logarithmique permet de s'affranchir du problème des unités par une normalisation des grandeurs.

En considérant le flux J traversant une voie métabolique, l'équation de sommation montre que la somme des coefficients de contrôle du flux J par toutes les enzymes de la voie métabolique est égale à 1. On dit alors que le contrôle du flux J est partagé entre les différentes étapes constituant le réseau métabolique. Dans notre exemple, nous avons :

$$C_{E_1}^J + C_{E_2}^J + C_{E_3}^J = 1$$

✘ Le coefficient de le **coefficient de contrôle de la concentration M** par une enzyme E_i :

$$C_{E_i}^M = \left| \frac{dM}{dE_i} \frac{E_i}{M} \right|_{ss} = \left| \frac{dM}{dv_i} \frac{v_i}{M} \right|_{ss} = \left| d \ln M / d \ln v_i \right|_{ss}$$

Ce paramètre mesure l'influence d'une variation de la quantité (ou de l'activité v) de l'enzyme E_i sur la grandeur de la concentration M à l'état stationnaire ss. L'expression logarithmique permet de s'affranchir du problème des unités par une normalisation des grandeurs.

En considérant le métabolite intermédiaire M , l'équation de sommation montre que la somme des coefficients de contrôle de la concentration de M par toutes les enzymes de la voie métabolique est égale à 0. Dans notre exemple, nous avons :

$$C_{E_1}^B + C_{E_2}^B + C_{E_3}^B = 0 \quad \text{et} \quad C_{E_1}^C + C_{E_2}^C + C_{E_3}^C = 0$$

2) Les paramètres locaux, définis au niveau de chaque enzyme de la voie métabolique:

✘ Le coefficient d'élasticité de l'enzyme E_i envers son substrat S ou son produit P :

$$\varepsilon_S^{v_i} = \left| \frac{dv_i}{v_i} / \frac{dS}{S} \right|_{ss} \quad \text{et} \quad \varepsilon_P^{v_i} = \left| \frac{dv_i}{v_i} / \frac{dP}{P} \right|_{ss}$$

Ce paramètre mesure l'influence d'une variation d'un pool de métabolite S sur la vitesse v de l'étape enzymatique E_i , dans les conditions de l'état stationnaire ss analysé. Il dépend des caractéristiques cinétiques et thermodynamiques de l'enzyme considérée : plus une enzyme est saturée par son substrat, moins elle répond à des changements de concentration et le coefficient d'élasticité envers son substrat est alors faible ; plus une étape est éloignée de l'équilibre, moins l'enzyme répond à des changements de concentration en son produit et le coefficient d'élasticité envers son produit est alors faible.

Les coefficients de contrôle de certaines étapes sont regroupés sous le même terme (*e.g.* transporteurs d'hexoses et d'hexoses-Pi, phosphatase acide). Pour sommer les coefficients de contrôle (*cf.* **figure.73 & 74**), les relations suivantes doivent être appliquées:

Considérons la variable v (flux, concentration, *etc.*) et le paramètre p (V_{max} , E_{total} , *etc.*), il est possible de démontrer les relations suivantes :

$$C_{p_1+p_2}^v = C_{p_1}^v + C_{p_2}^v$$

$$C_p^{v_1+v_2} = (v_1 \cdot C_p^{v_1} + v_2 \cdot C_p^{v_2}) / (v_1 + v_2)$$

$$C_p^{v_1/v_2} = C_p^{v_1} - C_p^{v_2} \quad \text{et} \quad C_p^{v_1 \cdot v_2} = C_p^{v_1} + C_p^{v_2}$$

II. COMMUNICATIONS & "WORKSHOP"

II.A. PUBLICATION

Beurton-Aimar, M., Beauvoit, B., Monier, A., Vallée, F., Dieuaide-Noubhani, M., and Colombié, S. (2011). **Comparison between elementary flux modes analysis and ¹³C-metabolic fluxes measured in bacterial and plant cells.** BMC Systems Biology, 5, art. no. 95

II.B. COMMUNICATION ORALE

Antoine Monier, Sarah Monlort, Marie-Helene Andrieu, Sophie Colombier, Frédéric Delmas, Delphine Lapaillerie, Marc Bonneau, Véronique Germain, Martine Dieuaide-Noubhani & Bertrand Beauvoit. **Implication of the vacuolar AtPAP26 in the sugars metabolism in *Arabidopsis thaliana* roots**, 5^{ème} js RFMF (Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique), 2011, Paris.

II.C. COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

Antoine Monier, Sarah Monlort, Marie-Helene Andrieu, Sophie Colombier, Frédéric Delmas, Delphine Lapaillerie, Marc Bonneau, Véronique Germain, Martine Dieuaide-Noubhani & Bertrand Beauvoit. **Implication of the vacuolar AtPAP26 in the sugars metabolism in *Arabidopsis thaliana* roots**, Journée de l'école doctorale Sciences de la vie et de la Santé, 2011, Arcachon

Antoine Monier, Sarah Monlort, Marie-Helene Andrieu, Sophie Colombier, Frédéric Delmas, Delphine Lapaillerie, Marc Bonneau, Véronique Germain, Martine Dieuaide-Noubhani & Bertrand Beauvoit. **Implication of the vacuolar AtPAP26 in the sugars metabolism in *Arabidopsis thaliana* roots**, 5^{ème} js RFMF (Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique), 2011, Paris

Antoine Monier, Sarah Monlort, Marie-Helene Andrieu, Sophie Colombier, Frédéric Delmas, Delphine Lapaillerie, Marc Bonneau, Véronique Germain, Martine Dieuaide-Noubhani & Bertrand Beauvoit. **Implication of the vacuolar AtPAP26 in the sugars metabolism in *Arabidopsis thaliana* roots**, Journée de l'école doctorale Sciences de la vie et de la Santé, 2012, Arcachon

Antoine Monier, Sarah Monlort, Marie-Helene Andrieu, Sophie Colombier, Frédéric Delmas, Véronique Germain, Martine Dieuaide-Noubhani & Bertrand Beauvoit. **Implication of the vacuolar AtPAP26 in the sugars metabolism in *Arabidopsis thaliana* roots**, Plant Biology Congress, 2012, Freiburg

II.D. WORKSHOP

École thématique INRA : Initiation à la modélisation, 21-25 Mai 2012, La Rochelle.



III. RÉSUMÉ

Résumé

Les « Purple Acid Phosphatases » (PAPs) sont des phosphatases acides présentes dans le règne végétal et animal. Elles sont caractérisées à la fois par la présence de sept acides aminés conservés impliqués dans la structure d'un centre bimétallique et par leur couleur rose/violet lorsqu'elles se trouvent en solution. Chez les plantes, certaines PAPs présenteraient à la fois une activité phosphatase sur des métabolites (PEP, G6P...) et sur des phospho-peptides (glycosidases...), d'une part, et une activité peroxydase, de l'autre. Ces PAPs pourraient donc, non seulement être impliquées dans le métabolisme carboné, mais aussi dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. On compte à ce jour 29 gènes codant pour des PAPs chez *Arabidopsis thaliana*, dont un certain nombre est induit par la carence en Pi et par le stress oxydatif ou la sénescence. Parmi eux, le gène de l'AtPAP26 (At5g34850) présente de très fortes homologies de séquence avec des orthologues présents chez d'autres plantes. La protéine AtPAP26, qui présente *in vitro* une activité phosphatase sur le PEP et le G6P et une activité peroxydase, est sécrétée même si de nombreux indices laissent penser qu'elle pourrait également être localisée dans la vacuole.

Notre objectif est d'étudier le rôle d'AtPAP26 dans le métabolisme et le stockage des sucres dans la vacuole. Notre hypothèse de départ est que la protéine AtPAP26 pourrait intervenir *via* son activité phosphatase dans un cycle de substrat vacuolaire impliquant le glucose-6-phosphate et le glucose. Nous avons montré que chez le mutant *pap26*, l'activité glucose-6-phosphatase, mesurée *in vitro* et *in organello*, chute de manière importante. Parallèlement, chez le mutant *gpt2*, le transport tonoplastique des hexoses phosphates diminue de façon significative. Des expériences de marquages isotopiques sur du tissu racinaire en culture ont montré qu'une part importante du glucose et du fructose ne provient pas de l'hydrolyse du saccharose et que AtPAP26 est en partie responsable de cette synthèse. Enfin, par une approche *in-silico*, nous avons modélisé le métabolisme des sucres dans un système compartimenté impliquant la vacuole et ses transporteurs. La confrontation du modèle avec deux jeux de données expérimentales (concentrations à l'état stationnaire et cinétiques de marquage) a permis de confirmer l'existence d'une activité hydrolytique sur les hexoses phosphates vacuolaires.

Abstract

«Purple Acid Phosphatases» (PAPs) are acid phosphatases found both in animal and vegetal kingdoms. They are characterized by the presence of seven conserved amino acids involved in a di-metal center and by their pink/purple color in solution. In plants, some PAPs exhibit an acid phosphatase activity on various phospho-esters and on phospho-peptides. An alkaline peroxidase activity has been demonstrated *in vitro*. Therefore, PAPs could be implicated both in the carbon metabolism and in the scavenging of reactive oxygen species. To date, 29 different PAP-encoding genes were identified in the *Arabidopsis thaliana* genome. Some of them are induced by phosphate deprivation, oxidative burst or senescence. The gene encoding the protein AtPAP26 (At5g34850) exhibits a high sequence similarity with orthologous from other plants. The AtPAP26 protein, showing both a phosphatase activity on PEP, G6P and F6P, and a peroxidase activity, is one of the most abundant root-secreted acid phosphatases but also appears to be localized in the vacuole.

Our aim is to study the implication of AtPAP26 in the metabolism and storage of sugars in the vacuole. Our first hypothesis is that AtPAP26, *via* its phosphatase activity, could be involved in a glucose / glucose-6-phosphate cycle localized in the vacuole. We showed that the glucose-6-phosphatase activity in the *pap26* mutant is highly affected both *in vitro* and *in organello* compared to the wild type. At the same time, the hexose phosphate transport capacity of the vacuole is highly affected in the *gpt2* mutant compared to the wild-type. Moreover, isotopic labeling experiments performed on cultured root tissues have shown that a significant part of the intracellular glucose and fructose pool does not originate from sucrose and that AtPAP26 is, at least in part, responsible for this synthesis. Finally, we build a kinetic model of sugar metabolism in a compartmented system which has been validated by using two independent experimental data sets (steady state concentrations and kinetics of labeling of soluble sugars). This *in silico* modeling approach confirmed the involvement of a hexose phosphatase activity localized in the vacuole.