

Université de Caen Basse-Normandie

École doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Thèse de doctorat

présentée et soutenue le : 16/04/2015

par

Alexandra Girondé

pour obtenir le

Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie

Spécialité : Biologie animale et végétale

Exploration de la variabilité génotypique de l'efficacité d'usage du N chez le colza d'hiver : vers un idéotype adapté à une limitation en nitrate et l'identification des mécanismes protéolytiques impliqués dans une remobilisation foliaire efficace.

Directeur de thèse : Jean-Christophe Avice (Pr)
Co-directeur de thèse : Philippe Etienne (MCF, HDR)

Jury

Jacques Le Gouis, Directeur de recherche, UMR GDEC, Clermont-Ferrand	(rapporteur)
Anis Limami, Professeur, UMR IRHS/Agrocampus ouest, Angers	(rapporteur)
Alain Bouchereau, Professeur, IGEPP/Université de Rennes 1, Rennes	(examinateur)
Alain Ourry, Professeur, UMR EVA/UCBN, Caen	(examinateur)
.....	
Jean-Christophe Avice, Professeur, UMR EVA/UCBN, Caen	(directeur de thèse)
Philippe Etienne, Maître de Conférences/HDR, UMR EVA/UCBN, Caen	(co-directeur de thèse)

Remerciements

Ces 3 années (et les 4 qui ont précédé !) furent pleines de bons moments et de joies qui m'ont permis de m'épanouir pleinement dans ce travail que j'affectionne tant. Je vais tenter de remercier à sa juste valeur tout le monde dans ces remerciements, parce qu'il y a peu de chances que je puisse le faire sans balbutier le jour J !

*En premier lieu, je tiens à remercier les 2 directeurs successifs qui ont eu la folie de m'accueillir au laboratoire EVA : **Pr. Frédéric Le dily** et **Pr. Marie-Pascale Prud'homme**. Frédéric, je tiens à te remercier pour tes bons conseils, tes cours de physiologie végétale à jamais gravés dans ma mémoire et pour ta bonne humeur. Marie, merci de m'avoir fait confiance pour la thèse, pour tes conseils avisés et ta manière juste de diriger ce laboratoire. J'ai beaucoup aimé être doctorante sous ta direction, de me sentir soutenue et écoutée. Continue ainsi ! Je remercie aussi le directeur adjoint **Philippe Laîné**, pour sa chronique « le compte est bon » à chaque réunion de service ! Blague à part, merci pour ta présence, ta bienveillance, et tes maxis légumes (mon congélateur déborde encore de tes « monstro-courges ») !*

*Je suis très honorée que **Jacques Le Gouis** et **Anis Limami** aient accepté d'être les rapporteurs de mon travail et les en remercie. Je remercie également **Alain Bouchereau** et **Alain Ourry** pour avoir accepté d'en être les examinateurs et pour leur participation à ce jury.*

*Je tiens à présent à remercier très chaleureusement, mon directeur de thèse **Jean-Christophe Avice** et ainsi exprimer ce que je n'ai jamais vraiment dit. Mes mots ne seront jamais assez forts et justes pour t'exprimer ma reconnaissance. Tu m'as fait aimer la biologie/physiologie végétale dès le début (au point d'aller à 2 cours de biologie cellulaire en licence 1 !). Arrivée toute « petite » en licence 2 au laboratoire, j'ai pu grandir et m'épanouir dans ce travail si passionnant, en grande partie grâce à toi. Merci pour les stages durant ma licence, merci de m'avoir fait confiance pour les travaux soufre du master, puis azote de la thèse. Ta rigueur, ta passion encore intactes font de toi un modèle hors pair. Tu m'as permis de me surpasser (je n'aurais jamais pensé présenter mes travaux en anglais à Istanbul !). Tu as toujours eu les mots justes, au moment juste. Merci pour les délires et les rires, ta bonne humeur et ta disponibilité malgré un emploi du temps toujours plus chargé. Vraiment, merci.*

*Je remercie aussi mon co-directeur de thèse **Philippe Etienne**. Merci pour tes précieux conseils en biologie moléculaire. Tu m'as permis de mieux comprendre le protéasome et de faire des mutants qui, je l'espère, donneront de belles choses !*

*Je remercie aussi très fort mon super encadrant **Jacques Trouverie** pour tout (et surtout les boîtes de mouchoirs) ! Ta disponibilité, ton franc parler, tes délires, tout, tout ! Tu m'as permis de tenir bon jusqu'au bout, avec toujours de bons conseils. Tu es de ceux qui me manqueront le plus, assurément. Je suis désolée, je vais sûrement encore pleurer !*

*Je remercie aussi tout particulièrement **Lucie**, qui sans le savoir, m'a fait le plus beau des cadeaux en prenant cette lettre de stage en juin 2008. Merci d'avoir su me conseiller au cours des nombreux stages, permettant ainsi que ma thèse se passe du mieux possible. Et si celle-ci s'est passé sans encombres (mais pas sans embûches, sinon, ce n'est pas drôle !), c'est grandement grâce à toi. Je te souhaite énormément de bonheur, que ce soit avec ta petite famille ou dans ton métier d'enseignante (où tu excelles, je n'en doute pas !).*

Remerciements

Je remercie aussi tout particulièrement Céline, Fabienne et Anne, ainsi que toute l'équipe de **L'IJPB de Versailles**. Merci Céline de m'avoir accueillie à 2 reprises dans ton équipe et d'avoir pris le temps de discuter avec moi. Tu as beaucoup contribué à ma compréhension du sujet, notamment en me montrant d'autres manières de l'appréhender. Merci à Fabienne pour sa bonne humeur, le coup de main en manip' et le café du matin. Cela restera d'excellents souvenirs dans ma mémoire. Je remercie également Anne pour son travail colossal pour l'obtention de mes mutants et son accueil. J'ai beaucoup aimé ces quelques jours à travailler avec toi. Je remercie aussi pêle-mêle Fabien, Magali, Michèle, Liliana, Akira et Marianne pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie également **Emmanuelle** pour les quelques cours de pilates et les discussions toujours intéressantes en salle café, la **petite Sophie** pour son humour décalé, **Servane** pour ses précieux conseils en statistiques (les ACP n'ont plus de secret pour moi !) et les conversations de végétariennes et **Sylvain** pour le chapeau de souris du dernier repas de Noël, je le ressortirai ! Je remercie aussi **JB** pour les ateliers doctorants qui m'ont grandement aidé à démêler cette thèse, **Annette** pour le soutien lors de mes premiers cours de TP, **Marie-Laure** pour ses remarques pertinentes et les discussions autour du café et **Alain** pour les conversations « canasson » et son franc parler.

Mais je remercie aussi « **Jo-Jo** » pour sa bonne humeur et son réapprovisionnement des boîtes et des pipettes tel le Lucky Luke des paillasses, **Julie** pour avoir rendu les séries de broyages dans l'azote et les extractions plus distrayantes (et m*rde pour le concours, moi j'y crois !), « **Mayali** » pour son humour incroyable et sa présence bienveillante, « **Jolie-Sophie** » pour ses chansons brésiliennes du midi et ses blagues extrêmement drôles et son incommensurable soutien, **Marie-Paule** pour les analyses IRMS de dernière minute que tu as su gérer avec rapidité, **Josette** pour les montagnes de micropesées (en urgence) et **Bénédicte** pour les broyages de dernière minute (décidemment, beaucoup de dernière minute), même si les conditions ne s'y prêtaient pas ! Je remercie également très fort **Frédérine**. Sans toi, j'y serais encore ! Je te souhaite de trouver un CDI au plus vite (et d'avoir une maternité remplie de joie !). Je remercie aussi **Anne-Françoise**. Merci d'avoir toujours été là et de m'avoir aidé pour ma culture de grande importance en M2 ! (tu ne te souviens sûrement pas de mes 2 bacs de tests, mais je ne t'en veux pas, je m'en souviens pour 2 !). Je remercie aussi **Patrick** pour le soutien informatique (indispensable !) et **Dominique** pour ta gentillesse et ton « point météo » du matin !

Je remercie aussi tout spécialement **Cédric**, l'étudiant de licence le plus doué en manip ! Tu m'as permis d'avancer à une vitesse fulgurante durant ma 3^e année. Tout de suite autonome en manip avec d'excellentes initiatives, tu as été d'une aide précieuse. Je te souhaite de trouver tout ce que tu recherches à la Réunion !

Et merci à mes compagnons de galère ! Je n'ai pas été aussi présente que je l'aurais voulu mais vous comptez beaucoup pour moi. Alors merci à « **la plus belle** » (Marine bien évidemment !) pour avoir joué au petit chimiste avec moi et pour ta gentillesse, ne change pas quoi qu'il se passe ! Tu as égayé chaque sortie, chaque réunion, chaque café, chaque pause (miam les carambars !) ! Merci à **Caro** pour la compagnie, parfois nocturne, et les conversations « écologie » dans tous les sens du terme, sans oublier que tu resteras à jamais celle avec qui j'ai partagé mon premier (et je n'espère pas dernier) « putain de stade » Indochinois. Courage, tu nous fais une superbe thèse ! Merci à Docteur **Vincent** (le premier à avoir fini !) pour avoir été là à Istanbul (sinon, je serais encore perdue là-bas !). Merci pour m'avoir suivi dans mes délires, parfois pas évidents (KAPOUÉ !) ! Tu as beaucoup contribué à détendre l'atmosphère, merci ! Merci aux Triplettes (**William** (Elise),

Remerciements

*Anne et Gérard (Thaïs) pour les ouragans réguliers dans le bureau 1 pour nous rappeler qu'il n'y a pas que le boulot dans la vie. Merci pour vos délires et les pauses café toutes plus loufoques que les unes que les autres ! Merci aussi à **Philippe** dit « Philou » ! Merci pour tes conseils, tu as été précieux dans ma transition vers la thèse, toujours honnête. J'ai adoré discuter avec toi ! Je te souhaite du bonheur avec ta petite famille ! Bon courage aussi à **Elise T.** qui commence ! Je souhaite également à **Maxence** de bientôt rejoindre le club des docs, que ce soit ici ou ailleurs ! Vous allez tous grave me manquer !*

*Je remercie également **ma famille** pour m'avoir aidé à la fin de la thèse, où concilier les études et vie privée s'est avéré sportif, au propre comme au figuré (qui ne m'a jamais vu/entendu courir dans les couloirs) ! Merci à **ma mère** pour le goût de la perfection, de la rigueur, et du travail bien fait, ce sont ces qualités qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. Merci également d'avoir rendu possible le rêve d'habiter en maison, cela a été une bouffée d'oxygène appréciable !! Merci également à **mon père** pour son aide au champ (tous les jours et lors de mes déplacements), ainsi que pour son quotidien : « Faut que tu prennes des vacances, t'as le droit, ça va pas ça » ! Je souhaite également du courage à ma petite sœur **Allison** pour trouver son chemin dans la multitude de possibilités qu'offre l'université de Caen. J'y ai trouvé ma voie, et une partie de moi restera ici après mon départ. J'espère que tes études te combleront comme elles m'ont comblée. J'adresse un clin d'œil également à la grande sœur que j'ai retrouvéé, **Elodie**, avec qui j'espère écrire de nouveaux souvenirs très bientôt !*

*Merci à « **Mawie Thewese** », mon « pototo » (âme sœur, ça faisait trop gnian-gnian, tu me connais). Je ne te dis jamais rien alors profite de ces quelques lignes ! Tu as été indispensable dans ce délire de la thèse. Tu as été conciliant pour le peu de temps qu'il restait pour toi après la thèse et les chevaux. Tu es resté là, patient (jeu de mot avec ton boulot !) et ton « et pourtant tu le bouffes ! » aura été ta plus belle phrase que tu m'ais dite (j'en ferai ton épitaphe !) ! Celle qui m'a fait prendre conscience de ce que je mangeais et m'a doucement fait basculer dans le végétarisme (et je ne regrette rien). Tu m'as fait grandir et j'espère que l'on restera longtemps ensemble (comme on dit : encore 70 ans à tirer !) et qu'on sera heureux, avec **Chatounette**, kakarikis, poules, lapins, canards, oies, cochons, poneys, chevaux, lamas, dromadaires et pourquoi pas dahus ! Tant qu'ils ne sont pas dans nos assiettes et qu'on est ensemble, rien ne peut nous arriver.*

*Parce que c'est devenu une tradition dans mes remerciements, **quelques mots équitins** ! Je remercie mon **Dadou Run** (Running) pour les multiples frais de vétérinaire, les tracas, et les debout 5h/aller-retour le midi pour les balades/piqures/soins en tout genre. Mais que ne ferais-je pas pour toi, tu resteras le cheval de ma vie avec Filou ! Merci à la **Grosse Niny** (Onyx) d'avoir été toujours aussi heureuse de me voir (le plus doux des hennissements), malgré l'heure tardive et le peu de temps que je lui consacre (et pour la frayeur poulain...). Merci à **Mamie Lyze** (Alyzée, doyenne d'une trentaine d'années !!), qui a tenu bon sans me faire la frayeur de partir au cours de la thèse, même si le dernier hiver à nécessité des arrangements pour te rentrer le soir et te sortir le matin (y compris de curer le box de nuit à 8h le soir...). Merci à mon **P'tit Kiki** (Diamant et oui, j'aime les surnoms ridicules !) qui est le poulain le plus mignooooon du moooooonde ! Celui qui a toujours envie de câlin, surtout quand je suis propre et prête à aller au labo... Tous les 4, ils ont contribué à mon équilibre mental malgré leur contribution à déséquilibrer un emploi du temps déjà bancal. Que cette famille équestre continue de s'agrandir encore et toujours, avec une « Epona » pour Loïc et le poulain que les voisins me doivent ! Tel Obélix, je suis tombée dans la marmite toute petite, et comme disent mon père et Loïc : « c'est foutu, la cabane va tomber sur le chien !!! ».*

Liste des abréviations

^{14}N : azote 14

^{15}N : azote 15

AAP1 : « amino acid permease 1 »

ABA : acide abscissique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AGH : γ -glutamylhydroxamate

AlaT : alanine aminotransférase

ANOVA : analyse of variance

ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AP : protéases à aspartate

API : inhibiteur des protéases à aspartate

ARN : acide ribonucléique

AS : asparagine synthétase

ATP : adénosine triphosphate

BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

BET : bromure d'éthyldium

BSA : « bovine serum albumin »

Cab : « chlorophyll a/b-binding protein »

Canola : « canadian oil, low acid »

CETIOM : centre technique interprofessionnel des oléagineux et du chanvre

CHATS : « constitutive high affinity transport system »

CIPAN : culture intermédiaire piège à nitrate

CK : cytokinines

CLATS : « constitutive low affinity transport system »

Clp : protéases caséinolytiques

CND41 : « chloroplast nucleoid DNA binding protein 41 »

CP : protéases à cystéine

CPI : inhibiteur des protéases à cystéine

CRAW : centre wallon de recherche agronomique

Deg proteases : « degradation of periplasmic proteins »

DM/MS : « dry matter » / matière sèche

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTT : dithiothréitol

EAA/NAE : efficacité d'assimilation de l'azote

EAbA/NUpE : efficacité d'absorption de l'azote

EDTA : éthylène diamine tétra acétique

EF1-1 : « elongation factor 1-1 »

ERA/NRE : efficacité de remobilisation de l'azote

EUA/NUE : efficacité d'usage de l'azote

EUtA/NUtE : efficacité d'utilisation de l'azote

ExoP : exopeptidase

FAO : « Food and Agriculture Organization of the United Nations » (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

FM / MF : « fresh matter » / matière fraîche

FtsH : protéases « Filamentation temperature-sensitive H »

GAs : gibbérellines

GDH : glutamate
deshydrogénase

GOGAT : glutamine
oxoglutarate
aminotransférase
(glutamate synthase)

GS : glutamine synthétase

HN : « high nitrogen »
(fort azote)

HtrA : « high temperature
requirement A »

IGEPP : Institut de
génétique, environnement
et protection des plantes,
Rennes

IHATS : « inducible high
affinity transport system »

IJPB : Institut Jean-Pierre
Bourgin, Versailles

ILATS : « inducible low
affinity transport system

INN : indice de nutrition
azotée

IRMS : « isotope-ratio
mass spectrometry »

KO : « knock out »

LAP : leucine
aminopeptidases

LB_{prod} : production de
biomasse foliaire

Lhcb3 : « LHCII type III
chlorophyll a/b-binding
protein »

LHCII : « light harvesting
complex II »

LN : « low nitrogen »
(faible azote)

LSU/GSU : « Rubisco
large subunit » / grande
sous-unité de la Rubisco

MC : métacaspases

MeJa : jasmonate de
méthyle

MG132 :
benzyloxycarbonyl-leu-
leu-leucinol

MMP : « matrix
metalloproteinases »

MP : métalloprotéases

MPI : inhibiteur des
métalloprotéases

MPP : « mitochondrial
processing-peptidases »

NADH : nicotinamide
adénine dinucléotide

NADPH : nicotinamide
adénine dinucléotide
phosphate

NBI : « nitrogen balance
index »

NBT : nitroblue
tetrazolium

NCBI : « National center
for biotechnology
information »

NDVI : « normalized
difference vegetation
index »

NiR : nitrite réductase

NIRS : « near infrared
spectroscopy »
(spectroscopie proche
infrarouge)

NR : nitrate réductase

NRE_{leaf} : efficacité de
remobilisation dans la
feuille source

OGM : organisme
génétiquement modifié

Pap-L : protéases
« papain-like »

PAR : « photosynthetically
active radiations »
(rayonnements
photosynthétiques actifs)

PCD : « programmed cell
death » (mort cellulaire
programmée)

PCR : « polymerase chain
reaction » (réaction en
chaîne par polymérase)

PE : « protein extract »
(extrait de protéines
solubles)

PEF : « plant elemental
fluxes »

PI : inhibiteur du
protéasome

PSI : photosystème I

PSII : photosystème II

PVDF : polyvinylidene difluoride

PVP : polyvinylpyrrolidone

PVPP : polyvinylpolypyrrolidone

QTL : « quantitative trait loci »

RAPSODYN :

« Optimisation of the rapeseed oil content and yield under low nitrogen input: improving breeding of adapted varieties using genetics and genomics »

RCB : « Rubisco-containing bodies » (vésicules de dégradation de la Rubisco)

Remob_{aa} : remobilisation des acides aminés

Remob_{prot} : remobilisation des protéines solubles

ROS : « reactive oxygen species » (espèces réactives de l'oxygène)

RT-PCR : « reverse transcription polymerase chain reaction »

Rubisco : ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase

SA : acide salicylique

SAG : « senescence-associated genes »

SAV : « senescence-associated vacuole »

SDG : « senescence down-regulated genes »

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : « SDS polyacrylamide gel electrophoresis »

SE : « standard error » (erreur standard)

SOD : superoxide dismutase

SP : protéases à sérine

SPAD : « soil plant analysis development »

SPI : inhibiteur des protéases à sérine

SSU/PSU : « Rubisco small subunit » / petite sous-unité de la Rubisco

Sub-L : protéases subtilisin-like

TAE : tampon tris acétate EDTA

TBS : « tris buffer saline » (tampon tris salin)

TBST : tampon TBS avec tween 20

TCA : acide trichloroacétique

TCN : teneur critique en N

TGX : « tris-glycine extended »

TP : protéases à thréonine

TSW : « thousand seed weight » (poids de mille grain(e)s)

Ub : ubiquitine

UPLC : « ultra performance liquid chromatography »

UPS : « ubiquitin 26S-proteasome system »

VPE : « vacuolar processing enzyme »

WSCP : « water soluble chlorophyll-binding protein »

SOMMAIRE

Remerciements**Liste des abréviations****CHAPITRE A : INTRODUCTION GENERALE 1****CHAPITRE B : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE & OBJECTIFS 4****I. La culture de colza et la nutrition azotée..... 4**

I.I. L'azote au cours du cycle de développement du colza..... 4

I.I.1. Du semis à la reprise de croissance (stades A-B)..... 4

I.I.2. De la reprise de croissance à la transition stade végétatif – stade reproducteur (stades C-E)..... 5

I.I.3. De la floraison à la récolte (stades reproducteurs : F-G)..... 6

I.II. Optimisation des pratiques culturales : fertilisation et gestion des cultures..... 6

I.II.1. L'indice de nutrition azotée (INN) 7

I.II.2. La Réglette Azote et le système YARA Image IT 8

I.II.3. Mesure de la transmittance 8

I.II.4. Mesure de la réflectance 8

I.II.5. Mesure de la fluorescence..... 9

I.III. Gestion de l'azote par le colza : l'efficacité d'usage de l'azote (EUA) 10

I.III.1. L'efficacité d'absorption de l'azote (EAbA) 10

a. L'EAbA aux stades végétatifs 11

b. L'EAbA aux stades reproducteurs 11

I.III.2. L'efficacité d'utilisation de l'azote (EUtA)..... 12

a. L'efficacité d'assimilation de l'azote (EAA) 13

b. L'efficacité de remobilisation de l'azote (ERA) 13

I.III.3. Les voies d'amélioration de l'EUA 17

a. L'obtention de plantes génétiquement modifiées à forte EUA 17

b. La sélection variétale..... 18

II. La sénescence foliaire et la remobilisation de l'azote 19

II.I. Importance agronomique de la sénescence : l'exemple des phénotypes « stay-green » 19

II.II. Les manifestations physiologiques et moléculaires de la sénescence foliaire 20

II.II.1. L'initiation (phase 1) 22

II.II.2. Le démantèlement et le recyclage des éléments cellulaires (phase 2)..... 22

II.II.3. La phase terminale (phase 3) 25

II.III. La régulation de la sénescence foliaire 25

II.III.1. Les facteurs endogènes..... 25

a. Le signal sucre et le ratio C/N 25

b. Les hormones 26

c. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)..... 28

d. Les facteurs de transcription..... 29

II.III.2. Les facteurs externes 29

III. Les protéases impliquées dans la sénescence foliaire	30
III.I. Les protéases à cystéine (CP ; EC 3.4.22).....	31
III.I.1. Les métacaspases (MC)	32
III.I.2. Les papain-like (Pap-L)	33
III.II. Les protéases à sérine (SP ; EC 3.4.21)	34
III.II.1. Les subtilisin-like (Sub-L)	35
III.II.2. Les protéases caséinolytiques (Clp)	36
III.II.3. Les « degradation of periplasmic proteins » (Deg)	37
III.III. Les métalloprotéases (MP ; EC 3.4.24).....	38
III.III.1. Les « mitochondrial processing-peptidases » (MPP).....	39
III.III.2. Les « matrix metalloproteinases » (MMP)	39
III.III.3. Les « filamentation temperature-sensitive H » (FtsH).....	40
III.IV. Les protéases à aspartate (AP ; EC 3.4.23)	41
III.V. Les protéases à thréonine : le protéasome (TP; 3.4.25).....	43
III.VI. Les exopeptidases (ExoP)	45
IV. Bilan des connaissances et problématiques de recherche	46
CHAPITRE C : MATERIELS & METHODES	51
I. Conditions de cultures et dispositifs expérimentaux	51
I.I. Culture de 10 génotypes de colza au stade rosette en conditions contrôlées (<i>articles 1 et 2</i>) : culture « Rosette ».....	51
I.II. Culture de 2 génotypes aux stades reproducteurs en conditions contrôlées (<i>article 3</i>) : Culture « Graines ».....	52
I.III. Sélection de feuilles sénescents pour l'étude de la remobilisation du N foliaire	53
II. Détermination de la composition de la graine (culture « Graines »).....	54
III. Analyses élémentaires et biochimiques.....	54
III.I. Détermination des quantités de N total, de ¹⁵ N et calcul des flux plante entière (cultures « Rosette » et « Graines »).....	54
III.I.1. Analyses N total et ¹⁵ N	54
III.I.2. Calculs de flux de N au niveau plante entière	56
III.II. Détermination de la quantité d'acides aminés libres (cultures « Rosette » et « Graines »)	57
III.III. Quantification des autres composés azotés (cultures « Graines » et « Rosette »).....	59
IV. Détermination des composantes de l'efficience d'usage de l'azote (cultures « Rosette » et « Graines »)	59
V. Analyses protéomiques.....	61
V.I. Détermination de la quantité de protéines solubles dans la feuille source (cultures « Rosette » et « Graines »).....	61
V.II. Etudes des activités protéolytiques dans la feuille source	62

V.II.1. Dégradation de la Rubisco sur gel « Stain Free » (cultures « Rosette » et « Graines »).....	62
V.II.2. Activités protéolytique sur zymogrammes (culture « Rosette »).....	65
a. Zymogrammes.....	65
b. Identification des protéases impliquées dans les activités protéolytiques mises en évidence sur zymogrammes.....	65
V.III. Analyses de l'activité de la glutamine synthétase (GS) et la glutamate deshydrogénase (GDH) de la feuille source (culture « Graines »).....	66
V.IV. Immunodétections de protéines d'intérêts (cultures « Rosette » et « Graines »).....	67
V.IV.1. Extraction des protéines membranaires pour la détection de lhcb3, D1 et FtsH par western blot.....	68
V.IV.2. Transfert des protéines sur membrane et immunodétections.....	68
VI. Analyses moléculaires : progression de la sénescence foliaire au niveau plante entière (culture « Rosette »).....	70
VI.I. Extraction d'ARN et transcription reverse.....	70
VI.II. « Polymerase Chain Reaction » (PCR).....	71
VII. Analyses statistiques (culture « Rosette » et « Graines »).....	72
CHAPITRE D : RESULTATS.....	73
I. La remobilisation de l'azote au stade végétatif.....	73
I.I. Article 1: A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape.....	75
I.II. Article 2: A comparative study of proteolytic mechanisms during leaf senescence of four genotypes of winter oilseed rape highlighted relevant physiological and molecular traits for NRE improvement.....	96
II. La remobilisation de l'azote post-montaison.....	117
The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanism of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during the seed filling.....	119
CHAPITRE E : DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	141
I. L'étude de la variabilité génotypique de l'EUA aux stades végétatif et reproducteur révèle de nouvelles pistes pour définir les critères de sélection de variétés de colza adapté à une limitation en nitrate.....	142
I.I. Mise en évidence d'une variabilité génotypique de l'EUA dès le stade rosette : identification des génotypes les plus adaptés à une limitation en nitrate et des composantes de l'EUA impliquées dans une forte EUA au stade végétatif.....	142
I.II. Le N accumulé dans les feuilles avant la montaison doit être remobilisé efficacement vers la tige pour y être stocké transitoirement, puis remobilisé vers les graines au moment de leur formation/remplissage.....	143
I.III. Perspectives à envisager pour la sélection variétale de colza à forte EUA.....	145

II. La protéolyse est le principal levier d'amélioration de la remobilisation du N foliaire au stade rosette alors que le devenir des produits de protéolyse jouerait un rôle prépondérant dans la remobilisation foliaire post-montaison.....	146
II.I. L'étude de la variabilité génotypique de la remobilisation du N foliaire permet d'identifier des mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans une protéolyse élevée au stade rosette.....	147
II.II. Au cours des premiers stades reproducteurs, la protéolyse élevée est associée à une forte activité des protéases à cystéine et du protéasome, mais la remobilisation du N foliaire semble principalement limitée par l'exportation/la dégradation des produits de protéolyse.....	153
II.III. Perspectives à envisager pour la caractérisation/validation de nouvelles pistes de sélection de colza à forte ERA en conditions de bas intrants N.....	155
CHAPITRE F : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	158
ANNEXE 1 : ACTE DE CONGRES rédigé pour le « XVII International Plant Nutrition Colloquium » du 19 au 22 août 2013 à Istanbul, Turquie (communication orale)	182
ANNEXE 2 : ACTE DE CONGRES rédigé pour le « 6th European Workshop on Leaf Senescence » du 14 au 18 octobre 2014 à Versailles, France (présentation d'un poster).....	186

CHAPITRE A

INTRODUCTION GENERALE

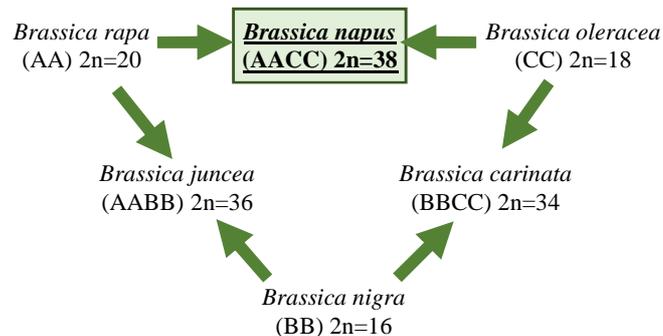


Figure A-1 : Place du colza (*Brassica napus*) dans le triangle de « U » représentant les différentes relations génétiques entre diverses espèces de Brassicacées. Le triangle de U décrit les relations génétiques entre 3 espèces de *Brassica* (*B.*) diploïdes : le chou (*B. oleracea*), la navette (*B. rapa*) et la moutarde noire (*B. nigra*) et 3 espèces allotétraploïdes résultant d'hybridations entre les diploïdes: le colza (*B. napus*), la moutarde brune (*B. juncea*) et la moutarde d'Abyssinie (*B. carinata*). A, B et C représentent les différents génomes et n représente le nombre de chromosomes (d'après U, 1395).

Tableau A-1 : Différentes utilisations de l'huile de colza en fonction de la composition de l'huile extraite des graines.

Riche en acide érucique	Riche en acide oléique	Faible en α -linoléique Riche en acide oléique	Riche en acide α -linoléique
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Chimie verte (bioplastique, base de produits cosmétiques, détergents, lubrifiants) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Chimie verte (bioplastique, base de produits cosmétiques, détergents, lubrifiants) ✓ Diététique ✓ Biocarburant 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alimentation (friture) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Diététique ✓ Biocarburant

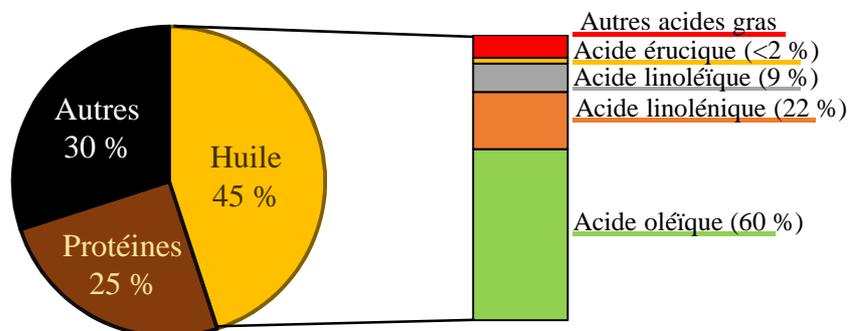


Figure A-2 : Teneur moyenne en protéines, en huile, et composition en acides gras de l'huile de la graine de colza (source Nesi *et al.*, 2008; CETIOM).

CHAPITRE A : INTRODUCTION GENERALE

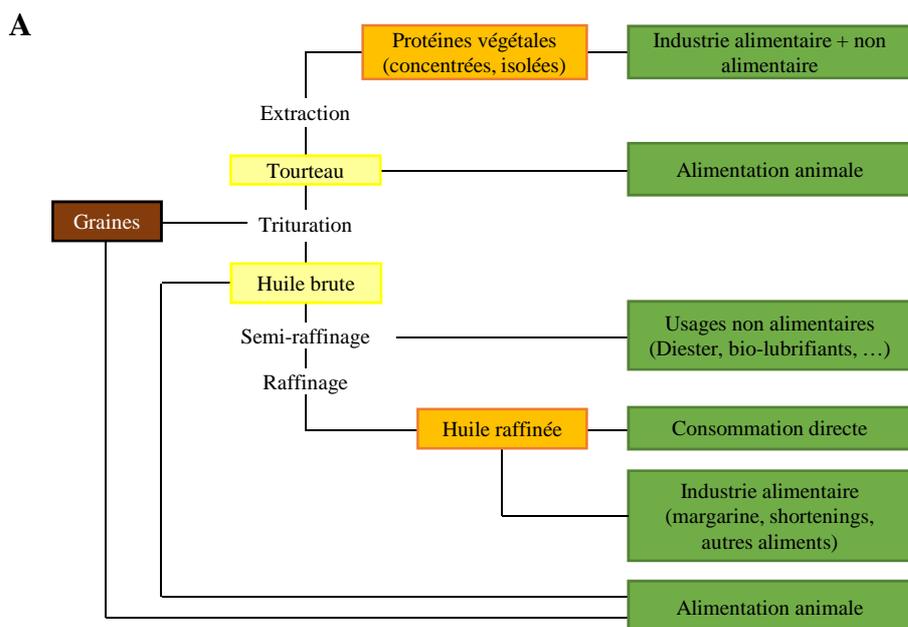
Le colza, du néerlandais « koolzaad » (graine de chou), est une plante herbacée bisannuelle de la famille des Brassicacées. Cet oléagineux est issu d'un croisement entre le chou et la navette (U, 1935) (Figure A-1), 2000 à 1500 ans avant J.-C. L'hybride issu de ce croisement possède par conséquent un double génome et a été sélectionné sous 2 formes : le rutabaga pour ses racines et le colza pour la production d'huile ou de fourrage. Il existe deux variétés de colza : le colza de printemps cultivé au Canada et en Australie (cycle de 120-150 jours), et le colza d'hiver plus adapté aux climats européens (cycle de 250-310 jours).

Plusieurs « types » de colza ont été sélectionnés en fonction de la composition en acides gras de l'huile extraite des graines (Tableau A-1). Les graines des variétés utilisées pour l'alimentation humaine contiennent 40 à 50% d'huile, composée en moyenne de 22% d'acide linoléique (précurseur d'oméga 6) et 9% d'acide linoléique (précurseur d'oméga 3) (Figure A-2). Grâce à cette composition en acides gras, l'huile de colza alimentaire participe à réduire de manière significative les risques de maladies coronariennes (ANSES¹) et de cancer du sein (Cho *et al.*, 2010). Cependant, l'huile de colza utilisée dans l'alimentation humaine contenait naturellement de l'acide érucique, composé présumé toxique pour l'homme. Par conséquent, une première sélection génétique a été réalisée dans les années 70, et seuls des colzas d'hiver et de printemps présentant un taux d'acide érucique inférieur à 2% de la fraction lipidique (variétés dites « 0 ») sont admis pour l'alimentation humaine (Nesi *et al.*, 2008). Ces variétés de colza sont appelées Canola pour « **C**anadian **o**il, **l**ow **a**cid ».

Par ailleurs, le résidu de pressage (tourteau) issu de l'extraction de l'huile des graines par trituration (Figure A-3A) est valorisé dans l'alimentation animale (vaches laitières, porcs et volailles). Cependant, le colza est naturellement riche en glucosinolates, que ce soit dans les parties végétatives ou les graines. Ce composé soufré entraîne une faible appétence du tourteau, une perturbation des fonctions de la glande thyroïdienne et une limitation de la croissance du bétail (CETIOM²). Ainsi, pour éviter une trop forte concentration en glucosinolates du tourteau, les variétés « 0 » obtenues dans les années 70 ont de nouveau été sélectionnées dans les années 80 pour donner naissance aux variétés « 00 » (double zéro), avec des graines présentant une faible teneur en glucosinolates (inférieure à 20 µmoles par gramme). Le tourteau de colza est un peu moins riche en protéines que le tourteau de soja mais sa composition en acides aminés (lysine, méthionine et cystéine), en minéraux (calcium et phosphore ; Figure A-3B) et en acides gras insaturés (acide oléique) permet une amélioration de la qualité nutritionnelle du lait chez les vaches laitières et de la production de

¹ ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

² CETIOM : Centre technique interprofessionnel des oléagineux et du chanvre



B

	Tourteau de colza	Tourteau de soja 48
Matière sèche (%)	88,7	87,8
Protéines brutes (%)	33,7	45,3
Cellulose brute (%)	12,4	6,0
Matière grasse (%)	2,3	1,9
Lys DI (% PDIE)	6,8	6,9
Met DI (% PDIE)	2,0	1,5
Calcium (g/kg)	8,3	3,4
Phosphore (g/kg)	11,4	6,2
UFL (par kg)	0,85	1,06
UFV (par kg)	0,80	1,05
PDIA (g/kg)	92	177
PDIN (g/kg)	219	331
PDIE (g/kg)	138	229

C

Variations des résultats obtenus avec du tourteau de colza par rapport à du tourteau de soja	
Ingestion d'ensilage de maïs (kg MS/VL/jour)	0,1
Ingestion de la ration totale (kg MS/VL/jour)	+1,1
Lait brut (kg/jour)	+0,6
Taux butyreux (teneur en matière grasse du lait ; g/kg)	-1,2
Taux protéique (g/kg)	+0,3
Gain de poids vif (g/jour)	+60

Figure A-3 : Différents traitements de la graine de colza en fonction de son utilisation (A), composition du tourteau de colza comparé à celui de soja 48 (B) et bénéfices observés avec le tourteau de colza par rapport au tourteau de soja (C).

MS : matière sèche ; PDIA : protéines d'origine alimentaire digérées dans l'intestin ; PDIE : ensemble des protéines digestibles dans l'intestin, d'origine alimentaire ou microbienne, lorsque la ration est déficitaire en énergie ; PDIN : ensemble des protéines digestibles dans l'intestin, qu'elles soient d'origine alimentaire ou microbienne lorsque la ration est déficitaire en azote dégradable ; UFL : unité fourragère pour la lactation ; UFV : unité fourragère viande bovine ; VL : vaches laitières (source : CETIOM, Institut de l'élevage et PROLEA).

viande bovine (Figure A-3C ; CETIOM). Le tourteau de colza, produit en France, est donc devenu une excellente alternative au tourteau de soja largement importé.

Du fait de ces nombreuses utilisations alimentaires et non alimentaires (Tableau A-1), la culture de colza est en expansion et présente la plus grande augmentation des superficies de culture depuis ces 25 dernières années, que ce soit au niveau français, européen ou mondial (+106% de surface de culture entre 1990 et 2013). En effet, avec une production de 21 millions de tonnes de graines en 2013 (FAO³), l'Union Européenne est le premier producteur mondial et au sein de l'UE, la France présente la 2^{ème} plus grande superficie de culture en 2014 (1,5 millions d'hectares avec un rendement moyen de 36,7 q.ha⁻¹ ; Figure A-4), juste derrière l'Allemagne. L'Union Européenne est également le premier producteur mondial de tourteau de colza avec une production française de tourteau de 2,5 millions de tonnes pour la saison 2012/2013 (CETIOM).

La population mondiale croît sans interruption (Figure A-5A) augmentant les besoins alimentaires, notamment ceux en huile végétale (Figure A-5B), et non alimentaires (Figure A-5C). Pour optimiser les rendements et maintenir une production suffisante, la culture de colza requiert une quantité importante d'engrais azotés (160-250 kg.ha⁻¹) (Rathke *et al.*, 2005). Or, les coûts liés aux engrais azotés, dont la production de fertilisants azotés de synthèse nécessite du gaz naturel (méthane, CH₄), augmentent régulièrement et représentent le poste de dépense le plus important des cultures (Rothstein, 2007). De plus, l'azote apporté en excès peut être responsable d'une pollution environnementale en étant lessivé (risque d'eutrophisation) et/ou transformé *via* les bactéries dénitrifiantes du sol en un gaz à effet de serre, le protoxyde d'azote (N₂O), 310 fois plus polluant que le CO₂.

Face à ces enjeux économiques et environnementaux, il devient crucial de trouver des moyens de limiter l'apport d'intrants azotés tout en maintenant, voire en augmentant, le rendement du colza. Ce travail de thèse a donc pour ambition de contribuer à la caractérisation des déterminants physiologiques et métaboliques impliqués dans une gestion de l'azote efficace par le colza.

Bénéficiant d'une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, mes travaux de recherche doctorale sont pleinement inscrits dans le programme ANR-GENOPLANTE GENERGY⁴ (2008-2012) dont l'objectif général était d'améliorer le rendement en huile du colza pour la production de biocarburant, et le programme

³ Food and Agriculture Organization of the United Nations

⁴ ANR-07-GPLA-016 GENERGY: Improvement of the oil yield of the rapeseed crop in the context of bio fuel production

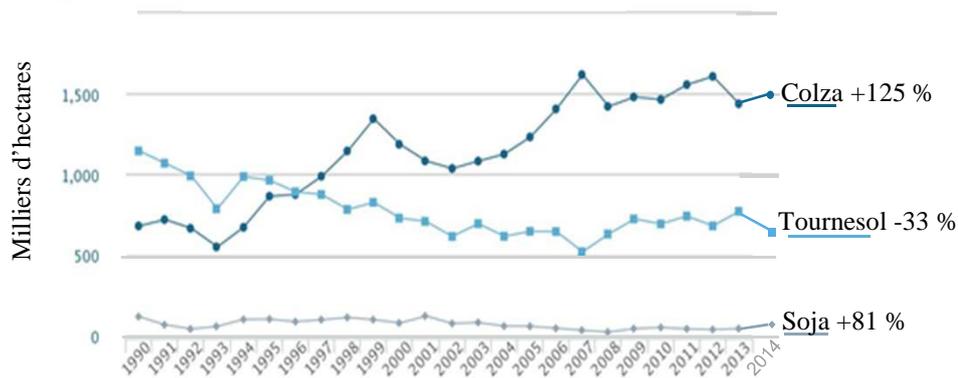


Figure A-4 : Evolution de la superficie des cultures de colza, de tournesol et de soja en France entre 1990 et 2014.

La surface de culture de colza a augmenté de 125 % en France entre 1990 et 2014 (source : FAO).

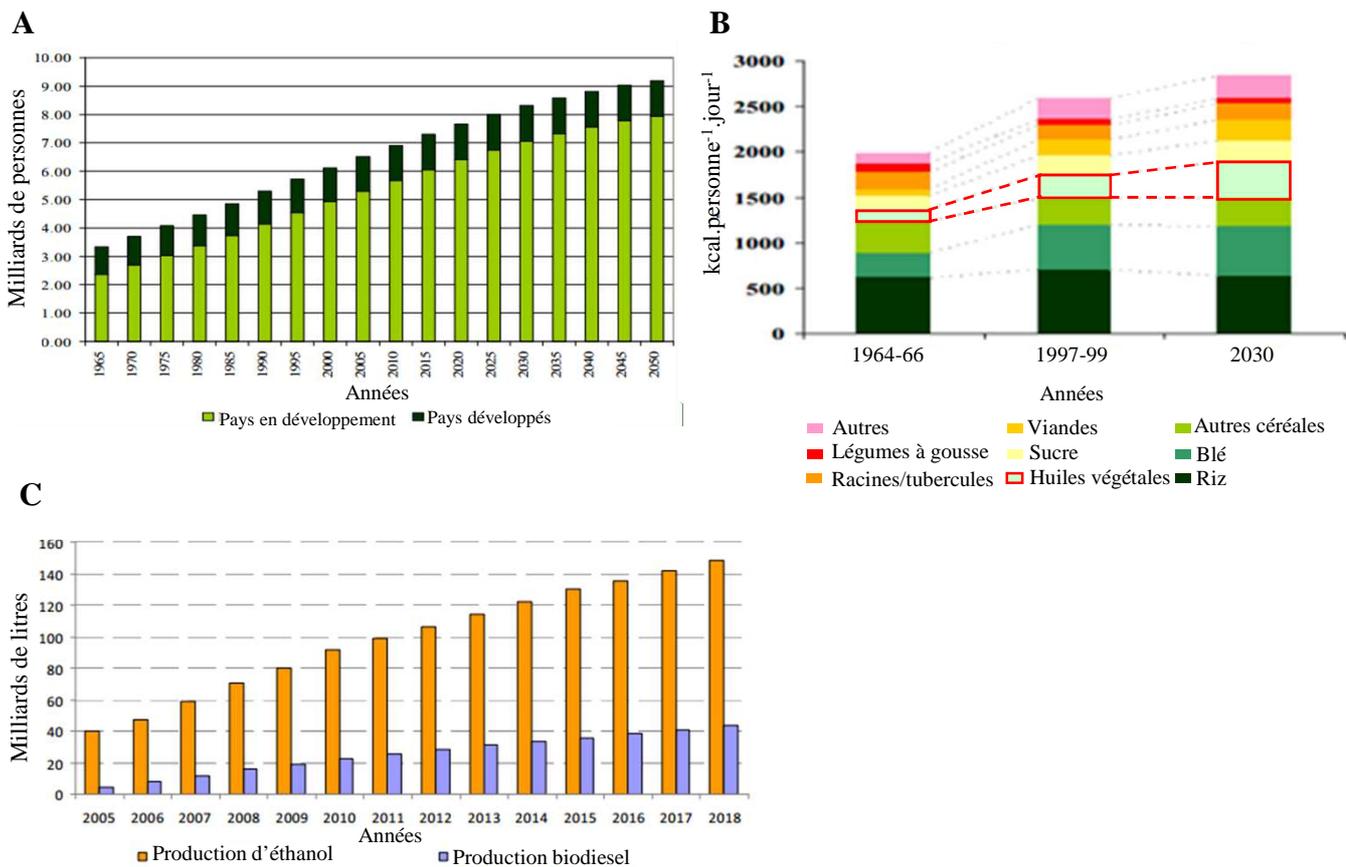


Figure A-5 : Evolution mondiale de la population (1956-2010) et prédictions jusqu'en 2050 (A), évolution des besoins alimentaires en kilocalories par personne et par jour déterminée sur 2 périodes: 1964-1966, 1997-1999 et estimée pour 2030 (B), production (2005 à 2014) et prédiction de production de biocarburants jusqu'en 2018 (C) (source : FAO).

Investissement Avenir RAPSODYN⁵ (2012-2019), qui a pour objectif d'optimiser le rendement du colza en conditions de faibles apports azotés.

Le mémoire de thèse sera organisé de la manière suivante : après une synthèse bibliographique des connaissances relatives à la gestion de l'azote, à la sénescence et aux mécanismes cellulaires associés (chapitre B), les dispositifs expérimentaux et les différentes techniques utilisées au cours de ce travail doctoral seront détaillées (chapitre C) et les résultats seront présentés sous forme de 3 articles (chapitre D), avant d'être discutés globalement dans un chapitre « discussion générale et perspectives » (chapitre E).

⁵ ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input

CHAPITRE B

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE & OBJECTIFS

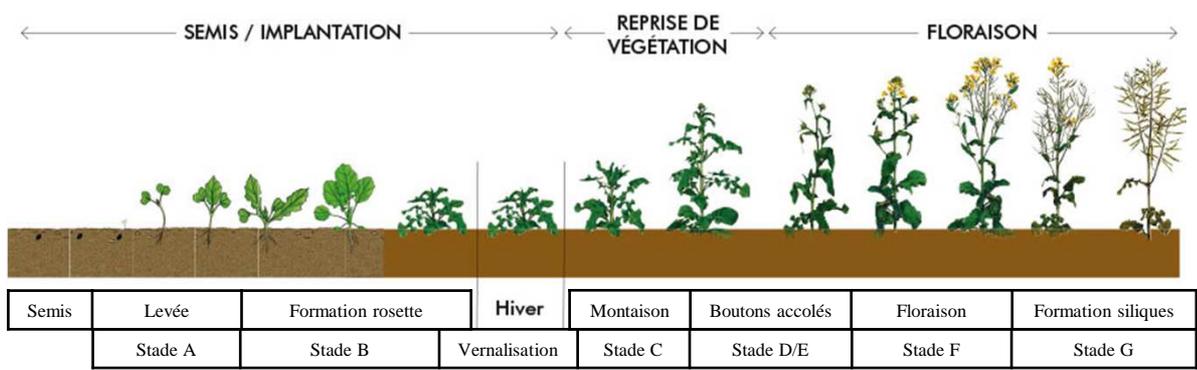


Figure B-1 : Cycle de développement du colza d’hiver, du semis à la formation des graines.
 (source : CETIOM).

CHAPITRE B : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE & OBJECTIFS

I. La culture de colza et la nutrition azotée

En plus de l'azote disponible dans le sol, le colza nécessite des apports d'engrais azotés importants (160-250 kg.ha⁻¹) (Rathke *et al.*, 2005), mais seulement 50% de cet azote est retrouvé dans les graines (Schjoerring *et al.*, 1995). Par conséquent, il est crucial de mieux comprendre l'utilisation du N par le colza afin d'en améliorer sa valorisation et ainsi réduire les coûts économiques et optimiser le bilan agro-environnemental de cette culture.

I.I. L'azote au cours du cycle de développement du colza

Le cycle de développement du colza comprend sept étapes principales (Figure B-1) : le semis, la levée (formation des cotylédons : stade A), formation de la rosette (production de feuilles ; stade B), montaison (croissance de la tige ; stade C), développement des bourgeons floraux (stades D et E), floraison (stade F) et développement des siliques/formation des graines (stade G). Les capacités d'absorption et les besoins en N du colza varient en fonction du stade de développement et sont détaillés dans les paragraphes suivants.

I.I.1. Du semis à la reprise de croissance (stades A-B)

En France, le colza d'hiver est semé entre le 15 août et le 15 septembre à une densité de 30 à 60 graines par m², permettant d'atteindre en sortie d'hiver une densité de 25-35 pieds par m². Dans un premier temps, les cotylédons se forment (stade A) puis une vingtaine de feuilles apparaissent et forment la rosette (stade B). Au niveau racinaire, le pivot se développe et accumule des réserves organiques pour la suite du cycle. La croissance ralentit, voire stoppe durant l'hiver (période de repos de végétation). En effet, même si le colza peut résister à des températures de -20°C (Merrien and Pouzet, 1988), son « zéro de végétation », *i.e.* température à laquelle la croissance s'arrête, se situe à 5°C. Cette période de froid est cruciale pour le développement du colza car elle permet sa vernalisation, étape nécessaire à l'initiation florale. La durée de la vernalisation est d'autant plus courte que la température est basse, l'héméroperiode longue et les plantes âgées.

Durant l'automne, avant la vernalisation, le colza est qualifié de « pompe à nitrate » du fait d'une grande capacité d'absorption et de stockage du N. Ces caractéristiques font que le colza est souvent utilisé comme Culture Intermédiaire Piège à Nitrate (CIPAN). Au cours de la période automnale, l'apport d'engrais azotés est interdit du 1^{er} septembre au 31 janvier en zones vulnérables (directive nitrate

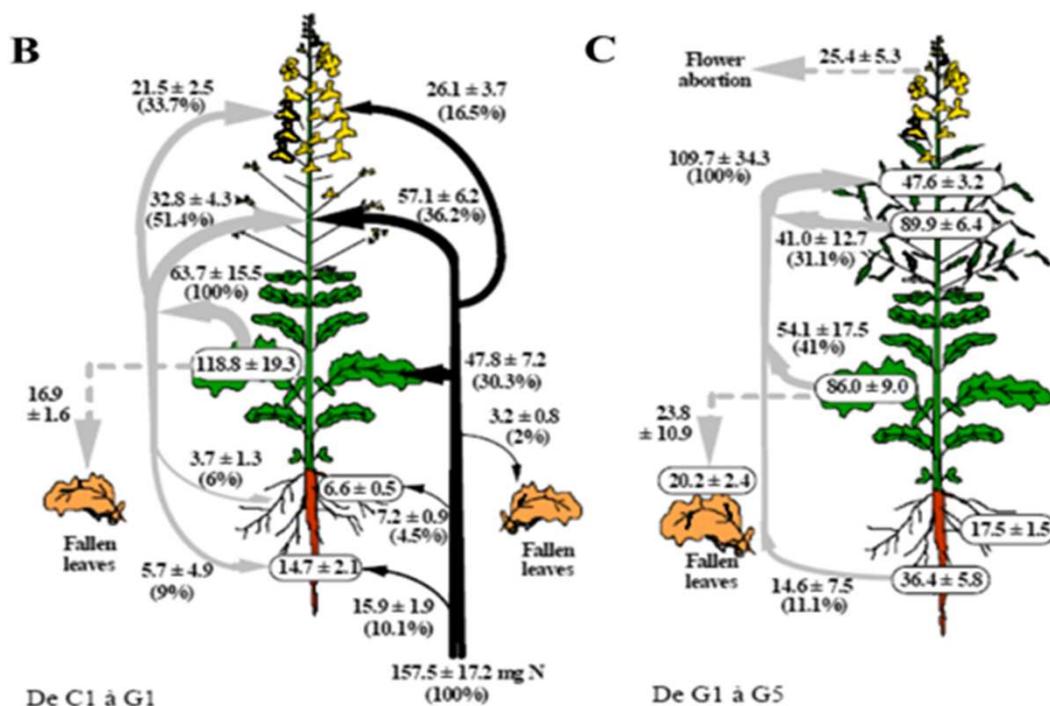


Figure B-2 : Flux d'azote chez le colza (cv. Capitol) avant (A) et après (B) la floraison. Les flux de N (mg de N par organe) issus de la remobilisation sont indiqués à gauche (flèches grises) et les flux du N provenant de l'absorption à droite (flèches noires). Le pourcentage par rapport à l'azote total absorbé ou remobilisé est indiqué entre parenthèses (Rossato *et al.*, 2001).

Tableau B-1 : Dose (UA : unité d'azote, *i.e.* kg de N par ha) et modalités de fractionnement des engrais azotés à apporter en fonction de la taille du colza en sortie d'hiver (source CETIOM).

	Type de colza en sortie d'hiver			
	Petit (moins de 0,8 kg/m ²)	Moyen (0,8-1,6 kg/m ²)	Gros (1,6-2,5 kg/m ²)	Très gros (plus de 2,5 kg/m ²)
Dose totale à apporter	170 à 220 UA	130 à 200 UA	70 à 140 UA	0 à 80 UA
Nombre d'apports	3	2 à 3	1 à 2	0 à 1
Reprise (stades C1-C2)	40 UA	60 à 80 UA	0 à 60 UA	0 UA
Boutons accolés (stades C2-D2)	70 à 100 UA	50 à 100 UA	60 à 100 UA	0 à 80 UA
Boutons séparés (stade E)	60 UA	0 à 40 UA	0 UA	0 à 80 UA

91/676/CEE de 1991). En effet, un apport de N durant cette période permet une augmentation de la surface foliaire mais pas du rendement (Colnenne *et al.*, 1998). De plus, les feuilles de colza très riches en N peuvent chuter avec une teneur en N élevée (jusqu'à 3,5% de la matière sèche) (Malagoli *et al.*, 2005b). Ce N organique peut être minéralisé par les bactéries du sol puis lessivé sous forme de nitrate, augmentant le risque de pollution environnementale. Enfin, un fort apport de N durant l'automne favorise une croissance de la tige (élongation automnale) qui augmente la sensibilité au gel et constitue une « porte d'entrée » pour le phoma (CETIOM).

I.I.2. De la reprise de croissance à la transition stade végétatif – stade reproducteur (stades C-E)

Après la période hivernale, une reprise de croissance est observée, davantage conditionnée par la date du semis que par la température (Tittonel *et al.*, 1988). La surface foliaire augmente jusqu'à la floraison (stades F1-F2) et est associée à une élongation/ramification de la tige (début de montaison ; stades C1-C2). En fin de montaison, à partir du mois d'avril, les boutons floraux apparaissent en grappe sur la tige principale (stades D1-D2/E).

Par le biais d'un marquage avec un isotope stable du N (^{15}N), une forte absorption du N a été mise en évidence de la reprise de croissance (C1) au début de la floraison (F) (Rossato *et al.*, 2001). A ces stades, une croissance importante des parties aériennes (tige, feuilles et inflorescences) est observée et, en conséquence, le N absorbé est principalement alloué à ces organes (Figure B-2). Etant donné les capacités d'absorption élevées et les forts besoins en N, une fertilisation de 160 à 250 kg/ha est préconisée au printemps pour obtenir une production de biomasse permettant d'atteindre l'objectif de rendement souhaité. La quantité de fertilisants N apportée dépend de la biomasse du colza en sortie d'hiver, du potentiel de rendement de la parcelle, du type de sol et de l'apport du N par les matières organiques (urée, effluents d'élevage...). L'apport de N *via* les matières organiques doit être particulièrement pris en compte. En effet, si un apport de N minéral est requis, il doit être décalé dans le temps pour permettre au colza de valoriser le N stocké durant la période hivernale. Par ailleurs, en cas de dose d'engrais supérieure à 100 kg.ha⁻¹, la dose à apporter doit être fractionnée pour éviter les pertes importantes, notamment par lessivage (Tableau B-1). Des outils ont été développés pour raisonner/ajuster cette fertilisation azotée (détaillés dans le paragraphe B.I.II).

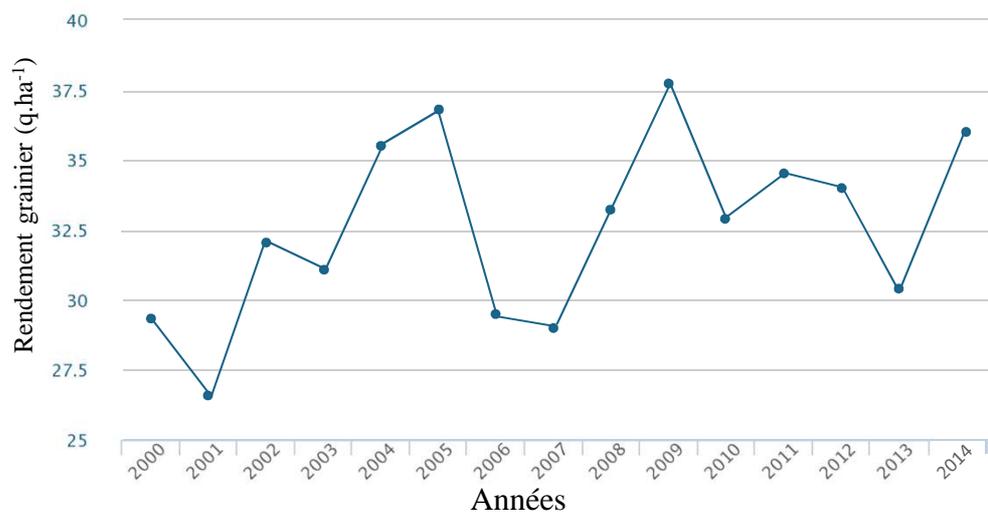


Figure B-3 : Rendement grainier moyen du colza en quintaux de graines par hectare (q.ha⁻¹) de 2000 à 2014 en France (sources : FAO, CETIOM).

I.I.3. De la floraison à la récolte (stades reproducteurs : F-G)

La floraison (stade F) dure 4 à 6 semaines (Leterme, 1988) et sa date d'initiation dépend grandement de la précocité du cultivar, mais reste relativement stable pour un génotype donné. Cependant, dans le cas d'un semis tardif, la floraison peut être retardée et un gel en début de floraison peut en augmenter sa durée (Mendham and Salisbury, 1995). Le colza est principalement autogame, et la fécondation donne naissance aux siliques au sein desquelles le développement, le remplissage et la maturation des graines nécessitent 6 à 7 semaines (stades G1-G5). La récolte se fait lorsque le taux d'humidité des graines est inférieur à 15%. En France, le rendement en graines du colza est estimé à 36,7 q.ha⁻¹ en 2014, et est monté jusqu'à 37,7 q.ha⁻¹ en 2009 (Figure B-3) (FAO, CETIOM).

Le niveau de disponibilité en N du sol est souvent faible en fin de cycle du fait des conditions climatiques sèches et d'une forte absorption du N durant les stades de développement précédents. De plus, les capacités d'absorption du N minéral diminuent significativement au début de la formation des siliques (cf. §B.I.III.1.b.). Par conséquent, le N utilisé pour le remplissage des graines provient majoritairement de la remobilisation du N endogène, notamment des feuilles, des tiges et du pivot (Figure B-2).

I.II. Optimisation des pratiques culturales : fertilisation et gestion des cultures

Les modalités de fertilisation et la gestion des cultures de colza d'hiver ont été significativement améliorées ces dernières années. Par exemple, le type de sol, les conditions climatiques et le stade du développement du colza influencent grandement l'efficacité de la forme de N appliquée (nitrate ou ammonium) sur le rendement : en hydroponie, un apport de N composé à 75% d'ammonium et à 25% de nitrate permet d'augmenter significativement la croissance dans les premiers stades de développement en comparaison à une alimentation en nitrate seul ou à une alimentation entièrement sous forme d'ammonium, cette dernière provoquant même une diminution drastique de la croissance (Rathke *et al.*, 2006).

Une autre piste prometteuse est l'utilisation des biostimulants. Etant donné leur faible teneur en N, phosphore et potassium, les biostimulants ne sont pas considérés comme des engrais. Chez le colza d'hiver par exemple, l'application d'un extrait à base d'algues (AZAL5) ou d'acide humique (E7) développé par TIMAC AGRO (groupe ROULLIER) au stade végétatif permet une meilleure absorption du nitrate et du sulfate *via* une induction de leurs transporteurs racinaires respectifs. Dans le cas d'AZAL5, cette meilleure absorption permet d'augmenter l'allocation de N aux parties aériennes et

Tableau B-2 : Moyens d'amélioration de la fertilisation azotée et conséquences attendues
(d'après Rathke *et al.*, 2006).

Moyen d'amélioration	Conséquences attendues
Culture et rotation de culture	Augmentation de l'absorption et de l'utilisation du N par l'utilisation de culture efficace pour le N, réduction de la fréquence des jachères et rotation des cultures à enracinement peu profond/profond
Amélioration génotypique	Cultivars avec une absorption et une utilisation accrue du N du sol et des fertilisants
Prédiction de fertilisation précise Demande en N (<i>i.e.</i> test sur la plante et le sol, capteur de fertilisation contrôlée, modélisation de l'apport)	Augmentation de l'absorption et de l'utilisation du N du sol et des fertilisants en considérant le N disponible au début de la croissance et la minéralisation durant la croissance des plantes
Forme d'azote apportée (<i>i.e.</i> fertilisant minéral vs fumure organique, urée vs ammonium vs nitrate, utilisation d'inhibiteurs d'uréases et de nitrification)	Eviter la perte de N causée par les formes de N ou une transformation du N dans le sol. Augmentation de l'efficacité d'usage du N en considérant la préférence des plantes pour une certaine forme de N (NH_4^+ vs NO_3^-)
Dates et nombres des apports	Réduction de la perte de N au début de la croissance, augmentation de l'efficacité d'usage de l'azote
Techniques d'application (<i>i.e.</i> surface vs incorporation vs diffusion)	Réduction de la perte de N, amélioration de la disponibilité spatiale du N, réduction de l'immobilisation du N
Culture intermédiaire (CIPAN : culture intermédiaire piège à nitrate) et associations avec des plantes fixatrices de N_2 (légumineuses)	Absorption du N du sol et minéralisation du N résiduel des plantes à l'automne menant à une réduction de la perte de N par lessivage et à une augmentation de la disponibilité en N pour les cultures suivantes
Gestion des résidus de culture Incorporation des chaumes Timing, intensité et profondeur d'enfouissement de la culture	Contrôle de la minéralisation du N pendant l'automne et l'hiver Immobilisation du N minéral du sol Contrôle du N minéral du sol

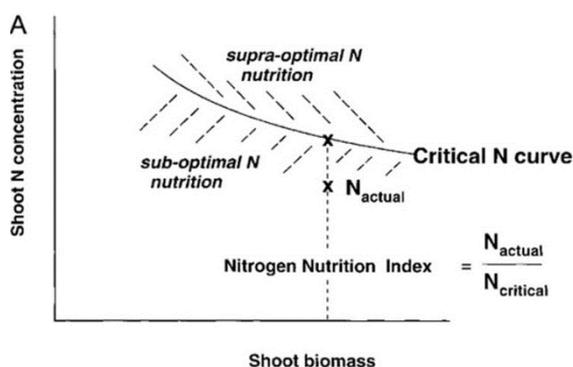


Figure B-4 : Représentation graphique de la relation entre la teneur en azote dans la matière sèche aérienne (« Shoot N concentration ») et la quantité de matière sèche aérienne (« Shoot biomass ») au mètre carré permettant le calcul de l'indice de nutrition azoté (INN ou NNI pour « Nitrogen Nutrition Index ») en référence à la courbe critique de dilution de l'azote (Lemaire *et al.*, 1989).

aux parties racinaires, conduisant à une augmentation de la biomasse des parties aériennes (+23%) et racinaires (+102%) (Jannin *et al.*, 2013). Cependant, ces résultats restent à valider en conditions de plein champ et à confirmer en termes de rendement grainier.

Un autre exemple est la culture de colza en association avec une plante fixatrice (gesse, fenugrec, trèfle d'Alexandrie, lentille, vesce, féverole) qui permet idéalement (i) d'améliorer l'exploration racinaire du colza, (ii) de stocker l'azote à l'automne puis de le libérer au printemps sans concurrencer le colza et (iii) une meilleure occupation du sol limitant la croissance d'adventices. Ces associations avec une légumineuse peuvent permettre de réduire la dose de N apportée au printemps d'environ 30 unités (kg de N par ha) sans crainte de perte de rendement (CETIOM).

D'autres pratiques culturales ont été développées ces dernières années pour améliorer le rendement (Tableau B-2) (Rathke *et al.*, 2006). Parallèlement, des méthodes de diagnostic du statut N et des outils d'aide à la décision ont été développés pour permettre aux exploitants agricoles d'ajuster la fertilisation azotée à leur objectif de rendement, tout en limitant les pertes de N. Les principaux outils et méthodes actuellement utilisés ou en cours de développement sont décrits dans les paragraphes suivants.

L.II.1. L'indice de nutrition azotée (INN)

L'INN permet de définir si le niveau de nutrition azotée de la culture est suffisant ou non pour atteindre l'objectif de rendement souhaité. L'INN est calculé à partir de la teneur critique en N (TCN), déterminée comme la teneur en N minimale permettant d'atteindre la croissance maximale. Chez le colza (Colnenne *et al.*, 1998), la TCN est définie ainsi :

$$\text{TCN (en \% de la MS)} = 4,48 \times \text{MS}^{-0,25}$$

avec : 4,48 = teneur optimale en N (%) pour une biomasse accumulée de 1 tonne par hectare

MS = matière sèche en tonne par hectare

0,25 = coefficient de dilution du N accumulé au cours de la croissance.

L'INN correspond au rapport entre la TCN et la teneur en N mesurée au sein de la culture (Figure B-4) (Lemaire *et al.*, 1989). Par conséquent, si l'INN est de 1, la teneur en N dans la plante correspond à la TCN et celle-ci est suffisante pour obtenir un rendement optimal tout en limitant les pertes de N. Cependant, cette méthode est destructrice car elle nécessite la détermination de la teneur en N dans la matière sèche de la plante et donc le sacrifice de parties aériennes.

A

Vous devez sélectionner un type de sol
Vous devez saisir un apport ou non de matière organique

Type de sol Superficiel Profond

Apports de matière organique Oui Non

Objectif de rendement 35

Poids frais du colza
(Si vous n'avez dû une pesée de sortie d'hiver, laissez le champ "entrée hiver" vierge)

entrée hiver 0.2 en kg/m²

sortie hiver 1.2 en kg/m²

Méthode par pesée (recommandée) Méthode visuelle

Calculer la dose d'azote

B Dose d'azote à apporter : 100 kg/ha

Rappel des données saisies

Type de sol	Profond	Poids frais entrée hiver	0.2
Apport de matière organique	non	Poids frais sortie hiver	1.2
Objectif de rendement	35	Valeur de poids utilisée	1.2

Paramètres utilisés pour le calcul dans votre région

Nouveau calcul

Fractionnez vos apports
Fractionner dès que la dose totale à apporter dépasse 100 unités. L'absorption de l'azote et de l'engrais sera meilleure et les risques de perte d'azote diminués. Le fractionnement dépend de la taille du colza à la reprise de végétation.

Apport d'azote
u = unité = kg d'azote/ha

Taille du colza et dose à apporter	Reprise de végétation	Boutons accolés (stades C2-D2)	Bouton séparés (stade E)
Gros colzas (< 100 u)		< 100 u	
Colzas moyens (100 à 170 u)	60 à 80 u	40 à 90 u	
Petits colzas (> 170 u)	60 u	70 u et +	40 u

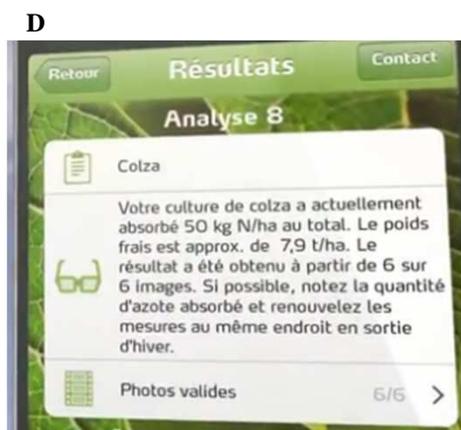


Figure B-5 : Données à renseigner (A) et préconisation de fertilisation (B) de la Réglette Azote ; application smartphone YARA Image IT pour les préconisations de fertilisation (C et D).
Pour l'application YARA Image IT, les photographies prises par le téléphone (C) sont utilisées pour estimer les besoins en N de la culture (D) (source : CETIOM, YARA).

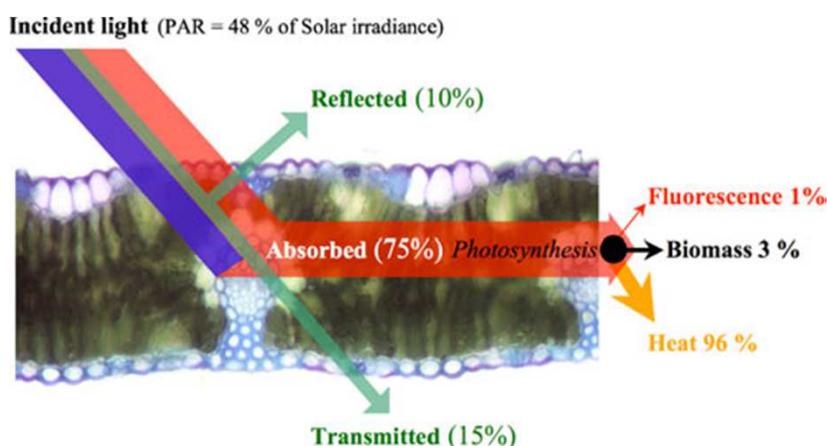


Figure B-6 : Devenir du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR = 48 % du rayonnement solaire) dans une feuille de blé. 10 % du PAR est réfléchi, 15 % transmis et 75 % est absorbé. Le rayonnement absorbé sert à la photosynthèse et sera converti en fluorescence (1 %), biomasse (3 %) et chaleur (96 %).

I.II.2. La Réglette Azote et le système YARA Image IT

Développée par le CETIOM, la Réglette Azote est un outil simple basé sur l'INN décrit ci-dessus (§B.I.II.1.) qui permet de déterminer la dose de fertilisants azotés à apporter au printemps à partir de données faciles à obtenir : type de sol (superficiel ou profond), apports de matières organiques effectués, objectif de rendement et poids frais du colza en entrée et sortie d'hiver (Figure B-5A). La Réglette Azote fournit la dose à apporter ainsi que les fractionnements à effectuer si la dose dépasse les 100 unités (Figure B-5B). Cette méthode a l'avantage d'être simple d'emploi et économique, mais elle est peu précise et nécessite la destruction de 2 à 4 m² de culture pour chaque pesée.

Récemment, une application smartphone (YARA Image IT), dérivée de la Réglette Azote a été développée par YARA en collaboration avec le CETIOM. Cette application permet d'évaluer la biomasse et la quantité de N absorbée par le colza en entrée et en sortie d'hiver grâce à de simples photographies numériques (Figure B-5C et 5D). La technologie utilisée repose sur l'indice de couverture, le taux de pixels verts et l'évaluation des feuilles sénescentes. Cette méthode simple, rapide et peu coûteuse, pourrait remplacer à terme « la pesée » de biomasse aérienne destructrice exigée pour la méthode de la Réglette Azote.

I.II.3. Mesure de la transmittance

La mesure de la transmittance consiste en une émission de 2 flux lumineux incidents (dans le rouge à 650 nm et dans l'infrarouge à 940 nm), qui vont être en partie absorbés et réfléchis. Une partie de ce flux lumineux traverse le tissu végétal sans interaction avec celui-ci (Figure B-6), et sa mesure permet de déterminer un indice de transmittance. Cet indice est corrélé au niveau de chlorophylles, qui peut ensuite être associé à un niveau de N foliaire (Jusko and Koscik, 2002). De par leur caractère non destructeur, les appareils mesurant la transmittance comme le N-Tester (YARA) ou la pince SPAD (SPAD-502 model, Minolta) sont intéressants pour déterminer le statut N du colza. Cependant, la mesure étant effectuée sur certaines parties du limbe, elle peut ne pas être représentative du statut N global de la plante et la fiabilité des estimations du statut N peut être problématique pour de faibles valeurs SPAD.

I.II.4. Mesure de la réflectance

Les mesures de la réflectance correspondent au rapport entre le flux lumineux incident produit par l'appareil de mesure et le flux lumineux réfléchi par le tissu végétal. L'indice de réflectance estimé par l'appareil permet de mesurer la teneur en



Figure B-7 : Fonctionnement simplifié de Farmstar Expert.

Les images acquises par satellite sont traitées et analysées pour déduire les besoins en azote sur une parcelle donnée (source : Farmstar).

chlorophylles, le statut N et la quantité de biomasse de la parcelle. Les appareils utilisés pour la mesure de la réflectance (GPN, GreenSeeker et Yara N-sensor) sont particulièrement fiables pour des cultures de céréales présentant un couvert végétal homogène, mais le sont moins pour les cultures de colza dont le couvert est plus hétérogène.

Le Greenseeker et le Yara N-sensor sont deux types d'appareils permettant de calculer un indice de végétation basé sur la réflectance (NDVI : « Normalized Difference Vegetation Index ») qui est lié au contenu en N (Bell *et al.*, 2004). Un NDVI inférieur à 0.1 correspond à un sol nu et plus la valeur est élevée, plus l'activité photosynthétique et le couvert sont importants. Le GPN quant à lui, calcule l'indice de réflectance grâce à une comparaison avec une parcelle surfertilisée en azote, entraînant une contrainte technique supplémentaire.

Des systèmes de télédétection par satellite ont également été développés dans certaines régions. La plus répandue est FarmStar Expert (développée par EADS-ASTRIUM et ARVALIS en collaboration avec le CETIOM). Les données de la parcelle (variétés, date de semis, profondeur du sol, irrigation ...) sont fournies par l'exploitant agricole et constituent une base de données permettant d'optimiser la programmation des satellites. Les mesures de réflectance réalisées par les satellites permettent d'élaborer une carte de bilan et d'en déduire les préconisations et conseils de fertilisation (Figure B-7). Cette méthode présente les avantages de pouvoir analyser une grande surface et de prendre en compte la variabilité au sein d'une même parcelle, ce qui permet d'adapter géographiquement la fertilisation (les variations pouvant atteindre 80 unités au sein d'une même parcelle). Cependant, cette méthode est très dépendante des conditions atmosphériques (les nuages influencent les résultats) et s'avère très onéreuse.

I.II.5. Mesure de la fluorescence

Certains appareils optiques (DUALEX® et Multiplex® de FORCE-A) sont capables d'effectuer des mesures de fluorescence permettant de diagnostiquer le statut N d'une culture (indice NBI pour « Nitrogen Balance Index »). L'excitation de certaines molécules (chlorophylles, flavonols, anthocyanes...) par un flux lumineux à une longueur d'onde spécifique produit une émission de fluorescence qui permet de quantifier leur variation de niveau. En se basant sur le fait qu'une carence en N provoque une augmentation des composés phénoliques (flavonols) et une diminution du niveau des chlorophylles, la fluorescence émise permet de calculer un NBI qui serait représentatif du statut N de la culture (Cartelat *et al.*, 2005). Cette méthode serait plus sensible que la mesure de la réflectance (cf. §B.I.II.4.).

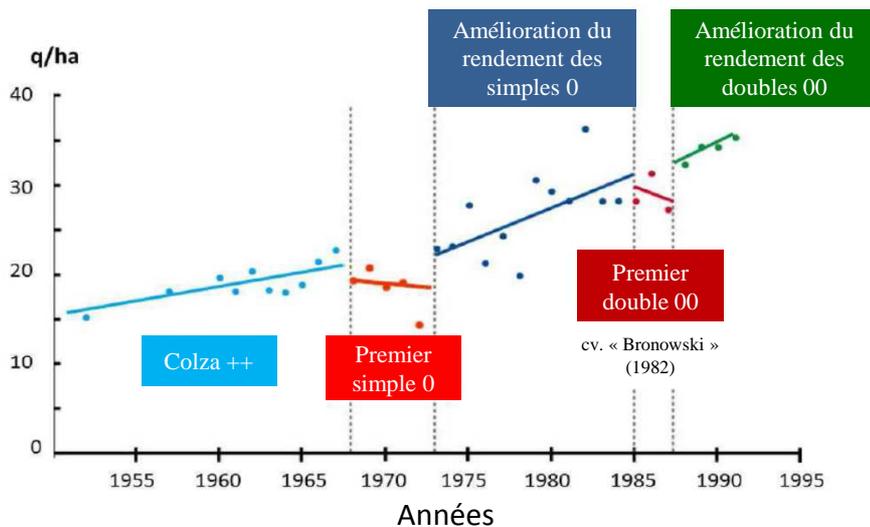


Figure B-8 : Evolution du potentiel de rendement du colza des années 50 aux années 90.

Les rendements sont observés lors d'essais préalables à l'inscription au catalogue officiel. Les mentions « simple 0 » et « double 00 » renvoient respectivement à la sélection de cultivars appauvris en acide érucique puis en glucosinolates dans les graines. La mention colza « ++ » correspond à des génotypes dont les graines sont riches en acide érucique et glucosinolates (cf. Introduction générale) (Source AMSOL, juin 2002).

Tableau B-3 : Différents indices permettant d'évaluer la valorisation de l'azote du sol et des fertilisants par les plantes (d'après Good *et al.*, 2004 et Hawkesford, 2011).

Abréviation	Dénomination	Formule	Unité
EUF	Efficience d'usage du fertilisant	$(N_{\text{abs}} / N_{\text{app}}) \times 100$	%
EAbA	Efficience d'absorption de l'azote	$N_{\text{abs}} / N_{\text{dispo}} (\text{Sol} + \text{fertilisation})$	kg.kg ⁻¹
EUtA	Efficience d'utilisation de l'azote	$\text{Rdt} / N_{\text{abs}}$	kg.kg ⁻¹
EUA	Efficience d'usage de l'azote	$\text{EAbA} \times \text{EUtA} = \text{rdt} / N_{\text{dispo}} (\text{Sol} + \text{fertilisation})$	kg.kg ⁻¹
HI	Harvest index (Indice de récolte)	$M \text{ graines} / \text{biomasse totale aérienne}$	Fraction
NHI	Nitrogen harvest index (Indice de récolte en azote)	$N \text{ dans les graines} / N \text{ dans les parties aériennes totales}$	Fraction
EAgroA	Efficience agronomique de l'azote	$\text{Rendement en présence de fertilisant} - \text{rendement sans fertilisation}$	kg.kg ⁻¹
ARE	Apparent recovery efficiency	$N_{\text{abs}} / N \text{ appliqué via le fertilisant}$	kg.kg ⁻¹

N_{abs} : Quantité de N absorbé; N_{app} : Quantité de N apporté; N_{dispo} : quantité de N disponible; Rdt : rendement en graines (quantité de graines produites); M: Masse.

Ces dernières années, l'ensemble des pratiques culturales (méthodes de fertilisation raisonnée et gestions des cultures) ont permis d'améliorer le bilan agro-environnemental du colza tout en permettant de faire progresser les rendements moyens (Figure B-8). Cependant la marge de progression liée à l'optimisation de la conduite des cultures de colza restera limitée et il est nécessaire de sélectionner des variétés plus adaptées aux nouvelles directives agricoles, notamment dans un contexte de réduction des intrants azotés. L'identification de ces variétés plus performantes nécessite une meilleure compréhension de la gestion du N par le colza afin de déterminer des critères pertinents de sélection.

I.III. Gestion de l'azote par le colza : l'efficacité d'usage de l'azote (EUA)

De nombreux indices permettant d'évaluer les performances agronomiques des espèces de grandes cultures en fonction de la disponibilité et des apports en N ont été définis au fil des ans pour estimer, entre autres l'efficacité d'utilisation du fertilisant, la capacité à absorber et utiliser l'azote etc. (Tableau B-3) (Good *et al.*, 2004; Hawkesford, 2011). Parmi ces indices, l'Efficacité d'Usage de l'Azote (EUA) exprime la capacité de la plante à valoriser l'azote disponible, qu'il provienne du sol ou des fertilisants. Cet indice peut être calculé de différentes manières selon l'espèce ou le stade de développement considéré. Chez le colza, l'EUA est généralement définie au stade reproducteur par la biomasse de graines produites par kg de N apporté par fertilisation. Au stade végétatif, l'EUA est généralement estimée comme la biomasse aérienne totale en fonction de l'apport en N ou le ratio de la biomasse aérienne en conditions de N limitant sur la biomasse aérienne en conditions de N non limitant (un ratio de 1 indiquant une biomasse identique dans les 2 conditions azotées et donc une EUA élevée en conditions de disponibilité en N réduite) (Balint and Rengel, 2008).

Quels que soient sa définition ou son mode de calcul, l'EUA résulte des capacités de la plante à prélever l'azote du sol (Efficacité d'Absorption de l'Azote ; EAbA) et à l'utiliser pour la croissance (Efficacité d'Utilisation de l'Azote ; EUtA). L'EUtA est également la résultante de 2 autres composantes : la capacité à assimiler l'azote absorbé (Efficacité d'Assimilation de l'Azote ; EAA) et à le remobiliser des vieux organes (organes sources) vers les organes de stockage ou en croissance (organes puits) (Efficacité de Remobilisation de l'Azote ; ERA ; Figure B-9).

I.III.1. L'efficacité d'absorption de l'azote (EAbA)

Comme dit précédemment, le nitrate est la principale forme de N minéral absorbée par le colza, et la capacité d'absorption du N nitrique fluctue en fonction du

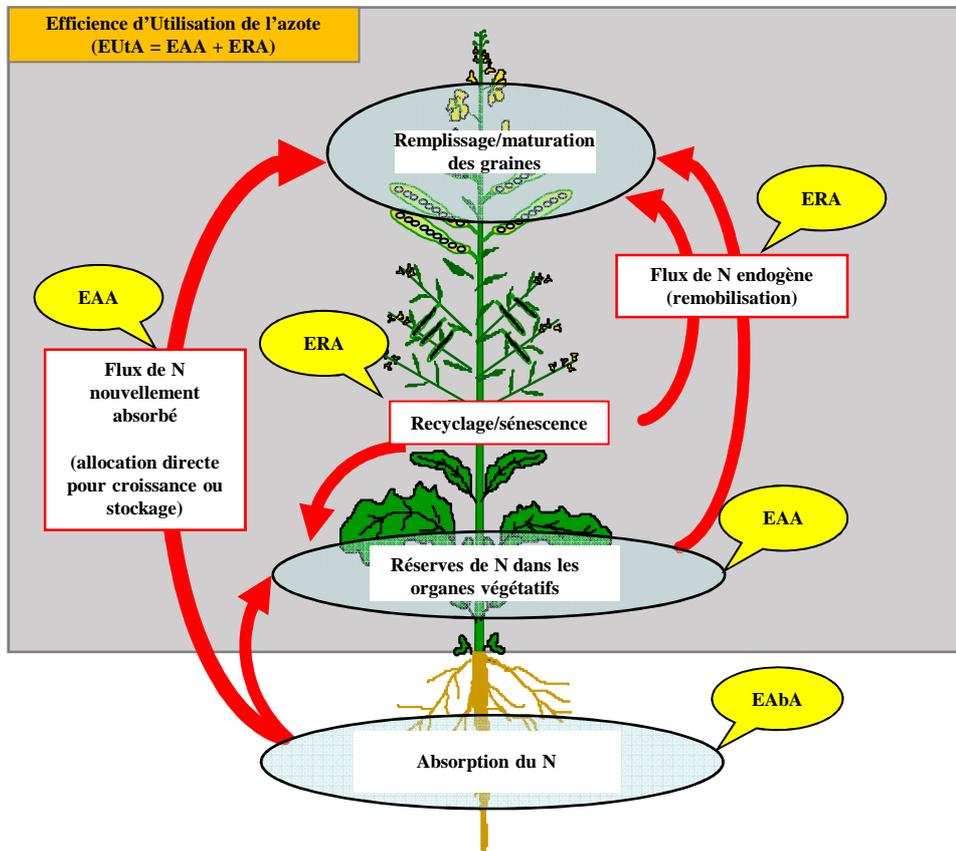


Figure B-9 : Schéma simplifié des composantes de l'efficacité d'usage de l'azote (EUA).

L'azote est absorbé au niveau racinaire sous forme de nitrate qui sera majoritairement assimilé au niveau foliaire, dans les chloroplastes. L'azote réduit est ensuite, soit transitoirement stocké dans les organes végétatifs, soit utilisé pour la croissance. L'azote des organes sources (principalement les feuilles) est ensuite remobilisé vers les organes végétatifs en croissance (jeunes feuilles, tige) et/ou les graines en formation. EAbA : Efficacité d'Absorption de l'Azote ; EAA : Efficacité d'Assimilation de l'Azote ; ERA : Efficacité de Remobilisation de l'Azote ; EUtA : Efficacité d'Utilisation de l'Azote (d'après Avicé et Etienne, 2014).

stade de développement (cf. §B.I.I). Le nitrate du sol est importé dans les racines par 4 systèmes de transporteurs dédiés : les transporteurs de haute affinité constitutifs (CHATS) et inductibles (IHATS) et les transporteurs de faible affinité constitutifs (CLATS) et inductibles (ILATS) (Krapp *et al.*, 2014; Malagoli *et al.*, 2004; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Tsay *et al.*, 2007).

a. L'EAbA aux stades végétatifs

Une comparaison des capacités d'absorption du trèfle, de graminées (ray-grass, seigle) et de plusieurs Brassicacées en conditions contrôlées a montré que le colza présentait une capacité d'absorption du nitrate parmi les plus élevées (Lainé *et al.*, 1993). De plus, l'étude de 4 génotypes de colza de printemps a mis en évidence que les variations de l'EUA étaient dues à des fluctuations de l'EUtA (déterminée comme la quantité de matière sèche produite par gramme d'azote dans la plante) et non aux variations de l'EAbA (Svecnjak and Rengel, 2006). Par conséquent, les capacités d'absorption du nitrate à ces stades de développement végétatif n'apparaissent pas comme le principal facteur limitant la production de biomasse, et donc l'EUA.

b. L'EAbA aux stades reproducteurs

Après la floraison, l'absorption du N minéral diminue fortement en conditions de plein champ (Malagoli *et al.*, 2005b; Noquet *et al.*, 2004), probablement en lien avec la faible disponibilité en N minéral généralement observée en fin de cycle. En effet, le N minéral du sol est prélevé en grande partie par la plante au cours des stades précédents et/ou est rendu moins disponible à cause d'épisodes de sécheresse fréquemment rencontrés à cette période (Merrien *et al.*, 1988). Cependant, une diminution de l'absorption étant également observée en conditions contrôlées (Beuve *et al.*, 2004; Malagoli *et al.*, 2004; Rossato *et al.*, 2001), cette diminution de l'absorption ne dépend pas uniquement de facteurs externes, mais également de facteurs internes, notamment une forte répression des transporteurs de nitrate racinaires (Malagoli *et al.*, 2004).

L'étude des composantes de l'EUA de 4 (Ulas *et al.*, 2013) et de 12 (Wiesler *et al.*, 2001b) génotypes de colza d'hiver suggèrent une corrélation entre l'absorption du N pendant les stades reproducteurs et le rendement en graines. Plus précisément, la comparaison de 10 génotypes de colza d'hiver cultivés au champ montre que chaque kilogramme de N absorbé en plus après la floraison permettrait d'augmenter le rendement de 0,16 quintaux par hectare (Berry *et al.*, 2010). La durée d'absorption serait notamment décisive en conditions de faibles

apports de N et, à l'inverse, en conditions optimales d'alimentation en N, l'EUtA (kg de graines produits par g de N dans les parties aériennes) semble être plus importante pour le rendement (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2011). Ce résultat est confirmé par une étude réalisée en conditions de plein champ sur les génotypes de colza d'hiver Apex et Capitol. De plus, cette étude suppose qu'une absorption de N plus élevée serait associée à une activité photosynthétique des feuilles plus importante pendant les stades reproducteurs (phénotype stay green), ce qui permettrait une augmentation de l'apport de photoassimilats aux racines, et donc une stimulation de l'absorption de N (Wiesler *et al.*, 2001a). Ces résultats suggèrent donc qu'une augmentation de la durée de vie des feuilles (sénescence retardée) pourrait permettre une augmentation de l'absorption de N et *in fine* à une augmentation du rendement grainier. Cependant, la supériorité des hybrides en terme de rendement en graines par rapport aux lignées cultivées en situation de limitation en N n'est pas liée à un retard de sénescence chez le colza d'hiver, mais serait, au contraire, associée à une sénescence accélérée (Koeslin-Findeklee *et al.*, 2014).

En résumé, la durée d'absorption et la quantité de N absorbé pendant les stades reproducteurs seraient décisives pour le rendement, essentiellement en conditions de N limitant, mais des précisions restent à apporter. En effet, même si un apport de N pendant le remplissage des graines permet effectivement d'augmenter le rendement du colza de printemps (Dreccer *et al.*, 2000), toutes les études ci-dessus sont uniquement basées sur des estimations de l'absorption par différences/bilans et aucune étude précise n'a été faite pour confirmer ces résultats. De plus, même si une bonne absorption est un prérequis à un bon rendement, dans un contexte de réduction des apports de fertilisants azotés, et donc de la quantité de N disponible, une forte capacité d'absorption ne sera vraisemblablement pas suffisante pour améliorer le rendement. Ainsi, une amélioration de la gestion de l'azote prélevé par le colza (*i.e.* l'EUtA) est également indispensable, et permettrait même d'augmenter/maintenir la production de graines pour la même quantité (voire une quantité plus faible) de N absorbé.

I.III.2. L'efficacité d'utilisation de l'azote (EUtA)

Aucune des études faites à ce jour n'a permis de clairement déterminer si le facteur limitant l'EUtA est l'assimilation (EAA) et/ou la remobilisation (ERA). En effet, les indices utilisés pour estimer l'EUtA correspondent généralement à la biomasse aérienne par mg de N dans les parties aériennes au stade végétatif ou la masse de graines par quantité de N dans les parties aériennes à la récolte finale (graines mures) et l'ERA est souvent estimée simplement comme la teneur en N résiduel des feuilles mortes. Ces calculs permettent d'évaluer globalement

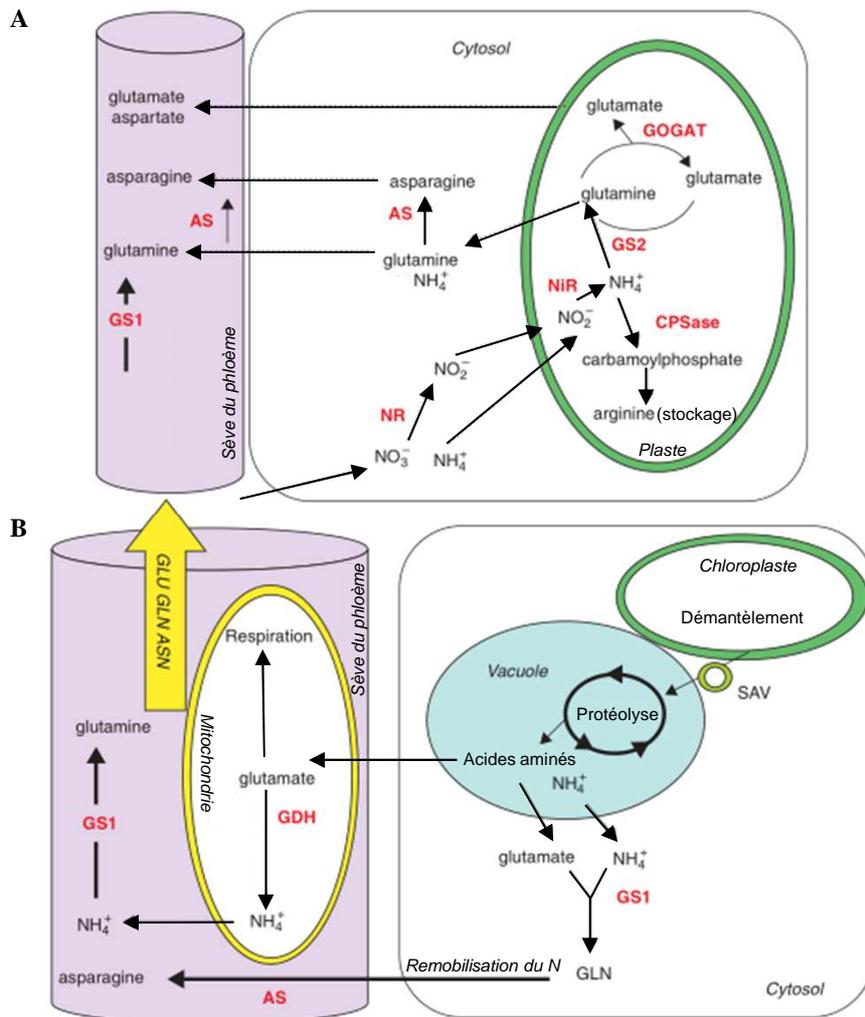


Figure B-10 : Schéma simplifié du métabolisme azoté dans une jeune feuille (A) et une feuille âgée en cours de remobilisation du N (B).

Les enzymes sont indiquées en rouge. AS : asparagine synthétase ; ASN : asparagine ; CPSase : carbamoylphosphate synthétase ; GDH : glutamate deshydrogénase ; GLN : glutamine ; GLU : glutamate ; GOGAT : glutamine oxoglutarate aminotransferase ou glutamate synthase ; GS1 : glutamine synthétase cytosolique ; GS2 : glutamine synthétase chloroplastidiale ; NiR : nitrite réductase ; NR : nitrate réductase ; SAV : « senescence-associated vacuole » (d'après Masclaux *et al.*, 2010).

l'utilisation du N par la plante mais ne permettent pas de distinguer et d'évaluer précisément la contribution de la remobilisation et de l'assimilation.

a. L'efficacité d'assimilation de l'azote (EAA)

Une fois absorbé, le nitrate est réduit dans le cytosol par la nitrate reductase (NR) en nitrite, lui-même réduit en ammonium par la nitrite réductase (NiR) dans les chloroplastes foliaires ou les proplastides racinaires. L'ammonium est ensuite fixé sur des acides α -cétoniques pour la synthèse d'acides aminés, qui seront utilisés, entre autres, pour la synthèse des protéines (Figure B-10A). Cette assimilation se fait majoritairement par le cycle glutamine synthétase (GS)/ glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) mais elle peut aussi se faire par amination réductrice catalysée par la glutamate déshydrogénase (GDH). Cependant, l'assimilation de l'ammonium sur un α -cétoglutarate par la GDH pour donner du glutamate est très minoritaire (essentiellement en cas d'excès en ions NH_4^+) (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

Certains transformants présentant des surexpressions d'enzymes de l'assimilation montrent une augmentation de biomasse et/ou de rendement, mettant en avant un rôle crucial de ces enzymes dans l'EUA. Les principaux résultats obtenus ces dernières années seront détaillés dans le paragraphe B.I.III.3.a.

b. L'efficacité de remobilisation de l'azote (ERA)

Lorsque l'offre en N est supérieure à la demande pour la croissance, le nitrate, les acides aminés et certaines protéines peuvent être mis en réserve dans la vacuole et dans les plastides. Chez le colza, le N est majoritairement stocké au niveau des feuilles sous forme de protéines, mais également d'acides aminés et d'acides nucléiques (le nitrate étant rarement accumulé en quantité importante). Lors de la remobilisation du N, les protéines sont dégradées en acides aminés et/ou peptides par diverses protéases, discutées dans le sous-chapitre B.III. Les produits de la protéolyse sont ensuite exportés vers les tissus en croissance *via* les tissus conducteurs du phloème.

Chez diverses plantes et notamment le colza, l'azote est remobilisé des organes sources (principalement des tissus sénescents) vers les jeunes tissus, majoritairement sous forme de glutamine, glutamate et asparagine (Lohaus and Moellers, 2000; Lohaus and Schwerdtfeger, 2014). Par conséquent, les acides aminés doivent être convertis en forme transportable avant leur chargement dans le phloème et leur exportation vers les tissus en croissance. Ce rôle est rempli par

les enzymes de l'assimilation du N, à savoir GS, GDH et asparagine synthétases (AS) (Figure B-10B) (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

Deux formes de GS existent : la forme cytosolique (GS1) et la forme chloroplastidiale (GS2). Des approches génomiques et QTL (« quantitative trait loci ») (Bernard and Habash, 2009; Hirel *et al.*, 2001) réalisées chez les céréales comme le riz et le maïs ont mis en évidence un rôle important de l'enzyme GS cytosolique (GS1) dans la gestion du N, la croissance, le rendement et le remplissage des grains. Chez *Arabidopsis* et le colza, de nombreuses isoformes de GS1 existent (5 et 16 respectivement), et une induction de l'expression de certains de ces gènes est observée pendant la sénescence foliaire (Guo *et al.*, 2004; Ochs *et al.*, 1999; Orsel *et al.*, 2014). De plus, la surexpression d'un gène codant une isoforme de GS1 du soja (*GS15*) chez *Lotus corniculatus* conduit à une sénescence précoce, confirmant le rôle important de GS1 dans les processus associés à la sénescence (Vincent *et al.*, 1997).

Au cours de la sénescence foliaire, la quantité et l'activité GDH augmentent chez *Arabidopsis* (Masclaux *et al.*, 2000). Certaines isoformes de GDH (EC1.4.1.2 et EC 1.4.1.3) possèdent une activité désaminante en plus de leur activité aminante qui permet de générer de l' α -cétoglutarate et de l'ammonium à partir du glutamate. Durant la sénescence, il peut être suggéré que l'action désaminante de cette enzyme permettrait de fournir de l' α -cétoglutarate aux réactions associées à la respiration et de l'ammonium à la GS pour la synthèse de glutamine, forme transportable d'azote (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010) (Figure B-10B). Par ailleurs, la protéolyse libérant invariablement de l'ammonium (Damodaran and Ananta-Narayanan, 1938; Hunter and Smith, 1925), une éventuelle activité aminante de la GDH permettant la détoxification de l'ammonium par la synthèse de glutamate, acide aminé transportable et retrouvé dans les tissus conducteurs du phloème du colza (Lohaus and Moellers, 2000), n'est pas à exclure.

Parmi les enzymes qui participent à l'assimilation de l'ammonium, l'asparagine synthétase cytosolique (AS), qui catalyse le transfert d'un groupement amide de la glutamine vers l'aspartate pour donner du glutamate et de l'asparagine, semble cruciale pour la remobilisation du N. En effet, des mutants d'*Arabidopsis thaliana* n'exprimant plus le gène *ASN2*, codant une asparagine synthétase, montrent une sénescence retardée et un défaut de remobilisation du N (Gaufichon *et al.*, 2013).

Les acides aminés convertis sont ensuite exportés de la cellule par des systèmes de transporteurs dédiés. Chez *Arabidopsis*, il existe au moins 67 gènes

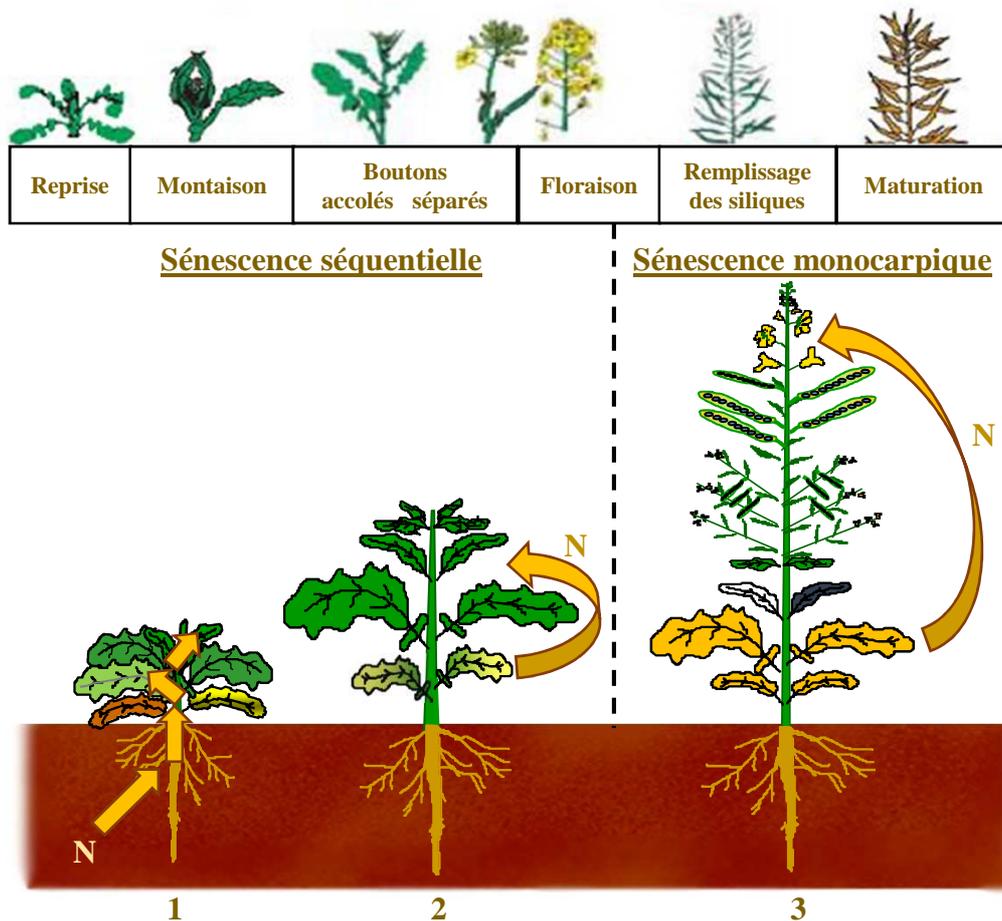


Figure B-11 : Sénescences et remobilisation de l'azote chez le colza.

Lors de la sénescence dite séquentielle, l'azote est absorbé par les racines et assimilé/stocké en grande partie dans les feuilles (1). La sénescence progresse ensuite de manière acropète le long de l'axe de la plante, *i.e.* l'azote des vieilles feuilles est recyclé et redistribué vers organes en croissance (jeunes feuilles, tige) (2). Pendant la sénescence dite monocarpique, en fin de phase reproductive, l'azote est remobilisé de l'ensemble des tissus végétatifs (feuilles, tige, racines et enveloppes de siliques) vers les graines (3).

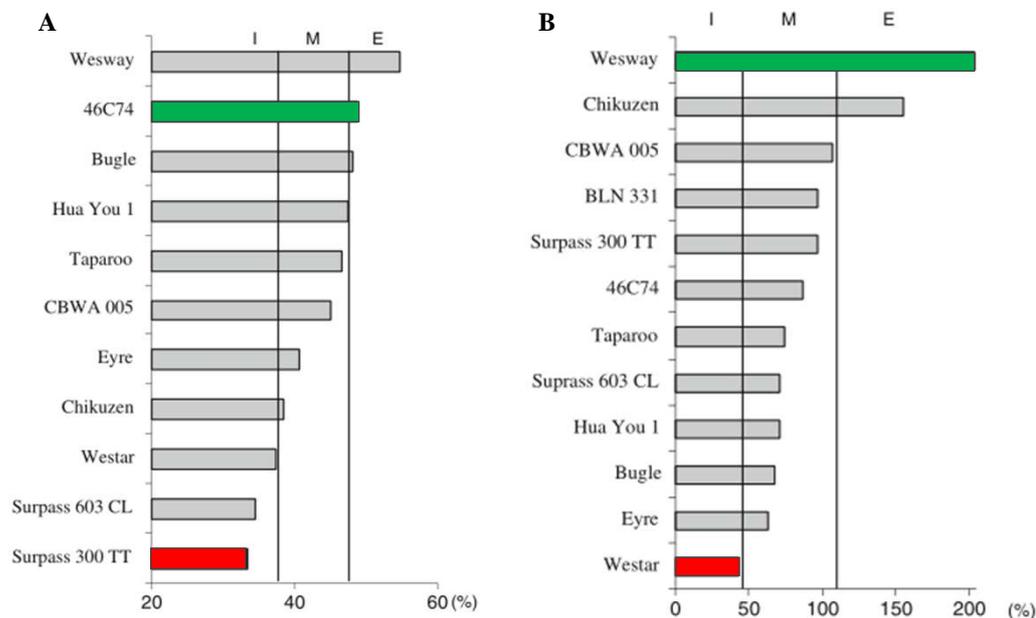


Figure B-12 : Variabilité génotypique de la réponse à la limitation en N du colza de printemps au stade végétatif (A) et reproducteur (B).

Le classement au stade végétatif se fait sur la base du ratio (en %) entre la matière sèche des colzas limités en N (51 mg N.kg⁻¹ de sol) et la matière sèche des colzas bien alimentés en N (140 mg N.kg⁻¹ de sol) après 42 jours de croissance. Au stade reproducteur, le classement se fait grâce au ratio (en %) de la production de graines en conditions d'azote limitant (180 mg N.kg⁻¹ de sol) et de la production de graines en conditions d'azote non limitant (400 mg N.kg⁻¹ de sol). Le classement diffère entre les stades végétatifs et reproducteurs. La barre verte indique le génotype le plus efficace tous critères confondus et la barre rouge présente le génotype le moins efficace pour le stade végétatif (A) ou le stade reproducteur (B). E : efficace, M : moyennement efficace, I : inefficace (d'après Balint et Rengel, 2008).

codant des transporteurs d'acides aminés putatifs (Rentsch *et al.*, 2007). Ces transporteurs sont donc nombreux mais peu de données existent sur leur réelle implication dans les mécanismes de sénescence. Une accumulation de transcrits du transporteur AAP1 (amino acid permease 1) est observée chez 2 génotypes de colza au cours de la sénescence foliaire (cv. Capitol, Desclos, 2008 et cv. Lirajet, Tilsner *et al.*, 2005). De plus, l'absence d'accumulation d'acides aminés au sein des différentes fractions cellulaires (cytosol, vacuoles et plastes) suppose que le chargement des acides aminés dans le phloème lors de la sénescence foliaire n'est pas limitant chez le colza (Tilsner *et al.*, 2005). Par conséquent, la dégradation des protéines constituerait le principal facteur limitant la remobilisation du N foliaire (Avice and Etienne, 2014).

Les phénomènes de protéolyse associée à la remobilisation du N ont lieu au cours de la sénescence. Il est important de distinguer les mécanismes associés à la sénescence séquentielle qui se manifeste au cours des stades végétatifs, et ceux associés à la sénescence monocarpique qui se produit en fin de cycle (ultimes stades reproducteurs ; Figure B-11). En effet, une étude de l'EUtA chez plusieurs génotypes de colza de printemps durant tout le cycle montre que les résultats obtenus aux stades végétatifs ont une faible valeur prédictive sur ce qui se passe aux stades reproducteurs (Figure B-12) (Balint and Rengel, 2008).

L'ERA aux stades végétatifs

Au cours de la sénescence séquentielle (Figure B-11), l'azote est remobilisé des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles en croissance. La suppression de 50 % des feuilles au début de la montaison provoque une diminution du nombre de péricarpes de 30% malgré la croissance rapide de nouvelles feuilles et une absorption du N plus longue (Noquet *et al.*, 2004), démontrant le rôle crucial de la remobilisation du N foliaire. Cependant, le N résiduel des feuilles chutées peut être très élevé (jusqu'à 3,5% de la matière sèche), traduisant une mauvaise efficacité de remobilisation du N aux stades végétatifs (Malagoli *et al.*, 2005b). Cette chute de feuilles riches en N organique au cours de la phase automno-hivernale peut conduire à une perte de N de l'ordre de 100 kg par hectare par an, qui ne sera que très partiellement réabsorbé en fin de cycle (30 %), en cas de minéralisation (Dejoux *et al.*, 2000). Des simulations faites aux stades végétatifs supposent qu'une diminution du N résiduel de 2 à 1% de la matière sèche pourrait permettre d'augmenter le rendement de 5 à 10% (Malagoli *et al.*, 2005a). Une amélioration de la remobilisation du N des vieilles feuilles vers les tissus en croissance durant la croissance végétative permettrait

donc une diminution des pertes d'azote par les feuilles chutées tout en permettant d'augmenter le rendement en graines, et donc d'augmenter l'EUA.

L'ERA aux stades reproducteurs

La sénescence séquentielle s'étend jusqu'à la floraison et, en fin de cycle (durant les stades reproducteurs), un autre type de sénescence entre en jeu : la sénescence monocarpique. Cette dernière se caractérise par une remobilisation du N des parties végétatives vers les graines (Figure B-11).

Les feuilles sont les principaux organes sources tout au long du cycle, y compris durant les stades reproducteurs, aussi bien en conditions contrôlées (Rossato *et al.*, 2001) qu'au champ (Gombert *et al.*, 2010; Malagoli *et al.*, 2005b) (Figure B-2). De manière générale, le N résiduel des feuilles mortes est beaucoup plus faible pendant les stades reproducteurs (1% de la matière sèche au cours de la floraison) que lors des stades végétatifs (Malagoli *et al.*, 2005b), notamment du fait qu'une grande proportion du N des feuilles est remobilisé (86% du N présent au début de la floraison) (Ulas *et al.*, 2013). Ces résultats démontrent que la remobilisation du N foliaire est plus efficace au cours des stades reproducteurs qu'aux stades végétatifs. Bien que considérée comme particulièrement efficace, la remobilisation du N foliaire au cours de la sénescence monocarpique (*i.e.* post-floraison) semble toutefois soumise à une variabilité génotypique, comme le montrent les travaux récemment conduits sur 4 génotypes de colza d'hiver (Ulas *et al.*, 2013).

La tige est le 2^e organe source le plus important durant les stades reproducteurs (Figure B-2). Là encore, un faible niveau de N résiduel est retrouvé (Wiesler *et al.*, 2001b) mais des variations plus importantes ont été observées entre les génotypes (Ulas *et al.*, 2013). De plus, une étude a montré que les génotypes de colza de printemps présentant une EUA plus élevée étaient capables de remobiliser le N de la tige et des péricarpes plus efficacement (Balint and Rengel, 2011). La tige semble donc impliquée dans les variations de rendement durant les stades reproducteurs, mais aucune étude ne permet de définir clairement l'implication des feuilles et des tiges dans les différences de remobilisation et de remplissage des graines constatées entre génotypes.

Une optimisation de l'EUA nécessite une bonne absorption et une bonne utilisation du N. Si l'absorption ne semble pas limitante aux stades végétatifs, de nombreuses études suggèrent que l'absorption post-floraison est un des facteurs décisifs pour le rendement.

Durant le remplissage des graines, les conditions climatiques rendent le N peu disponible et dans un contexte de réduction des intrants azotés, la quantité d'azote disponible après la floraison sera encore plus faible. Il est donc primordial, en complément d'une absorption efficace, d'améliorer l'EUtA. Les résultats obtenus avec des plantes transgéniques surexprimant diverses enzymes de l'assimilation sont prometteurs (cf. §B.I.III.3.a) mais une vaste étude sur 40 géotypes de colza de printemps a permis d'émettre l'hypothèse que la remobilisation du N serait le principal facteur limitant de l'EUtA (Yau and Thurling, 1987). Plus récemment, l'EUA plus élevée des hybrides par rapport aux lignées serait due, entre autres, à une remobilisation efficace des parties végétatives vers les organes reproducteurs (Koeslin-Findeklee *et al.*, 2014). De plus, une bonne assimilation ne sera une plus-value pour le rendement que si la remobilisation du N est également efficace. Les pertes d'azote se produisant surtout aux stades végétatifs du fait d'un défaut de remobilisation des feuilles, il est crucial de mieux comprendre les mécanismes impliqués et d'identifier des pistes d'amélioration de la remobilisation aux stades végétatifs, ce qui permettra, à terme, de limiter les pertes du N préalablement absorbé.

I.III.3. Les voies d'amélioration de l'EUA

L'obtention de nouveaux géotypes de colza adaptés à une réduction des intrants azotés peut se faire principalement de 2 manières : *via* la surexpression ou l'arrêt de l'expression de gènes impliqués dans certaines composantes de l'EUA (obtention de plantes génétiquement modifiées) ou *via* l'exploration de la variabilité génotypique naturelle pour sélectionner les variétés les plus performantes en conditions limitantes en intrants azotés.

a. L'obtention de plantes génétiquement modifiées à forte EUA

Les plantes présentant des modifications génétiques peuvent s'obtenir de différentes manières : la mutation EMS (méthanesulfonate d'éthyle), le tilling (« targeted induced local lesions in genomes ») ou la transformation génétique à proprement parler, notamment les Organismes Génétiquement Modifiés (OGM). Seuls les derniers résultats obtenus sur les OGM sont détaillés ci-dessous.

Une absorption efficace du N minéral étant un prérequis évident à une bonne EUA, des tentatives d'augmentation des capacités d'absorption (forte EAbA) par une augmentation des capacités à assimiler le nitrate (forte EAA) ont été effectuées. Cependant, chez le tabac, la pomme de terre et *Arabidopsis*, la surexpression de la NR ou de la NiR permet souvent d'augmenter l'absorption de nitrate, sans pour autant avoir de conséquence sur la biomasse ou le rendement (Good *et al.*, 2004). Ces résultats mettent en avant une régulation complexe de la

réduction du nitrate indiquant que cette étape de l'assimilation du nitrate n'est pas la meilleure piste pour une amélioration de l'assimilation et de l'EUA.

Du fait du lien important entre la GS et le rendement (cf. §B.I.III.2.b.), des transformants de *Lotus corniculatus* surexprimant une GS1 du soja (*GS15*) ont été obtenus. Ces transformants montrent une forte teneur en acides aminés et une floraison précoce, suggérant une plus forte remobilisation du N (Vincent *et al.*, 1997). Chez le tabac, la surexpression de GS augmente la croissance en situation d'alimentation limitée en N (Fuentes *et al.*, 2001). D'autres surexpressions de la GS1, mais également de la GS2 (isoforme chloroplastidiale) et de la GDH ont été faites, avec plus ou moins de succès concernant la biomasse ou le rendement. Le meilleur résultat concerne la surexpression d'une alanine aminotransférase (AlaT) de l'orge dans les racines de colza (promoteur *btg26*). L'AlaT est une transaminase qui catalyse le transfert d'un groupement amine du glutamate sur un pyruvate pour former du 2-oxoglutarate et de l'alanine. La surexpression de l'AlaT de l'orge dans les racines de colza a permis une augmentation de l'influx de nitrate, permettant d'atteindre le même rendement que les plantes sauvages avec 40% de fertilisants azotés en moins (Good *et al.*, 2007).

L'obtention de plantes transgéniques est très utile pour faire avancer la compréhension des mécanismes associés à une forte EUA et pour identifier les pistes permettant son amélioration. Cependant, même si la culture de plantes transgéniques pour la commercialisation est autorisée dans plusieurs pays, elle est interdite en France. Par conséquent, une autre voie d'amélioration doit être trouvée, et la sélection variétale est toute indiquée.

b. La sélection variétale

Par le passé, la sélection variétale du colza s'est faite sur des niveaux élevés d'apport en N minéral. Par conséquent, la culture des variétés actuelles de colza avec moins d'intrants azotés conduit à une diminution importante du rendement. Une variabilité génotypique de la réponse à une carence en azote existe chez le colza de printemps (Balint and Rengel, 2008; Balint and Rengel, 2011; Yau and Thurling, 1987) comme chez le colza d'hiver (équipe de Walter J. Horst ; (Ulas *et al.*, 2013)). La sélection de variétés hybrides a, dans un premier temps, permis d'augmenter le rendement lors de stress environnementaux, notamment lors d'une carence en N (Gehring *et al.*, 2007; Kessel *et al.*, 2012). Cependant, cette augmentation reste limitée, de nouvelles variétés plus adaptées doivent être identifiées. La sélection variétale nécessite un préalable : l'identification de moyens de sélection rapides et simples de génotypes avec la

caractéristique souhaitée. Cependant, peu d'études parviennent à mettre en évidence des critères de sélection simples et rapides de variétés de colza présentant un bon rendement dans des conditions de bas intrants azotés. Cette problématique correspond à l'objectif général des programmes de recherche ANR-GENOPLANTE GENERGY et Investissement d'Avenir RAPSODYN, dans lesquels sont inscrits ces travaux de thèse.

II. La sénescence foliaire et la remobilisation de l'azote

La sénescence est le stade ultime du développement, associant des événements biochimiques et physiologiques de manière ordonnée et contrôlée, au niveau de la plante, de l'organe, de la cellule et/ou des organites, conduisant à la mort de tout ou partie de la plante.

La sénescence est un processus essentiel au niveau plante entière. En effet, les nutriments absorbés durant le cycle de développement doivent être recyclés, puis éventuellement stockés temporairement dans les organes végétatifs avant de pouvoir atteindre les graines lors de leur formation et remplissage (Figure B-11) (Gregersen, 2011). La remobilisation, *i.e.* les mécanismes de dégradation et d'exportation des molécules et des macromolécules (protéines, glucides, lipides, acides nucléiques) qui se déroulent pendant la sénescence, permettent la redistribution de ces nutriments des vieux organes (organes sources) vers les jeunes tissus (organe puits), pour le stockage ou la croissance (Peoples and Dalling, 1988). Par conséquent, la sénescence n'est pas un « simple » processus dégénératif mais une étape cruciale pour la remobilisation des macroéléments comme l'azote, principal facteur limitant de la croissance des plantes.

Une amélioration de la remobilisation du N associée aux mécanismes de sénescence permettrait un meilleur recyclage du N et donc d'obtenir un rendement similaire avec moins d'intrants azotés. De plus, une remobilisation du N efficace permettrait de limiter la quantité de N retournée au sol, et donc de limiter (i) le développement des pathogènes opportunistes (Gregersen, 2011), (ii) le risque de pollution de l'eau par lessivage du N et (iii) l'émission de gaz à effet de serre (N₂O).

II.I. Importance agronomique de la sénescence : l'exemple des phénotypes « stay-green »

Le symptôme visuel le plus évident de la sénescence des feuilles est le jaunissement progressif des limbes, dû à la dégradation des chlorophylles. Cependant, la dégradation des chlorophylles n'est pas toujours un indicateur pertinent de la sénescence. Par exemple, nombre de phénotypes « stay-green » identifiés chez les céréales présentent une sénescence avec perte de capacité photosynthétique sans perte

Tableau B-4 : Différents types de mutants « stay-green » et phénotypes associés (d'après Kusaba *et al.*, 2013).

Type de stay-green	Phénotype
Type A (« functional stay-greens »)	Retard de l'initiation de la sénescence
Type B (« functional stay-greens »)	Progression de la sénescence ralentie
Type C (« cosmetic stay-greens »)	La sénescence se déroule normalement mais les chlorophylles ne sont pas dégradées
Type D (« pseudo-stay-greens »)	La plante meurt avant le début ou dans les premières étapes de la sénescence
Type E (« hyper-greens »)	Accumulation de chlorophylles (dégradation ralentie pendant la sénescence)

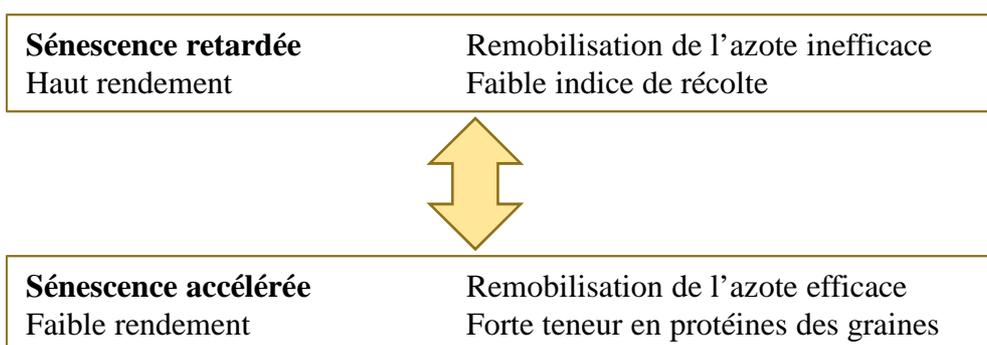


Figure B-13 : Illustration du « dilemme de la sénescence ».
(d'après Gregersen *et al.*, 2011)

de la couleur verte des feuilles. Ce maintien des pigments chlorophylliens est dû à un défaut de dégradation des chlorophylles, associé ou non à une modification d'autres processus de dégradation (Gregersen, 2011; Thomas and Ougham, 2014). Les « stay green » sont classés en 5 catégories (Tableau B-4) et représentent des modèles de choix pour étudier la régulation de la sénescence et son impact sur le rendement (Kusaba *et al.*, 2013).

L'entrée en sénescence correspond au passage d'une période d'acquisition du C par la photosynthèse à celle de remobilisation des éléments (notamment N et C), et les phénotypes stay-green de types A et B peuvent être définis comme des plantes présentant un retard de cette transition métabolique (Thomas and Ougham, 2014). Ces plantes stay-green de types A et B présentent une prolongation des capacités photosynthétiques qui permet une acquisition du C plus importante, conduisant à une augmentation de la production de biomasse. Cependant, chez ces phénotypes, la remobilisation du N est diminuée (Gregersen, 2011). En effet, la dégradation des chlorophylles étant un préalable à la dégradation des protéines des membranes thylakoïdiennes (Christ and Hörtensteiner, 2014), une rétention des chlorophylles peut limiter la dégradation des protéines membranaires, source d'azote non négligeable (Thomas and Ougham, 2014).

La sénescence est donc un facteur important du rendement et de la qualité des graines et les phénotypes « stay-green » illustrent parfaitement le dilemme lié à la sénescence foliaire (Figure B-13) : (i) une sénescence ralentie permet une période photosynthétique plus longue, une meilleure acquisition du C et donc un meilleur rendement, mais la remobilisation des nutriments est moins efficace ; (ii) à l'inverse, une sénescence précoce diminue l'acquisition du C par la photosynthèse, réduisant le rendement, mais la remobilisation des nutriments comme l'azote vers les graines est plus efficace. Une sénescence idéale permettrait de combiner un bon rendement et une remobilisation efficace des éléments (Gregersen, 2011).

II.II. Les manifestations physiologiques et moléculaires de la sénescence foliaire

Le colza d'hiver est une plante bisannuelle (Figure B-1) qui, en plus de la sénescence des cotylédons au début du cycle, présente 2 types de sénescence (Figure B-11) :

- **La sénescence séquentielle pendant la phase végétative (du début du stade rosette jusqu'à la floraison).** Cette sénescence est uniquement foliaire et progresse de manière acropète de long de l'axe de la plante, au fur et à mesure que les feuilles atteignent leur maturité. Elle permet une remobilisation des nutriments des feuilles basales (les plus âgées) vers les feuilles du haut du couvert ou les organes reproducteurs en croissance.

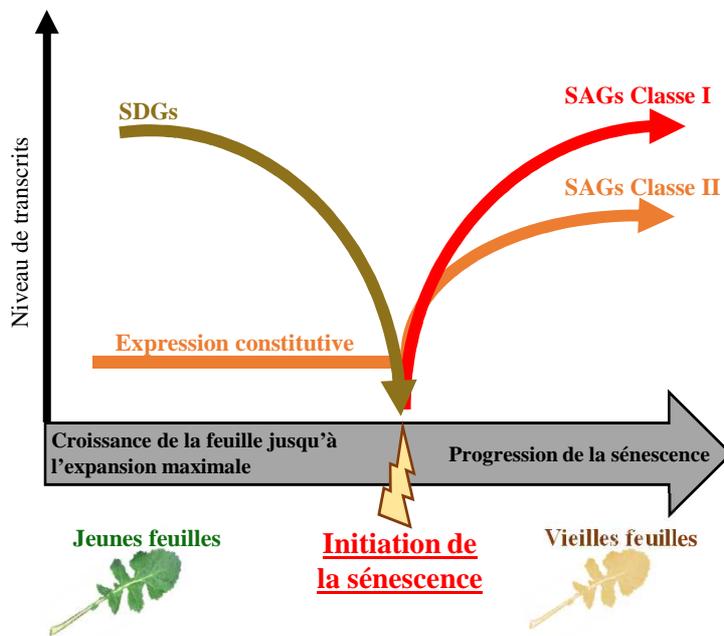


Figure B-14 : Différents profils d'expression de gènes spécifiques de la sénescence foliaire au cours du développement d'une feuille.

Il faut distinguer les SDGs (« Senescence Down-regulated Genes ») dont le niveau de transcrits diminue pendant la sénescence et les SAG (« Senescence-Associated Genes ») dont le niveau de transcrits augmente pendant la sénescence. Parmi les SAGs, certains gènes sont exprimés de manière constitutive avant l'initiation de la sénescence, puis sont surexprimés au cours de la sénescence (Classe II), et d'autres sont spécifiquement induits au cours de l'initiation de la sénescence (Classe I) (d'après Gan et Amasino, 1997).

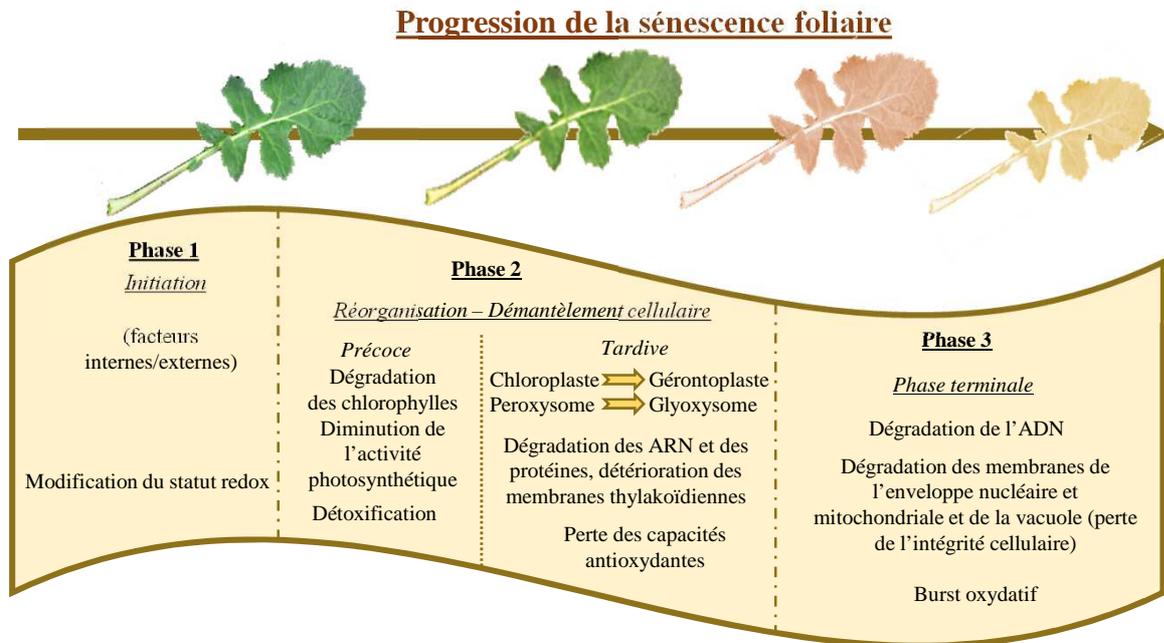


Figure B-15 : Les différentes phases de la sénescence foliaire. (d'après Zimmerman et Zentgraf, 2005).

- **La sénescence monocarpique pendant les stades reproducteurs (à partir de la floraison)**, où l'ensemble des organes végétatifs (feuilles, tige, racines et péricarpes) entrent en sénescence et remobilisent leurs nutriments vers les graines.

A l'échelle de l'**organe**, la sénescence se traduit au niveau macroscopique par un jaunissement de la feuille, conséquence d'une dégradation des chlorophylles et aboutit à la chute de l'organe par abscission. Par ailleurs, à l'échelle de la feuille, la sénescence présente une progression basipète : la sénescence progresse de l'extrémité du limbe vers la base de la feuille, près du pétiole (Watanabe *et al.*, 2013). Au sein de l'organe, de profonds changements **tissulaires** se produisent (Sorin *et al.*, 2014) et les tissus autour du système vasculaire sont les derniers à entrer en sénescence, probablement pour pouvoir assurer le transport des molécules issues du catabolisme jusqu'aux stades avancés de sénescence (Gan and Amasino, 1997).

A l'échelle de la **cellule**, la sénescence commence par des changements dans l'expression de certains gènes (Figure B-14). Les gènes de type SDG (« Senescence Down-regulated Genes »), présentent une expression diminuée. Cette répression de l'expression concerne essentiellement les gènes codant des protéines de l'appareil photosynthétique. Cependant, la sénescence étant un processus actif, elle nécessite la synthèse de nouvelles protéines comme les protéases (cf. §B.III), les lipases, les RNAses, les enzymes et les transporteurs impliqués dans le transfert des nutriments vers les vaisseaux conducteurs du phloème (cf. §B.I.III.2.b.). Les gènes dont l'expression est induite sont appelés les SAG pour « Senescence-Associated Genes », et ils peuvent différer en fonction du type de sénescence. Par exemple, des différences ont été observées entre la sénescence développementale et celle induite par l'obscurité chez *Arabidopsis* (Gan and Amasino, 1997) et la sénescence naturelle et celle induite par la prévention de la pollinisation chez le maïs (Zhang *et al.*, 2014). La sénescence des cellules foliaires s'accompagne également de changements de la composition en métabolites (Watanabe *et al.*, 2013), notamment une diminution de proline (Albert *et al.*, 2012). Par ailleurs, une augmentation de la quantité d'eau et de la taille de la cellule est observée, notamment du fait d'une vacuole plus grande. L'hydratation cellulaire permettrait d'ailleurs de déterminer l'évolution de la sénescence des cellules foliaires de colza (Musse *et al.*, 2013)

La sénescence cellulaire peut se décomposer en 3 phases : (1) l'initiation, (2) le démantèlement et le recyclage des éléments cellulaires et (3) la phase terminale (Figure B-15) (Zimmermann and Zentgraf, 2005).

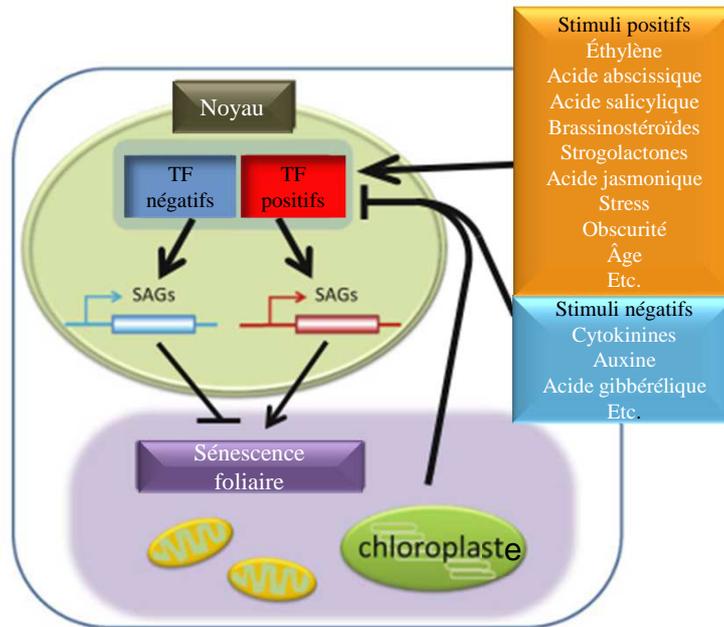


Figure B-16 : Représentation schématique de la régulation de la sénescence foliaire.

Les stimuli positifs provoquent la sénescence en induisant l'expression de facteurs de transcription (TFs). Les TFs positifs induisent l'expression des gènes SAGs («Senescence Associated Genes»). Les TFs négatifs induisent les gènes SAGs qui répriment la sénescence (d'après Kusaba *et al.*, 2013).

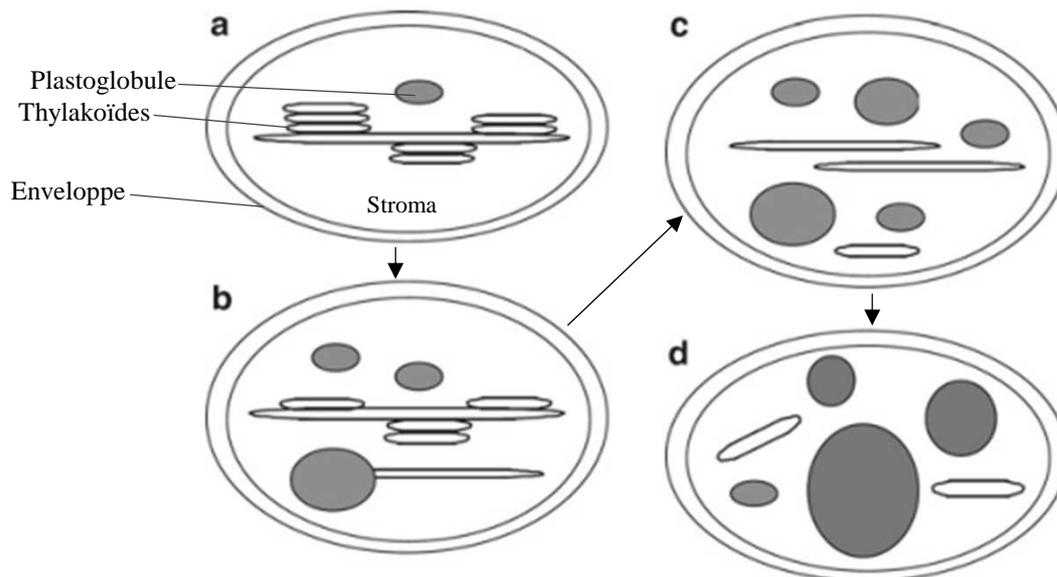


Figure B-17 : Représentation schématique de l'évolution d'un chloroplaste en gérontoplaste au cours de la sénescence foliaire.

(a) Représentation schématique d'un chloroplaste de feuilles vertes avec de nombreux thylakoïdes organisés en grana et de petits plastoglobules ; (b) l'induction de la sénescence foliaire provoque un démantèlement des thylakoïdes et une accumulation des plastoglobules ; (c) le nombre de thylakoïdes est encore réduit avec une apparition de membranes désempilées accompagnée par une augmentation du nombre et de la taille des plastoglobules ; (d) disparition de la membrane thylakoidienne et formation de plastoglobules de grande taille. (d'après Biswal *et al.*, 2012).

II.II.1. L'initiation (phase 1)

Beaucoup de facteurs internes et externes influencent la sénescence (Figure B-16, cf. §B.II.III). Elle peut être développementale, *i.e* déclenchée naturellement peu de temps après l'expansion maximale de la feuille (Craft-Brandner *et al.*, 1998) ou induite par un stress externe. Son déclenchement est intimement lié à l'âge et au développement des organes reproducteurs chez le pois, le riz et le tournesol, mais ce mécanisme n'est pas retrouvé chez la Brassicacée modèle *Arabidopsis* (Gregersen *et al.*, 2013; Guo and Gan, 2005). Qu'elle soit développementale ou induite par un stress, différents facteurs endogènes participent au déclenchement/déroulement de la sénescence (cf. §B.II.III.1).

II.II.2. Le démantèlement et le recyclage des éléments cellulaires (phase 2)

Au cours de cette phase, le **peroxysome** se transforme en glyoxysome. Cette transformation est une étape importante, et elle est caractérisée par une augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans le cycle du glyoxylate. Cette induction du cycle du glyoxylate permet, *via* une succession d'étapes, la synthèse de glucides à partir d'acétyl-coenzyme A issu de la dégradation des lipides des membranes (Cornah and Smith, 2002). Il s'agit d'un processus crucial car cette dégradation des lipides membranaires, notamment au niveau des thylakoïdes, se produit tout au long de la sénescence de la feuille et permet, grâce aux glyoxysomes, d'approvisionner la cellule en glucose, essentiel aux mécanismes énergétiques associés à la sénescence (Hayashi *et al.*, 2000).

Les **chloroplastes** sont parmi les premiers organites touchés par la sénescence et leur métabolisme influence la sénescence de la cellule et de la feuille (Kusaba *et al.*, 2013). Au cours de cette 2^e phase, ils se transforment en gérontoplastes (Figure B-17), caractérisés par une accumulation de plastoglobules et un nombre de thylakoïdes plus restreints (Biswal *et al.*, 2012). La photosynthèse devient de plus en plus limitée du fait du catabolisme des chlorophylles, des protéines, des lipides et des ARN (Gan and Amasino, 1997).

Dans un premier temps, une baisse du transport des électrons des photosystèmes I et II (PSI, PSII) débouchant sur une diminution de l'activité photosynthétique est observée (Stressman *et al.*, 2002). Par conséquent, l'énergie lumineuse n'est plus utilisée pour la photosynthèse, mais elle est restituée sous forme d'énergie à la plante, conduisant à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), participant ainsi au stress oxydatif général observé

lors de la sénescence (cf. §B.II.III.1.c.). La dissipation de l'excès énergétique au cours de la sénescence est en partie assurée par la formation de xanthophylles et d'anthocyanes (Lu *et al.*, 2003).

A la suite de cette diminution de l'activité photoynthétique, la dégradation des chlorophylles est observée. Les chlorophylles stabilisant les protéines transmembranaires du « Light Harvesting Complex II » (LHCII), cette dégradation est un préalable à la dégradation des protéines membranaires des thylakoïdes (Hörtensteiner and Feller, 2002). De nombreuses enzymes sont impliquées dans la dégradation des chlorophylles, notamment durant la sénescence (Christ and Hörtensteiner, 2014). Tout comme la diminution de la photosynthèse, la dégradation des chlorophylles conduit à une accumulation de ROS capables de provoquer de nombreux dégâts métaboliques (Mittler *et al.*, 2004). Si les membranes thylakoïdiennes sont dégradées très tôt, l'intégrité de l'enveloppe plastidiale en revanche est conservée plus tardivement.

Les protéines chloroplastidiales sont majoritairement dégradées au cours de cette 2^e phase. L'azote est stocké dans la cellule en grande partie sous forme de protéines (70-90% des composés azotés réduits) (Peoples and Dalling, 1988) et les chloroplastes contiennent jusqu'à 70% des protéines foliaires (Gan and Amasino, 1997). Parmi ces protéines, la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (Rubisco) et les protéines du LHCII peuvent représenter chacun 20% de l'azote foliaire (Ellis, 1979; Hörtensteiner and Feller, 2002; Kumar *et al.*, 2002; Makino *et al.*, 1984; Matile *et al.*, 1996). De plus, la détermination des 30 protéines les plus abondantes dans les feuilles chutées d'un génotype de colza présentant une faible remobilisation foliaire (cv. Capitot) montre que la Rubisco est la protéine résiduelle la plus abondante. Ces résultats supposent que la faible remobilisation de ce génotype serait liée à une faible dégradation de la Rubisco (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014). Par conséquent cette étape de sénescence des chloroplastes, notamment la dégradation des protéines et plus particulièrement celle de la Rubisco, serait cruciale pour la remobilisation de l'azote. Cette protéolyse serait assurée par des protéases chloroplastidiales, mais également vacuolaires et cytosoliques (cf. §B.III).

De nombreuses protéases ont été identifiées lors d'une étude du protéome vacuolaire d'*Arabidopsis*, notamment des protéases à cystéine, sérine et à aspartate (Carter *et al.*, 2004). Leur implication dans la dégradation des protéines chloroplastidiales au cours de cette phase pose un problème de compartimentation. De récentes études mettent en avant un trafic cellulaire impliquant différentes voies. En effet, la Rubisco et la glutamine synthétase (GS2), 2 protéines du stroma, ont été retrouvées au cours de la sénescence dans de petites vésicules à double membrane

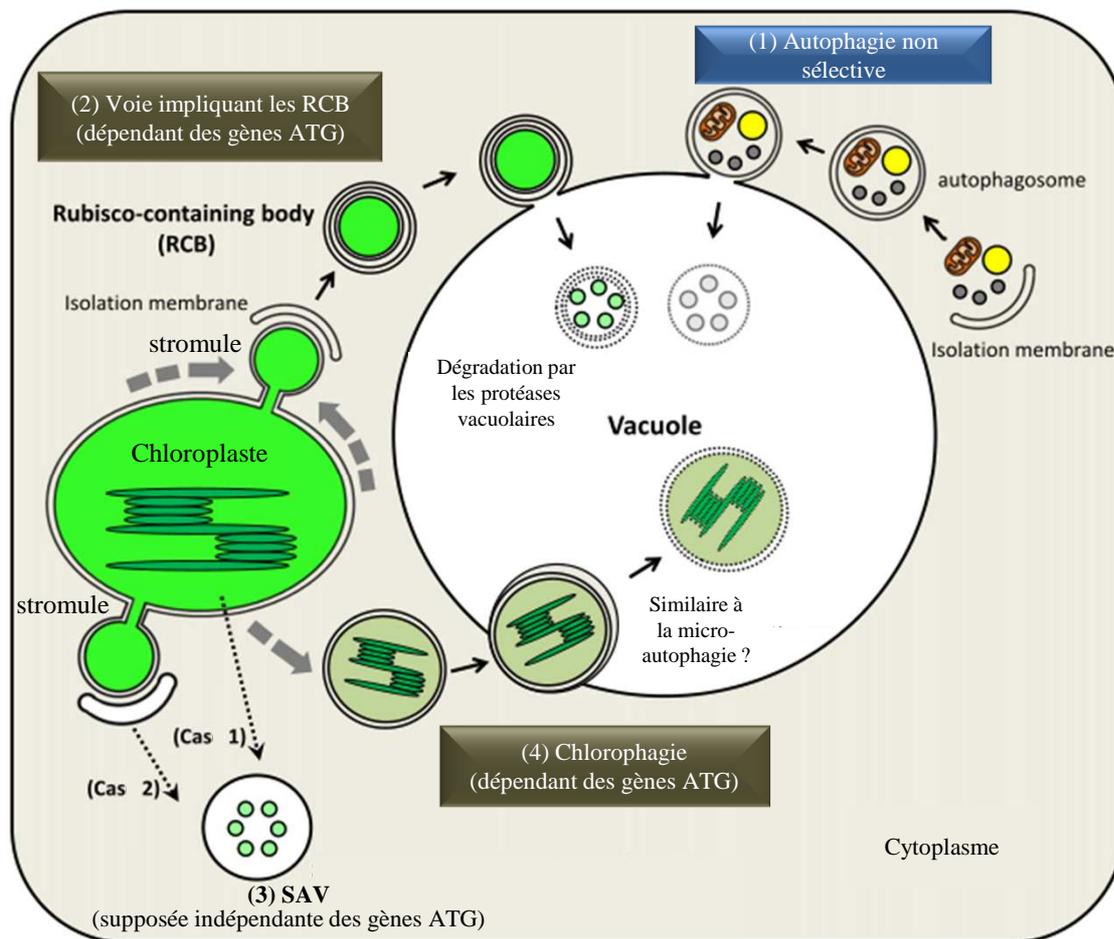


Figure B-18 : Processus de dégradation des protéines plastidiales et du chloroplaste.

En plus de l'autophagie non sélective des composants et des organites cytoplasmiques (1), des chloroplastes et leurs protéines peuvent être dégradés sélectivement par des voies impliquant les RCB (« Rubisco containing bodies ») (2) ou les SAV (« Senescence-Associated Vacuole ») (3). Lorsque la dégradation du chloroplaste est bien avancée, la digestion de l'ensemble du chloroplaste dans la vacuole (chlorophagie (4)) est supposée. Gènes ATG : gènes impliqués dans l'autophagie (d'après Ishida *et al.*, 2014).

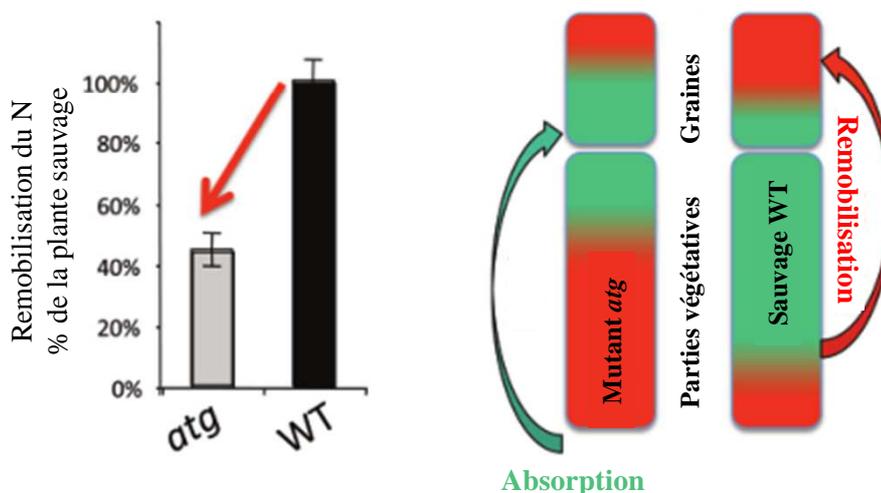


Figure B-19 : Remobilisation de l'azote chez les mutants où l'autophagie est déficiente (*atg*) et chez la plante sauvage (WT) d'*Arabidopsis*.

La couleur verte représente l'azote absorbé et la couleur rouge représente l'azote remobilisé. La remobilisation de l'azote est diminuée lorsque l'autophagie est déficiente. En effet, une plus grande proportion de l'azote alloué aux graines provient de l'absorption chez les mutants contrairement aux sauvages, où l'azote remobilisé prédomine. Les mutants d'autophagie présentent donc une faible remobilisation de l'azote vers les graines (d'après Avila-Ospina *et al.*, 2014).

appelés les RCB pour « Rubisco-containing Bodies » (Chiba *et al.*, 2003). Ces vésicules proviennent de stromules formés à partir de l'enveloppe plastidiale et leur contenu est transporté afin d'être dégradé, soit par des vacuoles associées à la sénescence (SAV) (Martínez *et al.*, 2008b), soit par la vacuole lytique centrale (autophagie) (Izumi *et al.*, 2010). Contrairement aux SAV, les RCB nécessitent pour leur formation l'expression de gènes liés à l'autophagie (Figure B-18) et ils seraient donc intimement liés aux mécanismes d'autophagie (Ishida *et al.*, 2014; Ishida *et al.*, 2008). En revanche, les protéines des thylakoïdes n'étant pas retrouvées au sein de telles vésicules ((Martínez *et al.*, 2008a; Martínez *et al.*, 2008b), leur dégradation est supposée emprunter une autre voie, potentiellement entièrement chloroplastidiale. Cependant, un autre type de vésicules, les « CV-containing vesicles » impliquant des protéines CV (« chloroplast vesiculation »), ont été mises en évidence récemment chez *Arabidopsis* et pourraient intervenir dans les dernières étapes de dégradation des protéines chloroplastidiales, après le démantèlement des membranes, y compris les protéines membranaires comme la protéine D1 (Wang and Blumwald, 2014).

L'autophagie est considérée comme une voie de transport d'organites et de métabolites du cytosol et du chloroplaste vers la vacuole lytique centrale pour dégradation (Figure B-18) (Ishida *et al.*, 2014). Longtemps considérée comme un phénomène non sélectif, des preuves d'une certaine sélectivité ont été mises en évidence (Xie and Klionsky, 2007). Les mécanismes d'autophagie sont impliqués dans la maintenance cellulaire (élimination de composés toxiques, de protéines endommagées, etc.) et activés à certains stades de développement, notamment lors de la sénescence, en réponse à une carence nutritionnelle ou un stress environnemental chez *Arabidopsis* (Lv *et al.*, 2014). L'autophagie a également un rôle dans l'élimination des peroxysomes oxydés et probablement dans la transformation de ces organites en glyoxysome au cours de la sénescence (Shibatan *et al.*, 2014). L'autophagie a également un rôle dans la remobilisation de l'azote foliaire. En effet, le groupe du Dr. Céline Masclaux-Daubresse (IJPB⁶) a récemment montré que des mutants avec une autophagie limitée présentent une remobilisation de l'azote vers les graines moins efficace que les souches sauvages (Figure B-19) (Avila-Ospina *et al.*, 2014). Cependant les liens entre sénescence foliaire, remobilisation des composés azotés et autophagie restent à préciser, et plus particulièrement chez le colza.

⁶ Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles

II.II.3. La phase terminale (phase 3)

Comme dit précédemment (cf. §B.II.II), la sénescence nécessite la synthèse de protéines *de novo* sous le contrôle du génome nucléaire et il est donc logique que le noyau soit parmi les derniers organites dégradés (Gan and Amasino, 1997).

La production d'énergie (ATP) par la respiration est également essentielle pour une bonne progression de la sénescence. La production d'ATP nécessite des substrats respiratoires comme le glucose et les acides gras, issus de la dégradation des réserves glucidiques, lipidiques et des membranes. Les mitochondries sont donc préservées (Del Rio *et al.*, 2003; Quirino *et al.*, 2000), notamment grâce au fait que ces organites possèdent un potentiel membranaire élevé jusqu'à des stades tardifs de la sénescence (Keech *et al.*, 2007; Simeonova *et al.*, 2004).

En toute fin de sénescence, une perte de l'intégrité membranaire apparaît au niveau des mitochondries et du noyau, mais également au niveau des chloroplastes et des vacuoles. La sénescence aboutit à la mort cellulaire programmée ou PCD (« programmed cell death ») qui comprend une succession de processus ayant des points communs avec l'apoptose animale (Shahri, 2011). Il s'agit du stade ultime et irréversible de la sénescence, et la mort de la cellule est la seule issue.

II.III. La régulation de la sénescence foliaire

La sénescence est un phénomène ordonné et très contrôlé, dont l'initiation et la progression sont modulées par des facteurs endogènes et environnementaux.

II.III.1. Les facteurs endogènes

Les facteurs déclenchant peuvent inclure une accumulation de ROS et/ou un déclin de la photosynthèse, mais peu de données permettent de déterminer si la sénescence provoque ces facteurs ou l'inverse (Guo and Gan, 2005). Quoi qu'il en soit, l'implication des hormones et des facteurs de transcription dans la régulation de la sénescence n'est plus à prouver (Kusaba *et al.*, 2013).

a. Le signal sucre et le ratio C/N

Le taux de glucides simples au niveau cellulaire affecte la longévité de la feuille et régule les processus de la sénescence développementale (Zhang and Zhou, 2013). Au cours de la sénescence, les teneurs en glucose et en fructose augmentent dans les feuilles d'*Arabidopsis* (Wingler *et al.*, 2006). De plus, un ajout de glucose induit la sénescence chez *Arabidopsis* (Wingler *et al.*, 2006) et

Tableau B-5 : Exemples de manipulation de la sénescence *via* une augmentation de la production de cytokinines (d'après Gregersen *et al.*, 2013 et Kant *et al.*, 2015).

Plante	Chlorophylles	Phénotype	Biomasse/rendement	Référence
Tabac	Feuilles restent vertes	Photosynthèse prolongée	50% de matière sèche en plus	1
	Pas de déclin	Retard du déclin de la photosynthèse	Plus de matière sèche des feuilles basales	2
Riz	Feuilles restent vertes	Relations source/puits altérées	Plus de panicules	3
Maïs	Jaunissement normal	-	Plus de fleurs	4
Tomate	-	Floraison précoce	Augmentation du poids du fruit	5
Colza de printemps	Feuilles restent vertes	Retard de sénescence foliaire	Augmentation du rendement en graines	6

Les plantes sont transformées pour surproduire des cytokinines au début de la sénescence afin de retarder la progression de la sénescence des plantes. Références : 1 : Gan et Amasino 1995 ; 2 : Jordi *et al.*, 2000 ; 3 : Liu *et al.*, 2010 ; 4 : Young *et al.*, 2004 ; 5 : Swartzberg *et al.*, 2006 ; 6 : Kant *et al.*, 2015.

une alimentation riche en C provoque la sénescence chez l'orge (Parrott *et al.*, 2005). Toutefois, d'autres études ont montré qu'une limitation en glucides simples provoquait une induction de gènes SAG (Watanabe *et al.*, 2013), démontrant ainsi la complexité du lien entre le statut C (niveau de glucides simples) et la sénescence.

De plus, ces données ne permettent pas de déterminer si cet effet sur la sénescence est dû au signal « sucre » impliquant l'hexokinase (Wingler *et al.*, 2006), ou à un rétrocontrôle négatif de la photosynthèse (Zhang and Zhou, 2013). Une accumulation de glucose produit par la dégradation de l'amidon et des lipides pourrait exercer un rétrocontrôle négatif sur la photosynthèse et pourrait ainsi être un facteur déclenchant de la sénescence. Mais cette accumulation de glucose au cours de la sénescence reste modérée. Ainsi, il est difficile de penser que cette accumulation de sucres simples puisse, à elle seule, expliquer la diminution de la photosynthèse observée en début de sénescence.

En outre, un faible apport en N induit plus fortement la sénescence lors d'ajout de glucose (Wingler *et al.*, 2006). En effet, la diminution de la disponibilité en N réduit l'assimilation du N dans les acides aminés, provoquant une augmentation du ratio C/N, accentué en cas d'ajout de glucose. Cette augmentation du ratio C/N pourrait également être un signal déclencheur de la sénescence.

b. Les hormones

Les cytokinines (CK), l'auxine et les gibbérellines (GAs) sont des hormones dites « anti-sénescence » (Gan and Amasino, 1997; Mueller-Roeber and Balazadeh, 2014; Noodén *et al.*, 1988). Au contraire, l'acide abscissique (ABA), l'éthylène, l'acide salicylique (SA), les brassinostéroïdes, les strigolactones et le jasmonate de méthyle (MeJa) sont des hormones déclenchant/induisant la sénescence (Figure B-16) (He *et al.*, 2002; Kusaba *et al.*, 2013; Zhang and Zhou, 2013). Les hormones les plus étudiées pour leur rôle dans la sénescence sont les CK, l'ABA, l'éthylène, le MeJa et le SA, et un rapide aperçu des principaux résultats est présenté ci-dessous.

Les **Cytokinines (CK)** sont impliquées *via* leur effet retardateur de l'entrée en sénescence (Zhang and Zhou, 2013). En effet, la surexpression d'une enzyme impliquée dans la synthèse des CK (isopentenyltransférase) lors de la sénescence grâce à un promoteur de protéines spécifiques de la sénescence (protéase à cystéine SAG12 ou récepteur de protéine kinase SARK) retarde la sénescence, ce qui permet d'augmenter la biomasse ou le rendement, confirmant ainsi le lien fort entre sénescence et rendement (Tableau B-5) (Gregersen *et al.*,

2013; Kant *et al.*, 2015). A l'inverse, une diminution de substrats nécessaires à la synthèse des CK (isopentenyl diphosphate et dimethylallyl diphosphate) conduit à une sénescence précoce (Masferrer *et al.*, 2002). Les CK seraient impliquées dans la régulation de la sénescence, notamment la sénescence liée à l'alimentation en N. En effet, une augmentation du niveau de CK *via* une induction de l'isopentenyl transférase peut retarder la sénescence et la remobilisation des protéines foliaires chez le tabac (Gregersen *et al.*, 2013).

L'**acide abscissique (ABA)** est une hormone très importante dans la régulation de la sénescence foliaire et son accumulation a été reportée dans les feuilles en situation de sécheresse, de stress salin, de température extrême et de contraintes abiotiques, connues pour provoquer une sénescence précoce. Chez *Arabidopsis*, l'application d'ABA déclenche l'accumulation de ROS lors d'un stress hydrique et induit la sénescence (Zhang and Zhou, 2013). Par ailleurs, des mutants insensibles à l'ABA présentent un phénotype stay-green (Kusaba *et al.*, 2013). L'ABA participerait notamment à l'inhibition de la biosynthèse des chlorophylles en parallèle à l'induction de la dégradation de celles-ci, mais cette hormone serait un facteur activateur de la sénescence plutôt que déclencheur (Zhang and Zhou, 2013).

La production d'**éthylène** coïncide avec l'entrée en sénescence et son application induit une sénescence prématurée (Koyama, 2014). De plus, des mutants insensibles à l'éthylène présentent un phénotype stay-green chez *Arabidopsis*, démontrant son importance dans la sénescence mais cette phytohormone ne serait pas indispensable à son initiation (Kusaba *et al.*, 2013; Zhang and Zhou, 2013). L'éthylène interviendrait notamment dans la régulation des facteurs de transcription (Koyama, 2014).

La teneur en **jasmonate de méthyle (MeJa)** augmente dans les feuilles lors d'une sénescence développementale ou induite par l'obscurité chez *Arabidopsis*, mais elle n'est pas indispensable à l'initiation ou au déroulement de ces 2 types de sénescence (Seltmann *et al.*, 2010). De plus, l'application de MeJa stimule la sénescence (He *et al.*, 2002) et induit l'expression d'enzymes de dégradation des chlorophylles (chlorophyllases) (Tsuchiya *et al.*, 1999). Des mutants insensibles au MeJa présentent un phénotype stay-green suite à un passage dans l'obscurité mais des résultats contradictoires ne permettent pas de statuer sur son rôle précis (Kusaba *et al.*, 2013). Chez le colza, l'ajout de MeJa en application foliaire ou dans la solution nutritive provoque une accélération de la sénescence avec une stimulation de la mobilisation de l'azote dans les feuilles âgées et matures (Rossato *et al.*, 2002). Tous ces résultats montrent bien l'implication du MeJa dans la sénescence, notamment dans la dégradation des

chlorophylles et la remobilisation de l'azote, mais son rôle précis reste indéterminé.

L'**acide salicylique (SA)** s'accumule dans les feuilles sénescentes. Un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes SAG est supposé (Morris *et al.*, 2000), notamment en fin de sénescence (Zhang and Zhou, 2013).

c. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les peroxydes (RO₂), notamment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et les radicaux libres comme l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et l'hydroxyle (.OH) sont les principales ROS dans les cellules foliaires. Ces ROS sont formées au cours de la photo-respiration, l'oxydation des lipides, la production de NADPH, H⁺ ou de xanthine (Mittler *et al.*, 2004).

Les ROS sont de puissants oxydants pouvant causer de nombreux dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides membranaires (Zhang and Zhou, 2013). Elles peuvent être détoxifiées par des molécules antioxydantes (glutathion, ascorbate, vitamine E, caroténoïdes et polyphénols) ou des enzymes comme la catalase, les peroxydases, la glutathion-S-transferase ou les superoxydes dismutases (Mittler *et al.*, 2004). Un stress oxydatif est avéré lorsque la production de ROS dépasse les capacités de la cellule à les détoxifier.

L'accumulation de ROS est un point commun entre les manifestations de la sénescence et de nombreuses réponses à des stress biotiques et abiotiques (Guo and Gan, 2005). Par conséquent, l'accumulation de ROS est supposée être un des facteurs déclenchants de la sénescence. En effet, un stress oxydatif se produit pendant la sénescence, conséquence d'une production de ROS augmentée, mais également d'une chute des activités antioxydantes (Panchuk *et al.*, 2005; Pastori and Del Rio, 1997). Cependant les ROS agiraient principalement comme signal activant l'expression de gènes, notamment les SAG, et non par dommage cellulaire (Navabpour *et al.*, 2003). De plus, les mitochondries font partie des derniers organites dégradés (cf. §B.II.II.3) et leur capacité à détoxifier efficacement les ROS ne serait pas étrangère à leur longévité : en effet, chez le pois, il a été montré que le niveau de transcrits et la teneur en superoxyde dismutase (Mn-SOD), une enzyme détoxifiante manganèse dépendante, augmentent dans les mitochondries lors de la sénescence foliaire (Del Rio *et al.*, 2003).

d. Les facteurs de transcription

Tous ces facteurs endogènes vont provoquer des réactions en chaîne impliquant de nombreux facteurs de transcription (AP2-EREBP, CCAAT-DR1, CCAAT-HAP2, WRKY, bZIP, NAC) (Ay *et al.*, 2014). A titre d'exemple, chez *Arabidopsis*, le facteur WRKY53 semble jouer un rôle important lors de la sénescence. En effet, sa surexpression entraîne une augmentation de l'expression du gène codant la protéase à cystéine SAG12 (Miao *et al.*, 2004), connue pour être spécifique de la sénescence (Guo *et al.*, 2004). Les NAC (NAM, ATAF et CUC) sont des facteurs de transcription spécifiques des plantes et chez *Arabidopsis*, 2 facteurs NAC (ORE1 et ORS1) ont également un rôle antagoniste dans la régulation de la sénescence démontrée par validation fonctionnelle (Kusaba *et al.*, 2013). Chez le blé, la surexpression d'un des facteurs de transcription NAC (TaNAC-S) permet d'augmenter la concentration en N des grains en parallèle d'une sénescence foliaire retardée (Zhao *et al.*, 2014). La régulation des facteurs NAC au cours de la sénescence fait par ailleurs intervenir l'éthylène (Koyama, 2014), connu pour pouvoir induire la sénescence (cf. §B.II.III.1.b).

II.III.2. Les facteurs externes

En conditions de plein champ, les conditions optimales de croissance sont rarement réunies et les plantes sont fréquemment soumises à des stress variés. Les stress biotiques (non détaillés dans cet état de l'art) (Gregersen *et al.*, 2013; Pontier *et al.*, 1999) et abiotiques ont un impact sur la progression de la sénescence et les mécanismes associés peuvent varier en fonction du stress (Watanabe *et al.*, 2013) mais tous impliquent des hormones (Zhang and Zhou, 2013). Un rapide aperçu des dernières connaissances concernant l'influence des stress abiotiques sur la sénescence est détaillé ci-dessous.

La **lumière** est un facteur important du développement, et un excès comme une insuffisance (ombrage, obscurité) peuvent provoquer la sénescence (Gan and Amasino, 1997; Gregersen *et al.*, 2013; Zhang and Zhou, 2013). Un excès de lumière provoquerait des dommages de l'appareil photosynthétique et donc la production de ROS, potentiellement impliquées dans le déclenchement de la sénescence (Gregersen *et al.*, 2013). La photopériode (Noodén *et al.*, 1996) et la qualité du rayonnement (Prochazkova and Wilhelmova, 2004) sont également importantes pour la régulation de la sénescence. Chez le colza, la sénescence des feuilles peut être retardée en cas d'ombrage (Brunel-Muguet *et al.*, 2013). La lumière agirait indirectement sur la

sénescence *via* son action sur l'activité photosynthétique et la modification du ratio C/N (Wingler *et al.*, 2006).

Tout comme la lumière, une élévation de **température** serait responsable de dommages au niveau de l'appareil photosynthétique, entraînant une accumulation de ROS pouvant provoquer une sénescence précoce (Gregersen *et al.*, 2013; Zhang and Zhou, 2013).

Un **stress hydrique** peut également provoquer une sénescence précoce qui contribue au maintien de la balance hydrique de la plante et favorise la remobilisation (Gan and Amasino, 1997; Guo and Gan, 2005; Zhang and Zhou, 2013). Cette sénescence précoce en situation de stress hydrique a été observée de manière concomitante à une stimulation de l'activité protéolytique dans les vieilles feuilles de colza (Ilami *et al.*, 1997) ou à une augmentation de l'expression de gènes codant des protéases chez *Arabidopsis* (Koizumi *et al.*, 1993).

L'**ozone**, par le biais d'un stress oxydatif, est également un facteur déclenchant de la sénescence (Gan and Amasino, 1997; Zhang and Zhou, 2013).

La disponibilité en **nutriments** est également à prendre en compte (Gan and Amasino, 1997; Guo and Gan, 2005). Par exemple, en fonction des réserves cellulaires en sulfate, une limitation en soufre (S) peut retarder l'initiation de la sénescence (Abdallah *et al.*, 2011; Dubousset *et al.*, 2009). A l'inverse, une restriction ou une privation en nitrate accélèrent l'entrée en sénescence (Gregersen *et al.*, 2013; Guo and Gan, 2005; Zhang and Zhou, 2013). Chez le colza notamment, cette accélération de la sénescence foliaire en réponse à une limitation en N minéral a été reportée à maintes reprises, associée à une augmentation de la dégradation des chlorophylles et des protéines (Etienne *et al.*, 2007; Gombert *et al.*, 2006; Gombert *et al.*, 2010). La limitation en N agirait en perturbant le ratio C/N, potentiellement déclencheur de la sénescence (Wingler *et al.*, 2006). A l'inverse, un excès d'N peut provoquer un retard de sénescence pouvant causer, par exemple, un phénomène de verse (Gregersen, 2011).

III. Les protéases impliquées dans la sénescence foliaire

Chez le colza, l'ensemble des travaux de recherche suggèrent que la faible ERA est essentiellement due à un défaut de dégradation des protéines au cours de la sénescence foliaire (Avice and Etienne, 2014). Le chapitre suivant se focalisera sur les connaissances actuelles concernant les caractéristiques et le rôle des différentes classes de protéases dans la protéolyse associée à la sénescence. Etant donné le grand nombre de travaux effectués sur ce

Tableau B-6 : Protéases à cystéine (CP) dont l'expression du gène, la quantité de protéines ou l'activité est induite lors de la mort cellulaire programmée (PCD) ou de la sénescence foliaire.

Protéases à cystéine (CP)	Gène	Protéine	Activité	Type de sénescence/PCD	Organisme	Références
Globales	<i>LSC7</i> <i>LSC790</i>			SDev	<i>B.napus</i>	1
	<i>CP</i>			SDev	<i>A.thaliana</i>	2, 3
		CP		SDev	<i>P.sativum</i>	4
		CP		SDev	<i>Z.mays</i>	5
			CP	SDev	<i>A.thaliana</i>	6
		<i>bcp-15</i>		SDev	<i>B.napus</i>	7
			CP	SNCS (coupe)	<i>B. oleracea</i>	8
			CP	PCD (stress oxydatif)	<i>A.thaliana</i>	9
			Cysp15a	SDev	<i>M.truncatula</i>	10
		See2	SDev	<i>Z.mays</i>	5	
Métacaspases			Caspase 3-like	PCD protoplastes cotyledons	<i>N.tabacum</i>	10
		AtMC2d (type II)		PCD foliaire (stress (a)biotique)	<i>A.thaliana</i>	11
			Type II MC8 (KO)	PCD (H ₂ O ₂ et UVs)	<i>A.thaliana</i>	12
			γ VPE	Maturation de protéines pendant la SNCS	<i>A.thaliana</i>	13
Papaïn-like	<i>Papaïn-like</i>			SNCS (coupe)	<i>B.oleracea</i>	8
	<i>SAG2</i>			SDev	<i>A.thaliana</i>	3, 6, 14, 15, 16
	SAG12					
	RD21					
		SAG12		SNCS (limitation en N)	<i>B.napus</i>	17
	<i>RD21</i> <i>RD19</i>			SNCS (stress hydrique)	<i>A.thaliana</i>	18

CP : protéases à cystéine non identifiées. SNCS : sénescence ; SDev : sénescence développementale ; KO : implication démontrée par mutant Knock-Out. Références : 1 : Buchanan-Wollaston et Ainsworth 1997 ; 2 : Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005 ; 3 : Guo *et al.*, 2004 ; 4 : Schiltz *et al.*, 2004 ; 5 : Donnison *et al.*, 2007 ; 6 : Otegui *et al.*, 2005 ; 7 : Stroher *et al.*, 1997 ; 8 : Coupe *et al.*, 2003 ; 9 : Belenghi *et al.*, 2003 ; 10 : Sun *et al.*, 1999 ; 11 : Watanabe et Lam 2011 ; 12 : He *et al.*, 2008 ; 13 : Rojo *et al.*, 2004 ; 14 : Grbic, 2003 ; 15 : Yamada *et al.*, 2001 ; 16 : Van der Hoorn *et al.*, 2004 ; 17 : Desclos *et al.*, 2009 ; 18 : Koizumi *et al.*, 1993.

sujet, cette synthèse bibliographique est focalisée sur les résultats obtenus chez les Brassicacées et s'étend à d'autres familles botaniques seulement dans les cas où aucune donnée n'a été collectée chez les Brassicacées.

III.I. Les protéases à cystéine (CP ; EC 3.4.22)

Parmi les 826 protéases codées par le génome d'*Arabidopsis* (van der Hoorn, 2008), plus de 140 impliquent une cystéine au sein de leur site catalytique. Ces protéases à cystéine (CP) sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la dégradation des protéines de stockage des graines (Toyooka *et al.*, 2000) et la maturation des fruits (Alonso and Granell, 1995).

Lors de la sénescence foliaire développementale, une augmentation de l'expression de gènes codant des CP est observée chez le colza (gènes *LSC7* et *LSC790*) (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997) et *Arabidopsis* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Diaz-Mendoza *et al.*, 2014) (Tableau B-6). De plus, une accumulation de CP est observée lors de la sénescence foliaire développementale chez le pois (Schiltz *et al.*, 2004) et le maïs (Donnison *et al.*, 2007) et l'activité des CP est augmentée lors de la sénescence naturelle chez *Arabidopsis* (Otegui *et al.*, 2005). Par ailleurs, les mutants anti-sens d'une CP de la luzerne (*Cyp15a*), proche de RD19 d'*Arabidopsis*, présentent un ralentissement de la sénescence foliaire (Sheokand *et al.*, 2005).

Les CP sont également induites lors d'une sénescence provoquée par des facteurs externes. En effet, une induction de l'expression de gènes codant des CP est observée chez le colza (*bcp-15*) (Stroeher *et al.*, 1997) lors d'un stress hydrique, connu pour accélérer la sénescence foliaire (Munné-Bosch and Alegre, 2004). Un inhibiteur chimique de CP (iodoacétamide) inhibe de 14% l'activité protéolytique des fleurons de brocoli (*Brassica oleracea*) présentant une sénescence induite par le détachement (Coupe *et al.*, 2003). La surproduction d'un inhibiteur de CP (la cystatine AtCYS1) bloque le déclenchement de la PCD (« Programmed Cell Death ») de suspension cellulaire d'*Arabidopsis* par un stress oxydatif, et diminue la PCD associée à la réaction hypersensible lors d'une attaque par un agent pathogène (Figure B-20) (Belenghi *et al.*, 2003).

Ces résultats mettent en avant le rôle clé des CP dans les processus de sénescence et de mort cellulaire développementales et/ou induites par différents stress. Les CP seraient notamment impliquées dans la dégradation de protéines du stroma, comme la Rubisco et la Rubisco activase chez le haricot (Yoshida and Minamikawa, 1996), le tabac (Prins *et al.*, 2008) et le blé (Thoenen *et al.*, 2007). Cependant, seules 3 études, respectivement chez *Arabidopsis* (Bayer *et al.*, 2011), la tomate (Harrak *et al.*, 2001) et le pois (Forsberg *et al.*, 2005), rapportent la présence de CP et/ou d'une activité

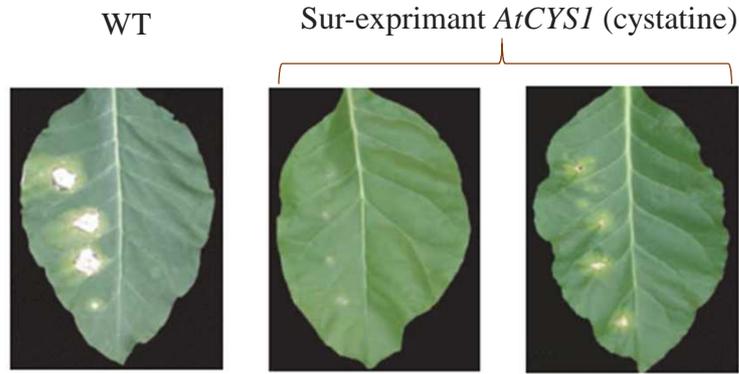


Figure B-20 : Réaction hypersensible (HR) des feuilles d'*Arabidopsis* infectées avec *P. syringae* chez une plante sauvage (WT) ou sur-exprimant un inhibiteur de protéases à cystéine (*AtCYSI*, cystatine).

Les nécroses correspondent à la mort cellulaire associée à la HR et sont plus importantes pour la plante sauvage que pour les transformants (d'après Belenghi *et al.*, 2003)

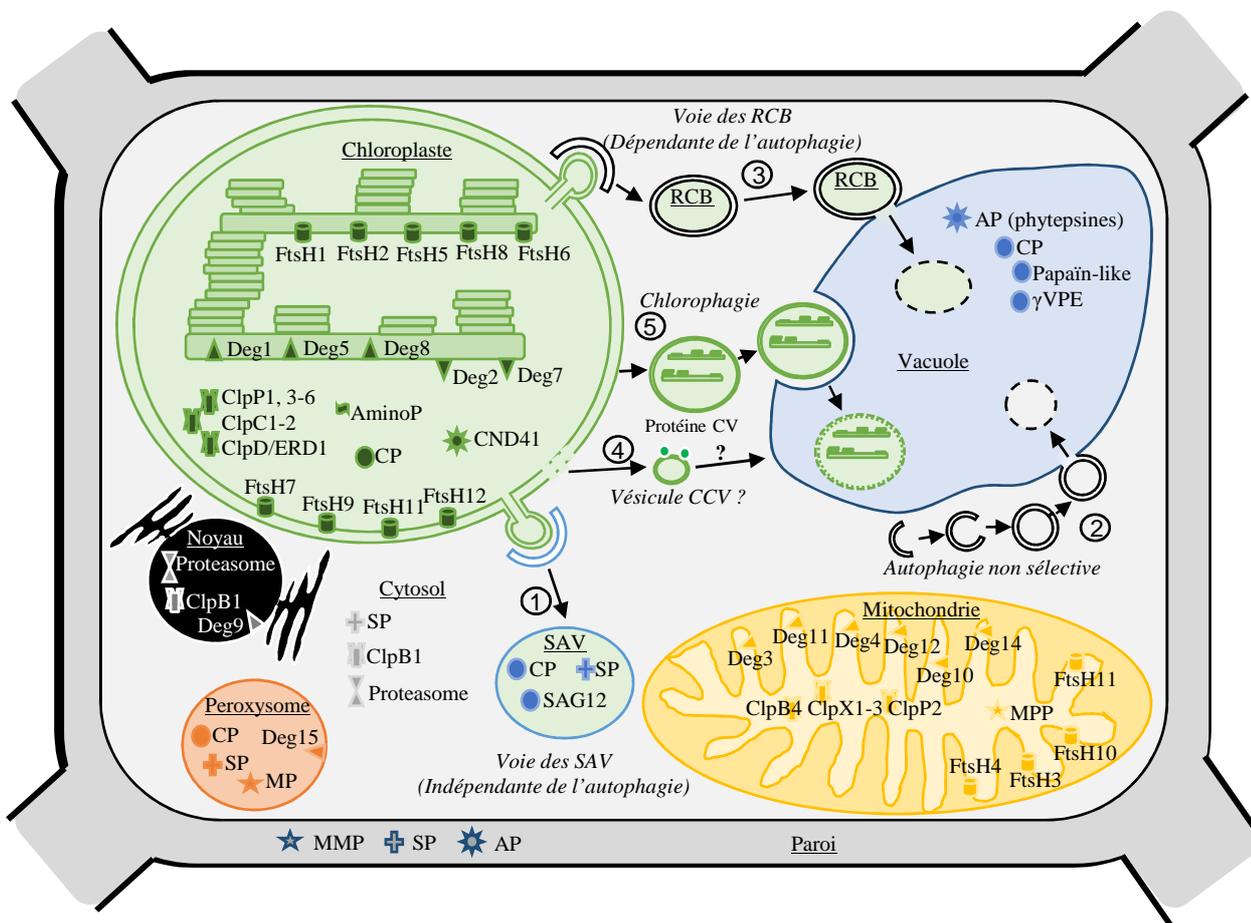


Figure B-21 : Localisation cellulaire des principales protéases potentiellement impliquées dans la dégradation des protéines foliaires au cours de la sénescence.

Les 5 mécanismes putatifs intervenant dans la dégradation des protéines chloroplastidiales sont indiqués en italique : la voie impliquant des SAV (1), la voie dépendante de l'autophagie (2), impliquant potentiellement des RCB (3), les CCV (4) et la chlorophagie (5). AminoP : aminopeptidases ; AP : protéases aspartiques non identifiées ; CCV : « CV-containing vesicles » ; Clp : protéases caséinolytiques ; CND41 : « Chloroplast Nucleoid DNA Binding Protein » ; CP : protéases à cystéine non identifiées ; CV : protéine « chloroplast vesiculation » ; Deg : « Degradation of periplasmic proteases » ; FtsH : « Filamentation Temperature-Sensitive H » ; MMP : « Matrix Metalloproteinases » ; MP : métalloprotéases non identifiées ; MPP : « Mitochondrial Processing Peptidases » ; RCB : « Rubisco Containing Bodies » ; SAV : « Senescence Associated Vacuole » ; SP : protéases à sérine non identifiées ; VPE « Vacuolar Processing Enzyme ».

CP dans les chloroplastes. En effet, les CP potentiellement impliquées dans la sénescence sont majoritairement localisées dans les vacuoles des cellules foliaires, notamment chez *Arabidopsis* (Carter *et al.*, 2004; Otegui *et al.*, 2005) et le tabac (Figure B-21) (Martínez *et al.*, 2008a). Les protéines stromales telles que la Rubisco et la glutamine synthétase (GS2) étant retrouvées dans les « Rubisco-containing bodies » (RCB), l'implication de l'autophagie pour pallier ce problème de compartimentation en orientant les RCB vers la vacuole lytique est fortement supposée (cf. §B.II.II.2) (Ishida *et al.*, 2014). De plus, la présence d'activité CP dans les vésicules de type SAV (Otegui *et al.*, 2005) implique également un trafic cellulaire indépendant de l'autophagie pour la dégradation des protéines du stroma (Figure B-18).

Deux familles de protéases à cystéine sont supposées avoir un rôle dans les mécanismes de protéolyse associée à la sénescence : les métacaspases (MC ; famille C14) et les papain-like (Pap-L ; famille C1).

III.I.1. Les métacaspases (MC)

Chez les plantes, aucun orthologue des caspases animales (cystéinyl aspartate-specific protéinases) fortement impliquées dans la PCD animale (Elmore, 2007), n'a pu être mis en évidence lors du séquençage d'*Arabidopsis* (Bonneau *et al.*, 2008). En revanche, l'utilisation de substrats fluorescents et d'inhibiteurs d'activité caspase a mis en évidence 6 activités caspase-like chez les plantes (Rotari *et al.*, 2005), et les protéines responsables de ces activités ont été nommées les métacaspases (MC) (Uren *et al.*, 2000). Les MC sont proches des « vacuolar processing enzyme » (VPE) (Rotari *et al.*, 2005) et se distinguent des caspases animales au niveau de la spécificité du substrat (Vercammen *et al.*, 2007). Deux types de MC ont été identifiés : le type I (Cambra *et al.*, 2010) et le type II, spécifique aux plantes (Vercammen *et al.*, 2007), dont respectivement 3 et 6 représentants ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Uren *et al.*, 2000).

Implication des MC dans la sénescence développementale et induite

De nombreux travaux ont permis d'apporter des éléments tangibles sur le rôle des MC dans la PCD végétale, étape ultime de la sénescence (Tableau B-6). Etant donné qu'une activité caspase-1-like a été mise en évidence pour la protéase γ VPE ayant un rôle dans la maturation des protéines vacuolaires impliquées dans les mécanismes de sénescence, les MC sont supposées intervenir dans la maturation des protéases, plutôt que dans la dégradation des protéines (Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011; Rojo *et al.*, 2004). Pour préciser le rôle des MC, il est nécessaire de connaître leur(s) substrat(s), encore inconnu(s) à ce jour (Woltering *et al.*, 2002).

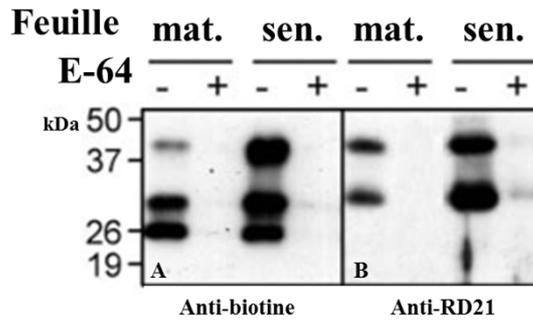


Figure B-22 : Activités des protéases à cystéine totales (A) et quantité de protéases à cystéine RD21 (B) dans les feuilles matures (mat.) ou sénescents (sen.) d'*Arabidopsis*.

L'activité des protéases à cystéine est détectée grâce à un inhibiteur de protéase à cystéine (E-64) biotinylé. La détection de la biotine sur gel par des anticorps spécifiques permet de déduire l'activité des protéases à cystéine de l'extrait. Les anticorps anti RD21 détectent 2 formes de la protéase RD21 : une forme intermédiaire de 38 kDa et une forme mature de 33 kDa. La comparaison de l'activité des protéases à cystéine totales et de RD21 permet de démontrer que l'augmentation d'activité des protéases à cystéine dans les feuilles sénescents est en partie due à la protéase RD21 (d'après van der Hoorn *et al.*, 2004).

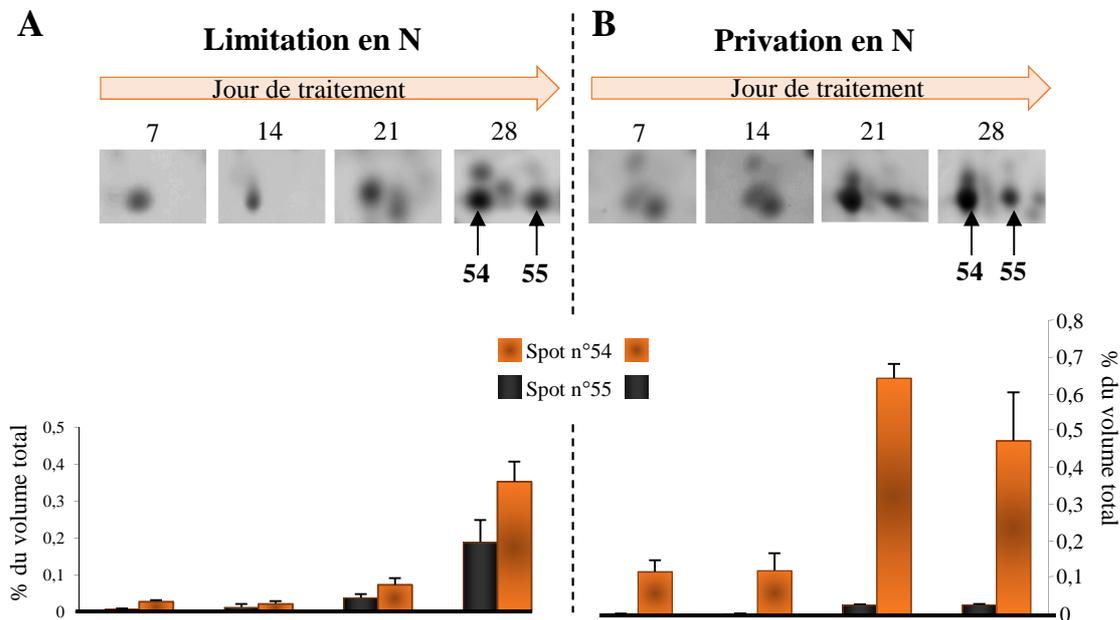


Figure B-23 : Quantification de la protéine SAG12-1 d'une feuille sénescence de colza limité (A) ou privé en N (B).

Après analyses des gels par le logiciel ProXpress, le volume de chaque spot est déterminé. La quantification des spots 54 et 55 a été déterminée en normalisant leurs volumes par rapport au volume total des spots de l'ensemble des protéines présentes sur le gel. Les spots 54 et 55 sur le gel bidimensionnel sont induits par la limitation et la privation en N en fin de sénescence, et correspondent à la protéase à cystéine SAG12-1 (d'après Desclos *et al.*, 2009).

III.I.2. Les papain-like (Pap-L)

Une des plus grandes familles de CP est celle des Pap-L avec 28 membres chez *Arabidopsis* (Garcia-Lorenzo *et al.*, 2006). Ces protéases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs et doivent subir une maturation (clivage d'un peptide) pour devenir actives, soit de manière autonome, soit *via* une autre protéase. Elles sont localisées majoritairement dans les vacuoles mais certaines peuvent être sécrétées (Martinez *et al.*, 2012). Du fait de leur similitude avec les cathepsines animales, les Pap-L sont classées en différents groupes : cathepsines L-like, B-like, H-like et F-like (Diaz-Mendoza *et al.*, 2014).

Implication des Pap-L dans la sénescence développementale et induite

De nombreux gènes codant des Pap-L sont surexprimés lors de la sénescence développementale des feuilles de colza (*SAG2*, *SAG12-1* et *SAG12-2*) (Noh and Amasino, 1999) et d'*Arabidopsis* (*SAG2*, *SAG12* et *RD21*) (Grbic, 2003; Guo *et al.*, 2004) (Tableau B-6). Au niveau protéomique, une accumulation de Pap-L a été détectée durant la sénescence foliaire d'*Arabidopsis* (*SAG12* et *RD21*) (Grbic, 2003; Otegui *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2001). De plus, grâce à une méthode permettant d'observer spécifiquement l'activité des CP sur gel et d'identifier la protéase responsable de cette activité, une augmentation de l'activité d'une Pap-like (*RD21*) est fortement suspectée lors de la sénescence foliaire d'*Arabidopsis* (Figure B-22) (van der Hoorn *et al.*, 2004). Cependant, un mutant KO n'exprimant plus une autre Pap-L (*SAG12*) chez *Arabidopsis* présente un phénotype (croissance et sénescence foliaire) similaire au type sauvage (Otegui *et al.*, 2005). De la même manière, l'expression de l'homologue de *SAG12* de la patate douce chez *Arabidopsis* ne modifie en rien la sénescence (Chen *et al.*, 2010). En revanche, la surexpression de cystatine, un inhibiteur de Pap-L, dans les feuilles de tabac conduit à un allongement de la durée de vie des feuilles (Prins *et al.*, 2008), mettant en avant un éventuel contrôle de la sénescence par les inhibiteurs de CP (Diaz-Mendoza *et al.*, 2014).

Les Pap-L interviendraient également dans la sénescence induite par des stress abiotiques, notamment chez *Arabidopsis* où un stress hydrique provoque une augmentation de l'expression du gène *RD19* (Koizumi *et al.*, 1993). Chez le colza, des approches protéomiques ont mis en évidence une accumulation d'une des 2 isoformes de *SAG12* (*SAG12-1*) lors de la sénescence foliaire induite par une limitation ou une privation en nitrate (Figure B-23) (Desclos *et al.*, 2009). Cette isoforme de *SAG12* est également retrouvée dans les 30 protéines

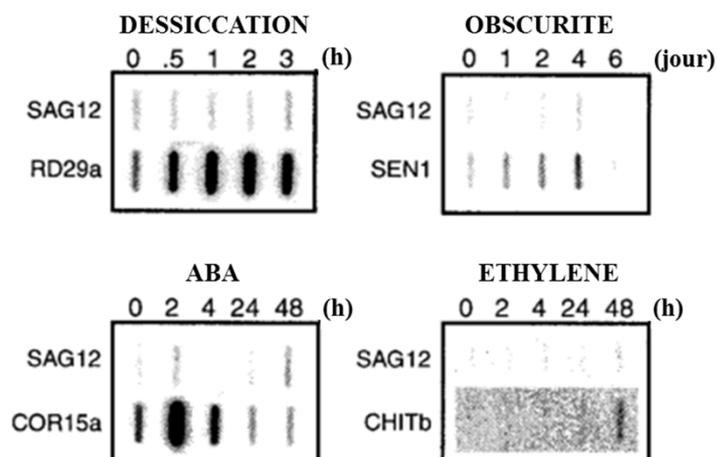


Figure B-24 : Expression du gène *SAG12* dans des jeunes feuilles *d'Arabidopsis* en réponse à une dessiccation, l'obscurité ou l'application d'acide abscissique (ABA) et d'éthylène.

Le gène *SAG12* n'est induit dans aucune des conditions testées. Les gènes *RD29a*, *SEN1*, *COR15a* et *CHITb* sont, respectivement, des contrôles positifs de la réponse aux stress provoqués par la dessiccation, l'obscurité, l'ABA et l'éthylène (d'après Noh et Amasino, 1999).

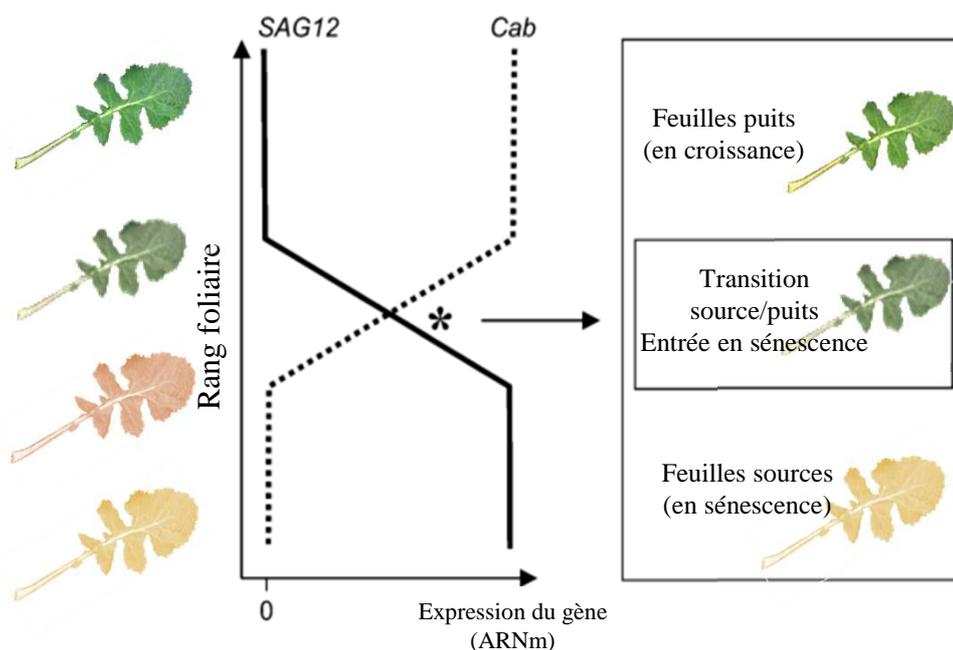


Figure B-25 : Représentation schématique du statut source/puits vis-à-vis de l'azote des feuilles de colza via l'expression des gènes *SAG12* et *Cab* (« chlorophyll a/b binding protein ») en fonction de leur position nodale. La transition source/puits pour l'azote se produit au début de la sénescence et correspond à une augmentation de l'expression de *SAG12* et une diminution de l'expression de *Cab*. L'astérisque correspond à la position nodale théorique du rang foliaire sujet à la transition source/puits et donc, au dernier rang foliaire entrant en sénescence (d'après Gombert *et al.*, 2006).

résiduelles les plus abondantes dans les feuilles chutées de colza, laissant supposer qu'elle agirait jusqu'à des stades tardifs de la sénescence foliaire (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014).

De plus, la protéine SAG12 est une Pap-L (cathepsine L-like) dont les niveaux de transcrite et de protéine sont spécifiquement augmentés lors de la sénescence développementale chez *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2004) et le colza (Lohman *et al.*, 1994). En effet, même si elle est accumulée en cas de limitation/privation en nitrate (Desclos *et al.*, 2009), son expression n'est pas induite lors d'une sénescence provoquée par blessure, dessiccation ou stimuli hormonaux (ABA, éthylène) appliqués sur des feuilles non sénescentes (Figure B-24) (Noh and Amasino, 1999). Grâce à une étude montrant que les promoteurs des gènes *SAG12* d'*Arabidopsis* et du colza étaient très similaires et spécifiquement induits lors de la sénescence, un indicateur de progression de la sénescence foliaire basé sur l'expression des gènes *SAG12* et *Cab* (« Chlorophyll a/b binding protein associé au LHCII ») a pu être développé chez le colza (Figure B-25) (Gombert *et al.*, 2006). Ces résultats révèlent un lien fort entre les Pap-L et la sénescence.

III.II. Les protéases à sérine (SP ; EC 3.4.21)

Les protéases à sérine (SP), caractérisées par une triade d'acides aminés (sérine, histidine, aspartate) au niveau du site catalytique, représentent la plus grande classe de protéases chez les plantes avec plus de 200 SP putatives chez *Arabidopsis* (Tripathi and Sowdhamini, 2006; van der Hoorn, 2008). Elles sont impliquées dans de nombreux stress abiotiques et biotiques, la symbiose (Antão and Malcata, 2005), la mobilisation des réserves pendant la germination (Tan-Wilson and Wilson, 2012) ou encore la formation des trachéïdes au niveau du xylème (Petzold *et al.*, 2012).

Une augmentation de l'expression de gènes codant des SP se produit lors de la sénescence foliaire développementale chez *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2004). De plus, Coupe et ses collaborateurs (Coupe *et al.*, 2003) ont observé qu'un inhibiteur chimique des SP diminuait de 10% l'activité protéolytique associée à la sénescence induite après la coupe d'un fleuron du brocoli (Tableau B-7). Des inhibiteurs de protéases à sérine sont par ailleurs retrouvés au niveau cellulaire et ils pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'activité des SP dans la sénescence foliaire.

En effet, chez le colza, une corrélation inverse est observée entre la sénescence foliaire et l'activité ainsi que le niveau d'accumulation de BnD22, un inhibiteur de protéases trypsiques (Figure B-26) (Etienne *et al.*, 2007; Reviron *et al.*, 1992). BnD22 est une WSCP (« water soluble chlorophyll binding protein ») qui peut représenter

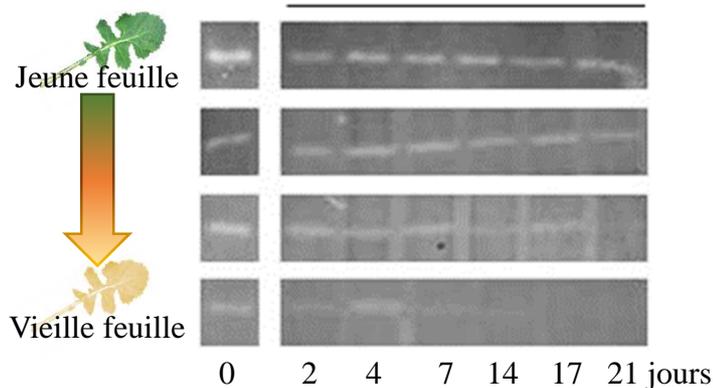
Tableau B-7 : Protéases à sérine (SP) dont l'expression du gène, la quantité de protéines ou l'activité est induite lors de la mort cellulaire programmée (PCD) ou de la sénescence foliaire.

Protéases à sérine	Gène	Protéine	Activité	Type de sénescence/PCD	Organisme	Références
Globales			Trypsine/ chymotrypsine	SNSC (coupe)	<i>B. oleracea</i>	1
	<i>SP</i>			SDev	<i>A.thaliana</i>	2
Subtilisine-like	<i>AtSLP2</i>			SNSC (MeJa)	<i>A.thaliana</i>	3
		P1 et P2		SDev	<i>T.aestivum</i>	4, 5
			Phytaspase (KO)	PCD (infection, stress oxydatif)	<i>S.lycopersicum</i>	6
Protéases Clp	<i>ERD1, ClpC1, ClpP3, ClpP5</i>			SDev	<i>A.thaliana</i>	7
	<i>ERD1, ClpC1</i>	ERD1		SNSC (obscurité)		
		ClpC,		SDev	<i>P.sativum</i>	8
	<i>Clp</i>			SNSC (carence en N)	<i>T.aestivum</i>	9
Protéases Deg	<i>Deg</i>			SDev	<i>H.vulgare</i>	10
	<i>Deg</i>			SDev	<i>Populus</i>	11
			Deg2 (KO)	SNSC chloroplastidiale	<i>A.thaliana</i>	12
			Deg5 (KO)	SNSC chloroplastidiale	<i>A.thaliana</i>	13

SP : protéases à sérine non identifiées ; SNCS : sénescence ; SDev : sénescence développementale ; KO : implication démontrée par mutant KO ; MeJa : traitement au jasmonate de méthyle. Références : 1 : Coupe *et al.*, 2003 ; 2 : Guo *et al.* 2004 ; 3 : Gollmack *et al.*, 2003 ; 4 : Roberts *et al.*, 2003 ; 5 : Roberts *et al.*, 2006 ; 6 : Chichkova *et al.*, 2010 ; 7 : Nakabayashi *et al.*, 2009 ; 8 : Schiltz *et al.*, 2004 ; 9 : Ruuska *et al.*, 2008 ; 10 : Jukanti *et al.*, 2008 ; 11 : Andersson *et al.*, 2004 ; 12 : Lucinski *et al.*, 2011b ; 13 : Lucinski *et al.*, 2011a.

Figure B-26 : Evolution de l'activité inhibitrice de protéases trypsiques dans des rangs foliaires d'âges différents.

L'activité à 19 kDa est détectée *via* un zymogramme sur une période de 21 jours et diminue avec l'âge des feuilles (d'après Etienne *et al.*, 2007).



jusqu'à 1% de la quantité de protéines solubles totales dans les jeunes feuilles de colza (Downing *et al.*, 1992; Reviron *et al.*, 1992). Un rôle dans la tolérance à un stress lumineux à long terme, notamment en protégeant les chlorophylles de la dégradation a été démontré pour son homologue WSCP1 chez le chou-fleur (Damaraju *et al.*, 2011). De plus, BnD22 présente le motif spécifique des inhibiteurs de protéases de type Kunitz (Reviron *et al.*, 1992), et son activité inhibitrice de protéases trypsiques chez le colza est désormais avérée (Desclos *et al.*, 2008). Par conséquent, en plus du maintien de la force puits dans les tissus en croissance *via* une protection de l'appareil photosynthétique, les WSCP comme BnD22, pourraient être impliquées dans le contrôle de la sénescence foliaire *via* une activité inhibitrice de SP.

Parmi les SP, 3 familles sont susceptibles d'avoir un rôle dans la sénescence : les subtilisin-like (Sub-L ; famille S8), les protéases caséinolytiques (Clp ; famille S14) et les « degradation of periplasmic proteins » (Deg ; famille S1).

III.II.1. Les subtilisin-like (Sub-L)

Avec 56 Sub-L putatives chez *Arabidopsis*, il s'agit d'une des plus grandes familles de SP. Ces protéases présentent une triade catalytique similaire aux chymotrypsines (histidine, aspartate, serine) (Tripathi and Sowdhamini, 2006) et sont le plus souvent extracellulaires (Schaller *et al.*, 2012), même si une localisation vacuolaire a également été démontrée (Carter *et al.*, 2004).

Implication des Sub-L dans la sénescence développementale et induite

Une Sub-L d'*Arabidopsis* (AtSASP) présente une induction de l'expression de son gène et de son activité (démontrée par zymogrammes bidimensionnels) lors de la sénescence foliaire développementale (Diaz-Mendoza *et al.*, 2014).

De plus, une augmentation de l'expression de Sub-L (*AtSLP2*) dans les feuilles d'*Arabidopsis* est également observée lors d'un traitement par le MeJA, connu pour induire la sénescence (Tableau B-7) (Golldack *et al.*, 2003). Cette famille de SP semble également jouer un rôle majeur dans la protéolyse associée à la sénescence monocarpique du blé (Chauhan *et al.*, 2009). En effet, une accumulation de 2 Sub-L (P1 et P2) est observée lors de la sénescence foliaire provoquée par l'obscurité, avec des pH optimaux respectifs de 8-10 et 10-11 (Roberts *et al.*, 2006). Ce type de Sub-L est d'ailleurs capable de dégrader la Rubisco *in vitro* (Roberts *et al.*, 2003). De plus, malgré le fait que les caspases soient des protéases à cystéine, certaines Sub-L peuvent (i) dégrader les substrats spécifiques des caspases animales et (ii) être inhibées par les inhibiteurs de

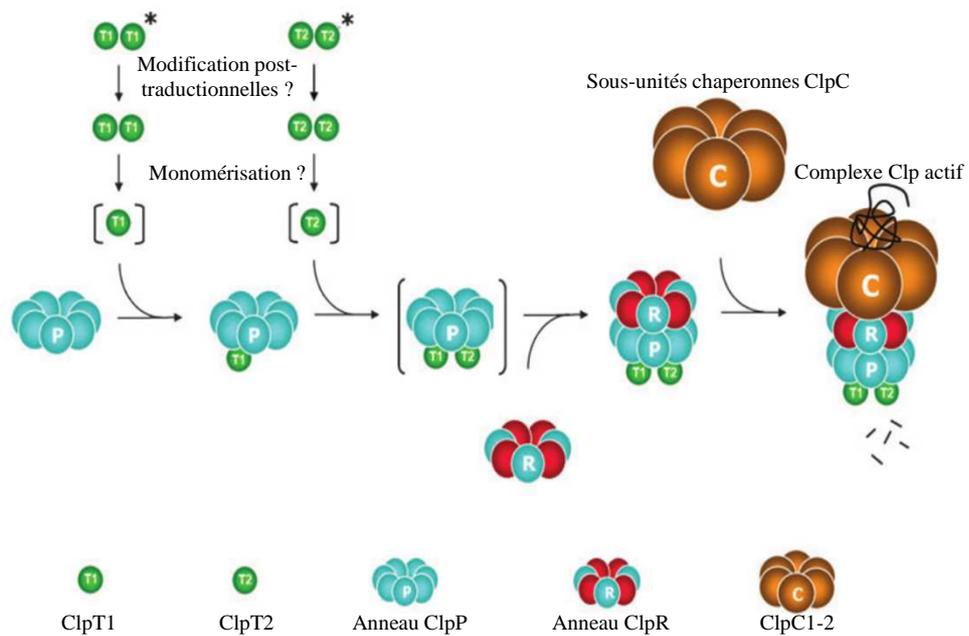


Figure B-27 : Modèle d'assemblage du complexe Clp chez *Arabidopsis*.

ClpT1 se lie en premier à l'anneau ClpP, suivi par ClpT2. Une fois le complexe ClpP/T1/T2 formé, une liaison avec l'anneau ClpR se produit pour donner le complexe catalytique Clp. Enfin, une liaison avec les sous-unités chaperonnes ClpC s'établit pour obtenir un complexe Clp actif (d'après Clarke *et al.*, 2012).

caspases (Woltering, 2004). Par conséquent, les activités caspase-like des cellules végétales, potentiellement impliquées dans la PCD (Sun *et al.*, 1999), sont en partie dues à des Sub-L (Vartapetian *et al.*, 2011) mais cela reste à prouver chez le colza.

Parmi les protéases non homologues des caspases mais présentant une activité caspase-like, il y a les saspases et les phytaspases. Les saspases sont extracellulaires et impliquées de manière probablement indirecte dans la dégradation de la Rubisco lors d'un stress biotique chez l'avoine (Coffeen and Wolpert, 2004; Vartapetian *et al.*, 2011). Les phytaspases, dont les mutants KO chez la tomate ne présentent plus de PCD en réponse à une infection, un stress oxydatif ou osmotique, seraient plus spécifiquement impliquées dans la PCD (Chichkova *et al.*, 2010). Ces Sub-L sont extracellulaires mais leur implication dans la dégradation de protéines intracellulaires, notamment chloroplastidiales, peut s'expliquer par une régulation par compartimentation. En effet, il a été montré que ces protéases extracellulaires sont importées dans la cellule au cours de la PCD (Chichkova *et al.*, 2012; Vartapetian *et al.*, 2011).

III.II.2. Les protéases caséinolytiques (Clp)

Les protéases caséinolytiques (Clp) sont des SP solubles parmi les plus connues, dont le fonctionnement, nécessitant de l'ATP, rappelle celui du protéasome 26S (Clarke, 2012). Elles sont présentes dans les mitochondries (Kwasniak *et al.*, 2012) et les chloroplastes (Clarke, 2012), où 5 Clp ont été localisées expérimentalement (Olinares *et al.*, 2011). Structurellement, les Clp sont des complexes protéiques constitués d'un centre protéolytique composé de 9 sous-unités, dont 5 catalytiques (ClpP) et 4 non catalytiques (ClpR) porteuses de l'activité ATPase et responsables de la reconnaissance et de la dénaturation du substrat (Roberts *et al.*, 2012) (Figure B-27). Leur association est régulée par d'autres Clp (ClpT), dites accessoires (Clarke, 2012). Cinq sous-unités catalytiques (ClpP1, 3-6) (Adam and Clarke, 2002) et 5 sous-unités chaperonnes (ClpC 1-2, ClpB3 et ClpD/ERD1) (Roberts *et al.*, 2012) ont été localisées au sein du chloroplaste (Figure B-21).

Implication des Clp dans la sénescence développementale et induite

En plus d'un rôle crucial pendant les premières phases de la biogenèse et l'homéostasie des chloroplastes (Kato and Sakamoto, 2010; Olinares *et al.*, 2011), un rôle des Clp dans la sénescence est également supposé. En effet, une augmentation de l'expression de gènes codant les sous-unités ERD1, ClpC1, ClpP3 et ClpP5 est observée lors de la sénescence foliaire naturelle

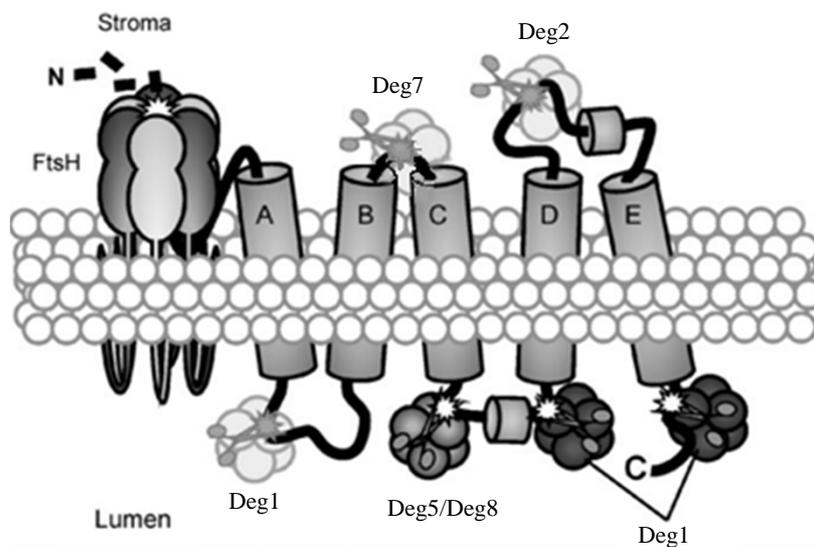


Figure B-28 : Modèle hypothétique de dégradation de la protéine D1 du photosystème II.

Les domaines transmembranaires (A à E) et les extrémités de la protéine D1 sont indiqués. Selon ce modèle, la protéine D1 est clivée côté lumen par les protéases Deg1 et le complexe Deg5/Deg8 et côté stroma par les protéases Deg2 et Deg7, avant d'être complètement dégradée par les métalloprotéases FtsH. Le clivage par des protéases Deg permettrait une dégradation de la protéine D1 plus efficace en cas de forte intensité lumineuse (adapté de Kato et Sakamoto, 2009 et Sun *et al.*, 2010a).

d'*Arabidopsis*, suggérant la formation d'un complexe ClpC, ClpP et ERD1 spécifique pendant la sénescence (Nakabayashi *et al.*, 1999) (Tableau B-7). Cependant, chez *Arabidopsis*, l'accumulation des transcrits d'*ERD1*, *ClpC*, *ClpP3* et *ClpP5* n'est pas suivie par une accumulation de protéines correspondantes (Nakabayashi *et al.*, 1999). En revanche, l'abondance des protéines ClpC augmente lors de la sénescence foliaire chez le pois (Schiltz *et al.*, 2004).

Lors d'une sénescence provoquée par l'obscurité, l'expression des gènes *ERD1* et *ClpC1* augmente également chez *Arabidopsis* (Lin and Wu, 2004; Nakabayashi *et al.*, 1999), aboutissant à une accumulation de la protéine ERD1. Des gènes *Clp* sont également induits lors d'une sénescence provoquée par une carence en N chez le blé (Ruuska *et al.*, 2008). Compte tenu de ces résultats, mais également de la localisation chloroplastidiale des Clp, cette classe de protéases pourrait être impliquée dans le contrôle de la protéolyse chloroplastidiale associée à la sénescence foliaire (Roberts *et al.*, 2012). Des mutants n'exprimant pas la protéase du stroma de type ClpP présentent toujours une dégradation de la Rubisco dans des préparations stromales. Par conséquent, même si leur cible reste inconnue, l'implication des Clp dans la dégradation de la Rubisco de manière directe ou indirecte n'est pas attendue (Desimone *et al.*, 1998).

III.II.3. Les « degradation of periplasmic proteins » (Deg)

Les protéases Deg, également appelés HtrA (« High temperature requirement A »), sont des SP présentant une fonction chaperonne en plus de leur fonction protéolytique, et dont l'action ne nécessite pas d'ATP (Schuhmann and Adamska, 2012). Elles sont au nombre de 16 putatives chez *Arabidopsis* (Garcia-Lorenzo *et al.*, 2006), s'associant en complexes répartis dans plusieurs organites (Figure B-21), dont 5 (Deg1, 2, 5, 7 et 8) sont adressées aux chloroplastes (Schuhmann and Adamska, 2012).

Les Deg sont principalement étudiées pour leur implication dans l'amélioration de l'efficacité de la réparation du PSII en cas de fort éclaircissement, notamment au niveau des premières étapes de dégradation de la protéine D1 (Kato and Sakamoto, 2009), en amont de l'action des métalloprotéases FtsH (Wagner *et al.*, 2012). Le modèle actuel propose que Deg1, 5 et 8 agissent ensemble dans la dégradation de D1, en clivant la protéine côté lumen (Sun *et al.*, 2013), aidées par Deg2 et 7 qui participent en clivant D1 côté stroma (Sun *et al.*, 2010b) (Figure B-28). Deg1 est également impliquée dans la dégradation des protéines CP26 (lhcb5), CP29 (lhcb4), D2 et CP22 (PsbS) du LHCII du PSII lors de photo-inhibition (Zienkiewicz

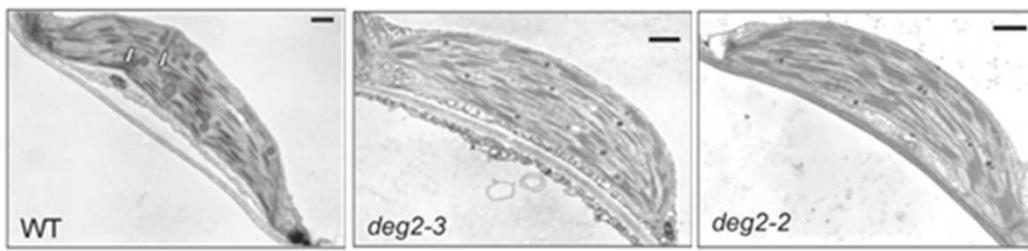


Figure B-29 : Ultrastructures des chloroplastes de feuilles d'*Arabidopsis* de type sauvage (WT) ou mutants n'exprimant plus *Deg2* (*Deg2-3* et *Deg2-2*).

Des ondulations sont clairement visibles dans les thylakoïdes des plantes sauvages mais pas chez les mutants, traduisant un retard d'entrée en sénescence des chloroplastes chez les mutants (Barre = 500 nm, d'après Lucinski *et al.*, 2011a)

Tableau B-8 : Métalloprotéases (MP) dont l'expression du gène, la quantité de protéines ou l'activité est induite lors de la mort cellulaire programmée (PCD) ou de la sénescence foliaire.

Métalloprotéases	Gène	Protéine	Activité	Type de sénescence/PCD	Organisme	Références
Globales	<i>MP</i>			SDev	<i>H.vulgare</i>	1
			MP	SDev	<i>T.aestivum</i>	2
	<i>MP</i>			SNSC (blessure)	<i>H.vulgare</i>	3
			MP	SNSC (coupe)	<i>B.oleracea</i>	4
MPP		β -MPP		SDev	<i>P.sativum</i>	5
				SNSC (limitation en N)	<i>B.napus</i>	6
		α -MPP		SNSC (limitation en N)	<i>B.napus</i>	6
MMP	<i>MMP</i>			SDev	<i>C.sativus</i>	7
	<i>At1-MMP</i> <i>At3-MMP</i> <i>At4-MMP</i> <i>At5-MMP</i>			SDev	<i>A.thaliana</i>	8
	<i>At2-MMP</i>		At2-MMP (KO)	SNSC (MeJa)	<i>A.thaliana</i>	9
FtsH	<i>FtsH</i>			SDev	<i>A.thaliana</i>	10
			FtsH	SDev	<i>P.sativum</i>	5
			FtsH2 FtsH5 FtsH8	SNSC (MeJa)	<i>A.thaliana</i>	11
		FtsH FtsH8		SNSC (limitation en N)	<i>B.napus</i>	6

MP : Métalloprotéases non identifiées SNCS : sénescence ; SDev : sénescence développementale ; KO : implication démontrée par mutant Knock-Out ; MeJa : traitement au jasmonate de méthyle ; MMP : « Matrix Metalloproteinases » ; MPP : « Mitochondrial Processing Peptidases » ; FtsH : « Filamentation Temperature Sensitive H ». Références : 1 : Jukanti *et al.*, 2008 ; 2 : Chauhan *et al.*, 2009 ; 3 : Parrot *et al.*, 2007 ; 4 : Coupe *et al.*, 2003 ; 5 : Schiltz *et al.*, 2004 ; 6 : Desclos *et al.*, 2009 ; 7 : Delorme *et al.*, 2000 ; 8 : Flinn 2008 ; 9 : Gollmack *et al.*, 2002 ; 10 : Guo *et al.*, 2004 ; 11 : Chen *et al.*, 2011.

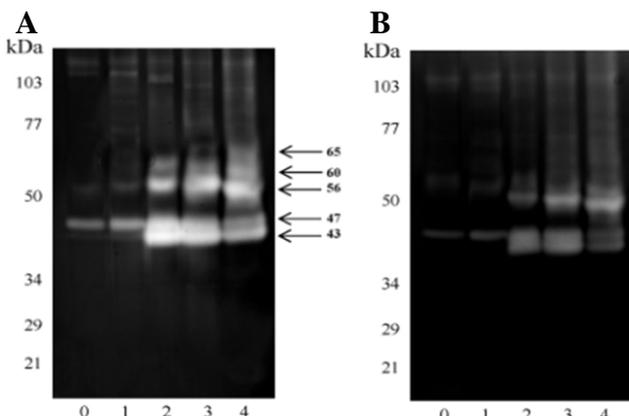


Figure B-30 : Zymogrammes d'extraits protéiques issus de fleur de brocoli après coupe en absence (A) ou présence (B) d'un inhibiteur de métalloprotéases.

La masse moléculaire des bandes d'activités est indiquée à droite du gel en kDa. Les puits 0 à 4 correspondent aux jours après coupe. Une augmentation des activités protéolytiques est observée lors de la sénescence induite par la coupe (43, 47, 56, 60 et 65 kDa) et inhibée partiellement par 20 mM de 1,10-phénanthroline, un inhibiteur de métalloprotéases (d'après Rossano *et al.*, 2011).

et al., 2012). Deg2 est capable de dégrader la protéine lhcb6 du LHCII lors de stress salin, thermique ou encore de stress induit par blessure (Luciński *et al.*, 2011b). Deg5 est supposée dégrader la protéine Pcbf du PSII après une blessure (Luciński *et al.*, 2011a) et Deg7 est capable de dégrader les protéines D2, CP47 et CP43 du PSII (Sun *et al.*, 2010a). Ces protéases seraient par conséquent impliquées dans la maintenance de l'ensemble du PSII.

Implication des Deg dans la sénescence développementale et induite

Du fait de l'implication des Deg dans la dégradation des protéines du LCHII en réponse à différents stress, il n'est donc pas exclu que ces protéases puissent jouer un rôle dans sa dégradation lors de la sénescence développementale. Cette hypothèse est corroborée par une augmentation de l'expression d'une Deg pendant la sénescence foliaire développementale du peuplier (Andersson *et al.*, 2004) et de l'orge (*Deg2*) (Jukanti *et al.*, 2008) (Tableau B-7). Une autre étude chez *Arabidopsis* a montré une diminution de l'expression des gènes codant les protéases Deg chloroplastidiales (*Deg1, 2, 5 et 8*) lors d'une sénescence provoquée par l'obscurité (Lin and Wu, 2004). Ces études transcriptomiques sont contradictoires mais elles peuvent s'expliquer par le fait que l'obscurité diminue les besoins de réparation de l'appareil photosynthétique. Cependant, un retard d'entrée en sénescence des chloroplastes chez les mutants d'*Arabidopsis* n'exprimant plus *Deg2* (Figure B-29) (Luciński *et al.*, 2011b) ou *Deg5* (Luciński *et al.*, 2011a) semble indiquer que certaines protéases Deg jouent un rôle dans l'initiation de la sénescence chloroplastidiale.

III.III. Les métalloprotéases (MP ; EC 3.4.24)

Le génome d'*Arabidopsis* comprend 81 gènes codant des MP (Schaller, 2004). Les MP sont des protéases liées à un ion métallique, le plus souvent du zinc, et sont impliquées dans la nodulation, la différenciation des plastes, la thermotolérance ou encore la méiose (van der Hoorn, 2008).

Lors de la sénescence développementale, une augmentation de l'expression d'un gène codant une MP à zinc a été observée chez l'orge (Jukanti *et al.*, 2008) et une augmentation de l'activité MP a été mise en évidence dans les feuilles lors de la sénescence monocarpique du blé (Chauhan *et al.*, 2009) (Tableau B-8). Une induction d'un gène codant une MP putative est également observée en cas de sénescence induite par blessure chez l'orge (Parrott *et al.*, 2007) et des activités MP ont été mises en évidence sur gel lors de la sénescence du fleuron de brocoli après coupe (Figure B-30) (Rossano *et al.*, 2011). De plus, l'implication des MP dans la dégradation de protéines stromales a été prouvée *in vitro*, notamment chez le pois où une MP dépendante du zinc

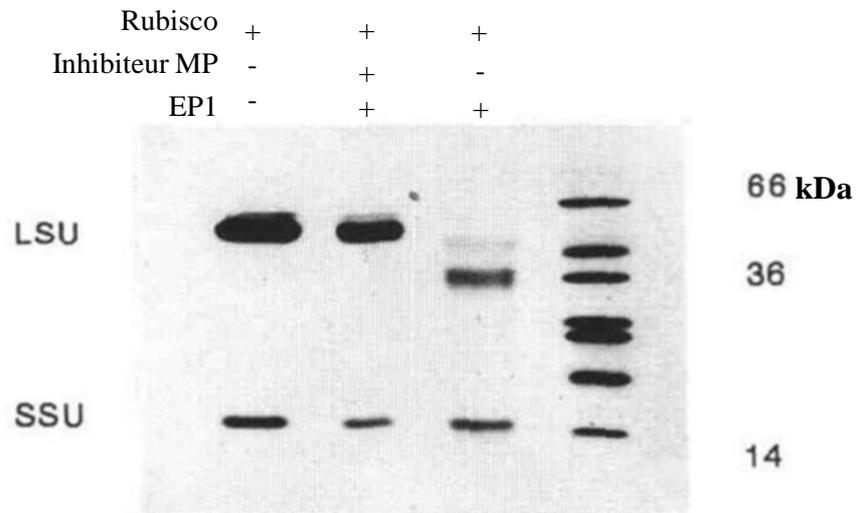


Figure B-31 : Dégradation *in vitro* de la Rubisco par la métalloprotéase EP1.

La Rubisco est incubée 24h à température ambiante avec ou sans EP1 et avec ou sans un inhibiteur de métalloprotéases (1 mM de 1,10-phénanthroline). La bande à 36 kDa correspond à un produit de dégradation de la grande sous-unité de la Rubisco. Cette expérience démontre que la Rubisco est dégradée par la métalloprotéase EP1. LSU et SSU correspondent respectivement à la grande et petite sous-unité de la Rubisco (d'après Brushnell *et al.*, 1993).

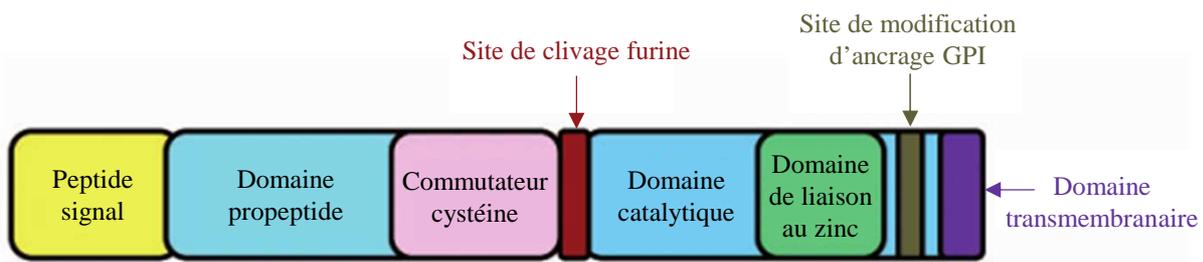


Figure B-32 : Structure des « matrix metalloproteinases » (MMP).

GPI : glycosylphosphatidylinositol (d'après Flynn, 2008).

localisée dans le stroma est capable de cliver la grande sous-unité de la Rubisco (Figure B-31) (Brushnell *et al.*, 1993).

Parmi les MP potentiellement impliquées dans la sénescence, 3 familles ont été mises en évidence : les « mitochondrial processing-peptidases » (MPP ; famille M16), les « matrix metalloproteinase » (MMP ; famille M10), et les « filamentation temperature-sensitive H » (FtsH ; famille M41).

III.III.1. Les « mitochondrial processing-peptidases » (MPP)

Les MPP sont localisées dans la membrane interne de l'enveloppe mitochondriale et sont composées de 2 sous-unités distinctes : α -MPP, responsable de la spécificité du substrat et β -MPP, portant le site de liaison au zinc et l'activité protéolytique. Deux α -MPP et une β -MPP sont présentes chez *Arabidopsis*. Elles interviennent dans la maturation des protéines en clivant la pré-séquence des protéines solubles et membranaires importées dans les mitochondries. Ces protéases ont un rôle important car, chez *Arabidopsis* par exemple, 77% des protéines mitochondriales ont une pré-séquence clivée par des protéases (Kwasniak *et al.*, 2012).

Implication des MPP dans la sénescence développementale et induite

Chez le pois, l'accumulation d'une β -MPP est observée au cours de la remobilisation du N associée à la sénescence foliaire développementale (Schiltz *et al.*, 2004) (Tableau B-8). Une accumulation des sous-unités α - et β -MPP du colza en situation de sénescence foliaire induite ou non par une limitation en nitrate est également observée en début de sénescence (Desclos *et al.*, 2009). En clivant les précurseurs de protéines adressées aux mitochondries (Gakh *et al.*, 2002), l'induction des MPP pourrait faciliter l'importation des protéines dans les mitochondries afin de maintenir la production d'énergie, indispensable au bon déroulement de la sénescence (Quirino *et al.*, 2000).

III.III.2. Les « matrix metalloproteinases » (MMP)

Les MMP sont des MP dont l'activité est extracellulaire, dépendante du zinc et du calcium et nécessitant un pH alcalin. Cinq MMP ont été identifiées dans le génome d'*Arabidopsis* (*At1-MMP* à *At5-MMP*). Leur structure (Figure B-32) suppose une localisation membranaire, mais cela n'a pas été démontré chez les plantes. Des rôles dans l'expansion et le remodelage des cellules pendant la croissance et le développement, dans la défense contre les pathogènes et la nodulation sont suspectés (Flinn, 2008; Marino and Funk, 2012).

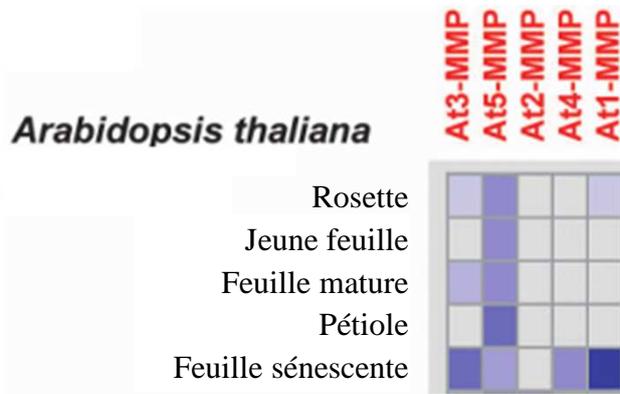


Figure B-33 : Expression des «matrix metalloproteinases» (MMP) d'*Arabidopsis* dans la rosette et des feuilles d'âges différents.

La couleur bleue indique le niveau d'expression: un bleu plus foncé représente une expression plus forte. L'expression de tous les gènes codant les *MMP* d'*Arabidopsis* augmentent dans la feuille sénescence, sauf *At2-MMP* et *At5-MMP* (d'après Flynn, 2008).

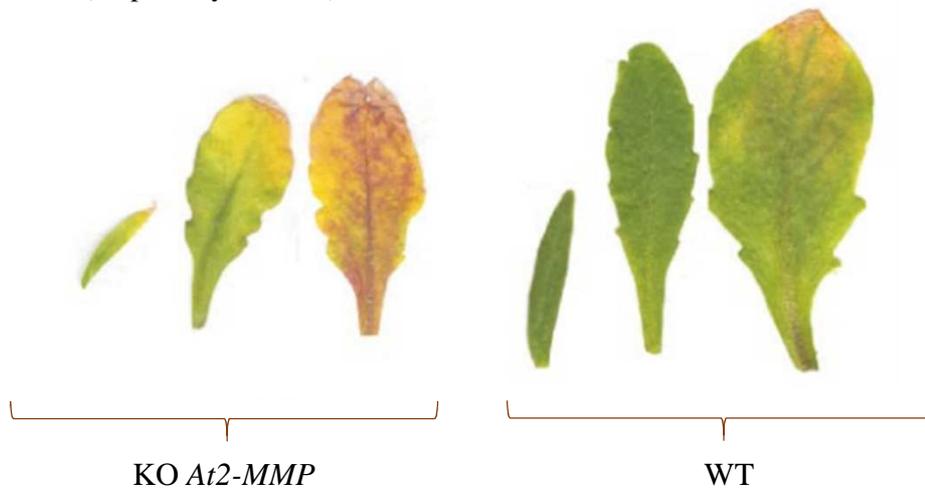


Figure B-34 : Phénotypes des feuilles d'un mutant d'*Arabidopsis* n'exprimant plus *At2-MMP* (KO *At2-MMP*) et de la plante sauvage (WT).

Une sénescence foliaire précoce est observée chez les mutants en comparaison du sauvage (d'après Golldack *et al.*, 2002).

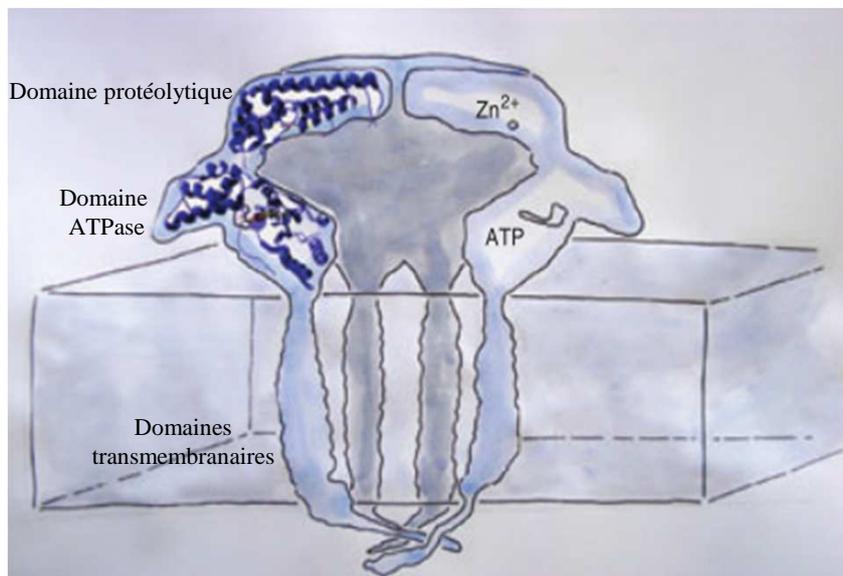


Figure B-35 : Représentation schématique de la structure des protéases « Filamentous temperature-sensitive H » (FtsH). Les protéases FtsH sont composées d'un domaine protéolytique, d'un domaine ATPase et de domaines transmembranaires permettant l'ancrage dans la membrane thylakoïdienne (d'après Wagner *et al.*, 2012).

Implication des MMP dans la sénescence développementale et induite

Les MMP ayant un rôle important dans le contrôle de la PCD des cellules animales, une implication dans le contrôle de la PCD végétale a été proposée (Beers *et al.*, 2000). En effet, chez le concombre, l'expression d'un gène *MMP* augmente tardivement lors de la sénescence développementale, supposant un rôle, non pas dans la remobilisation des nutriments, mais dans la dégradation de la matrice extracellulaire au cours de la PCD (Delorme *et al.*, 2000) (Tableau B-8). L'expression des gènes de la plupart des MMP augmente pendant la sénescence foliaire développementale, notamment chez *Arabidopsis* (Figure B-33) (Flinn, 2008). De plus, l'expression d'une MMP d'*Arabidopsis* (*AtMMP2*) est stimulée en réponse à un traitement au MeJA mais des mutants n'exprimant plus *At2-MMP* montrent une sénescence précoce, démontrant un rôle particulier de cette protéase dans le contrôle de la sénescence (Figure B-34) (Golldack *et al.*, 2002).

III.III.3. Les « filamentation temperature-sensitive H » (FtsH)

Les FtsH sont des protéases membranaires, ATP dépendantes avec un domaine protéolytique possédant une séquence de liaison au zinc (Figure B-35). Douze FtsH codant des formes actives et 5 pour des formes inactives (FtsHi) ont été identifiées dans le génome d'*Arabidopsis* (Wagner *et al.*, 2012). Les FtsH sont localisées dans les mitochondries et les chloroplastes (Figure B-21). Au regard de leur séquence, certaines FtsH, peuvent être groupées par paire et des compensations peuvent se produire entre ces paires : FtsH2/8, FtsH1/5, FtsH7/9 dans les chloroplastes et FtsH3/10 et FtsH11/4 dans les mitochondries. En revanche, les formes chloroplastidiales FtsH12 et 6 n'ont pas de paires connues à ce jour (Wagner *et al.*, 2012).

Leurs substrats peuvent être des protéines membranaires ou solubles, et ces protéases jouent un rôle dans la dégradation des protéines mal conformées et des protéines à courte durée de vie. Des mutants KO pour FtsH2 et 5 montrent un phénotype « panaché », indiquant un rôle important des FtsH dans la formation des chloroplastes (Adam *et al.*, 2005). De plus, les FtsH sont impliquées dans la réparation du PSII *via* la dégradation de la protéine D1, en aval des protéases Deg (Figure B-28) (Adam *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2012). Un rôle dans la thermotolérance est également démontré pour FtsH11, sans déterminer s'il s'agit de la forme mitochondriale ou chloroplastidiale (Chen *et al.*, 2006).

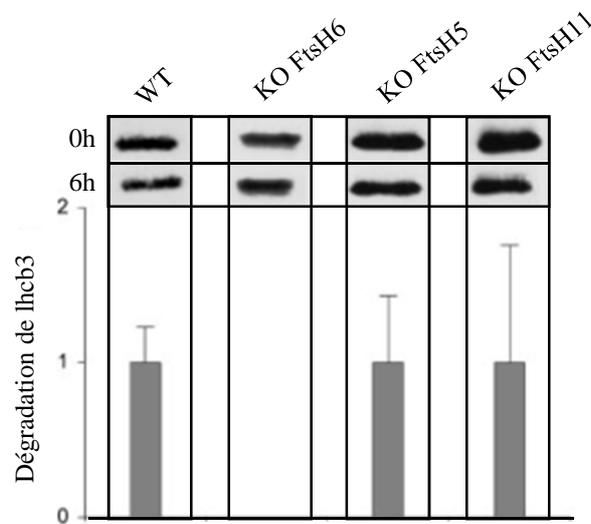


Figure B-36 : Dégradation de lhc3 chez la plante sauvage d'*Arabidopsis* (WT) et des mutants KO de FtsH6, 5 et 11.

La dégradation de lhc3 dans la membrane de thylakoïdes isolés à partir de feuilles sénescents est observée *in vitro* après 6h d'incubation. La dégradation de lhc3 est inhibée seulement chez le mutant n'exprimant plus *FtsH6* (d'après Zelisko *et al.*, 2005).

Implication des FtsH dans la sénescence développementale et induite

Tout comme les protéases à sérine Deg, les FtsH sont impliquées dans la dégradation du LHCII lors de stress lumineux et il n'est pas exclu qu'elles dégradent ce complexe protéique lors de la sénescence. En effet, l'expression d'un gène codant une FtsH est induite lors de la sénescence développementale foliaire d'*Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2004) mais, à l'inverse, l'expression de 2 gènes *FtsH* est diminuée lors de la sénescence foliaire induite par l'obscurité (Lin and Wu, 2004). Au niveau protéomique, une FtsH est également accumulée pendant la remobilisation du N associée à la sénescence foliaire développementale chez le pois (Schiltz *et al.*, 2004) (Tableau B-8). Ces résultats en apparence contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que (i) la sénescence soit induite ou développementale, (ii) l'obscurité diminue les besoins de réparation de l'appareil photosynthétique et (iii) les isoformes de FtsH présentent des fonctions différentes.

L'application de MeJa, induisant la sénescence, provoque l'accumulation des protéines FtsH2, 5 et 8 dans les feuilles d'*Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2011). Chez le colza, de 2 protéases FtsH chloroplastidiales (dont FtsH8) sont accumulées au cours des premières étapes de la sénescence foliaire induite par une limitation/privation en nitrate (Desclos *et al.*, 2009). Les FtsH auraient également un rôle dans la réaction hypersensible en réponse à une attaque par un agent pathogène chez le tabac, où la diminution des FtsH empêcherait une réparation efficace du PSII, inhibant la photosynthèse et conduisant à la PCD (Adam and Clarke, 2002). De plus, des mutants KO du gène *FtsH6* chez *Arabidopsis* démontrent *in vitro* l'implication de cette FtsH dans la dégradation des composantes Lhcb1 et 3 du PSII lors d'une sénescence induite par l'obscurité ou lors d'un stress lumineux (Figure B-36) (Zelisko *et al.*, 2005). Cependant, une autre expérimentation, utilisant un plus grand nombre de mutants KO de *FtsH6* contredit ce résultat et conclut que FtsH6 n'est pas une protéase clé de la dégradation du LHCII (Wagner *et al.*, 2011), mais un mécanisme de compensation entre les différentes FtsH n'est pas à exclure. Peu de résultats mettent en avant une accumulation des FtsH mais la protéolyse des chloroplastes semble liée à la quantité de protéases comme à la sensibilité du substrat à la dégradation (Hörtensteiner and Feller, 2002; Zelisko *et al.*, 2005).

III.IV. Les protéases à aspartate (AP ; EC 3.4.23)

Les AP contiennent 2 molécules d'aspartate dans leur site actif et seulement 3 familles existent chez les plantes. Avec 158 gènes AP identifiés dans le génome

Tableau B-9 : Protéases à aspartate (AP) dont l'expression du gène, la quantité de protéines ou l'activité est induite lors de la mort cellulaire programmée (PCD) ou de la sénescence foliaire.

Protéases à aspartate (AP)	Gène	Protéine	Activité	Type de sénescence/PCD	Organisme	Références
Globales	<i>AP</i>			SDev	<i>A.thaliana</i>	1, 2
	<i>AP</i>			SDev	<i>O.sativa</i>	3, 4
	<i>LSC760</i>			SDev	<i>B.napus</i>	5
		AP (GI : 1326165)		SNSC (limitation en N)	<i>B.napus</i>	6
			AP	SNSC (coupe)	<i>B.oleracea</i>	7
Phytpsines	<i>Phytpsine</i>			SDev	<i>T.aestivum</i>	8
	<i>Phytpsine</i>			SNSC (MeJa)	<i>S.lycopersicum</i>	9
			CND41 (KO / over)	SDev	<i>N.tabacum</i>	10, 11
		CND41		SNSC (limitation en N)	<i>A.thaliana</i>	12

AP : protéases à aspartate non identifiées ; SNCS : sénescence ; SDev : sénescence développementale ; KO : implication démontrée par mutant Knock-Out ; over : implication démontrée par surexpression ; MeJa : traitement au jasmonate de méthyle. Références : 1 : Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005 ; 2 : Guo *et al.*, 2004 ; 3 : Lee *et al.*, 2001 ; 4 : Liu *et al.*, 2008 ; 5 : Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997 ; 6 : Desclos *et al.*, 2009 ; 7 : Wang *et al.*, 2004 ; 8 : Gregersen et Holm, 2007 ; 9 : Beers *et al.*, 2000 ; 10 : Kato *et al.*, 2004 ; 11 : Kato *et al.*, 2005 ; 12 : Diaz *et al.*, 2008.

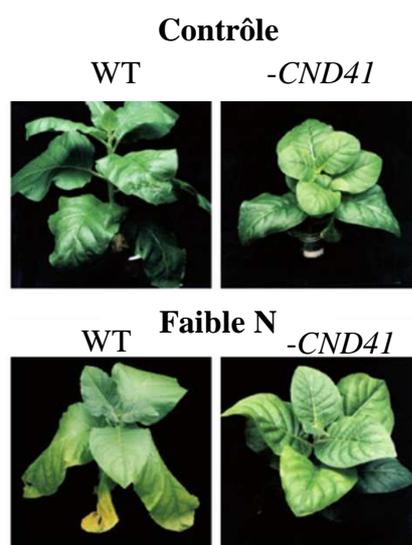


Figure B-37 : Phénotypes des mutants anti-sens de la protéase à aspartate CND41 (-*CND41*) et des plantes sauvages (WT) de tabac bien alimentés (Contrôle) ou limités en N (Faible N).

La sénescence foliaire est retardée chez les mutants anti-sens (-*CND41*) en situation d'azote limitant (d'après Kato *et al.*, 2004).

d'*Arabidopsis* (Schaller, 2004), elles représentent la 2^e plus grande classe de protéases après les SP (van der Hoorn, 2008). Les AP peuvent être extracellulaires, vacuolaires ou plastidiales (Figure B-21), et ont des rôles supposés dans la défense contre les pathogènes, la gamétogenèse, l'embryogenèse, la dégradation des protéines de réserves des graines, la croissance et le développement cellulaire (Beers *et al.*, 2000; Tan-Wilson and Wilson, 2012; van der Hoorn, 2008).

Une induction de l'expression des gènes codant des AP est observée lors de la sénescence foliaire développementale d'*Arabidopsis* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2004) et du colza (LSC760) (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997) (Tableau B-9). Au niveau protéomique, une AP (GI: 1326165) est accumulée et maintenue à un niveau élevé tout au long de la sénescence foliaire chez le colza limité ou privé en nitrate (Desclos *et al.*, 2009), et encore présente à un niveau relativement élevé dans les feuilles mortes (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014). De plus, une activité AP a été mise en évidence dans les fleurs de brocoli au cours de la sénescence après coupe *via* l'utilisation d'un inhibiteur chimique (la pepstatine A) (Wang *et al.*, 2004).

La famille des phytepsines (famille A1) semble jouer un rôle prépondérant dans la sénescence foliaire. Les phytepsines sont synthétisées sous la forme d'un pro-peptide inactif et localisées majoritairement dans les vacuoles des cellules foliaires. Elles ont un rôle dans la défense, l'interaction pollen/pistil et la dégradation des protéines de stockage des graines (Beers *et al.*, 2000; Schaller, 2004).

Implication des phytepsines dans la sénescence développementale et induite

Une augmentation des transcrits d'un gène codant une phytepsine est observée lors de la sénescence développementale du blé (Gregersen and Holm, 2007) et d'une sénescence induite par une blessure ou un traitement au MeJa chez la tomate (Beers *et al.*, 2000) (Tableau B-9).

Parmi les phytepsines, un intérêt particulier a été porté sur la protéase CND41 (« Chloroplast Nucleoid DNA binding protein 41 »). D'abord identifiée chez le tabac, cette protéase présente une double activité : protéolyse et liaison à l'ADN. Son activité est optimale à pH acide, ne nécessite pas d'ATP, et un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes est supposé *via* son activité de liaison à l'ADN (Beers *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2000). La protéase CND41 du tabac est capable de dégrader *in vitro* la Rubisco dénaturée, à un pH physiologique de 7,5. Par ailleurs, un mutant n'exprimant plus CND41 présente un retard de sénescence en cas de limitation en N (Figure B-37) et un défaut de remobilisation de l'azote des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles du tabac,

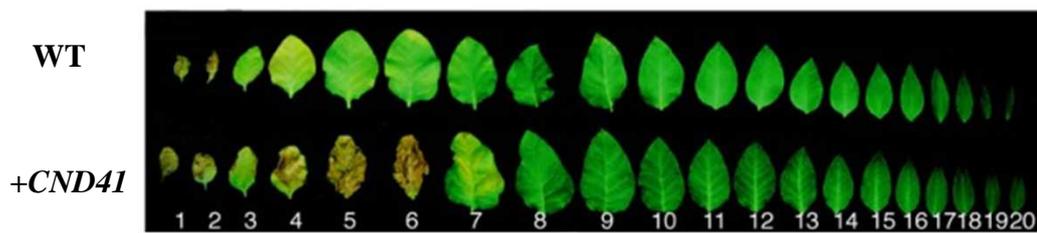


Figure B-38 : Feuilles des transformants sur-exprimant CND41 (+CND41) et des plantes sauvages (WT) du tabac.

Les plantes (mutant et sauvage) sont cultivées en situation d'azote limitant et de lumière continue pour induire fortement la sénescence foliaire. Dans les 2 cas, les feuilles sont de même dimension mais, les transformants surexprimant CND41 montrent une sénescence foliaire accélérée par rapport à la plante sauvage (6 rangs foliaires sénescents chez les transformants contre 2 pour le type sauvage) (d'après Kato *et al.*, 2005).

Figure B-39 : Exemple de structure des sous-unités α et β du protéasome 20S.

Le protéasome 26S est un complexe protéolytique composé d'une partie catalytique 20S et d'une partie régulatrice 19S. La partie catalytique 20S est présentée dans ce schéma. Le protéasome 20S est un assemblage de sous-unités α et β formant un cylindre. Les sous-unités portant les activités protéolytiques sont entourées en bleues. Les activités protéolytiques sont : chymotrypsine-like (sous-unité $\beta 5$), trypsine-like (sous-unité $\beta 2$) et peptidyl glutamyl-peptide hydrolase (sous-unité $\beta 1$) (d'après Jung *et al.*, 2009).

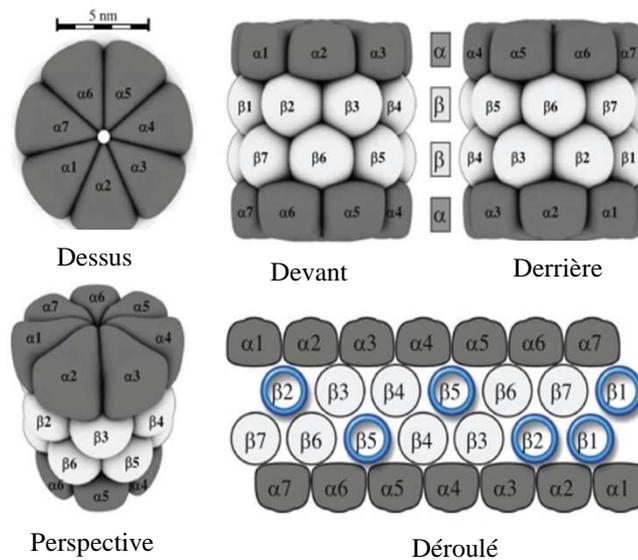
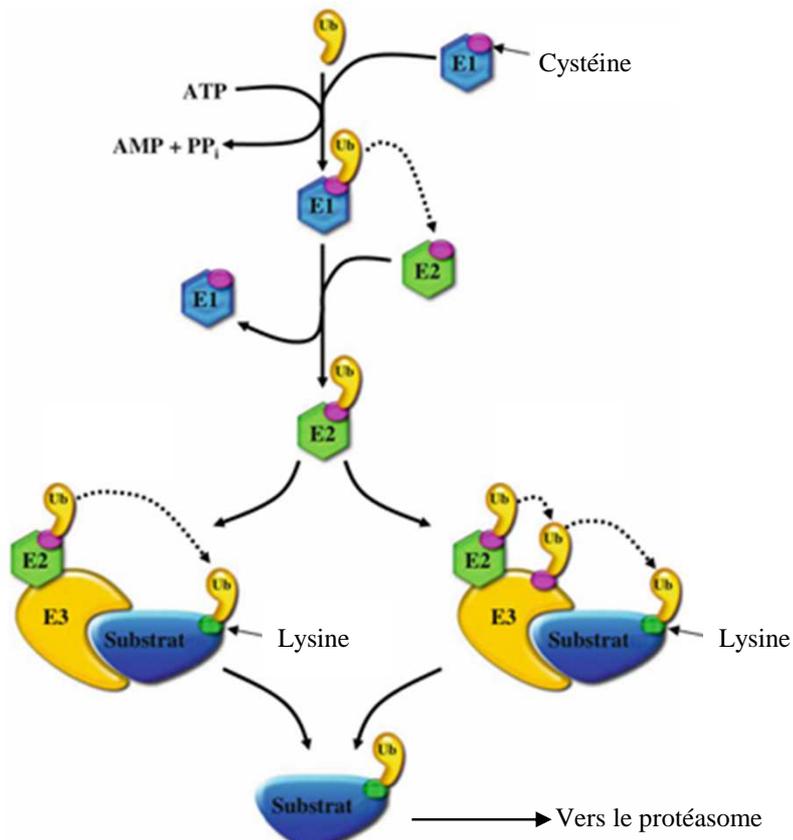


Figure B-40 : Ubiquitination (Ub) des protéines cibles par les ligases E1, E2 et E3.

L'enzyme E1 utilise de l'ATP pour activer l'ubiquitine. L'ubiquitine activée est transférée sur E2, l'enzyme de liaison de l'ubiquitine. L'enzyme E3, responsable de la spécificité de l'ubiquitination, se lie au substrat (protéine cible à dégrader). L'ubiquitine fixée sur l'enzyme E2 est transférée sur la protéine cible de 2 manières différentes. La liaison entre l'ubiquitine et la protéine cible se fait sur une lysine. Cette ubiquitination peut se répéter autant de fois que nécessaire et la protéine cible ainsi marquée est adressée au protéasome (d'après Jung *et al.*, 2009).



démontrant ainsi clairement son rôle crucial dans la remobilisation de l'azote associée à la sénescence. Son rôle dans le contrôle de la sénescence est entériné par le fait que les transformants de tabac sur-exprimant CND41 présentent une sénescence précoce (Figure B-38) (Kato *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2005)

Chez *Arabidopsis*, 2 homologues de CND41 ont été identifiés (Kato and Sakamoto, 2010) et une corrélation entre la quantité de protéases CND41 putative et la sénescence est observée chez 5 lignées recombinantes d'*Arabidopsis* présentant des niveaux de sénescence contrastés en condition de faible apport en N. De plus, dans ces lignées, la diminution de la quantité de Rubisco se produit juste après cette accumulation de CND41 (Diaz *et al.*, 2008).

III.V. Les protéases à thréonine : le protéasome (TP; 3.4.25)

Le protéasome 26S, est un complexe protéolytique constitué d'une partie catalytique 20S composée de 4 anneaux de 7 sous-unités α et β (Figure B-39) qui réalise la protéolyse, et d'une partie régulatrice 19S, porteuse de l'activité ATPase, qui déplie et oriente la protéine cible vers le corps catalytique 20S (Jung *et al.*, 2009). Ce complexe présente 3 activités protéolytiques : chymotrypsine-like (sous-unité $\beta 5$), trypsine-like (sous-unité $\beta 2$) et peptidyl glutamyl-peptide hydrolase (sous-unité $\beta 1$) (Smalle and Vierstra, 2004). Chez *Arabidopsis*, lors d'une exposition au cadmium, il est supposé que les protéines oxydées sont dégradées en peptides par le protéasome 20S, peptides qui sont ensuite dégradés en acides aminés par des peptidases dédiées (leucine aminopeptidase, tripeptidylpeptidase II et thimet oligopeptidase) (Polge *et al.*, 2009). Ce mode de dégradation en 2 étapes basé sur le modèle animal reste à prouver mais il pourrait bien s'étendre à la dégradation des protéines dans d'autres circonstances que l'exposition au cadmium.

Dans la majorité des cas, la protéolyse se fait *via* une ubiquitination réversible des protéines cibles (Kurepa and Smalle, 2008; Smalle and Vierstra, 2004). Cette ubiquitination consiste en la liaison d'une ou plusieurs ubiquitine(s) (Ub) à la protéine cible grâce à 3 types d'enzymes : E1 (enzyme d'activation de l'Ub), E2 (enzyme de liaison de l'Ub) et E3 (ligase) (Figure B-40). Chaque ligase E3 est responsable de la spécificité du complexe *via* l'ubiquitination de seulement quelques protéines cibles, résultant en un grand nombre de gènes codant des E3 chez *Arabidopsis* (plus de 1300) (Smalle and Vierstra, 2004).

Le protéasome étant localisé dans le noyau et le cytosol (Beers *et al.*, 2000), ses cibles sont majoritairement des protéines du cytosol, du noyau, de la membrane et du

Tableau B-10 : Protéase à thréonine (TP) dont l'expression du gène, la quantité de protéines ou l'activité est induite lors de la mort cellulaire programmée (PCD) ou de la sénescence foliaire.

Protéase à thréonine (TP)	Gène	Protéine	Activité	Type de sénescence/PCD	Organisme	Références
Protéasome	<i>UPS</i>			SDev SNSC (obscurité)	<i>A.thaliana</i>	1, 2, 3
	<i>Gènes du protéasome 26S</i>			SDev	<i>A.thaliana</i>	4
	<i>UPS</i>			SDev	<i>H.vulgare</i>	5
	<i>SEN3</i>			SDev SNSC (détachement, obscurité, hormone)	<i>A.thaliana</i>	6
	<i>α pab1</i> <i>AI</i>			SNSC (MeJa)	<i>A.thaliana</i>	7
			<i>β1</i>		SNSC (privation en N)	<i>B.napus</i>

UPS : gènes du « ubiquitine 26S-proteasome pathway » ; SU : sous-unité ; SNSC : sénescence ; SDev : sénescence développementale ; MeJa : traitement au jasmonate de méthyle. Références : 1 : Gepstein *et al.*, 2003 ; 2 : Guo *et al.*, 2004 ; 3 : Lin et Wu, 2004 ; 4 : Kurepa et Smalle 2008 ; 5 : Hollman *et al.*, 2014 ; 6 : Park *et al.*, 1998 ; 7 : Chen *et al.*, 2011 ; 8 : Desclos *et al.*, 2009.

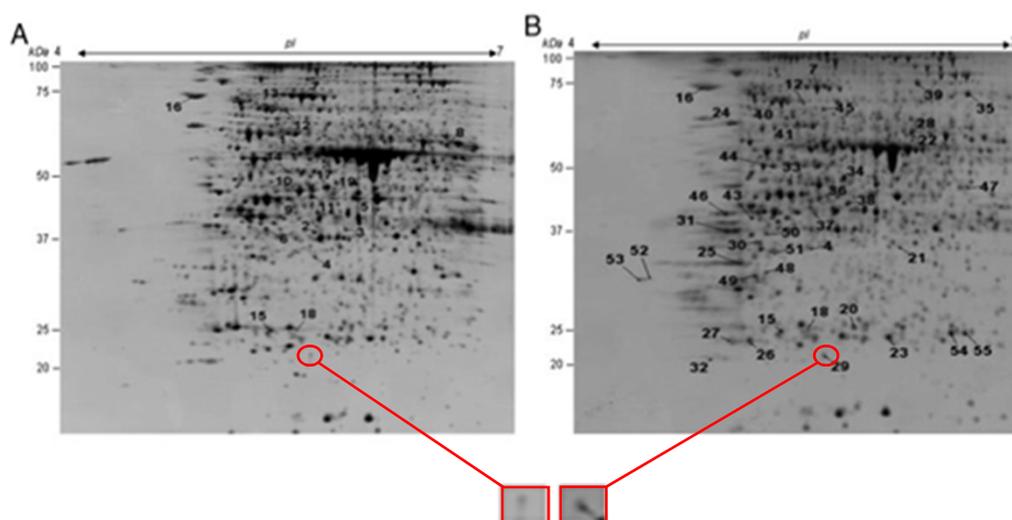


Figure B-41 : Protéomes d'une feuille sénescente de colza bien alimenté (A) ou privé en N (B).

Le spot 29 (entouré en rouge) augmente lors de la privation en azote et correspond à la sous-unité catalytique $\beta 1$ du protéasome 20S (d'après Desclos *et al.*, 2009).

réticulum endoplasmique (Smalle and Vierstra, 2004). Cependant, le champ d'action du protéasome s'étend probablement à d'autres organites. En effet, une ligase E3 chloroplastidiale a un rôle dans l'évolution et la biogénèse des chloroplastes (Ling *et al.*, 2012).

Au sein du génome d'*Arabidopsis*, un grand nombre de gènes codent des sous-unités du protéasome (Kurepa and Smalle, 2008), mais en prenant en compte tous les gènes impliqués dans l'ensemble du « Ubiquitine 26S-Proteasome System » (UPS), plus de 5 % (1400 gènes) du génome d'*Arabidopsis* est impliqué, supposant une grande importance du protéasome (Schaller, 2004; Smalle and Vierstra, 2004). En effet, de nombreuses cibles sont supposées chez *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2013) et le protéasome intervient dans la mitose, la glycolyse, la régulation hormonale (dont les hormones de la sénescence), le développement des feuilles et fleurs ainsi que la réponse à différents stress biotiques et abiotiques (Smalle and Vierstra, 2004).

Implication de l'UPS dans la sénescence développementale et induite

Lors de la sénescence développementale, une augmentation de l'expression de gènes codant l'UPS est observée chez *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2004), notamment quelques gènes codant les sous-unités α et β (Tableau B-10) (Kurepa and Smalle, 2008).

Chez *Arabidopsis*, une induction de la transcription d'un gène de poly-ubiquitine (SEN3) a été observée lors de la sénescence développementale foliaire, mais également induite par détachement, obscurité, traitement hormonal (éthylène, ABA et MeJa), mettant en avant l'implication de l'ubiquitination dans la protéolyse associée à la sénescence dans des conditions variées (Park *et al.*, 1998). De plus, chez *Arabidopsis*, une sénescence provoquée par l'obscurité conduit à l'augmentation de l'expression de gènes de l'UPS (Lin and Wu, 2004) et un traitement au MeJa provoque l'accumulation de transcrits des sous-unités $\alpha 2$ (pab1) et A1 (Chen *et al.*, 2011). Chez le colza, la sous-unité protéolytique $\beta 1$ s'accumule au niveau protéique à la fin de la sénescence foliaire induite par une limitation/privation en nitrate (Figure B-41) (Desclos *et al.*, 2009).

Les protéines carbonylées s'accumulent durant la sénescence et le protéasome est capable de les dégrader, notamment dans des feuilles détachées d'*Arabidopsis* soumis à un stress oxydatif (Jain *et al.*, 2008). De plus, des mutants n'exprimant plus *ORE9*, impliqué dans l'ubiquitination, ont une sénescence retardée, qu'elle soit développementale ou induite par des hormones (Woo *et al.*, 2001). Cependant, des mutants de tabac n'exprimant plus la sous-unité $\alpha 6$ et un gène du complexe 19S montrent une sénescence précoce (Kim *et*

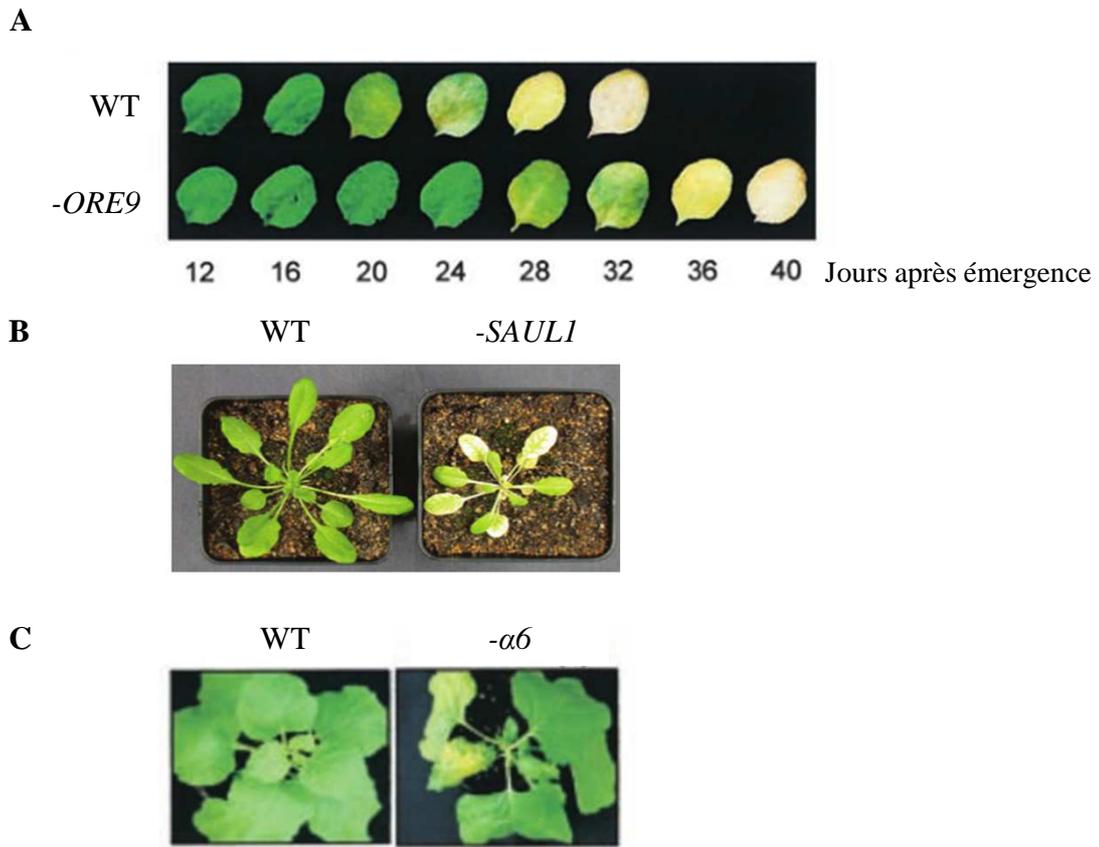


Figure B-42 : Phénotypes des souches sauvages (WT) et des transformants d'*Arabidopsis* n'exprimant plus *ORE9* (-*ORE9* ; A), la ligase E3 *SAUL1* (-*SAUL1* ; B) et du tabac n'exprimant plus la sous-unité $\alpha 6$ du protéasome 20S (- $\alpha 6$; C).

L'absence de protéine *ORE9* (impliquée dans l'ubiquitination) retarde la sénescence et l'absence de *SAUL1* (ligase E3) ou de la sous-unité $\alpha 6$ induit l'entrée en sénescence (d'après Woo *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2003 et Raab *et al.*, 2009).

al., 2003). Il en est de même chez des transformants d'*Arabidopsis* n'exprimant plus une ligase E3 impliquée dans l'adressage de protéines au protéasome (SAUL1) (Raab *et al.*, 2009). Ces résultats contradictoires, illustrés en Figure B-42, montrent que le protéasome intervient dans la régulation de la sénescence, mais que son rôle précis peut varier, potentiellement en fonction du type de cellule (Kurepa and Smalle, 2008). De plus, la sous-unité catalytique $\beta 1$ du protéasome présente une activité caspase-3-like (Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011) et, étant donné que les activités caspase-like des cellules végétales semblent fortement impliquées dans la sénescence (cf. §B.III.1.1.), la sous-unité $\beta 1$ du protéasome pourrait avoir un rôle important dans la sénescence.

Chez le tabac, il a été montré qu'en réponse à une attaque de pathogène, la sous-unité protéolytique $\beta 1$ est induite. L'utilisation de lignées surexprimant $\beta 1$ a permis de montrer que l'induction de cette sous-unité régulait négativement l'activité d'une NADPH oxydase responsable de la production de ROS (Lequeu *et al.*, 2005). Une accumulation de ROS se produisant lors de la sénescence, le protéasome pourrait avoir, entre autres, un rôle dans la régulation de la sénescence *via* la régulation des ROS. Le protéasome interviendrait donc préférentiellement dans la régulation de l'initiation de la sénescence (*via* la régulation des hormones, des ROS et de facteurs de transcription) plutôt que dans la remobilisation des nutriments en elle-même (Avila-Ospina *et al.*, 2014; Gregersen, 2011).

III.VI. Les exopeptidases (ExoP)

En plus des différentes endoprotéases détaillées ci-dessus, il existe les exopeptidases (ExoP) dont la mise en évidence lors de la sénescence développementale ou induite est récente. Ces dernières sont classées en 2 sous-catégories selon qu'elles dégradent les peptides par l'extrémité C-ter (carboxypeptidase) ou N-ter (aminopeptidase). Les ExoP ont un rôle entre autres dans la mobilisation des réserves de la graine (Tan-Wilson and Wilson, 2012), la défense, le transport vers la membrane et la méiose (Matsui *et al.*, 2006).

Une induction de gènes codant des carboxypeptidases est observée lors de la sénescence foliaire développementale du blé (Gregersen and Holm, 2007) et d'*Arabidopsis* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Une induction de gènes codant des aminopeptidases est également observée lors de la sénescence développementale du blé (Gregersen, 2011). Par ailleurs, des mutants d'*Arabidopsis* n'exprimant plus l'aminopeptidase LAP2 montrent une plus grande sensibilité aux stress et une sénescence accélérée (Waditee-Sirisattha *et al.*, 2011). Les aminopeptidases sont

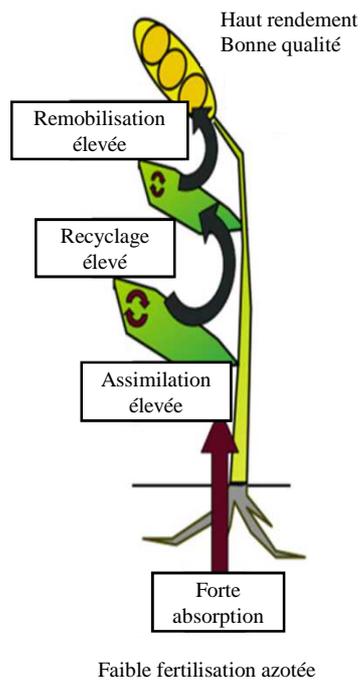


Figure B-43 : Représentation schématique d'un idéotype d'*Arabidopsis* adapté à un faible apport en N.

Cette représentation illustre qu'une adaptation à un faible apport d'intrants azotés nécessite : (i) une bonne absorption, (ii) une assimilation de l'azote absorbé efficace et (iii) des processus efficaces de recyclage/remobilisation des composés azotés des vieilles feuilles vers les feuilles en croissance, puis vers les graines (d'après Chardon *et al.*, 2012).

supposées participer à la dégradation complète des protéines du stroma, notamment lors de la sénescence (Hörtensteiner and Feller, 2002). Leurs rôles dans la sénescence restent à définir clairement mais leur faible mise en évidence lors des vastes études transcriptomiques et protéomiques de la sénescence effectuées à l'aveugle suggère que les exopeptidases jouent un rôle probablement moins conséquent que les endoprotéases.

IV. Bilan des connaissances et problématiques de recherche

La synthèse bibliographique met en avant une expansion mondiale de la culture de colza au cours de ces 20 dernières années. Toutefois, les besoins importants en intrants N (160-250 kg.ha⁻¹) et la faible efficacité d'usage de l'azote (EUA) du colza (seul 50% de cet engrais est utilisé pour le remplissage des graines) sont à l'origine de problèmes économiques et environnementaux. Cette faible EUA du colza est en partie liée à une chute de feuilles riches en azote au stade végétatif (jusqu'à 3,5% de la matière sèche) due à une mauvaise remobilisation de l'azote des feuilles âgées avant leur abscission (faible ERA). Cet azote perdu au cours de la saison automno-hivernal ne sera réabsorbé au printemps qu'à hauteur de 30% (après minéralisation par les bactéries du sol) (Dejoux *et al.*, 2000), il ne contribuera donc que faiblement à la reprise de croissance au printemps et au développement des graines. De plus, si les apports d'engrais au printemps ne sont pas ajustés aux besoins de croissance ou aux objectifs de rendement, les risques de surcoût économique et de pollution par lessivage et/ou émissions de GES sont accrus.

L'apport d'engrais azotés doit donc être diminué pour permettre de réduire les coûts économiques et environnementaux de la culture de colza. Des méthodes d'ajustement des intrants azotés ont été développées ces dernières années, permettant de raisonner la fertilisation azotée (Réglotte Azote, mesures de réflectance, transmittance etc.). Cependant, la culture de génotypes de colza à forte EUA capables (i) d'absorber efficacement l'azote, (ii) de l'assimiler en grande partie et (iii) de le recycler/remobiliser efficacement de ses vieilles feuilles vers les feuilles en croissance et/ou les graines, permettrait de réduire considérablement les pertes d'azote et, par conséquent, de limiter l'apport d'intrants azotés (Figure B-43) (Chardon *et al.*, 2012).

Il existe donc 3 leviers majeurs de l'amélioration de l'EUA, correspondant aux 3 composantes de celle-ci : l'absorption (EAbA), l'assimilation (EAA) et la remobilisation (ERA). La plupart des travaux s'appuyant sur l'exploration de la variabilité génotypique du colza sont réalisés dans des conditions expérimentales avec des méthodes d'investigations qui ne permettent pas d'estimer précisément le poids respectif des composantes de l'EUA. En effet, la plupart des études reposent sur des données qui ne prennent pas en compte le compartiment racinaire ou qui estiment les composantes de l'EUA par de simples bilans entre exportation du N du sol vers les tissus en croissance, mobilisation apparente depuis les

organes sources vers les tissus puits et pertes de N *via* les feuilles chutées. Ces travaux conduisent à sur- ou sous-estimer l'importance de certaines composantes de l'EUA.

Récemment, l'absorption post-floraison a été montrée comme responsable des variations de rendement. Cependant, même avec une absorption post-floraison efficace, la disponibilité en azote du sol sera particulièrement faible dans un contexte de réduction des intrants azotés et dans des conditions environnementales pouvant conduire à des épisodes de sécheresse en fin de cycle de développement. Une amélioration de l'EUtA est par conséquent indispensable pour augmenter/maintenir le rendement du colza avec une disponibilité en azote réduite.

Il existe 2 moyens principaux d'obtenir des variétés à forte EUtA adaptées aux nouvelles contraintes azotées : l'obtention de plantes génétiquement modifiées, qui a montré de bons résultats, essentiellement *via* la surexpression d'enzymes de l'assimilation du N (Good and Beatty, 2011) et la sélection variétale. L'obtention de plantes transgéniques à forte EAA est très utile pour identifier les leviers d'amélioration de l'EUtA du colza, mais leur culture à des fins commerciales est interdite par la loi française. Par conséquent, la sélection variétale s'impose comme le meilleur moyen d'obtenir de futures variétés élites. Différentes études mettent en avant une variabilité génotypique naturelle du colza en conditions de bas intrants azotés. Cette variabilité génotypique constitue une base pour identifier des déterminants physiologiques et moléculaires associés à une forte EUA, qui pourrait fournir par la suite des candidats utiles aux généticiens améliorateurs pour l'identification et la création de variétés plus adaptées aux conditions de bas intrants N.

Parmi les 2 composantes de l'EUtA (assimilation et remobilisation), une amélioration de la remobilisation serait un excellent moyen de réduire les pertes de N par la chute des feuilles et d'avoir plus de N disponible pour le remplissage des graines en fin de cycle, sans ajout supplémentaire d'intrants azotés. Par conséquent, l'étude de l'ERA présente un intérêt majeur. Les feuilles apparaissent comme un organe source crucial tout au long du cycle et l'état de l'art démontre que, contrairement à ce qui est observé au stade rosette, la remobilisation est considérée comme efficace aux stades reproducteurs. Ces résultats suggèrent la possibilité de mécanismes différents mis en jeu entre ces deux phases de développement.

Au sein de la feuille, l'azote est majoritairement stocké sous forme de protéines, et les connaissances actuelles montrent la complexité de la protéolyse associée à la sénescence foliaire, avec l'implication de plusieurs classes de protéases, à la fois vacuolaires, cytosoliques et chloroplastidiales. Chez le colza, l'exportation des produits de protéolyse (acides aminés principalement) semble non limitante et la protéolyse serait le principal facteur limitant la remobilisation. Cependant, peu de données ont été collectées sur les classes de protéases associées à une remobilisation efficace des protéines foliaires chez le colza.

Le premier objectif de ces travaux de thèse a été de déterminer précisément la composante de l'EUA pouvant servir de levier à son amélioration au stade rosette mais également aux stades reproducteurs, via une étude des différences génotypiques naturelles. Pour cela, 2 cultures ont été conduites en 2008 et 2010 dans le cadre du programme ANR-GENOPLANTE GENERGY, l'une portant sur 10 génotypes au stade rosette, et l'autre sur 2 génotypes cultivés sur un cycle complet (jusqu'aux graines mures). Les génotypes ont été choisis par le consortium du programme GENERGY et les travaux ont été réalisés au sein du « work package 2 » (WP2), dont l'un des objectifs était d'identifier les déterminants physiologiques et moléculaires impliqués dans une forte EUA en explorant la variabilité génotypique naturelle. Lors de ces expérimentations, un marquage ^{15}N de type « pulse-chase » a été appliqué, permettant de déterminer avec précision les flux liés à la remobilisation des différents organes et à l'allocation de l'azote absorbé et, ainsi, d'identifier les composantes de l'EUA susceptibles d'être de bon levier d'amélioration de la croissance et/ou du rendement.

Le deuxième objectif a consisté à explorer la variabilité génotypique naturelle de la remobilisation du N foliaire afin d'en déduire les mécanismes potentiellement impliqués dans une forte ERA foliaire. Dans ce contexte, j'ai effectué une étude de la remobilisation du N foliaire au niveau cellulaire afin d'identifier des déterminants physiologiques et protéiques associés à la remobilisation du N. Pour cela, j'ai comparé les mécanismes associés à la remobilisation du N (protéolyse, exportation des acides aminés) au sein d'une feuille mature entrant en sénescence au stade rosette et après la montaison.

L'ensemble de ces travaux conduits au sein de ma thèse ont permis la rédaction de 3 articles :

❖ **Article 1** (Chapitre D.I.I.).

Questions de recherche : Existe-t-il une variabilité génotypique de l'EUA et de l'ERA au stade rosette chez le colza d'hiver ? Si oui, quelle est la composante de l'EUA limitante ?

Objectifs : Cette expérimentation avait pour but de mettre en évidence l'existence d'une variabilité de l'EUA et de l'ERA chez le colza d'hiver au stade rosette et d'estimer le poids de l'ERA, EAbA et EAA dans les variations de l'EUA en réponse à un faible apport de nitrate.

Démarches : Pour remplir cet objectif, l'EUA de 10 génotypes cultivés au stade rosette a été déterminée en réponse à une alimentation limitée ou non en azote. L'EUA a été estimée précisément, non pas en fonction de la biomasse totale comme traditionnellement, mais comme la production de biomasse de jeunes feuilles en fonction de la quantité d'azote absorbé. En parallèle, le marquage ^{15}N de type « pulse-chase » a permis de déterminer une ERA à l'échelle de la feuille. A la suite de ces études, les 10 génotypes ont été classés en

fonction de leur EUA et ERA foliaires et 4 profils présentant des réponses contrastées à une limitation en N ont pu être identifiés. J'ai donc choisi 4 génotypes représentant ces 4 profils pour étudier l'importance de l'absorption, l'assimilation et la remobilisation dans les variations de l'EUA observées. L'ERA foliaire est aussi brièvement étudiée *via* la quantification des protéines solubles et des acides aminés (en point final), afin de confirmer l'importance de la protéolyse pour la remobilisation du N.

Référence de l'article : Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M.-F., Deleu C., Avice J.-C. (2015) Profiling approach of natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* (*JEXBOT/2014/137661*, sous presse).

❖ **Article 2** (Chapitre D.II).

Questions de recherche : Quelles sont les classes de protéases impliquées dans une remobilisation de l'azote efficace au stade rosette ? Les principales protéines dégradées peuvent-elles être représentatives de l'ERA foliaire ?

Objectifs : Identifier des classes de protéases et des protéines cibles impliquées dans une ERA efficace.

Démarche : Les mécanismes de remobilisation de 4 génotypes présentant des profils de réponses contrastées à la limitation en azote et identifiés dans le cadre de l'article 1 ont été étudiés. J'ai approfondi l'étude de la remobilisation du N foliaire initiée dans l'article 1 par une étude cinétique des quantités d'azote, de protéines solubles, d'acides aminés et de protéines cibles majeures de la protéolyse (sous-unités de la Rubisco, protéines du photosystème II D1 et Lhcb3). J'ai ensuite étudié la protéolyse à un point de cinétique pertinent grâce à (i) une nouvelle méthode de quantification des activités protéolytiques (développée durant ma thèse en collaboration avec Marine PORET) avec ou sans inhibiteurs des 5 grandes classes de protéases, (ii) une quantification de l'activité protéolytique sur zymogrammes et séquençage des protéases impliquées et (iii) la quantification des métalloprotéases FtsH, supposées impliquées dans la remobilisation du N.

Référence de l'article : Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Niogret M.-F., Avice J.-C. A comparative study of proteolytic mechanisms during leaf senescence of four genotypes of winter oilseed rape highlighted relevant physiological and molecular traits for NRE improvement. *Soumission prévue à Plant Science en février 2015*.

❖ **Article 3** (Chapitre D.II.).

Questions de recherche : La remobilisation du N est-elle un facteur clé de l'EUA aux stades reproducteurs ? Quels sont les organes les plus importants dans la gestion du N post-floraison ? Quels sont les mécanismes cellulaires impliqués dans la remobilisation foliaire, considérée comme efficace à ces stades de développement ?

Objectifs : Déterminer si la remobilisation est un facteur clé de l'EUA après la montaison et quels sont les organes impliqués dans une remobilisation du N efficace. En parallèle, déterminer les mécanismes cellulaires impliqués dans l'ERA foliaire considérée comme élevée à ces stades de développement.

Démarches : De la même manière qu'au stade rosette, un marquage ^{15}N a été effectué afin de permettre de déterminer avec précision les composantes de l'EUA, notamment l'importance de l'absorption et de la remobilisation pour le rendement en conditions d'azote limitant ou non, et de préciser le poids des différents organes dans la remobilisation du N de la montaison au stade graines matures. De plus, afin de mettre en évidence des mécanismes cellulaires associés à la remobilisation du N foliaire efficace, des mesures cinétiques ont été effectuées sur une feuille entrant en sénescence entre la montaison et la formation des siliques : la quantification des protéines solubles et des acides aminés, l'implication des différentes classes de protéases dans la protéolyse cellulaire *via* l'utilisation de la Rubisco comme substrat, la quantification du niveau de protéines et l'activité de 2 enzymes majeures du métabolisme azoté (glutamine synthétase et glutamate deshydrogénase ; collaboration avec l'équipe de Céline Masclaux-Daubresse, IJPB, INRA).

Référence de l'article : Girondé A., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M.-F., Nesi N., Carole D., Soulay F., Masclaux-Daubresse C. and Avic J.-C. (2015) The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanism of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during the seed filling. *BMC Plant Biology* (acceptée en janvier 2015 ; ID : 1514664601536833).

CHAPITRE C

MATERIELS & METHODES

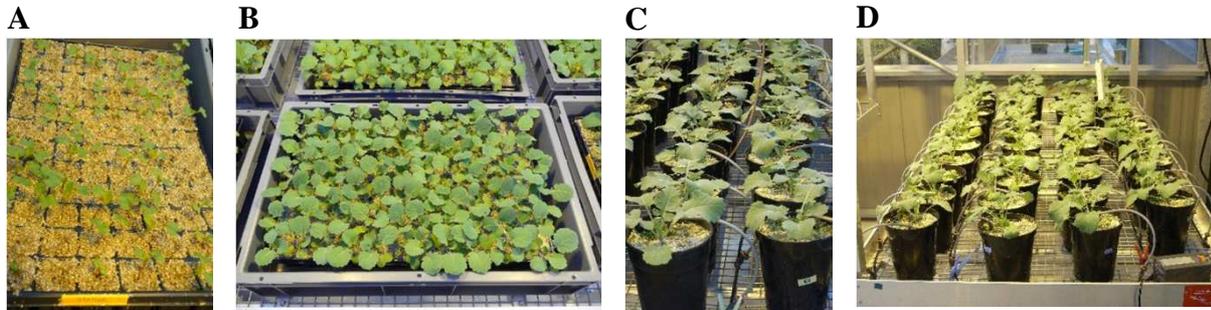


Figure C-1 : Photographies de plantes de la culture « Rosette » réalisée en serre.
 Les photographies ont été prises le 31 mars (repiquage ; A), le 23 avril (stade plantule ; B) et le 25 juin 2008 (après transfert en pot ; C et D).

Tableau C-1 : Composition de la solution Hoagland ¼.

Macroéléments	Concentration (mM)	Microéléments	Concentration (µM)
Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	1,25* ou 0**	H ₃ BO ₃	14
KNO ₃	1,25* ou 0,375**	MnSO ₄	5
KH ₂ PO ₄	0,25	ZnSO ₄	3
MgSO ₄	0,5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,7
EDTA, 2NaFe,3H ₂ O	0,2	CuSO ₄	0,7
		CoCl ₂	0,1

*Pour la solution à 3,75 mM de nitrate (HN)
 **Pour la solution à 0,375 mM de nitrate (LN)

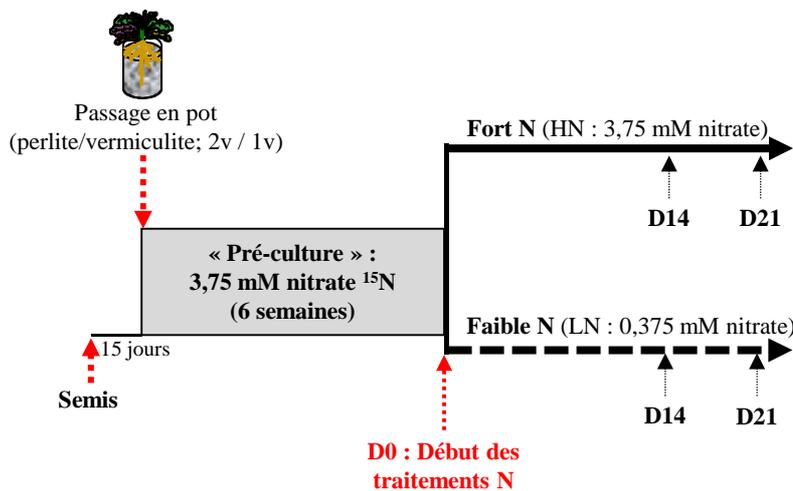


Figure C-2 : Dispositif expérimental mis en place pour la culture « Rosette ».

Dix génotypes ont été cultivés au stade rosette en conditions contrôlées. Après la germination, les plantes sont transférées en pot. Durant la pré-culture, la solution nutritive a été enrichie avec l'isotope ¹⁵N (K-¹⁵NO₃) (période de « pulse » du marquage). Après 6 semaines, les plantes sont séparées en 2 lots : bien alimentées en nitrate (HN ; 3,75 mM de nitrate) ou limitées en nitrate (LN ; 0,375 mM de nitrate). A partir de cette date (D0), l'azote 15 de la solution nutritive est remplacé par de l'azote 14 (période de « chasse »). Les racines, feuilles (limbes et pétioles) et les collets sont récoltés 14 (D14) et 21 jours (D21) après le début des traitements azotés.

CHAPITRE C : MATÉRIELS & MÉTHODES
--

I. Conditions de cultures et dispositifs expérimentaux**I.I. Culture de 10 géotypes de colza au stade rosette en conditions contrôlées (articles 1 et 2) : culture « Rosette »**

Afin de caractériser des géotypes de colza d'hiver présentant des différences d'efficacités d'usage et de remobilisation de l'azote au stade rosette, 10 géotypes de colzas non vernalisés (Aviso, Oase, ES-Astrid, Californium, Lioness, Express, Samouraï, Ténor, Darmor and Montégo) ont été cultivés en serre en 2008 (Figure C-1) et soumis à 2 niveaux d'alimentation nitrique (fort N (HN) : 3,75 mM de nitrate ou faible N (LN) : 0,375 mM de nitrate).

Les graines ont été stérilisées avec de l'éthanol 80 % (v/v; 30 secondes) puis de l'hypochlorite de sodium à 20 % (v/v; 20 minutes). Après 10 rinçages à l'eau ultrapure, les graines ont été mises à germer en alvéole sur vermiculite. Après germination et développement des jeunes plantules (15 jours), celles-ci ont été transférées en pots de 2,5 L (1 plante par pot) contenant un mélange perlite/vermiculite (2v/1v). Les plantes ont été arrosées 2 fois par semaine avec 90 mL de solution Hoagland ¼ (Tableau C-1). La thermopériode était de 20°C/16h (jour) et 15°C/8h (nuit), sous lumière naturelle supplée par des lampes à vapeur de sodium haute pression (MASTER GreenPower T400W, Philips) dispensant un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, « Photosynthetically Active Radiation ») de 400 μmol de photons. $\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ au niveau de la canopée. Pendant cette « pré-culture », la période de pulse du marquage « pulse-chase » a été appliquée. Pour cela, la solution nutritive a été enrichie à l'azote 15 ($\text{K-}^{15}\text{NO}_3$) avec un excès isotopique de 2,5 %. Cette période de marquage a duré 6 semaines (jusqu'à l'apparition de 15 à 16 feuilles vraies) permettant ainsi un marquage homogène de l'ensemble de la plante (Salon *et al.*, 2014).

A la suite de cette période de « pulse », les pots ont été rincés abondamment à l'eau osmosée pour lessiver le nitrate marqué, et du nitrate non marqué a alors été apporté dans la solution Hoagland ¼ (début de la période de « chasse »). A partir de cette date (Day 0 : D0), les plantes ont reçues 90 mL de solution nutritive par jour et ont été séparées en 2 lots : un lot bien alimenté en N (HN : 3,75 mM de nitrate) et un lot limité en N (LN : 0,375 mM de nitrate) avec 3 répétitions biologiques pour chaque traitement et chaque date de récolte. Les plantes ont ainsi été cultivées pendant 21 jours (Figure C-2) au cours desquels les feuilles ont été numérotées par ordre d'apparition, le rang n°1 étant la feuille la plus vieille. Après 14 (D14) et 21 jours (D21) de traitement, les racines, le collet ainsi que les limbes et pétioles de chaque rang foliaire ont été

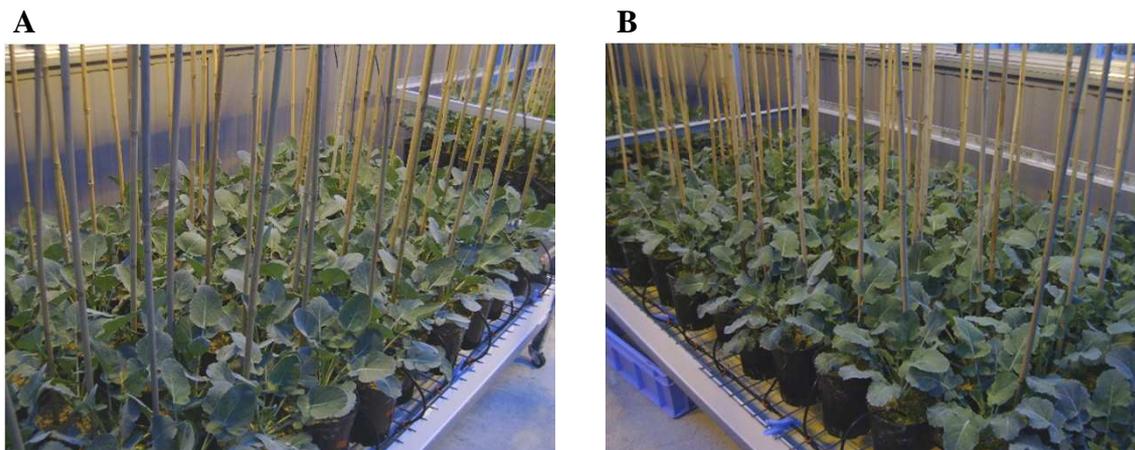


Figure C-3 : Photographies des plantes des géotypes Aviso et Oase de la culture « Graines » réalisée en serre.

Les photographies ont été prises au stade C1 d'Aviso (A) et Oase (B).

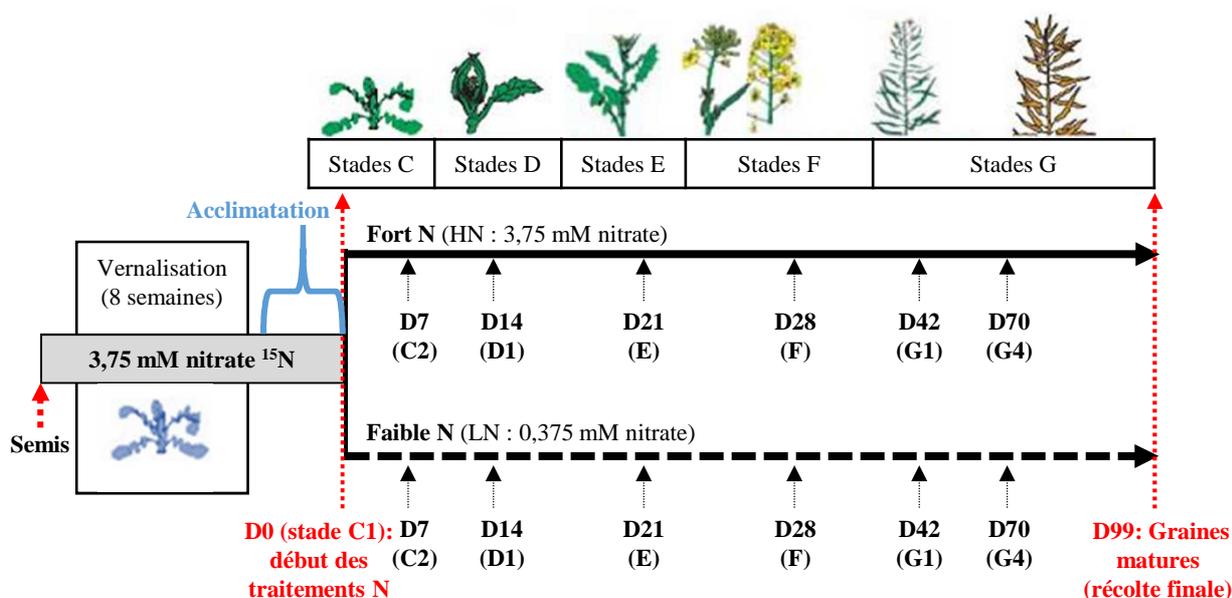


Figure C-4 : Dispositif expérimental de la culture « Graines ».

Pour cette culture, 2 géotypes ont été cultivés jusqu'au stade « graines matures » en conditions contrôlées. Après la germination, les plantes sont transférées en pot puis vernalisées. Du semis à la fin de la période d'acclimatation, la solution nutritive a été enrichie avec du ^{15}N ($\text{K}-^{15}\text{NO}_3$) (période de « pulse » du marquage). Ensuite, les plantes sont séparées en 2 lots : plantes bien alimentées en nitrate (HN ; 3,75 mM de nitrate) ou limitées en nitrate (LN ; 0,375 mM de nitrate). A partir de cette date (D0), l'azote 15 de la solution nutritive est remplacé par de l'azote 14 (période de « chasse »). Les racines, feuilles, tiges sont récoltés tous les 7 jours pendant 28 jours, puis après 42 jours (D42), 70 jours (D70) et enfin au stade graines matures (D99). A partir de D14, les siliques contenant les graines, ou les graines et les péricarpes lorsque les siliques sont déhiscentes, sont récoltés avec les autres organes.

récoltés séparément, pesés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Une partie de la matière fraîche congelée a été lyophilisée, afin d'obtenir la matière sèche.

I.II. Culture de 2 génotypes aux stades reproducteurs en conditions contrôlées (article 3) : Culture « Graines »

Pour (i) déterminer le rôle des feuilles et de la tige dans le rendement et le remplissage en N des graines et (ii) identifier les mécanismes physiologiques et moléculaires associés à la remobilisation de l'azote foliaire durant les stades reproducteurs, 2 génotypes ont été choisis parmi les 10 génotypes de la culture « Rosette » (cf. §C.I.I.) pour leur réponse à la limitation en N différente (Aviso et Oase), et cultivés en serre jusqu'au stade « graines matures » au cours de l'année 2010 (Figure C-3).

La stérilisation et la germination des graines ont été réalisées de la même manière que pour la culture « Rosette » (cf. §C.I.I.). Après germination, les plantes ont été arrosées 2 fois par semaine avec 90 mL de solution Hoagland ¼ (Tableau C-1) durant 2 mois (20°C/16h (jour) et 15°C/8h (nuit)), avant d'être transférées en chambre froide pour une période de vernalisation de 8 semaines (10°C/10h (jour) ; 4°C/14h (nuit)) avec un PAR de 400 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ fourni par des lampes à vapeur de sodium haute pression (MASTER GreenPower T400W, Philips). Pendant la vernalisation (8 semaines), chaque plante a reçu 90 mL de solution nutritive Hoagland ¼ 2 fois par semaine. Après vernalisation, les plantes ont été transférées en serre dans des pots de 2,5 L (1 plante par pot) contenant un mélange de perlite/vermiculite (2v/1v). Les pots ont été disposés de manière à simuler une densité proche des conditions de plein champ (36 plantes. m^{-2}). Pour cette culture, une thermopériode de 20°C/16h (jour) et 15°C/8h (nuit) a été appliquée.

A partir du semis jusqu'au début de la montaison (stade C1), y compris durant la vernalisation, la solution nutritive Hoagland ¼ a été enrichie avec de l'azote 15 (^{15}N -Nitrate) avec un excès isotopique de 2 % (Figure C-4). A la suite de cette période de « pulse », les pots ont été rincés abondamment à l'eau osmosée pour lessiver le nitrate marqué. A partir du stade C1 (correspondant au day 0 (D0)), la période de « chase » a commencé (remplacement du nitrate marqué au ^{15}N par du nitrate non marqué) et les plantes ont été séparées en 2 lots : un lot bien alimenté en N (HN ; 3,75 mM de nitrate) et un lot limité en N (LN ; 0,375 mM de nitrate). Pour cette culture, 4 répétitions biologiques ont été cultivés pour chaque traitement et chaque date de récolte. La culture des plantes a ensuite été conduite jusqu'au stade graines matures (D99). Chaque jour, la solution nutritive a été fournie automatiquement aux plantes avec un volume adapté à la croissance de celles-ci : 90, 120, 150 et 180 mL par plante, respectivement appliqués à la montaison (stade C), à l'apparition des bourgeons floraux (stade D/E), à la floraison

(stade F) et durant la maturation des graines (stade G). Les récoltes ont été effectuées à D0 (stade C1 : début de la montaison), D7 (stade C2 : montaison), D14 (stade D1 : bourgeons floraux accolés), D21 (stade E : premiers pétales visibles), D28 (stade F : floraison), D42 (stade G1 : chute des premiers pétales), D70 (stade G4 : remplissage des graines) et D99 (stade graines matures). Au cours de ces récoltes, les racines (incluant le pivot et les racines secondaires), les feuilles et la tige (avec ramifications), ainsi que les siliques contenant les graines ou les graines et les péricarpes séparément lorsque les siliques étaient déhiscentes, ont été récoltés séparément. Les feuilles ont été classées et poolées en 3 groupes (feuilles mortes, feuilles matures/sénescences et jeunes feuilles) selon leur position nodale, leur surface foliaire (déterminée par le LI-COR 300 area meter ; LI-COR, Lincoln, NE, USA) et leur niveau d'accumulation en chlorophylles (déterminée par le SPAD ; Soil Plant Analysis Development ; Minolta, SPAD-502 model). Les différents organes ont été pesés en frais, immédiatement congelés, et une partie a été lyophilisée afin d'obtenir la matière sèche. Le poids de mille graines (« thousand seed weight » ; TSW) et le nombre de graines ont été déduits du poids de 100 graines et de la masse totale des graines après 48h à 30°C.

I.III. Sélection de feuilles sénescences pour l'étude de la remobilisation du N foliaire

Cultures « Rosette » et « Graines »

Afin d'identifier les déterminants physiologiques et protéomiques associés à une remobilisation du N efficace, une feuille mature entrant en sénescence a été choisie, à la fois chez les 10 génotypes de la culture « **Rosette** », permettant ainsi de comparer les mécanismes de remobilisation foliaire entre génotypes plus ou moins efficaces, mais également sur les 2 génotypes de la culture « **Graines** », permettant ainsi d'étudier la remobilisation foliaire post-montaison. Une comparaison des résultats obtenus au stade rosette et au stade reproducteur a également été réalisée (cf. Chapitre E).

La sénescence développementale est déclenchée peu de temps après la maturité de la feuille (Craft-Brandner *et al.*, 1998). Par conséquent, pour obtenir une feuille qui entre en sénescence au cours de la culture, une feuille ayant atteint sa maturité à D0, *i.e.* présentant une surface foliaire (déterminée par le planimètre LI-COR 300) et un niveau en chlorophylles maximum (déterminée par la pince SPAD), a été sélectionné pour les 2 cultures. Cette feuille est appelée la « feuille source », et pour la culture « **Rosette** » dont les feuilles ont été numérotées par ordre d'apparition, la feuille source correspond au rang foliaire n°11 pour les génotypes ES-Astrid, Californium et Darmor, et n°12 pour les 7 autres génotypes.

Pour les 2 cultures, cette feuille a été directement congelée dans l'azote liquide : une moitié a été conservée à -80°C pour les analyses protéomiques ou de biologie

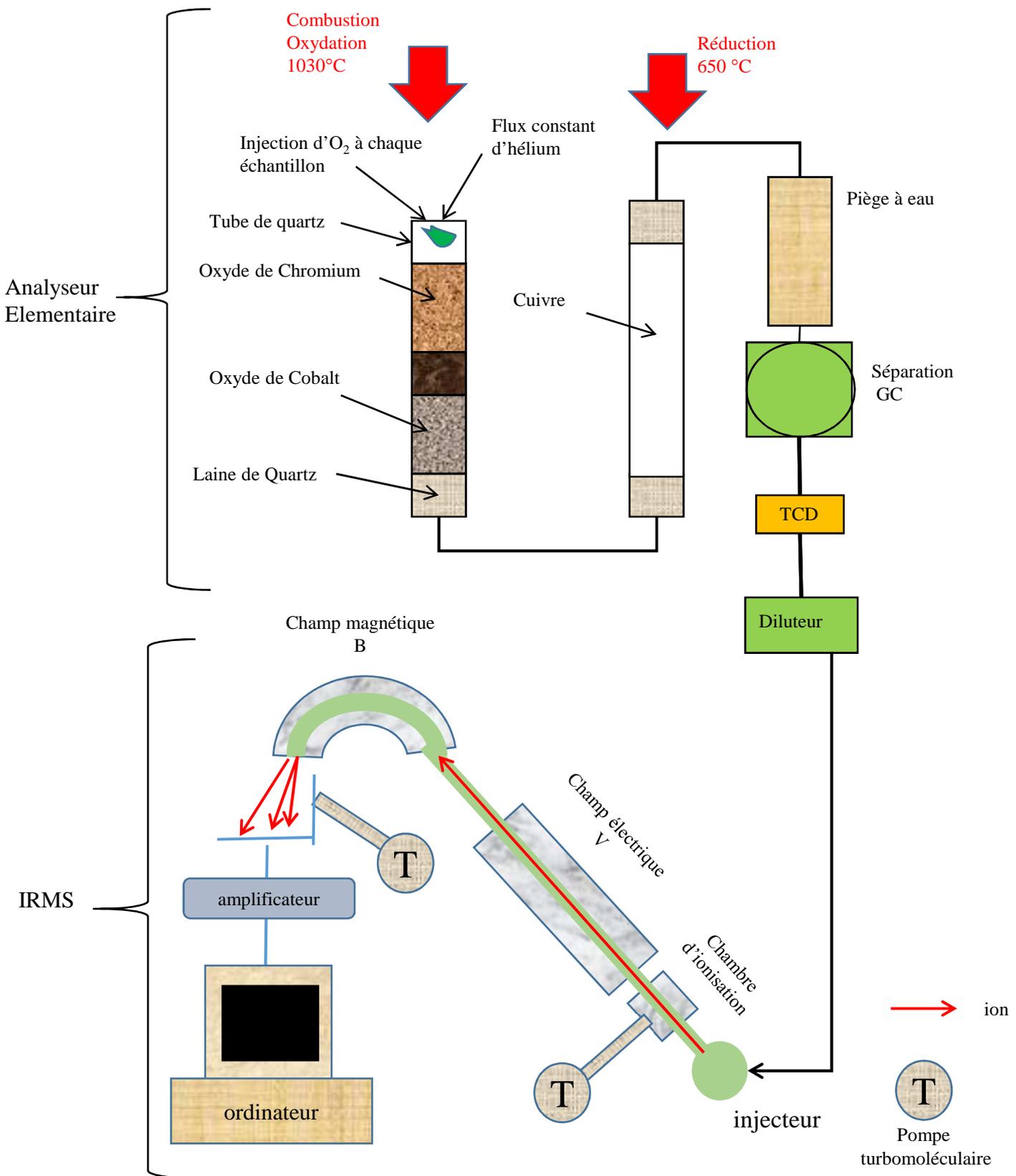


Figure C-5 : Schéma de l'analyseur élémentaire et du spectromètre de masse de ratio isotopique.

GC : « Gas chromatography » (chromatographie en phase gazeuse) ; IRMS : « Isotope ratio mass spectrometry » (spectromètre de masse de ratio isotopique) ; TCD : « Thermal Conductivity Detector » (détecteur à conductibilité thermique).

moléculaire, alors que l'autre moitié a été lyophilisée pour déterminer la matière sèche et effectuer les analyses élémentaires et biochimiques complémentaires.

II. Détermination de la composition de la graine (culture « Graines »)

La composition de la graine en protéines et en huile, ainsi que la proportion des principaux acides gras dans l'huile ont été déterminées pour les génotypes Aviso et Oase de la culture « **Graines** », afin de déterminer l'impact de la carence en N post-montaison sur ces paramètres.

Les mesures ont été effectuées par spectroscopie proche infrarouge (NIRS, NIRSystem model 6500, FOSS NIRSystem Inc., Silver Spring, MD, USA) (Velasco *et al.*, 1999). Cette technique repose sur l'absorption des rayons proches infrarouges par la matière organique. Pour chaque mesure, 3 g de graines de chaque répétition ont été placés dans une coupelle standardisée et scannés 3 fois par le système NIRS. La teneur en huile et protéines, ainsi que la composition en acides gras ont été déterminées grâce à une calibration externe (CRAW⁷, Gembloux, Belgique).

III. Analyses élémentaires et biochimiques

Pour les 2 cultures, des mesures de la quantité de N total et de ¹⁵N ont permis l'estimation des flux de N issus de la remobilisation et de l'absorption au niveau plante entière. De plus, le dosage des protéines solubles et des acides aminés a été fait dans la feuille source pour étudier plus en détail les facteurs limitant la remobilisation du N foliaire.

III.I. Détermination des quantités de N total, de ¹⁵N et calcul des flux plante entière (cultures « Rosette » et « Graines »)

III.I.1. Analyses N total et ¹⁵N

Les analyses de N total et ¹⁵N des 2 cultures ont été faites à l'aide d'un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse de mesure du ratio isotopique (Isotope-Ratio Mass spectrometer, IRMS) de marque Isoprime (GV Instrument, Manchester, Royaume-Uni) (Figure C-5).

Les échantillons lyophilisés et finement broyés ont été pesés précisément dans des nacelles en aluminium de façon à obtenir environ 50 µg d'azote.

⁷ Centre wallon de recherches agronomiques

L'échantillon ainsi conditionné a été injecté dans la colonne de combustion en présence d'un flux constant d'hélium pour éviter une contamination par l'air. Les échantillons ont subi une combustion totale afin de passer sous forme gazeuse : N₂, CO₂, H₂O et oxydes d'azote. Un passage sur une colonne de cuivre métallique a permis la réduction de ces gaz en N₂ et CO₂. Après piégeage de l'eau, le N₂ et le CO₂ ont été séparés sur une colonne de chromatographie en phase gazeuse (45°C), avant une injection dans le spectromètre de masse isotopique.

Les gaz N₂ et CO₂ ont été ionisés puis accélérés dans une chambre électrique, avant d'être déviés dans un champ électromagnétique. L'angle de déviation dépend de la masse (m) et de la charge (z). L'ionisation des gaz polarisant toutes les molécules de N₂ de la même manière, seule leur masse change l'angle de déviation. Ainsi, la déviation du N₂ de masse 28 (¹⁴N¹⁴N) est plus grande que celle du N₂ de masse 29 (¹⁴N¹⁵N), elle-même plus grande que celle du N₂ de masse 30 (¹⁵N¹⁵N). Les ions ont été collectés sur 3 détecteurs et la somme des ions a donné la quantité totale de N.

L'analyse IRMS fournit le pourcentage d'azote (% N) dans la matière sèche qui est utilisé pour calculer la quantité de N (QN) dans un tissu donné :

$$QN = \% N \times MS / 100$$

avec : MS = matière sèche de l'échantillon

L'abondance isotopique (A %) a également été déterminée par l'IRMS selon ce calcul :

$$A \% = 100 \times [^{15}\text{N} / (^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})]$$

avec : ¹⁵N = quantité d'isotope de masse 15

¹⁴N = quantité d'isotope de masse 14

L'abondance isotopique a été utilisée pour estimer la quantité (en µg) de ¹⁵N en excès (Q¹⁵N_{en excès}) :

$$Q^{15}\text{N}_{\text{en excès}} = [(A \% - A \%_{\text{standard naturel}}) / 100] \times QN$$

avec : A %_{standard naturel} = abondance naturelle du ¹⁵N dans l'air (0,37307 %)

Culture « Rosette »

La quantité de N de la feuille source des 10 géotypes a été quantifiée à D0 et à D21 pour estimer l'efficacité de remobilisation du N foliaire (NRE_{leaf}) :

$$NRE_{\text{leaf}} = (QN_{t0} - QN_{t0+\Delta t}) \times 100 / QN_{t0}$$

avec : QNt_0 = quantité de N dans la feuille source à la date t_0

$QNt_{0+\Delta t}$ = quantité de N dans la feuille source à la date $t_{0+\Delta t}$

De plus, pour les 4 génotypes présentant des réponses différentes à la limitation en N (Oase, Samourai, Californium et Aviso), la quantité de N total et ^{15}N a été déterminée dans tous les organes (toutes les feuilles, incluant les limbes et pétioles, les racines et le collet) à D0 et D21, mais également dans la feuille source à la date de récolte intermédiaire (D14).

Culture « Graines »

La quantité de N total et de ^{15}N a été estimée dans tous les organes aux dates clés D0, D42, D70 et D99 pour l'étude des flux de N et dans la feuille mature à D0, D7, D14, D21 et D28 pour l'étude de la remobilisation du N foliaire en cinétique.

III.1.2. Calculs de flux de N au niveau plante entière

Pour la culture « **Rosette** », les flux de N au niveau plante entière ont été déterminés uniquement pour 4 génotypes présentant les 4 réponses différentes à la limitation en nitrate : Aviso, Oase, Samourai et Californium. Pour simplifier l'interprétation des résultats, les feuilles ont été classées et groupées en fonction de leur statut source (perte de ^{15}N) ou puits (gain de ^{15}N) pour le N entre les 2 dates étudiées. Pour la culture « **Graines** », les flux d'azote au niveau plante entière ont été réalisés sur les 2 génotypes. La méthode de calcul des flux de N issus de l'absorption et de la remobilisation a été décrite en détails dans un article publié récemment (Salon *et al.*, 2014) et les calculs, détaillés ci-dessous, ont été réalisés en s'appuyant sur une macro Excel (PEF : « Plant Elemental Fluxes »).

Les calculs de flux de N ont requis la normalisation de la quantité de ^{15}N en excès pour chaque organe:

$$Q^{15}\text{N} = (Q^{15}\text{N}_{\text{organe}} \times MQ^{15}\text{N}_{\text{plante toutes dates incluses}}) / Q^{15}\text{N}_{\text{plante entière}}$$

avec : $Q^{15}\text{N}$ = quantité de ^{15}N en excès normalisée

$Q^{15}\text{N}_{\text{organe}}$ = quantité de ^{15}N en excès de l'organe à la date t

$MQ^{15}\text{N}_{\text{plante toutes dates incluses}}$ = moyenne de la quantité de ^{15}N en excès, toutes dates et organes confondus

$Q^{15}\text{N}_{\text{plante entière}}$ = quantité de ^{15}N en excès dans la plante à la date t

Un organe source présente une diminution de la quantité de ^{15}N entre les 2 dates observées, et la quantité de N remobilisé (QNR_{source} , en mg) a été calculée ainsi :

$$QNR_{\text{source}} = [QN_{\text{total } t} \times (Q^{15}\text{N}_t - Q^{15}\text{N}_{t+\Delta t})] / Q^{15}\text{N}_t$$

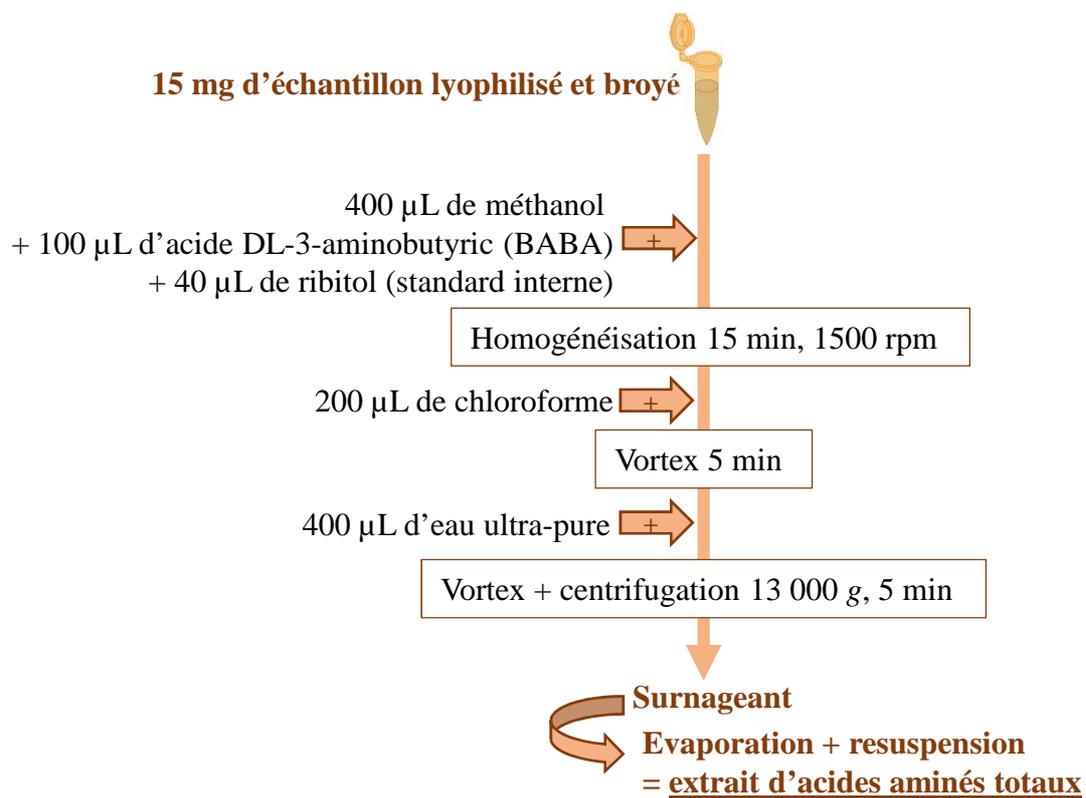


Figure C-6 : Protocole d'extraction des acides aminés selon la méthode développée par l'Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP) de Rennes.
Ce protocole a été appliqué sur les feuilles sources des 10 géotypes de la culture « Rosette ».

avec : $QN_{total\ t}$ = quantité de N total dans l'organe source à la date t
 $Q^{15}N_t$ = quantité de ^{15}N en excès normalisée dans l'organe source à la date t
 $Q^{15}N_{t+\Delta t}$ = quantité de ^{15}N en excès normalisée dans l'organe source à la date $t+\Delta t$

Un organe puits présente un gain de ^{15}N entre les 2 dates étudiées et la quantité de N remobilisé reçu (QNR_{puits} , en mg) a été calculée selon l'équation suivante :

$$QNR_{puits} = (Q^{15}N_{t+\Delta t} - Q^{15}N_t) / [(\Sigma Q^{15}N_{source\ t}) - (\Sigma Q^{15}N_{source\ t+\Delta t}) / QN_{total\ remobilisé}]$$

avec : $\Sigma Q^{15}N_{source\ t}$ = somme de la quantité de ^{15}N en excès normalisée issu des organes sources à la date t

$\Sigma Q^{15}N_{source\ t+\Delta t}$ = somme de la quantité de ^{15}N en excès normalisée issu des organes sources à la date $t+\Delta t$

$QN_{total\ remobilisé}$ = quantité de N total remobilisé

Les calculs de la quantité de N remobilisé permettent de déduire la quantité de N absorbé et alloué (en mg) aux organes sources (QNI_{source}) et puits (QNI_{puits}) :

$$QNI_{source} = (QN_{t+\Delta t} - QN_t) + QNR_{source}$$

$$QNI_{puits} = (QN_{t+\Delta t} - QN_t) - QNR_{puits}$$

avec : QN_t = quantité de N dans l'organe source ou puits à la date t

$QN_{t+\Delta t}$ = quantité de N dans l'organe source ou puits à la date $t+\Delta t$

QNR_{source} = quantité de N remobilisé depuis l'organe source étudié

QNR_{puits} = quantité de N remobilisé vers l'organe puits étudié

III.II. Détermination de la quantité d'acides aminés libres (cultures « Rosette » et « Graines »)

Afin de confirmer que l'exportation des acides aminés n'est pas un facteur limitant de la remobilisation du N foliaire, la quantité d'acides aminés libres de la feuille source a été déterminée pour les 2 cultures.

Pour la culture « **Rosette** », la quantité d'acides aminés a été déterminée dans la feuille source à D0 et D21 chez les 10 génotypes. Ces analyses ont été effectuées par l'équipe du Pr. Alain Bouchereau de l'Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes (IGEPP⁸) de Rennes dans le cadre du programme GENERGY (Figure C-6). Quinze milligrammes d'échantillons foliaires préalablement lyophilisés et

⁸ Institut de génétique, environnement et protection des plantes, Rennes

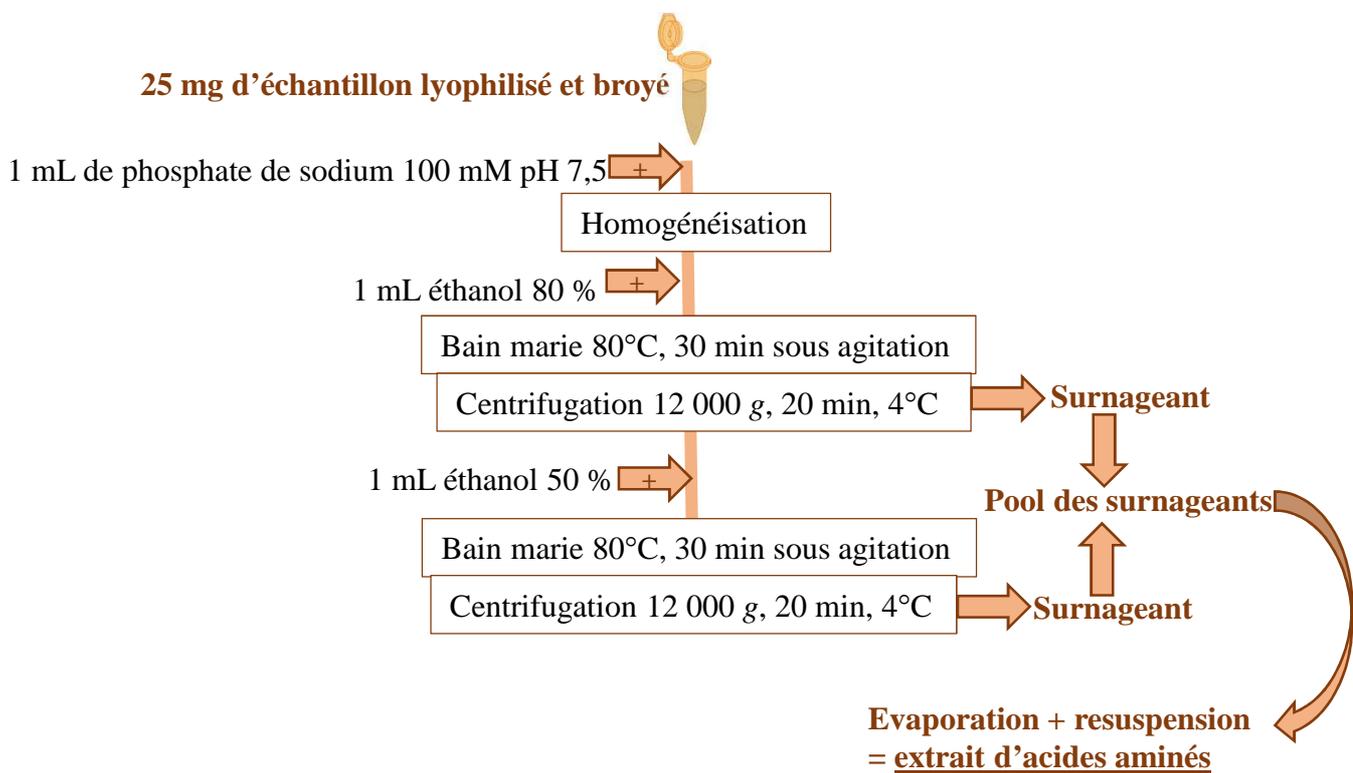


Figure C-7 : Protocole d'extraction des acides aminés selon la méthode développée au laboratoire d'Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutrition N, C & S (EVA) de Caen.

Ce protocole a été appliqué sur les feuilles sources des 4 géotypes de la culture « Rosette » présentant une réponse contrastée à la limitation en N et sur les 2 géotypes de la culture « Graines ».

broyés ont été dissous dans 400 µL de méthanol contenant 200 µM d'acide DL-3-aminobutyric (BABA) et 40 µM de ribitol comme standard interne. L'homogénat a été agité à 1500 rotations par minute pendant 15 minutes, puis 200 µL de chloroforme ont été ajoutés, avant une nouvelle agitation de 5 minutes. Après l'ajout de 400 µL d'eau ultrapure, les échantillons ont été homogénéisés et centrifugés 5 minutes à 13 000 g. Le surnageant a été récupéré et séché. Le résidu sec obtenu a ensuite été re-suspendu dans de l'eau ultrapure et 10 µL de cet extrait ont été utilisés pour la dérivation des acides aminés selon le protocole du kit AccQTag Ultra Derivatization (Waters Corporation, Milford, MA). Les acides aminés ont ensuite été analysés *via* un système Acquity « ultra performance liquid chromatography » (UPLC ; Waters Corporation, Milford, MA) en injectant 1 µL du mélange dérivé dans une colonne Acquity UPLC® chauffée à 55°C. Les acides aminés ont été élués à 0,7 mL.min⁻¹ avec un mix d'AccQTag Ultra Eluent dilué 10 fois et d'acétonitrile selon un gradient d'éluion spécifique. Les acides aminés dérivés ont été détectés à 260 nm *via* un détecteur à photodiode et la quantité d'acides aminés a été déterminée en µmoles par gramme de matière sèche. A l'issue de cette quantification, la remobilisation des acides aminés entre D0 et D21 a été estimée ainsi :

$$\text{Remob}_{\text{aa}} (\%) = 100 - (Q_{\text{aa D21}} \times 100 / Q_{\text{aa D0}})$$

avec $Q_{\text{aa D0}}$ et $Q_{\text{aa D21}}$ = quantité d'acides aminés (µmoles.feuille⁻¹) à D0 et D21, respectivement.

Pour les 4 génotypes contrastés de la culture « **Rosette** » et les 2 génotypes de la culture « **Graines** », la quantité d'acides aminés totaux de la feuille source a été déterminée en cinétique, selon un autre protocole réalisé au sein du laboratoire EVA (Figure C-7). Pour l'extraction des acides aminés, 1 mL de phosphate de sodium 100 mM (pH 7,5) a été ajouté à 25 mg de limbe lyophilisé préalablement broyé. Après 2 incubations successives de 30 minutes à 80°C avec respectivement 1 mL d'éthanol 80 % puis 1 mL d'éthanol 50 %, l'homogénat obtenu a été centrifugé 20 minutes à 12 000 g (4°C). Les surnageants contenant les acides aminés ont été poolés, évaporés et re-suspendus dans 500 µL d'eau ultrapure. Pour quantifier les acides aminés, 1 mL de réactif à la ninhydrine (ninhydrine 112 mM, chlorure d'étain 3,85 mM dans du tampon citrate 100mM pH5 et du diméthyl sulfoxide (DMSO) à 50 % (v/v)) a été ajouté à 100 µL d'extrait dilué. Après une incubation de 20 minutes dans l'eau bouillante, la réaction a été arrêtée par 10 minutes sur glace avant l'ajout de 5 mL d'éthanol 50 %. L'absorbance a ensuite été lue à 570 nm, et la concentration d'acides aminés a été estimée en micromoles d'équivalent L-Leucine à l'aide d'une gamme d'étalonnage de L-leucine (de 0 à 2 mM) obtenue dans les mêmes conditions que les échantillons.

III.III. Quantification des autres composés azotés (cultures « Graines » et « Rosette »)

Lors de l'étude de la remobilisation du N de la feuille source au stade végétatif (culture « **Rosette** ») et reproducteur (culture « **Graines** »), certains génotypes présentaient une dégradation des protéines solubles élevée non associée à une forte remobilisation de l'azote total, sans accumulation d'acides aminés (cf. Chapitre D). Par conséquent une fraction « autres composés azotés » (QN_{autre}) a été estimée. Pour cela, la quantité de N incorporée dans les protéines solubles (QN_{ps}) a été estimée en se basant sur une proportion de N de 16 % dans les protéines. Pour la quantité d'azote incorporé dans les acides aminés (QN_{aa}), la proportion de N a été estimée *via* une masse moléculaire moyenne de 100 g.mole⁻¹ et un ratio de 7,86, données issues de précédentes expérimentations sur des feuilles de colza de plusieurs génotypes effectuées au sein de notre laboratoire. Les calculs ont été les suivants :

$$QN_{\text{ps}} = Q_{\text{ps}} \times 16 / 100$$

$$QN_{\text{aa}} = (110 \times Q_{\text{aa}}) / 7,86$$

$$QN_{\text{autre}} = QN_{\text{feuille}} - (QN_{\text{ps}} + QN_{\text{aa}})$$

avec : Q_{ps} = quantité de protéines solubles dans la feuille (mg.limbe⁻¹) (cf. §C.V.I)

Q_{aa} = quantité d'acides aminés dans la feuille (μmoles.limbe⁻¹) (cf. §C.III.II)

QN_{feuille} = quantité d'azote total de la feuille (mg.limbe⁻¹)

IV. Détermination des composantes de l'efficience d'usage de l'azote (cultures « Rosette » et « Graines »)

Culture « Rosette »

Pour la culture « **Rosette** », l'efficience d'usage de l'azote (EUA) a été estimée comme la production de biomasse en g (LB_{prod}), *i.e.* la quantité de biomasse produite par les feuilles de rang supérieur à la feuille mature (jeunes feuilles en croissance), par mg de N fourni dans la solution nutritive ($QN_{\text{sol N}}$) :

$$EUA = LB_{\text{prod}} / QN_{\text{sol N}}$$

A partir des flux de N décrits au paragraphe C.III.I.2, l'efficience de remobilisation de l'azote (ERA) au niveau plante entière a précisément été évaluée comme la quantité de N remobilisé (mg) par rapport à la quantité de N disponible dans les organes sources (mg) :

$$ERA (\%) = \Sigma QN_{\text{remobilisation}} \times 100 / (\Sigma QN_{\text{source } t} + \Sigma QN_{\text{absorption}})$$

avec : $\Sigma QN_{\text{remobilisation}}$ = somme des quantités de N remobilisé entre la date t et t+ Δt

$\Sigma QN_{\text{source } t}$ = somme des quantités de N dans les organes sources à la date t

$\Sigma QN_{\text{absorption}}$ = quantité de N absorbé et alloué aux organes sources entre la date t et t+ Δt

Les flux de N ont également permis de déterminer l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUtA), qui a été définie comme la production de biomasse en g (LB_{prod}) par mg de N distribué aux feuilles en croissance :

$$EUtA = LB_{\text{prod}} / QN_{\text{jeunes feuilles}}$$

avec : $QN_{\text{jeunes feuilles}}$ = quantité de N issu de la remobilisation et de l'absorption distribué aux feuilles en croissance

Culture « Graines »

Pour la culture « **Graines** », l'EUA a été estimée au stade graines matures *via* le rapport suivant (Masclaux-Daubresse and Chardon, 2011) :

$$EUA = (QN_{\text{graines}} / QN_{\text{plante entière}}) / (DM_{\text{graines}} / DM_{\text{plante entière}})$$

avec : QN_{graines} = quantité de N dans les graines

$QN_{\text{plante entière}}$ = quantité de N dans la plante entière (incluant les racines et les graines)

DM_{graines} = matière sèche des graines

$DM_{\text{plante entière}}$ = matière sèche de la plante entière (incluant les racines et les graines)

L'EUtA a été déterminée au stade graines matures comme la production de graines en g (DM_{graines}) par mg de N dans les parties aériennes ($QN_{\text{parties A}}$) selon le calcul suivant :

$$EUtA = DM_{\text{graines}} / QN_{\text{parties A}}$$

Comme pour la culture « Rosette », l'estimation des flux d'azote au niveau plante entière a permis de définir de nouveaux indices de la remobilisation et de l'absorption. Pour la culture « Graines », l'ERA a été estimée de la même manière qu'au stade rosette, et l'efficacité d'absorption de l'azote (EAbA) comme la proportion de N issu de l'absorption par rapport au N total distribué aux graines :

$$EAbA (\%) = QNG_{\text{absorption}} * 100 / QNG_{\text{distribué}}$$

avec : $QNG_{\text{absorption}}$ = quantité de N issu de l'absorption et alloué aux graines

$QNG_{\text{distribué}}$ = quantité de N total (de la remobilisation et de l'absorption) distribué aux graines.

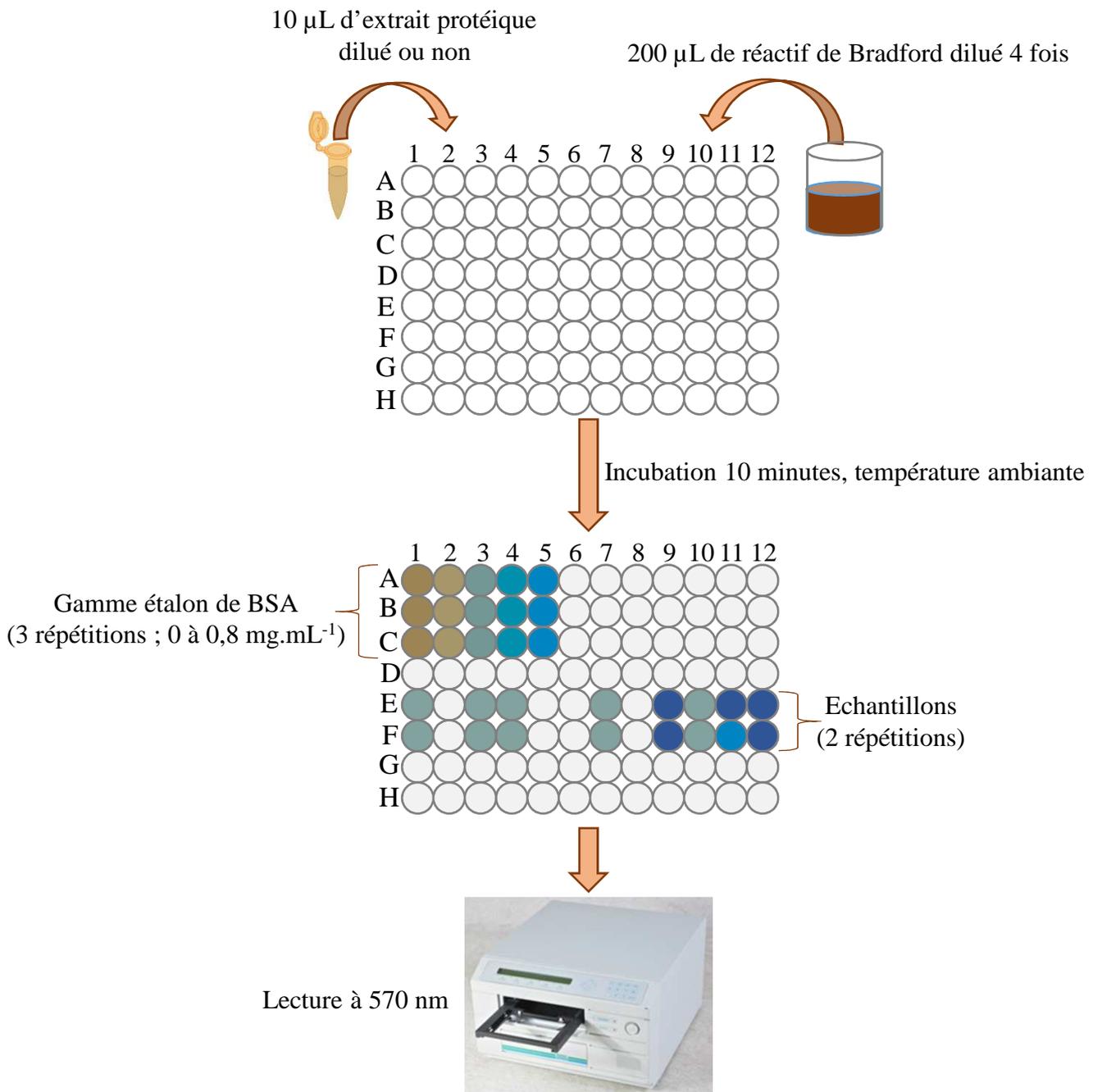


Figure C-8 : Protocole simplifié du microdosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976).

Pour le dosage des protéines, 10 μL d'extrait protéique (ou de BSA pour la gamme étalon) et 200 μL de réactif de Bradford (Bradford, 1976) dilué 4 fois sont déposés dans les puits d'une microplaque. Après agitation et un temps d'incubation de 10 minutes à température ambiante, l'absorbance est lue à 570 nm *via* un lecteur de microplaque. La concentration en protéines de l'extrait est calculé à partir d'une gamme étalon de BSA (sérum albumine bovine).

V. Analyses protéomiques

V.I. Détermination de la quantité de protéines solubles dans la feuille source (cultures « Rosette » et « Graines »)

En se basant sur l'hypothèse que la protéolyse est le principal facteur limitant la remobilisation du N foliaire, la dégradation des protéines solubles a été spécifiquement étudiée au niveau de la feuille source identifiée selon les critères définis au paragraphe C.I.III. :

- ❖ En point initial (D0) et point final (D21) pour les 10 génotypes de la culture « **Rosette** »,
- ❖ En cinétique (D0 à D21) pour les 4 génotypes contrastés de la culture « **Rosette** » (Aviso, Oase, Samourai et Californium),
- ❖ En cinétique de D0 à D28 pour les 2 génotypes (Aviso et Oase) de la culture « **Graines** ».

Les protéines solubles ont été extraites à partir de 200 mg de matière fraîche congelée, préalablement broyée dans l'azote liquide, en présence de 500 µL de tampon citrate-phosphate (100 mM, pH 6,5). Du polyvinylpyrrolidone (PVPP) a été ajouté à l'extrait pour fixer les polyphénols végétaux qui interfèrent avec les protéines et faussent le dosage. Après une centrifugation (1h à 12000 g, 4°C), le surnageant a été prélevé et ajusté à 500 µL avec du tampon citrate-phosphate. La concentration en protéines a été déterminée par dosage colorimétrique en microplaque selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) (Figure C-8). Pour cela, 200 µL de réactif de Bradford dilué 4 fois ont été ajoutés à 10 µL d'échantillon et, après 10 minutes, l'absorbance a été lue à 570 nm par un lecteur microplaque DYNEX. La concentration a été déterminée grâce à une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA, Sigma-Aldrich) comprise entre 0 et 0,8 mg.mL⁻¹.

Pour les 10 génotypes de la culture « **Rosette** », la remobilisation des protéines solubles (Remob_{prot}) entre D0 et D21 a été estimée ainsi :

$$\text{Remob}_{\text{prot}} (\%) = 100 - (Q_{\text{Prot D21}} \times 100 / Q_{\text{Prot D0}})$$

avec : Q_{Prot D0} et Q_{Prot D21} = quantité de protéines solubles (mg.feuille⁻¹) à D0 et D21, respectivement.

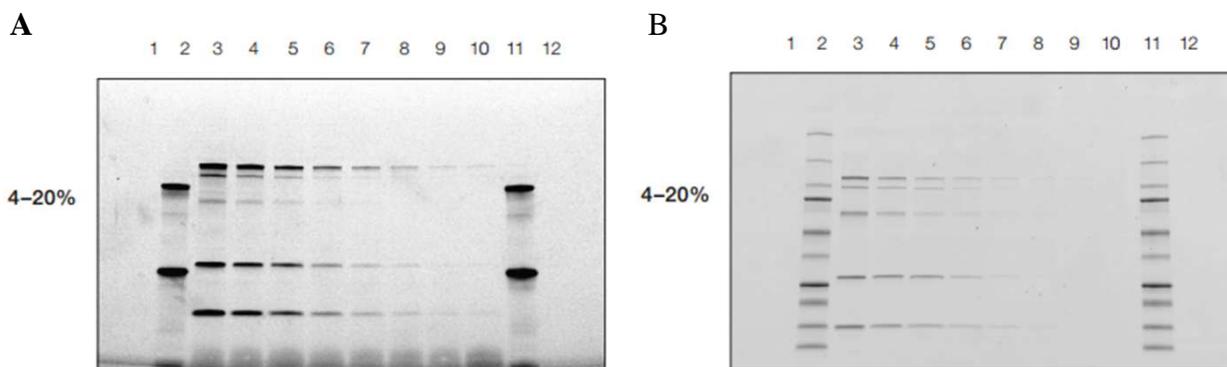


Figure C-9 : Comparaison de la sensibilité de détection des protéines après séparations sur gels « Stain Free » (A) et séparation sur gel SDS-PAGE colorés au Bleu de Coomassie (B).

Les mêmes extraits protéiques ont été chargés sur 2 gels à 4-20% d'acrylamide. Les puits 2 et 11 contiennent un standard de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Dual color, Bio-Rad) et les puits 3 à 10 contiennent le même échantillons contenant 5 protéines différentes avec des dilutions différentes. La détection des protéines des gels « Stain Free » (A) est identique, voire supérieure pour certaines protéines, à la coloration au Bleu de Coomassie (B) (source : Bio-Rad®).

V.II. Etudes des activités protéolytiques dans la feuille source

La protéolyse étant vraisemblablement le mécanisme limitant la remobilisation du N, une étude des activités protéolytiques a été effectuée sur la feuille source des 4 géotypes de la culture « **Rosette** » présentant des EUA contrastée, et les 2 géotypes de la culture « **Graines** ». Les activités protéolytiques ont été mesurées à la date de récolte qui présentait la plus forte dégradation des protéines solubles : D14 pour la culture « **Rosette** » et D7 pour la culture « **Graines** ».

V.II.1. Dégradation de la Rubisco sur gel « Stain Free » (cultures « **Rosette** » et « **Graines** »)

Les activités protéolytiques sont usuellement quantifiées avec un substrat chimique, l'azocaséine (la caséine liée à un composé « azo » absorbant à 440 nm). Cette méthode s'est avérée très difficile à mettre en œuvre sur les extraits protéiques de feuilles de colza. Par conséquent, une nouvelle méthode d'analyse des activités protéolytiques a été mise au point afin de se rapprocher des mécanismes de protéolyses susceptibles de se produire *in vivo*. La Rubisco pouvant représenter 65 % des protéines solubles chez les plantes C3, *i.e.* environ 20 % du N foliaire (cf. §B.II.II.2), sa dégradation présente donc un enjeu crucial pour la gestion du N. La grande sous-unité de la Rubisco (GSU) étant très abondante et facilement identifiable sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE), les activités protéolytiques impliquées dans la remobilisation du N ont été étudiées avec la GSU comme substrat, à partir d'extraits protéique issu de la feuille source des 4 géotypes Aviso, Oase, Samouraï et Californium de la culture « **Rosette** » et des géotypes Aviso et Oase de la culture « **Graines** ». Ces analyses ont permis de mettre en évidence, *in vitro*, les classes de protéases impliquées dans la dégradation de la Rubisco, et par extrapolation, dans la protéolyse globale de la cellule.

Pour ces travaux, une nouvelle méthode reposant sur l'utilisation de gels « Stain Free » (Bio-Rad®) a été développée en étroite collaboration avec Marine Poret (Master 2 Recherche). Ces gels ont l'avantage de permettre la détection des protéines immédiatement après leur séparation sur gel SDS-PAGE, sans coloration préalable et avec une sensibilité équivalente, voire supérieure, à une coloration au Bleu de Coomassie (Figure C-9). Les gels « Stain Free » contiennent du TGX (« Tris-Glycine extended ») comprenant un composé trihalo unique permettant la détection rapide des protéines par fluorescence. L'exposition du gel aux UV induit une réaction entre le composé trihalo et les tryptophanes des protéines, provoquant

Tableau C-2 : Conditions expérimentales utilisées pour les analyses des activités protéolytiques totales réalisées sur gel « Stain Free » pour les cultures « Rosette » et « Graines ».

		Quantités de protéines	Tampons d'incubation	Temps d'incubation (T)
Culture « Rosette »	Plantes bien alimentées en N (HN) (les 3 répétitions biologiques poolées)	10 µg	tampon sodium acétate pH 5 à 250 mM à 50 % (v/v) contenant 0,16 % β-mercaptoethanol (v/v)	45 min (sauf génotype Californium : 55 min)
		6 µg	tampon Tris-HCl pH 7,5 à 250 mM à 50 % (v/v) contenant 0,16 % β-mercaptoethanol (v/v)	90 min
	Plantes limitées en N (LN) (les 3 répétitions biologiques poolées)	10 µg	tampon sodium acétate pH 5 à 250 mM à 50 % (v/v) contenant 0,16 % β-mercaptoethanol (v/v)	20 min (sauf génotype Californium : 30 min)
		6 µg	tampon Tris-HCl pH 7,5 à 250 mM à 50 % (v/v) contenant 0,16 % β-mercaptoethanol (v/v)	90 min (sauf génotype Oase : 60 min)
Culture « Graines »	Plantes bien alimentées (HN) et limitées (LN) en N (4 répétitions biologiques séparément)	6 µg	tampon sodium acétate pH 5 à 250 mM 50 % (v/v) contenant 0,16 % β-mercaptoethanol (v/v)	60 min

l'émission de fluorescence proportionnelle au niveau d'abondance de la protéine (source : Bio-Rad^{®9}).

Les protéines vacuolaires, active a pH 5, jouent un rôle crucial dans la dégradation des protéines chloroplastidiales et notamment de la Rubisco (cf. §B.III.). Par conséquent, l'étude des activités protéolytiques a été faite dans un premier temps à pH 5, que ce soit pour la feuille source des 4 génotypes de la culture « **Rosette** » ou des 2 génotypes de la culture « **Graines** ».

Cependant, la dégradation des protéines chloroplastidiales peut également impliquer des protéases chloroplastidiales et cytosoliques (cf. §B.III.). Etant donné que l'efficacité de remobilisation du N au stade rosette est particulièrement médiocre, l'investigation des activités protéolytiques des 4 génotypes de la culture « **Rosette** » a été complétée par une étude des activités protéolytiques à pH 7,5.

Les activités protéolytiques nécessitant des conditions optimales, les modalités d'incubation (durée, quantité de protéines) ont été adaptées pour chaque culture, conditions d'alimentation en N et pH d'activité (Tableau C-2). En plus de l'activité protéolytique totale, l'activité protéolytique a été mesurée en présence des inhibiteurs de plusieurs classes de protéases pour déterminer la contribution de chaque classe à la dégradation des protéines. Les concentrations d'inhibiteurs des classes de protéases ont été les mêmes entre les traitements azotés mais ont été adaptées pour les 2 cultures :

- 1) Inhibiteur de protéases à cystéine (iodoacétamide) à 14,5 mM pour les 2 cultures.
- 2) Inhibiteur de protéases à sérine (aprotinine) à 34 µM pour la culture « **Graines** » et 68 µM pour la culture « **Rosette** ».
- 3) Inhibiteur de métalloprotéases (1-10 phénanthroline) à 5,5 mM pour la culture « **Graines** » et 11 mM pour la culture « **Rosette** ».
- 4) Inhibiteur de protéases à aspartate (pepstatine A) à 10,3 µM pour la culture « **Graines** » et 20,6 µM pour la culture « **Rosette** ».
- 5) Inhibiteur du protéasome (carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal, MG132) à 20 µM pour les 2 cultures.

Du fait de la solubilité du 1-10 phénanthroline et de la pepstatine A dans le méthanol, et du MG132 dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO), les activités protéolytiques totales ont également été mesurées en présence de méthanol et de DMSO à 0,5 % et utilisées comme contrôle pour ces inhibiteurs de protéases. Pour

⁹http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5974.pdf

pouvoir comparer les données de la culture « **Rosette** » malgré les différents temps d'incubation, la dégradation de la GSU a été estimée pour 20 et 60 minutes d'incubation pour les activités à pH 5 et 7,5, respectivement.

Cette méthode étant nouvelle, dans un premier temps l'étude de la dégradation de la Rubisco a été faite séparément sur les 4 répétitions biologiques de la culture « **Graines** ». Le coefficient de variation entre les répétitions biologiques étant minime (5 à 10 %, cf. §D.II.), les répétitions biologiques de la culture « **Rosette** » ont été poolées.

Après une incubation à 37°C ($t+\Delta t$) ou non (t_0), les extraits protéiques ont été dénaturés 7 minutes dans l'eau bouillante en présence de tampon Laemmli 2X avec β -mercaptoethanol (5 %, v/v) (Laemmli, 1970). Les échantillons ont ensuite été déposés dans les puits de gels « Stain Free » SDS PAGE (Mini-PROTEAN TGX Stain Free Gels 4-15 %) et l'électrophorèse s'est faite dans le tampon de migration Tris/SDS/Glycine (25mM / 0,1 % / 192 mM ; pH 8,8). Après la migration (200 V, 30 minutes), le gel a été démoulé, rincé rapidement avec de l'eau ultrapure puis placé sur une cassette à ultra-violet (système GelDoc, Bio-Rad®) pour la détection des protéines (5 minutes, exposition 2,8 sec.). La quantité de GSU de la Rubisco a été estimée *via* le volume du pic (V_{GSU}), déterminé grâce au logiciel Image Lab (Bio-Rad®). Le pourcentage de dégradation de la GSU (% Deg), déterminé pour toutes les conditions (avec ou sans inhibiteurs de protéases), et le pourcentage d'inhibition par les différents inhibiteurs (% Inh) ont été estimés selon les calculs suivants :

$$\% \text{ Deg} = \left\{ \left[\frac{V_{GSU} t_0 - V_{GSU} t+\Delta t}{T} \right] \times T_x \right\} \times 100 / V_{GSU} t_0$$

$$\% \text{ Inh} = \left[\frac{V_{GSU} \text{ inh } t_0 - (V_{GSU} \text{ inh } t_0 - V_{GSU} \text{ inh } t+\Delta t)}{V_{GSU} \text{ témoin } t_0 - V_{GSU} \text{ témoin } t+\Delta t} \right] \times 100$$

avec : $V_{GSU} t_0$ = volume du pic de GSU à t_0

$V_{GSU} t+\Delta t$ = volume du pic de GSU à $t+\Delta t$

T = temps d'incubation

T_x = temps d'incubation de référence pour la comparaison des géotypes (20 minutes pour pH 5 et 60 minutes pour pH 7,5)

$V_{GSU} \text{ inh } t_0$ = volume du pic de GSU avec l'inhibiteur à t_0

$V_{GSU} \text{ inh } t+\Delta t$ = volume du pic de GSU avec l'inhibiteur à $t+\Delta t$

$V_{GSU} \text{ témoin } t_0$ = volume du pic de GSU dans l'échantillon témoin (sans inhibiteur \pm méthanol ou DMSO) à t_0

$V_{GSU} \text{ témoin } t+\Delta t$ = volume du pic de GSU dans l'échantillon témoin (sans inhibiteur \pm méthanol ou DMSO) à $t+\Delta t$

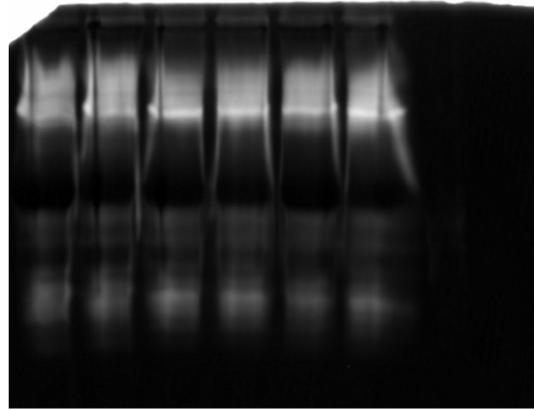


Figure C-10 : Exemple de mise en évidence d'activités protéolytiques sur gel (zymogramme).

Le gel de polyacrylamide contient 0,1 % de gélatine. Les protéases de l'extrait protéique dégradent la gélatine. Après coloration au bleu de Coomassie qui colore la gélatine présente dans l'ensemble du gel, l'apparition d'une bande claire révèle une dégradation de la gélatine et donc la présence d'une activité protéolytique.



Figure C-11 : Digesteur automatisé (MultiPROBE II, PerkinElmer) de la plateforme protéomique PISSARO de Rouen utilisé pour la digestion trypsique des protéases mises en évidence par zymogrammes.

V.II.2. Activités protéolytique sur zymogrammes (culture « Rosette »)

Pour identifier des protéases impliquées dans la remobilisation du N foliaire aux stades végétatifs (culture « **Rosette** »), l'activité des protéases a également été observée sur des gels contenant de la gélatine comme substrat (zymogrammes) et les protéines correspondantes ont été identifiées par spectrométrie de masse.

a. Zymogrammes

Pour les zymogrammes, les extraits de protéines solubles (cf. §C.V.I.) des 3 répétitions biologiques ont été poolés et un total de 75 µg de protéines ont été utilisés. Après l'ajout de tampon Laemmli sans β-mercaptoethanol (Laemmli, 1970), les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (gel de concentration de polyacrylamide (5.5 % ; p/v) ; gel de séparation de polyacrylamide (10 % ; p/v)) contenant de la gélatine à 0,1 % (p/v). Après la migration à 200 V dans un tampon de migration Tris/SDS/Glycine (25mM / 0,1 % / 192mM ; pH 8,8), les gels ont été incubés 45 minutes dans 25 mL de 2-propanol à 25 % puis rincés à l'eau ultrapure. Les gels ont ensuite été incubés sous agitation pendant 16 h à 30°C dans 100 mL de tampon sodium acétate (100 mM, pH 5) contenant du dithiothréitol (DTT) à 10 mM. Après l'incubation, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie R-250 à 0,25 %, dilué dans du méthanol 50 % (v/v) et de l'acide acétique 10 % (v/v).

Le bleu de Coomassie colorant les protéines en bleu, la dégradation de la gélatine par les protéases de l'extrait protéique provoque l'apparition d'une bande claire (Figure C-10). Les gels ont ensuite été scannés (système GelDoc) et analysés par le logiciel Image Lab.

b. Identification des protéases impliquées dans les activités protéolytiques mises en évidence sur zymogrammes

L'identification des protéases détectées sur les zymogrammes a été effectuée par spectrométrie de masse à la plateforme protéomique PISSARO de Rouen. Les bandes claires mettant en évidence une activité protéolytique ont été excisées et lavées plusieurs fois avec une solution d'hydrogencarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃, Sigma). Après une déshydratation dans une solution d'acétonitrile (CH₃CN) et un séchage (Speed-vac), les échantillons ont subi une digestion trypsique grâce à un digesteur automatique (MultiPROBE II, Perkin-Almer ; Figure C-11). Pour cette digestion trypsique robotisée, les échantillons ont été plongés dans une solution de trypsine à 15 ng.µL⁻¹ (Promega) préparée

dans du NH_4HCO_3 à 20 mM, puis incubés à 37°C sous agitation toute la nuit. Les peptides issus de la digestion trypsique ont été repris dans une solution d'extraction des peptides (20 μL d'acétonitrile à 20 mM et 20 μL de NH_4HCO_3 à 20 mM).

Une analyse nanoLC MS/MS a ensuite été effectuée. Pour cela, l'extrait peptidique a été re-suspendu dans 10 μL d'une solution aqueuse d'acétonitrile à 5 % (v/v) et d'acide formique à 0,2 % (v/v). Les échantillons (5 μL) ont ensuite été injectés sur le système de nanochromatographie (Ultimate, Dionex, Voisins-le-Bretonneux). Les peptides ont été enrichis puis dessalés sur une colonne de pré-concentration avant d'être séparés sur une colonne C_{18} (Pepmap C_{18} , diamètre interne 75 μm). Un gradient linéaire de 45 minutes (de 10 à 45 % d'acétonitrile dans 0,2 % d'acide formique) a été programmé à un débit de 200 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$. L'éluat a ensuite été analysé sur le système Q-Trap (Applied Biosystems) et les ions entrant dans le spectromètre de masse ont été analysés en continu. Le passage en mode MS/MS a permis d'obtenir le spectre de fragmentation des peptides, et la liste des pics sur les spectres MS/MS ont été extraits et comparés aux bases de données (NCBIInr, Brassica EST database (Brassica Genome Gateway 2007¹⁰)), via l'outil bio-informatique MASCOT Daemon (Matrix Science¹¹) pour identifier les protéases.

V.III. Analyses de l'activité de la glutamine synthétase (GS) et la glutamate deshydrogénase (GDH) de la feuille source (culture « Graines »)

L'exportation des acides aminés est supposé efficace mais leur conversion en forme transportable pourrait être la clé d'une amélioration de la remobilisation du N foliaire. Pour déterminer si la conversion des acides aminés est impliquée dans l'efficacité de remobilisation du N foliaire post-montaison, des mesures du niveau d'accumulation (cf. §C.V.IV) et d'activité de 2 enzymes permettant la synthèse des formes transportables d'acides aminés (glutamine synthétase (GS) et glutamate deshydrogénase (GDH)) ont été effectuées en collaboration avec l'équipe de Céline Masclaux-Daubresse à l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) à l'INRA de Versailles.

Pour ces activités enzymatiques, 150 mg de matière fraîche congelée, préalablement broyée dans de l'azote liquide, ont été mélangés avec du polyvinylpyrrolidone (PVP) et 1 mL de tampon d'extraction (10 mM Na-EDTA, 10 mM MgCl_2 , 250 mM Tris-HCl pH 7,6, 13,3 mM β -mercaptoéthanol et 2 mM leupeptine). Après une centrifugation de 10 minutes à 13 000 g (4°C), le surnageant

¹⁰ <http://brassica.bbsrc.ac.uk/>

¹¹ <http://www.matrixscience.com/>

Mesures d'activité Contrôle Gamme étalon

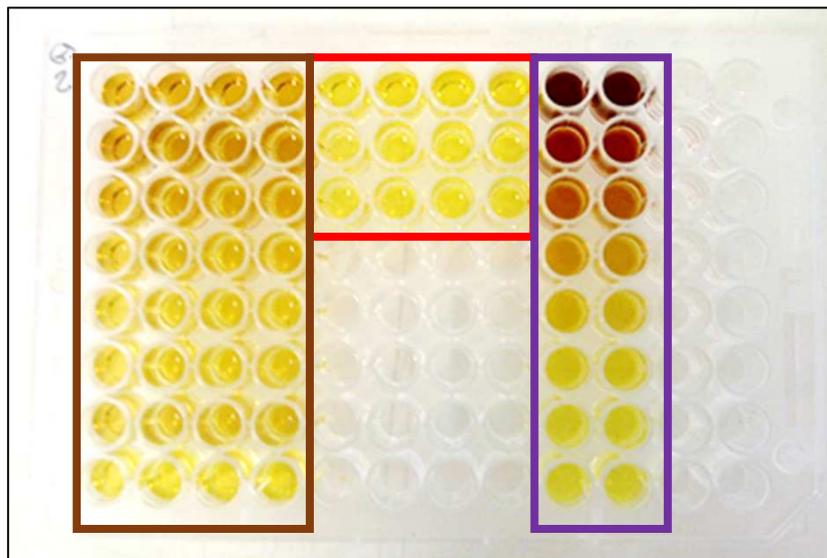


Figure C-12 : Exemple de dosage de l'activité de la glutamine synthétase (GS).

L'activité GS est quantifiée par l'apparition d'un sidérophore capable de chélater le fer, le gamma-glutamylhydroxamate (AGH), produit par la réaction catalysée par la GS entre l'hydroxylamine (NH_2OH) et le glutamate. La chélation du fer entraîne une couleur brune dont la densité optique est mesurable à 540 nm (selon la méthode de O'Neal et Joy, 1973)

contenant les protéines a été prélevé, et la concentration en protéines a été estimée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976)(Figure C-8).

La mesure de l'activité GS a été réalisée par la quantification de l'apparition d'un sidérophore, le γ -glutamylhydroxamate (AGH), produit par la réaction catalysée par la GS entre l'hydroxylamine (NH_2OH) et le glutamate (O'Neal and Joy, 1973). Ce sidérophore est capable de chélater le fer et se faisant, colore l'extrait en une couleur brune mesurable à 540 nm (Figure C-12). Dans une microplaque de 96 puits, les réactifs suivants ont été ajoutés aux 50 μL d'extrait protéique : 60 μL de tampon de réaction (Tris-HCl pH 7,6), 20 μL de tampon AMIX (MgSO_4 150 mM, glutamate 600 mM, hydroxylamine 45 mM et EDTA 30 mM, pH 7,6) et 20 μL d'ATP (60 mM). Pour les échantillons contrôles, l'ATP a été remplacé par le tampon de réaction. Après 30 minutes d'incubation à 30°C sous agitation, 150 μL de tampon STOP (FeCl_3 370 mM, acide trichloroacétique (TCA) 200 mM et HCl 1,79 M) ont été ajoutés. La microplaque a été centrifugée à 4000 g pendant 10 minutes et 200 μL du surnageant ont été transférés dans une plaque propre. L'absorbance a été mesurée à 540 nm et l'activité a été estimée *via* une gamme étalon d'AGH (de 0 à 20 mM).

L'activité de la glutamate déshydrogénase (GDH) se fait sur les mêmes extraits protéiques que l'activité de la GS. La GDH est une enzyme pouvant fonctionner dans le sens aminant ou désaminant. Notre objectif étant de déterminer si la GDH pouvait avoir un rôle dans la détoxification de l'ammonium issu de la protéolyse et dans la synthèse de glutamate (forme d'azote transportable dans le phloème), seule son activité aminante a été étudiée en détail. Pour cela, 250 μL de tampon de réaction (α -cétoglutarate 13 mM, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 50 mM, NADH 0,25 mM, CaCl_2 1 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8) ont été ajoutés à 50 μL d'extrait protéique (Masclaux *et al.*, 2000). Pour les contrôles négatifs, le $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a été remplacé par du tampon Tris-HCl. L'activité aminante a été mesurée *in vitro* par la disparition du cofacteur NADH, déterminée en cinétique (60 mesures toutes les 30 secondes) par une lecture d'absorbance à 340 nm par un lecteur de microplaque.

V.IV. Immunodétections de protéines d'intérêts (cultures « Rosette » et « Graines »)

Des immunodétections ont été réalisées afin de déterminer (i) le niveau d'accumulation des GS cytosoliques (GS1) et chloroplastidiales (GS2) pour la culture « Graines » et (ii) les niveaux d'abondance de protéines cibles des protéases (grande (GSU) et petite (PSU) sous-unités de la Rubisco ; protéines Lhcb3 et D1 du photosystème II (PSII)) et des protéases FtsH supposées impliquées dans leur dégradation pour les génotypes Aviso, Oase, Samourai et Californium de la culture « Rosette ».

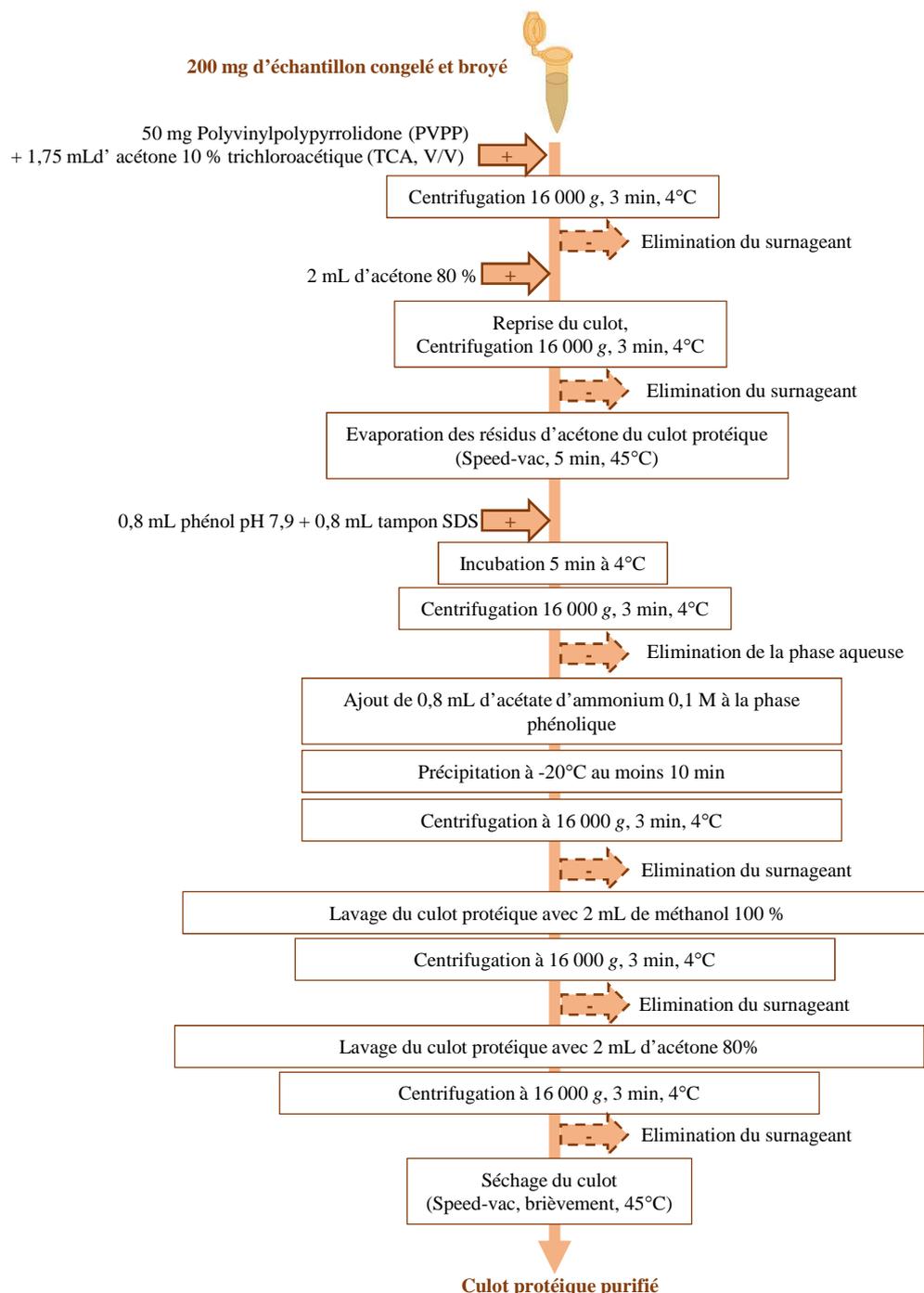


Figure C-13 : Protocole d'extraction des protéines membranaires pour la quantification par Western Blot des protéines lhcb3, D1 et des protéases FtsH.

Tampon SDS (30 % saccharose (p/v), 2 % SDS (p/v), 0,1M Tris-HCl (p/v), 0,5 % β -mercaptoéthanol (v/v), pH 8).

Tableau C-3 : Tampon R2D2 utilisé pour la solubilisation des protéines membranaires (d'après Mechin *et al.*, 2003).

Produits	Concentration
Urée	5 M
Thiourée	2 M
CHAPS	2 % (p/v)
N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate	2 % (p/v)
Dithiothréitol (DTT)	20 mM
Tris (2-carboxyethyl) phosphine	5 mM
IPG buffer (GE Healthcare)	0,5 %

Pour la culture « **Graines** », les 4 répétitions biologiques des extraits de protéines solubles obtenus pour la mesure des activités protéolytiques (cf. §C.V.I.) ont été poolées et 10 µg de protéines ont été déposés sur gel. Pour la culture « **Rosette** », les 3 répétitions biologiques ont également été poolées, mais 15 µg de protéines ont été utilisées pour la détection de toutes les protéines.

Les protéines du PSII (Lhcb3 et D1) et les protéases FtsH étant membranaires, une extraction de protéines membranaires a été réalisée.

V.IV.1. Extraction des protéines membranaires pour la détection de lhcb3, D1 et FtsH par western blot

Deux cent milligrammes d'extrait foliaire préalablement broyés dans l'azote liquide en présence de PVPP, ont été mélangés à 1,75 mL d'acétone contenant 10 % d'acide trichloroacétique (TCA ; v/v) (Figure C-13). Après une centrifugation à 16 000 g pendant 3 min à 4°C, le culot a été repris dans 2 mL d'acétate d'ammonium 0,1 M dissous dans du méthanol 80 %. L'homogénat a été centrifugé à 16 000 g, 3 min (4°C) et le culot a de nouveau été lavé avec 2 mL d'acétone à 80 %. Après une nouvelle centrifugation de 16 000 g (3 min, 4°C), le culot a été séché sous vide (Speedvac concentrator 5301, Eppendorf, France) pendant 5-10 min à 45°C. Le culot a été repris dans 0,8 mL de phénol à pH 7,9 et 0,8 mL de tampon SDS (30 % saccharose (p/v), 2 % SDS (p/v), 0,1 M Tris-HCl (p/v), 0,5 % β -mercaptoéthanol (v/v), pH 8). Après une incubation de 5 min à 4°C et une centrifugation de 16 000 g (3 min, 4°C), la phase phénolique a été récupérée, transférée dans un nouveau tube et complétée avec 1,75 mL d'acétate d'ammonium 0,1 M. Afin de permettre la précipitation des protéines grâce à l'acétate d'ammonium, les échantillons ont été placés à -20°C entre 2h et une nuit entière. Après une centrifugation à 16 000 g (5 mins, 4°C), le culot a été lavé successivement avec 1,75 mL de méthanol 100 % et 1,75 mL d'acétone 80 %. Les résidus d'acétone ont été évaporés après quelques minutes d'évaporation sous vide. Le culot protéique a ensuite été repris dans 400 µL de tampon R2D2 dont la composition est indiquée Tableau C-3.

V.IV.2. Transfert des protéines sur membrane et immunodétections

Après une dénaturation 5 minutes dans l'eau bouillante en présence de tampon Laemmli 2X (Laemmli, 1970) contenant du β -mercaptoéthanol (5 % ; v/v), les protéines ont été séparées en fonction de leur masse moléculaire par SDS-PAGE comprenant un gel de concentration (5 % de polyacrylamide, p/v) et un gel de

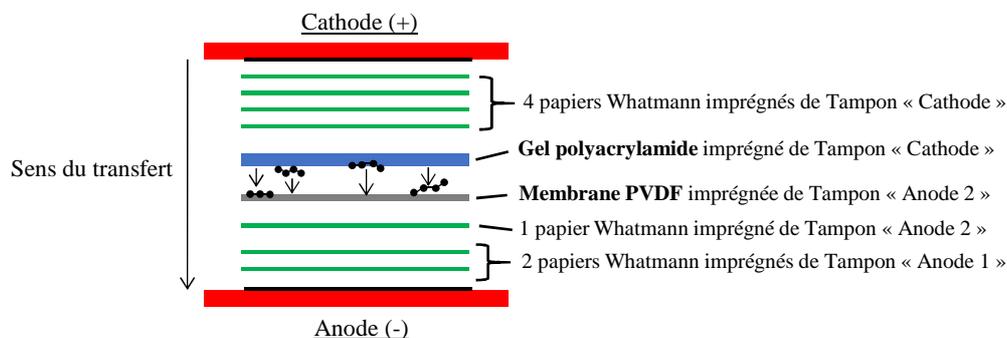


Figure C-14: Dispositif mis en place pour le transfert électrophorétique semi-sec des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de PVDF (polyvinylidene difluoride).

Système « western blot Milliblot-graphite electroblotter », MILLIPORE.

Tableau C-4 : Composition des tampons utilisés pour le transfert électrophorétique semi-sec des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de PVDF (Western Blot).

Produits	Tampon « Anode 1 »	Tampon « Anode 2 »	Tampon « Cathode »
Tris-Base	0,3 M	0,025 M	
SDS	0,1 %		
Méthanol	35 %		20 %
Glycine			0,04 M
pH	10,4		9,4

Tableau C-5 : Récapitulatif des immunodétections réalisées sur les 2 cultures.

Protéines cibles	Quantité de protéines	Dilution de l'anticorps primaire	Dilution de l'anticorps secondaire	Méthode de détection de l'anticorps secondaires
GS1 / GS2	10 µg	1/100	1/12 000	Phosphatase alcaline
GSU	15 µg	1/10 000 + lait 5%		
PSU		1/5 000 + lait 5%		
Lhcb3		1/2 000 + lait 5%		
FtsH		1/1 000 + lait 5%		
D1		1/20 000 + lait 5%	1/10 000	Peroxydase de raifort

D1 : protéine D1 du photosystème II ; FtsH : protéases « Filamentation Temperature-Sensitive H » ; GS1/GS2 : glutamine synthétase 1/ glutamine synthétase 2 ; GSU : grande sous-unité de la Rubisco ; Lhcb3 : protéine lhcb3 du « light harvesting complex » du photosystème II ; PSU : petite sous-unité de la Rubisco.

séparation (polyacrylamide à 10 %, p/v). L'électrophorèse s'est faite dans le tampon de migration Tris / SDS / Glycine (25mM / 0,1 % / 192mM ; pH 8,8) (Laemmli, 1970) et la migration a duré en moyenne 1h30 à 200 V (75 mA).

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane polyvinylidene difluoride (PVDF). Ce transfert électrophorétique « semi-sec » a été réalisé *via* le système de Western Blot en graphite de MILLIPORE (Milliblot-graphite electroblotter système) (Figure C-14). Après l'électrophorèse, le gel a été équilibré dans le tampon « Cathode » pendant 20 minutes tandis que la membrane a été plongée successivement dans du méthanol 100 % (15 secondes), de l'eau ultrapure (10 minutes) pour être finalement équilibrée dans le tampon « Anode 2 » (10 minutes). La composition des différents tampons utilisés est décrite dans le Tableau C-4. Le transfert a duré 20 minutes (100 V, 2,5 mA.cm⁻²).

Après 3 lavages de 5 min dans du tampon TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 à 0,15 % (v/v), pH 8), la membrane a été incubée 2h avec l'anticorps primaire puis, après 7 lavages au TBST et 3 au TSB de 5 min (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8), la membrane a été incubée 1h30 avec l'anticorps secondaire.

Afin de permettre une détection optimale, la dilution des anticorps et leurs détections ont été adaptées aux anticorps primaires et secondaires utilisés (Tableau C-5).

Pour la culture « **Graines** », la détection des enzymes GS1 (39 kDa) et GS2 (44 kDa), discriminées par leur masse moléculaire, a été faite grâce à des anticorps polyclonaux de lapin (1/100) obtenue *via* EUROGENTEC (Seraing, Belgium ; peptide : AYGNERRLTG) (Lemaitre *et al.*, 2008). L'anticorps primaire a été détecté *via* un anticorps secondaire de chèvre (1/12 000) couplé à la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline permet de détecter l'hybridation des anticorps sur la protéine cible *via* l'activité de la phosphatase alcaline (Blake *et al.*, 1984) en présence de ses 2 substrats : le p-nitro blue tetrazolium (NBT, Bio-Rad[®]) et le 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine salt (BCIP, Bio-Rad[®]), préparé dans un tampon de révélation (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 6H₂O 5 mM, pH 9,5). Après 5 à 10 minutes, la réaction a été arrêtée par des lavages successifs dans l'eau ultrapure. Les membranes ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Image Lab.

Pour la culture « **Rosette** », les anticorps primaires utilisés pour la détection de la GSU (1/10 000), la PSU (1/5 000), lhcb3 (1/2 000), D1 (1/20 000) et FtsH (1/1 000) sont des anticorps polyclonaux de lapin commerciaux (Agrisera[®]). Toutes les incubations d'anticorps primaires de la culture « Rosette » ont été effectuées dans une solution contenant du lait Régilait à 5 % (p/v) pour limiter les hybridations non spécifiques.

Les anticorps primaires reconnaissant les protéines GSU, PSU, lhcb3 et FtsH ont été détectés par les anticorps secondaires de chèvre anti lapin couplés à la phosphatase alcaline (1/12 000). En revanche, cette méthode de détection n'étant pas assez sensible pour la détection des anticorps primaires ciblant la protéine D1, ces anticorps secondaires ont été remplacés par des anticorps de chèvre anti lapin couplés à la peroxydase de raifort (1/10 000). La peroxydase de raifort des anticorps secondaires est utilisée en conjonction avec un agent luminescent, et le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéines. La détection s'est faite *via* le ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer, Courtaboeuf, France).

VI. Analyses moléculaires : progression de la sénescence foliaire au niveau plante entière (culture « Rosette »)

La progression de la sénescence foliaire des 4 géotypes de la culture « **Rosette** » représentatifs des différentes réponses à la limitation en nitrate (Aviso, Oase, Samourai et Californium) a été déterminée *via* l'estimation du dernier rang foliaire sénescant selon la méthode s'appuyant sur l'indicateur moléculaire *SAG12/Cab* (Gombert *et al.*, 2006). Cette méthode se base sur l'induction de l'expression du gène codant une protéase à cystéine (*SAG12*), spécifique de la sénescence développementale, et la répression concomitante de l'expression du gène *Cab*, codant une « chlorophyll a/b binding protein » (cf. §B.III.I.2., Figure B-25). Une extraction d'ARN, suivie d'une transcription reverse pour l'obtention d'ADN complémentaire (ADNc) puis une réaction de polymérase en chaîne (PCR) ont été effectuées.

VII. Extraction d'ARN et transcription reverse

Cent cinquante milligrammes de matière fraîche ont été broyés dans l'azote liquide puis plongés dans un mélange contenant 750 µL de phénol pH 4,3 et 750 µL de tampon d'extraction (LiCl 0,1 M, Tris Base 0,1 M, EDTA 10M, SDS 1 %, pH 8) préalablement incubé à 80°C sous hotte. Les échantillons ont été vortexés énergiquement avant l'ajout de 750 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1 v/v). Les tubes ont été vortexés à nouveau, puis centrifugés 5 min à 20 000 g (4°C). Le surnageant a été prélevé et précipité pendant une nuit à 4°C en présence de 750 µL de LiCl 4 M. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 20 min à 15 000 g (4°C). Le surnageant a été éliminé et le culot contenant les ARN a été repris dans 100 µL d'eau stérile. Ces ARN ont été purifiés par le biais des kits Qiagen® RNeasy mini kit selon les recommandations du fabricant. La quantité d'ARN obtenue a été mesurée au spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf®) à 260 nm (une unité d'absorbance correspond à 40 µg.mL⁻¹ d'ARN) et la contamination protéique a été évaluée grâce au

rapport des absorbances mesurées à 260 et à 280 nm (un rapport proche de 2 indique une faible contamination par les protéines). Quatre microlitres de tampon de charge (0,025 % de bleu de bromophénol (p/v), 0,025 % de xylène cyanole (p/v), 3 % de glycérol (v/v), 2,5 µL de bromure d'éthidium (BET à 10 mg.mL⁻¹), 100 µL de MOPS 10X, 615 µL de formaldéhyde désionisé et 188 µL de formaldéhyde) (Sambrook *et al.*, 1989) ont été ajoutés à 1 µg d'ARN et l'ensemble a été dénaturé 9 minutes à 70°C. Les échantillons dénaturés ont été déposés sur un gel TAE agarose (1,2 % p/v) où ils ont été séparés par électrophorèse (15 minutes, 100 mV) (Sambrook *et al.*, 1989). La visualisation de la migration des ARN sous UV *via* le logiciel Image Lab a permis de vérifier leur qualité.

Une transcription reverse a été effectuée sur les échantillons d'ARN purifiés. Le mix réactionnel comprend : 2,5 µL de mix Iscrip 5X (contenant les amorces et les oligopeptides ; Bio-Rad®), 0,5 µL d'enzyme reverse transcriptase et 1 µg d'ARN. Le mélange a été incubé 5 min à 25°C, 30 min à 42°C, puis la réaction a été stoppée (5 min à 85°C). L'ADNc ainsi obtenu a été utilisé pour les PCR.

VI.II. « Polymerase Chain Reaction » (PCR)

Pour déterminer la progression de la senescence, trois PCR semi-quantitatives indépendantes ont été réalisées : une seule pour les 2 gènes *SAG12-1* (AF089848) et *SAG12-2* (AF089849) (amorce sens 5'-GGCAGTGGCACACCAICCGGTTAG-3' et amorce anti-sens 5'-AGAAGCITTCATGGCAAGACCAC-3'), une pour le gène *Cab* du LHCII (AY288914) (amorce sens 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3' et amorce anti-sens 5'-CCTCCITCGCTGAAGATCTGT-3') et une pour le gène de référence *EF1-1* (DQ312264) (amorce sens 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3' et amorce anti-sens 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3'). Chaque PCR a été réalisée sur chacune des répétitions biologiques.

Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de 50 ng d'ADNc en présence d'un tampon de PCR 1X (Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X100 à 1 %, BSA 0,2 mg.mL⁻¹), de 200 µM de dNTPs, 0,2 µM d'amorces sens et anti-sens et de 0,4 M de Taq polymérase (5 U/µL, Qiagen®, France). La PCR s'est composée d'une étape initiale de dénaturation de l'ADNc à 95°C (5 min) puis 35 cycles (gènes *SAG12* et *EF1-1*) ou 18 cycles (gène *Cab*) comprenant : 30 sec à 95°C, 30 sec à 58°C (température d'hybridation des amorces) et 1 min à 72°C. Une dernière étape de 10 min à 72°C (fin d'élongation) a clôturé le programme de PCR.

Les deux amplimères obtenus pour les gènes *SAG12* (267 paires de bases) et *Cab* (290 paires de bases) ont été visualisés sur gel d'agarose et les gels ont ensuite été

analysés par le logiciel Image Lab pour la quantification des transcrits des gènes *SAG12* et *Cab*, normalisés par rapport aux transcrits du gène *EF1*.

VII. Analyses statistiques (culture « Rosette » et « Graines »)

Pour toutes les analyses réalisées sur les 2 cultures, la normalité des données a été testée avec le test de Ryan-Joiner à 95 %. Les analyses de variance (ANOVA) et les tests de Tuckey ont été utilisés pour comparer les moyennes. Quand la normalité des données n'était pas respectée, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé. Le seuil a été fixé à 5 %. La source de variations et les corrélations ont respectivement été déterminées par une ANOVA et un test de Pearson (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$). Tous ces tests statistiques ont été effectués avec le logiciel R. Trois et quatre répétitions biologiques ont été utilisées pour la culture « **Rosette** » et « **Graines** », respectivement. Toutes les données présentées sont exprimées par la moyenne \pm l'erreur standard (SE).

CHAPITRE D
RESULTATS

CHAPITRE D : RESULTATS

I. La remobilisation de l'azote au stade végétatif

Caractérisation des traits physiologiques et des protéases impliquées dans une forte efficacité d'usage du N et de remobilisation du N foliaire chez le colza d'hiver au stade végétatif

Les engrais azotés étant chers et susceptibles d'engendrer une pollution environnementale, leur utilisation doit être diminuée. Cependant, une réduction des intrants azotés au stade rosette réduit la croissance, conduisant à une diminution du rendement grainier chez le colza. Malgré la faible efficacité d'usage du N (EUA) observée chez le colza d'hiver, aucune étude n'a permis de mettre clairement en évidence le (ou les) facteur(s) limitant(s) l'EUA au stade végétatif. Quelques travaux ont suggéré que cette faible EUA serait en partie due à une faible efficacité de remobilisation du N (ERA) foliaire. Par conséquent, comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans une ERA foliaire efficace est un prérequis pour trouver de nouvelles pistes de sélection de variétés adaptées à de faibles intrants N.

Ces travaux avaient pour objectifs de caractériser :

- La composante de l'EUA (absorption, remobilisation et/ou assimilation) limitant la production de biomasse au stade rosette en situation d'apport en nitrate limitant
- Les mécanismes cellulaires (protéolyse et exportation des produits de protéolyse) associés à une remobilisation efficace du N foliaire au stade rosette

Pour déterminer précisément la composante limitant l'EUA, 10 génotypes de colza d'hiver ont été cultivés au stade rosette en serre sur 2 niveaux d'alimentation en nitrate (3,75 mM vs 0,375 mM). Ces génotypes ont ensuite été classés en fonction de leur production de biomasse et de leur efficacité de remobilisation du N foliaire et ont permis de faire ressortir 4 groupes de génotypes ayant des profils de réponse contrastés à une limitation en nitrate. Les flux de N plante entière ont été déterminés *via* un marquage de type « pulse-chase » au ¹⁵N pour un génotype emblématique de ces 4 groupes. Pour étudier les mécanismes cellulaires associés à une forte ERA foliaire, plusieurs paramètres ont été mesurés dans une feuille sénescence chez les 4 génotypes emblématiques des 4 profils de réponse à une limitation en nitrate : la remobilisation du N, l'exportation des acides aminés, la protéolyse (dégradation des protéines solubles, abondance de la Rubisco et des protéines D1 et lhcb3 du PSII, activités protéolytiques, abondance des protéases FtsH).

Ce chapitre regroupe 2 articles :

➤ **Article 1 :**

A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. (2015) *Journal of Experimental botany*, (JEXBOT/2014/137661, sous presse).

Girondé Alexandra^{1, 2, 3}, Poret Marine^{1, 2, 3}, Etienne Philippe^{1, 2, 3}, Trouverie Jacques^{1, 2, 3}, Bouchereau Alain⁴, Le Cahérec Françoise⁴, Leport Laurent⁴, Orsel Mathilde^{4,5,6}, Niogret Marie-Françoise⁴, Deleu Carole⁴, Avice Jean-Christophe^{1, 2, 3*}.

¹ *Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France*

² *UCBN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France, F-14032 Caen, France*

³ *INRA, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France*

⁴ *INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, F-35653 Le Rheu, France*

⁵ *Université d'Angers, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France*

⁶ *AgroCampus-Ouest, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France*

➤ **Article 2 :**

A comparative study of proteolytic mechanisms during leaf senescence of four genotypes of winter oilseed rape highlighted relevant physiological and molecular traits for NRE improvement. Soumission prévue à *Plant Science* en février 2015.

Girondé Alexandra^{1, 2, 3}, Poret Marine^{1, 2, 3}, Etienne Philippe^{1, 2, 3}, Trouverie Jacques^{1, 2, 3}, Bouchereau Alain⁴, Le Cahérec Françoise⁴, Leport Laurent⁴, Niogret Marie-Françoise⁴, Avice Jean-Christophe^{1, 2, 3*}.

¹ *Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France*

² *UCBN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France, F-14032 Caen, France*

³ *INRA, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France*

⁴ *INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, F-35653 Le Rheu, France*

I.I. Article 1 : A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape.

ABSTRACT

Oilseed rape, a crop requiring a high level of N fertilizers, is characterized by low N use efficiency. To identify the limiting factors involved in the N use efficiency of winter oilseed rape, the response to low N supply was investigated at the vegetative stage in ten genotypes by using long-term pulse-chase ¹⁵N-labelling and studying the physiological processes of leaf N remobilization.

Analysis of growth and components of N use efficiency allowed four profiles to be defined. Group 1 was characterized by an efficient N remobilization under low and high N conditions but by a decrease of leaf growth under N limitation. Group 2 showed a decrease in leaf growth under low N supply that was associated to a low N remobilization efficiency under both N supplies despite a high remobilization of soluble proteins. In response to N limitation, Group 3 is characterized by an increase in N use efficiency and leaf N remobilization compared to high N that is not sufficient to sustain the leaf biomass production at a similar level than non-limited plants. Genotypes of Group 4 subjected to low nitrate were able to maintain leaf growth to the same level as under high N. The profiling approach indicated that enhancement of amino acid export and soluble protein degradation was crucial for N remobilization improvement. At the whole plant level, N fluxes revealed that Group 4 showed a high N remobilization in source leaves combined with a better N utilization in young leaves. Consequently, an enhanced N remobilization limits N loss in fallen leaves, but this remobilized N needs to be efficiently utilized in young leaves to improve N use efficiency.

Short statements: Genotypic variations in *Brassica napus* reveal four profiles of response to nitrate limitation and that genotypes characterized by efficient N remobilization and N utilization have the highest N use efficiency.

KEYWORDS

Brassica napus, genotypic variability, nitrogen remobilization efficiency, nitrogen use efficiency, nitrogen utilization efficiency, amino acids, soluble proteins

ABBREVIATIONS

N, nitrogen; NUE, nitrogen use efficiency; NUtE, nitrogen utilization efficiency; NRE, nitrogen remobilization efficiency; NAE, nitrogen assimilation efficiency; HN, high nitrogen;

LN, low nitrogen; FM, fresh matter; LB_{prod} , leaf biomass production; NRE_{leaf} , nitrogen remobilization in the source leaves; $Remob_{prot}$, remobilization of soluble proteins; $Remob_{aa}$, remobilization of amino acids; Rubisco, Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase.

INTRODUCTION

The gain in crop productivity has been associated with a 20-fold increase in the use of N fertilizer during the past five decades (Glass, 2003) and it is expected to increase at least 3-fold by 2050 (Good *et al.*, 2004; Tilman, 1999). Oilseed rape (*Brassica napus* L.), cultivated for its seeds (65 058 240 tonnes worldwide in 2012; source FAO) from which oil is extracted for use in human food and animal feeding (meal) as well as for non-food uses (biofuel), is the third most cultivated oleaginous crop worldwide. However, oilseed rape is characterized by a high requirement of N fertilizers (160-250 kg.ha⁻¹) to obtain a sufficient seed yield (Rathke *et al.*, 2005). This high demand for N fertilizer can be explained by the fact that only 50% of the N fertilizer is recovered in seeds (Schjoerring *et al.*, 1995), revealing the weak N use efficiency (NUE) of oilseed rape. Since the production of N fertilizers depends on the price of energy, it accounts for the most costly input in crop production (Rothstein, 2007). In addition to a high economic cost, this large N balance surplus increases the risk of environmental pollution. Consequently, in a context of environmentally friendly farming, a reduction in N fertilizer inputs has become imperative (Behrens *et al.*, 2001) and a better understanding of the mechanisms involved in NUE is required to optimize the agri-environmental balance.

The NUE takes into account the capacity to absorb the N from the soil (N uptake efficiency; NU_{pE}) and to efficiently utilize this element within the plant (N utilization efficiency; NU_{tE}). NU_{tE} includes the abilities of plants to assimilate (N assimilation efficiency; NAE) and remobilize N from senescing to growing organs (N remobilization efficiency; NRE). Concerning the NU_{pE} , an efficient N uptake between bolting and flowering appears to be crucial for seed yield of oilseed rape crops (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2007). However, a comparison of N uptake capacity among various Brassica species, clover and ryegrass showed that oilseed rape manifested the highest nitrate uptake capacity during vegetative stages (Lainé *et al.*, 1993), demonstrating a high NU_{pE} for this crop. In addition, a study of four spring oilseed rape genotypes at the vegetative stages showed differences in NUE not explained by NU_{pE} , but were associated with differences in NU_{tE} (determined as changes in dry weight per unit change in N content) (Svecnjak and Rengel, 2006). Differences in NU_{tE} at the vegetative stages were also observed in 11 other genotypes of spring oilseed rape (Balint and Rengel, 2008). In a context of reducing N inputs, even if a higher NU_{pE} can participate in improving the NUE, the optimization of the NU_{tE} may lead to a similar seed yield with lower N input. However, none of previous studies were able to determine if the N assimilation and/or N remobilization were involved in the NU_{tE} variations. Indeed, in these

previous works, the NUtE indices were estimated at the whole plant level, without distinction between N remobilization from senescing organs and assimilation in growing organs.

However, some precision about the limiting factors of NUtE was recently established. Concerning the N assimilation, transgenic approaches targeted to enzymes involved in N metabolism such as glutamine synthetase showed that NADH-dependent glutamate synthase or asparagine synthetase may lead to a significant improvement in NUE in different species (Good and Beatty, 2011; Good *et al.*, 2004; Pathak *et al.*, 2008). For oilseed rape, plants overexpressing alanine aminotransferase (AlaT) needed 40% less N fertilizer to reach a similar yield to the wild type (Good and Beatty, 2011; Good *et al.*, 2007). These results highlighted the importance of efficient N assimilation for NUE. However, a high NAE needs to be correlated to an enhanced N remobilization to limit the N loss through the fallen leaves and, therefore, to improve/maintain seed yield under low N inputs.

The N remobilization is highly related to senescence, which is essential at the whole plant level due to the fact that the mechanisms associated with senescence allow the redistribution of nutrients from old organs to sink organs for growth or storage (Peoples and Dalling, 1988). Indeed, a correlation between the N remobilization and senescence severity was observed during the vegetative growth of *Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2008), *i.e.* during sequential senescence which consists of a remobilization from the older leaves to the younger leaves, along the axis of the plant. In oilseed rape, the N remobilization associated with the sequential senescence is considered as crucial for seed yield (Noquet *et al.*, 2004). However, a residual N in dead leaves up to 3.5% of dry matter was observed as a consequence of a low N remobilization from leaves of oilseed rape (Malagoli *et al.*, 2005b), which can lead to a N loss of up to 100 kg N.ha⁻¹ per year (Dejoux *et al.*, 2000). In addition, a simulation designed *via* a modelling approach that was aimed at identifying the key mechanisms involved in high NUE has suggested that a decrease in the residual N of dead leaves by 1% at the vegetative stages may increase seed yield (up to +15%) in addition to reducing the N loss (Malagoli *et al.*, 2005a). Together, these results suggested that an optimization of NRE is needed to decrease the N loss *via* dropped leaves and, therefore, improve the NUE.

To reach this goal, identification of the NUE limiting factors is required (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). The major form of N storage in leaves is proteins, which can account for 70 to 90% of the reduced N (Peoples and Dalling, 1988). During the N remobilization associated with senescence, proteins are degraded into amino acids by different classes of proteases (Martínez *et al.*, 2008b; Roberts *et al.*, 2012) and the resulting amino acids and/or peptides are exported to the growing organs. The main amino acids transported in the phloem sap of oilseed rape are glutamine and glutamate (Lohaus and Moellers, 2000) and a previous study on cv. Lirajet showed that the amino acid export was not limiting in the vegetative stages (Tilsner *et al.*, 2005). During the N remobilization phase of senescent leaves in oilseed

rape (cv. Capitol), the low amount of amino acids and the over-expression of amino acid transporters (such as AAP1) also suggested an efficient amino acid export (Desclos, 2008). However, these studies were only observed in two genotypes, and, therefore, efficient amino acid export remains to be confirmed in more genotypes.

Because amino acid export probably does not limit leaf N remobilization, the proteolysis mechanisms have been proposed to be crucial for leaf NRE (Avice and Etienne, 2014). Among the soluble proteins, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco; EC 4.1.1.39) contains up to 30% of the N in the mature leaf of C3 plants (Evans, 1989; Kumar *et al.*, 2002; Makino *et al.*, 1984) and this protein is supposed to be an important form of N storage compound that is easy to remobilize (Evans, 1989; Mae *et al.*, 1983; Makino *et al.*, 1984). Consequently, its budget is essential for N management at the whole plant level. Indeed, silencing of CND41, an aspartic protease known to degrade Rubisco (Kato *et al.*, 2001), resulted in a delayed senescence and an accumulation of Rubisco in the older leaves, suggesting a failure in N remobilization (Kato *et al.*, 2004). These results highlighted a key role for proteolysis mechanisms in the foliar N remobilization, especially those associated with Rubisco degradation, but this remains to be clearly demonstrated in a range of genotypes of winter oilseed rape.

Several approaches are possible to study the NUE (Kant *et al.*, 2011) and the genotypic selection of oilseed rape is in progress, but only a few studies have explored its genotypic variability to define the limiting factors of NUE at the vegetative stages. In addition, except for one (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2007), most of these studies were done on spring oilseed rape (Balint and Rengel, 2008; Balint and Rengel, 2011).

By exploring the natural variability of ten winter oilseed rape genotypes in response to ample and limiting nitrate regimes at the rosette stage, the present study aims to identify the main physiological traits related to a high NUE at the vegetative stage. Due to the high N loss that is a consequence of the low leaf NRE (Dejoux *et al.*, 2000; Malagoli *et al.*, 2005b), a profiling study was made with a special focus on foliar N remobilization. The importance of N remobilization at the whole plant level was investigated thanks to long-term pulse-chase $^{15}\text{NO}_3^-$ labelling, allowing the dynamics of N fluxes to be determined at the whole plant level and, therefore, to define accurate indexes of NRE and NUtE. Because proteolysis is a pivotal mechanism involved in foliar N remobilization (Avice and Etienne, 2014), the role of proteolysis in leaf NRE was also studied by estimations of the mobilization of N, amino acids and soluble proteins in a source leaf that became senescent during the experiment.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

Ten genotypes (Aviso, Oase, ES-Astrid, Californium, Lioness, Express, Samourai, Ténor, Darmor and Montégo) were cultivated at the vegetative stages in greenhouse conditions under a thermoperiod of 20°C (day-16h) and 15°C (night-8h). Natural light was supplied by high pressure sodium lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with a PAR (Photosynthetically Active Radiation) of 400 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ at the top of the canopy. After germination, seedlings were transferred into 2.5 L pots containing mixed vermiculite (1V) and perlite (2V) and cultivated with 25% Hoagland nutrient solution (1.25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.25 mM KNO_3 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.25 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM EDTA, $2\text{NaFe}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.7 μM CuSO_4 , 0.1 CoCl_2) renewed twice a week. During this period, plants received 3.75 mM of nitrate labelled with ^{15}N at 2.5 atom% excess to obtain a homogenous labelling in the whole plant (long-term pulse-chase method, Salon *et al.*, 2014). Six weeks after sowing (corresponding to Day 0 (D0) of the experiment), ^{15}N -nitrate labelling was stopped and plants were supplied for 21 days with 25% Hoagland solution (90 mL per plant, per day) containing two different concentrations: high (HN: 3.75 mM) or low nitrate (LN: 0.375 mM). Leaves were numbered in order of their appearance where 1 was the oldest leaf.

At D0, a single mature leaf that was becoming senescent during the experiment was chosen on each plant on the basis of its leaf area (determined by LI-COR 300 area meter, LI-COR, Lincoln, NE, USA) and chlorophyll content (by SPAD: Soil Plant Analysis Development; Minolta, SPAD-502 model). These leaves, called the “source leaves” (mean SPAD value of $52.20 \pm 5.52\%$ of variation; mean leaf area value of $127.91 \text{ cm}^2 \pm 18.60\%$ of variation) corresponded to leaf rank number 11 for ES-Astrid, Californium and Darmor and leaf rank number 12 for the other genotypes. The plants were harvested 14 (D14) and 21 (D21) days after the beginning of N treatment and roots, crown, laminae and petiole of each leaf were separated, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. Dry matter of each organ was determined after being freeze-dried, ground to a fine powder and stored at room temperature in the presence of desiccant for biochemical analyses. Concerning leaves, one half of the lamina was freeze-dried for biochemical studies and the other half was conserved frozen (-80°C) for proteomic and molecular analyses. Growth performance was determined after 21 d of nitrate treatment *via* leaf biomass production (LB_{prod} ; grams of fresh matter (FM) per plant) observed in growing leaf nodes above the source leaf (corresponding to leaves in expanding and emerging leaves).

N and ¹⁵N quantification and whole plant N fluxes

The N amount in source leaves of the ten genotypes was quantified at 0 and 21 days to estimate the foliar N remobilization (NRE_{leaf}). In addition, the total N and ¹⁵N amounts were quantified in all organs at 0 and 21 days for four genotypes, representing four different profiles in terms of growth performance and N management in response to low N supply: Oase_{Gr1} (Group 1), Samourai_{Gr2} (Group 2), Californium_{Gr3} (Group 3) and Aviso_{Gr4} (Group 4). The long-term pulse-chase labelling described above allowed estimation of the N fluxes from remobilization (from source organs to sink organs) and from nitrate uptake at the whole plant level. To simplify the study and calculation of N fluxes, the leaves above the source leaf (called “the younger leaves”), mainly sink leaves, were pooled and the source leaf and leaves below were grouped and considered as being source leaves. The determination of the N and ¹⁵N amounts was performed by an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) linked to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, IsoPrime GV Instruments, Manchester, UK). The calculation used to determine the N fluxes from remobilization or uptake has been previously published (Salon *et al.*, 2014).

Calculation of NUE, NRE and NUtE

The N use efficiency (NUE) was estimated as the LB_{prod} per milligram of N provided in the nutrient solution:

$$NUE = LB_{prod} / QN_{supply}$$

where LB_{prod} refers to the fresh matter (grams) of the leaves above the source leaf, and the QN_{supply} is the N amount (milligrams) provided in the nutrient solution during the 21 days of the experiment.

Based on the N fluxes, the N remobilized in % of N stored in source organs (N remobilization efficiency; NRE) was estimated for Oase_{Gr1}, Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3} and Aviso_{Gr4} as follows:

$$NRE (\%) = \Sigma QN_{remobilization} * 100 / (\Sigma QN_{source\ t} + \Sigma QN_{uptake})$$

where $\Sigma QN_{remobilization}$ corresponds to the total N amount remobilized between t and $t+\Delta t$, $\Sigma QN_{source\ t}$ is the N amount in all source organs at t and the ΣQN_{uptake} corresponds to the amount of N taken up that was allocated to all source organs between t and $t+\Delta t$.

The N utilization efficiency (NUtE), expressed as the LB_{prod} per milligram of N distributed to the younger leaves was calculated using this equation:

$$NUtE = LB_{prod} / QN_{younger\ leaves}$$

where LB_{prod} corresponds to the fresh matter of the younger leaves (grams) and $QN_{\text{younger leaves}}$ is the total N amount (milligrams) distributed (from both remobilization and uptake) to the younger leaves.

Protein quantification in source leaves

Soluble proteins were extracted from 200 mg of frozen fresh matter previously ground in a mortar with liquid nitrogen in the presence of 500 μL of citrate-phosphate buffer (20 mM citrate, 160 mM phosphate, pH 6.8 containing 50 mg of polyvinylpyrrolidone (PVPP)). After centrifugation (1h, 12 000 g, 4°C), the supernatant containing the soluble proteins was transferred to a microtube and the concentration of the soluble protein extract in equivalent bovine serum albumin (BSA) was quantified by protein-dye staining (Bradford, 1976). The remobilization of the soluble proteins ($Remob_{\text{prot}}$) was estimated as:

$$Remob_{\text{prot}} (\%) = 100 - (QProt_{D21} * 100 / QProt_{D0})$$

where $QProt_{D0}$ and $QProt_{D21}$ refer to the amount of soluble proteins (mg.leaf^{-1}) at D0 and D21, respectively.

The amino acid quantification in source leaves

Metabolite extraction and quantitative analyses were made as previously described (Renault *et al.*, 2010). Amino acid analyses were performed from an Acquity reversed-phase ultra-performance liquid chromatography system (Waters Corporation, Milford, MA, USA), coupled with ultraviolet detection (UPLC[®]-UV). Concentrations were expressed in micromoles per leaf ($\mu\text{mol.leaf}^{-1}$). The remobilization of the amino acids ($Remob_{\text{aa}}$) was estimated as:

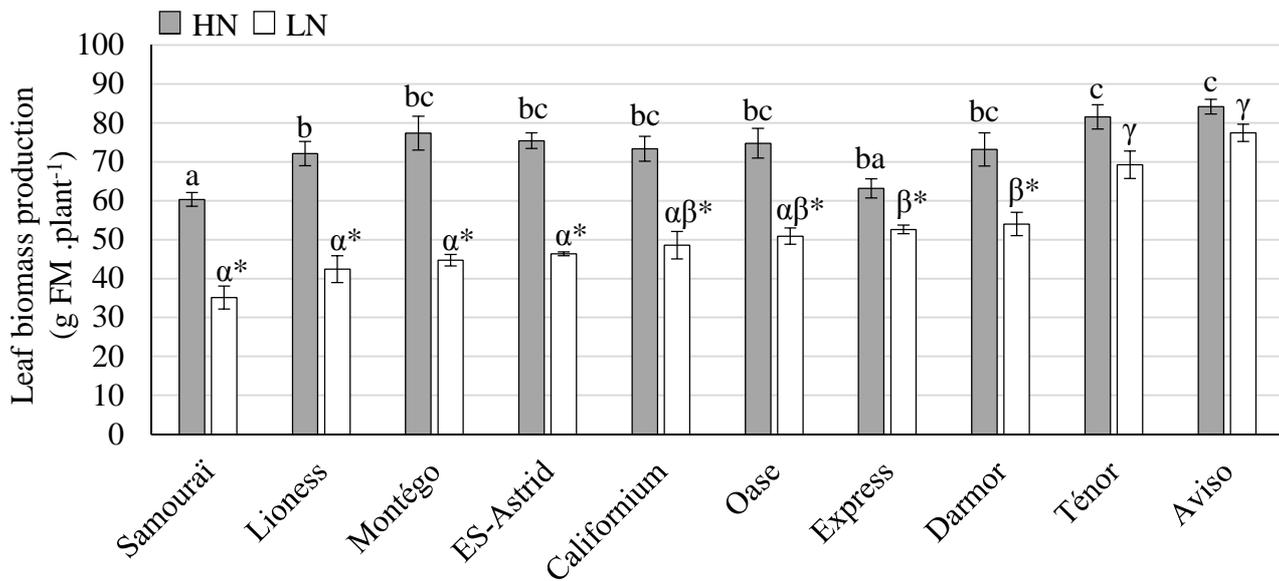
$$Remob_{\text{aa}} (\%) = 100 - (QAA_{D21} * 100 / QAA_{D0})$$

where QAA_{D0} and QAA_{D21} refers to the amount of amino acids per leaf at D0 and D21, respectively.

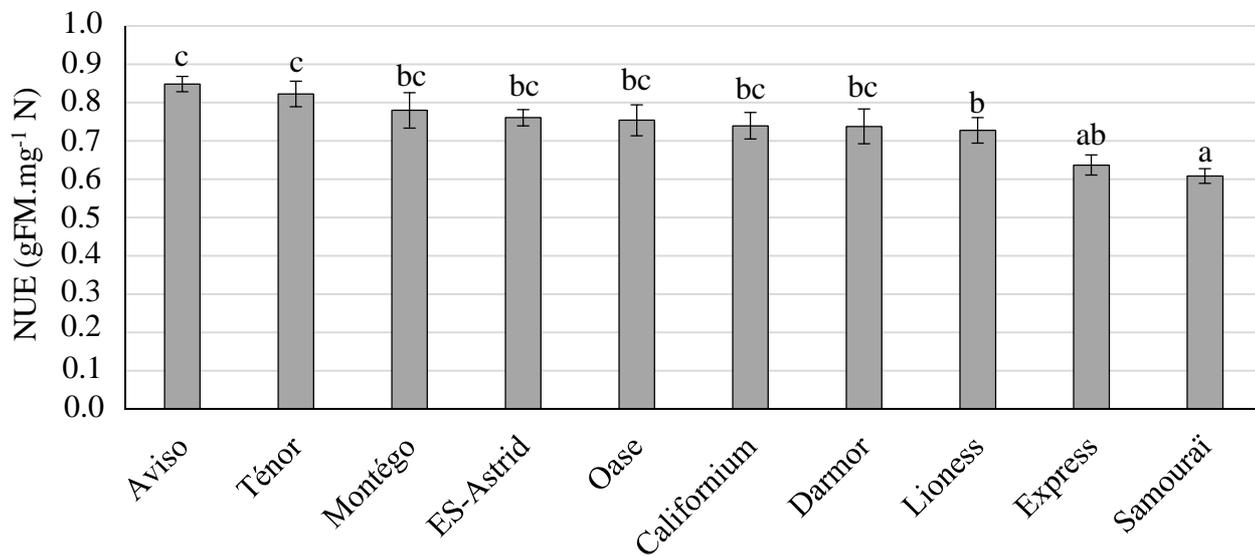
Determination of leaf senescence status

The up-regulation of the *SAG12* gene (encoding a cysteine protease) concomitantly with the down-regulation of *Cab* gene (encoding a Chlorophyll a/b binding protein) during leaf senescence of oilseed rape revealed the spatial progression of senescence and this method was used to determine senescence progression at the whole plant level. The extraction of RNA and the analysis of the molecular indicator, *SAG12/Cab*, after RT-PCR were performed as described by Gombert *et al.* (2006).

A- Leaf biomass production (LB_{prod})



B- NUE HN



C- NUE LN

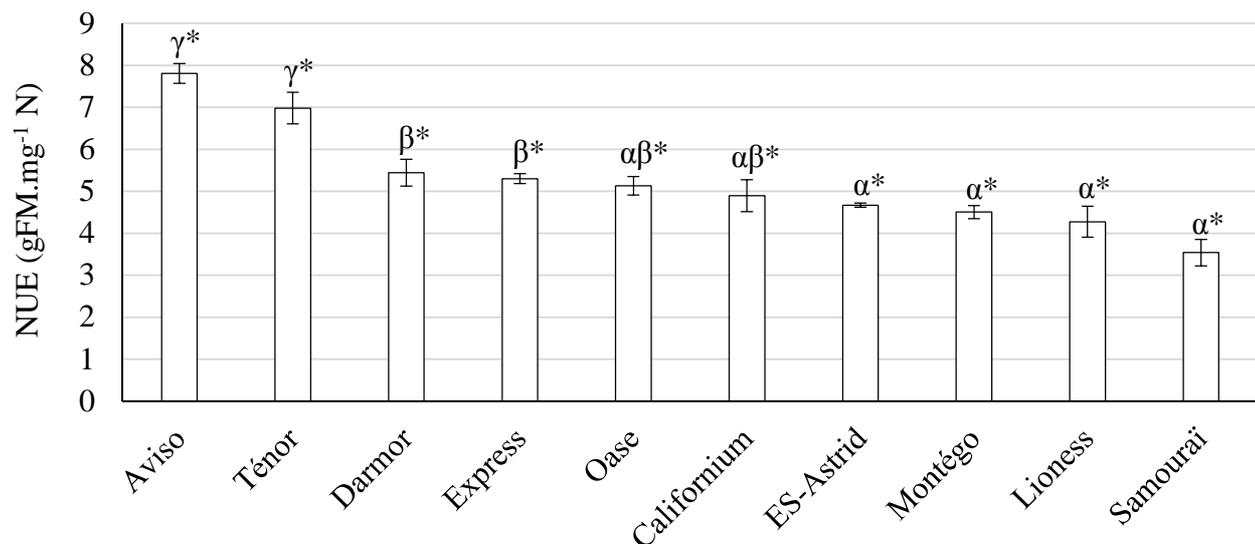


Figure D-1: Growth performance and NUE of ten genotypes supplied with ample N (HN: 3.75 mM nitrate) or low N (LN: 0.375 mM nitrate) over 21 days. Growth was determined as the leaf biomass production in grams per plant (LB_{prod} ; panel A) obtained during the 21 days of N treatment. The NUE was determined as the LB_{prod} per milligram of N provided by the nutrient solution in HN (B) and LN (C) during the 21 days of the experiment. Significant differences ($n=3$, $p<0.05$) were determined between genotypes (indicated by Latin letters a, b, c for HN and Greek letters α , β , γ for LN treatment) and between N treatments (indicated by asterisks).

Statistical analysis

The normality of the data was examined with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test were used to compare the means. When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was carried out. Statistical significance was postulated at $P < 0.05$. The source of variation and the correlations were determined by an ANOVA and the Pearson test, respectively ($*=p < 0.05$, $**=p < 0.01$, $***=p < 0.001$). Three biological repetitions were used ($n=3$) and all the data presented are expressed \pm standard error (SE).

RESULTS

Growth performance and NUE of the ten genotypes

To compare the response to nitrate availability of the ten genotypes at the vegetative stage, the growth performance was investigated as the leaf biomass production per plant (LB_{prod}), expressed as the fresh matter (FM) of growing and emerging leaves during the 21 days of N treatments (Figure D-1; see Materials and Methods for details). The LB_{prod} was strongly impacted by the N supply as well as the genotypes, and an interaction between N treatment and genotype was found ($p < 0.001$; Table D-S1). The NUE (LB_{prod} per milligram of N provided by the nutrient solution during the 21 days; Figure D-1B and D-1C), was negatively correlated to the N supply ($r = -0.91$, $p < 0.001$; Table D-S1) and an N supply x genotype interaction was observed ($p < 0.001$). In High N (HN) conditions, the highest LB_{prod} was observed for Aviso and Ténor (83 g FM.plant⁻¹ on average), followed by Montégo, ES-Astrid, Californium, Oase and Darmor (75 g FM.plant⁻¹ on average; Figure D-1A). In contrast, Express (63 g FM.plant⁻¹) and Samouraï (60 g FM.plant⁻¹) had the lowest LB_{prod} . In high N (HN) conditions, the highest NUE was observed in Aviso and Ténor (0.8 g FM.mg⁻¹ N) and the lowest was observed in Samouraï (0.6 g FM.mg⁻¹ N; Figure D-1B).

Under LN supply, only Aviso and Ténor were able to produce a similar LB_{prod} to that found under HN conditions (Figure D-1A), resulting in the highest NUE for these genotypes (7.8 and 6.9 g FM.mg⁻¹ N, respectively; Figure D-1C). In contrast, the other genotypes showed a lower LB_{prod} under LN compared to HN treatment (Figure D-1A), despite a higher NUE (Figure D-1C). The negative effect of LN conditions on LB_{prod} was more drastic for Lioness, ES-Astrid, Montégo and Samouraï (-41% on average when compared to HN plants; Figure D-1A) leading to the lowest NUE values (from 3.5 g FM.mg⁻¹ N for Samouraï to 4.7 g FM.mg⁻¹ N for ES-Astrid; Figure D-1C).

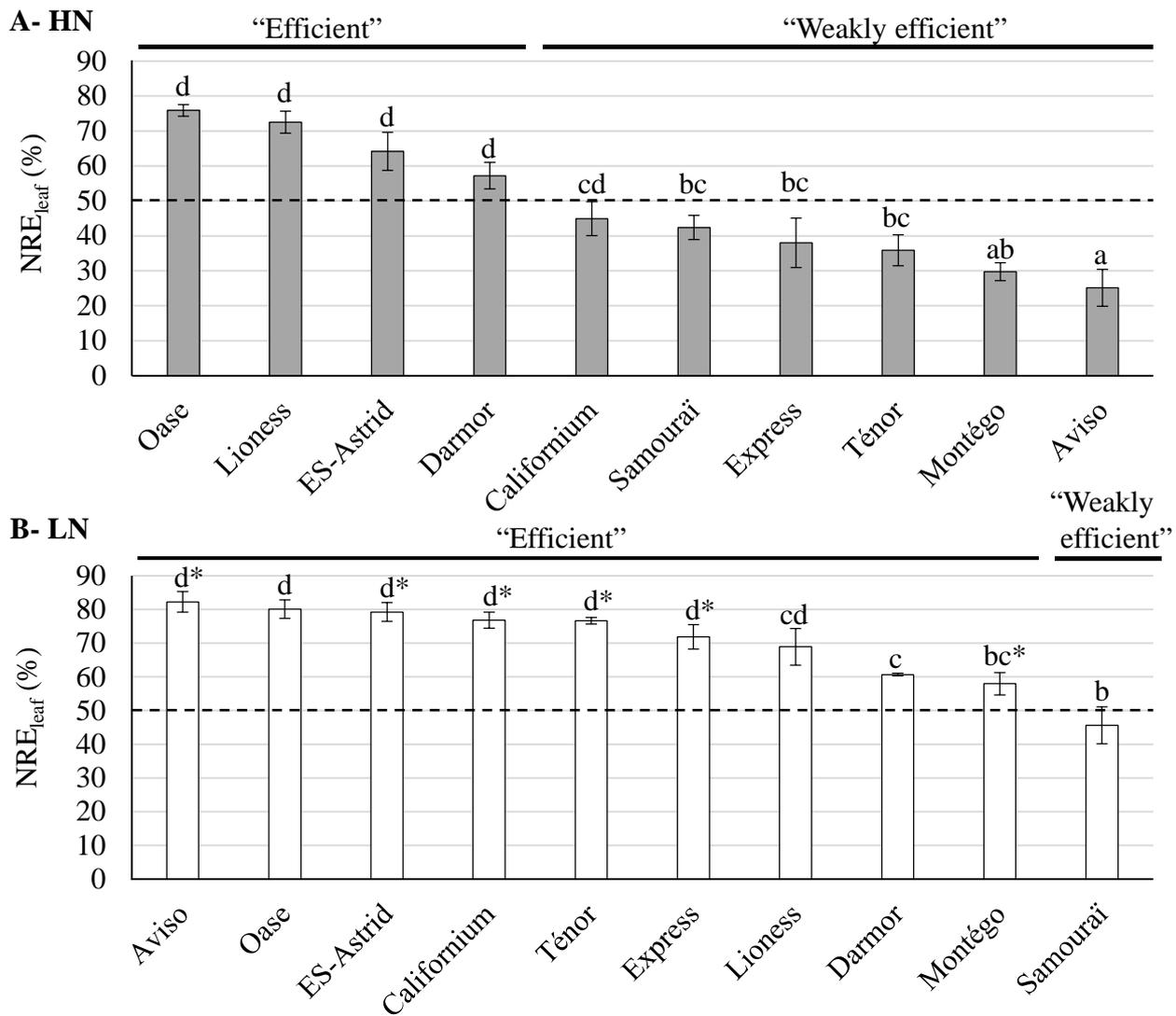


Figure D-2: N remobilization efficiency in a source leaf (NRE_{leaf}) of ten genotypes supplied with ample N (HN: 3.75 mM nitrate, panel A) or low N (LN: 0.375 mM nitrate, panel B). The data correspond to the decrease in the N amount during the 21 days of the experiment expressed in % of the initial N amount in the source leaf observed at D0. The “efficient” or “weakly efficient” criterion corresponds to a value of NRE_{leaf} over and up to 50% (represented by the dotted line), respectively. Significant differences between the two N treatments and the genotypes are indicated by asterisks and letters a, b and c, respectively ($n=3$, $p<0.05$).

Genotypic variability of leaf N remobilization efficiency

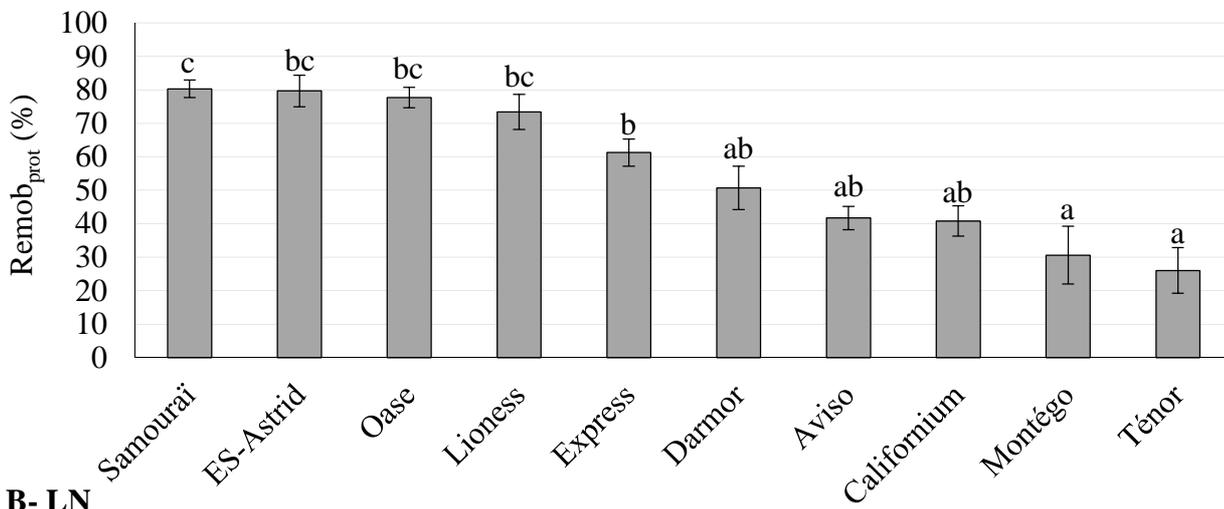
The impact of nitrate availability on the N remobilization in the ten genotypes was investigated *via* the N remobilization efficiency in senescing source leaves during the 21 days (NRE_{leaf}). The N treatment and genotypes influenced the NRE_{leaf} and an N treatment x genotype interaction was observed ($p < 0.001$; Table D-S1). Under HN conditions (Figures D-2A and D-S1), four genotypes remobilized more than 50% of the leaf N present at D0 and, therefore, were considered to be “efficient” for NRE_{leaf} : Oase (76%), Lioness, ES-Astrid and Darmor (57%). The other six genotypes were considered as “weakly efficient” with an NRE_{leaf} between 25% (Aviso) and 45% (Californium). Under LN conditions (Figure D-2B), nine genotypes were considered as efficient for NRE_{leaf} ($NRE_{leaf} > 50\%$): Aviso, Oase, ES-Astrid, Californium, Ténor, Express, Lioness, Darmor and Montégo. In contrast, the NRE_{leaf} of the genotype Samourai remained low (46%).

Genotypic variability of the soluble proteins and amino acids remobilizations in a source leaf

In order to determine if proteolysis was a limiting factor of the NRE_{leaf} , the remobilization of soluble proteins ($Remob_{prot}$) was investigated in a source leaf (Figures D-3 and D-S2) and estimated as the percentage of N remobilized compared to D0, meaning that a complete degradation of the soluble proteins would correspond to 100%. An N treatment x genotype interaction appeared for the $Remob_{prot}$ in the source leaf ($p < 0.05$; Table D-S1). Under HN conditions, the highest $Remob_{prot}$ was observed for Samourai, ES-Astrid, Oase and Lioness (78% on average, Figure D-3A) while the lowest $Remob_{prot}$ was observed for Ténor (26%). Compared to the HN treatment, only five genotypes presented a significant increase in $Remob_{prot}$ in response to LN conditions: Californium (69%), Ténor (71%), Express (79%), Aviso and Oase (89%; Figure D-3B).

During senescence, proteins are mainly degraded into amino acids (Caputo and Barneix, 1999). To determine if the export of amino acids *via* the phloem sieve elements could limit the N remobilization, the amount of free amino acids was quantified in a source leaf (Figure D-4). The remobilization of amino acids ($Remob_{aa}$) was impacted by the nitrate supply and the genotype but no genotype x N treatment interaction was observed ($p = 0.38$, Table D-S1). At the beginning of the experiment (D0), Darmor had the highest amount of amino acids (79 $\mu\text{moles.leaf}^{-1}$) and Samourai the lowest (30 $\mu\text{moles.leaf}^{-1}$; Figure D-4). At Day 21, a significant interaction N supply x genotypes was observed for the amount of amino acids in source leaf (Table D-S1), indicating that the amplitude of remobilization of amino acids was different for the ten genotypes in response to N limitation. Under HN conditions, a significant decrease in the amount of amino acids was observed after 21 days for all the genotypes,

A- HN



B- LN

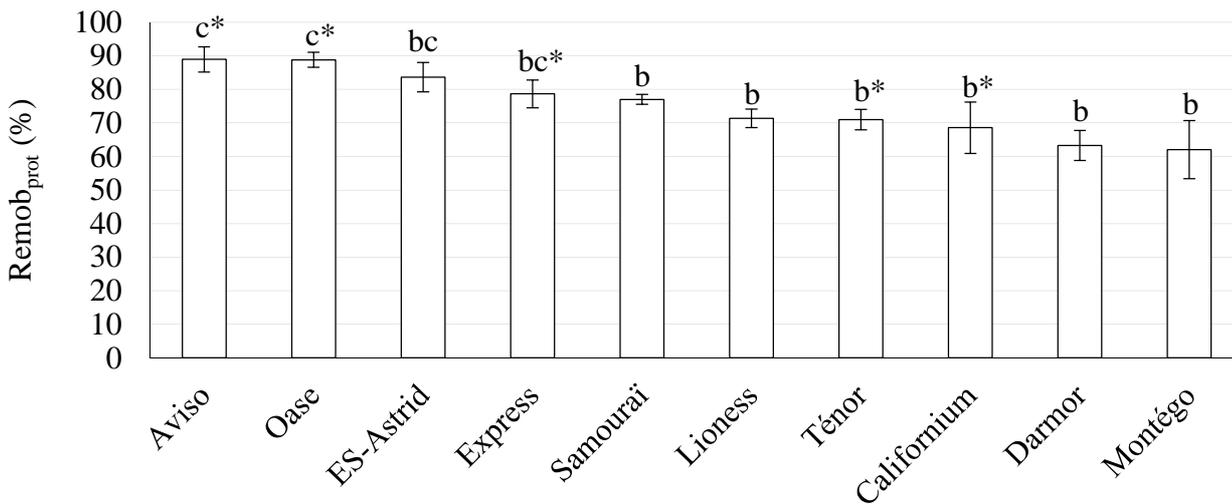


Figure D-3: Remobilization of the soluble proteins in a source leaf ($Remob_{prot}$) of ten genotypes supplied with ample N (HN: 3.75 mM nitrate) or low N (LN: 0.375 mM nitrate) over 21 days. The data correspond to the decrease in soluble proteins during the 21 days of the experiment expressed in % of the amount of soluble proteins in the source leaf at D0. Significant differences ($n=3$, $p<0.05$) were determined between genotypes in HN (indicated by letters a, b, c) and between N treatments (asterisks).

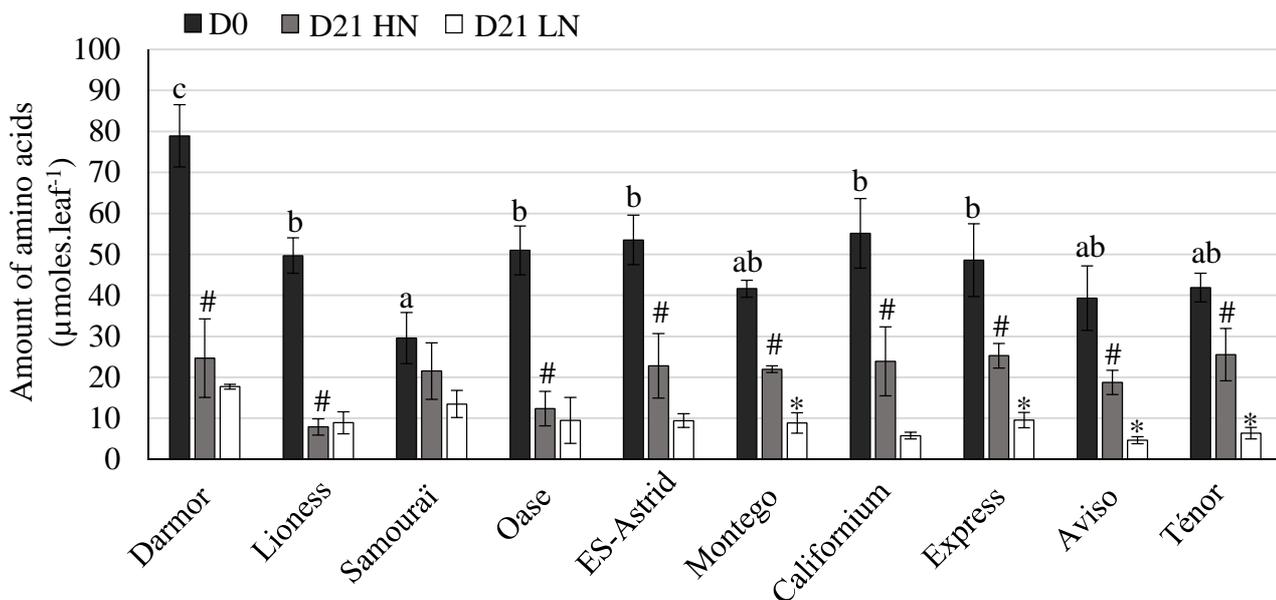


Figure D-4: Amount of amino acids in the source leaf ($\mu\text{moles.leaf}^{-1}$) of ten genotypes at D0 and after 21 days of culture with ample N (HN: 3.75 mM nitrate) or low N (LN: 0.375 mM nitrate). Letters a, b, c represent differences between genotypes at D0 in HN conditions, hashes represent significant differences between D0 and D21 in HN conditions and asterisks represent significant differences between HN and LN treatment at D21 ($n=3$, $p<0.05$).

except Samourai (Figure D-4). Under LN conditions (Figure D-4), only Montégo, Express, Aviso and Ténor had a lower amount of amino acids compared to HN conditions.

The results obtained from a principal component analysis (Figure D-5A) based on the differences of NUE, NRE_{leaf} , $Remob_{prot}$ and $Remob_{aa}$ between HN and LN conditions allowed four different response profiles to N limitation to be defined (Figure D-5A). The genotypes Darmor, ES-Astrid, Lioness and Oase, showed a decrease in LB_{prod} in the LN treatment despite efficient NRE_{leaf} , $Remob_{prot}$ and $Remob_{aa}$ in both N conditions were associated in Group 1 (Figure D-5B). The genotype Samourai is also characterized by a decrease in LB_{prod} under LN and similar NRE_{leaf} , $Remob_{prot}$ and $Remob_{aa}$ in both N conditions. However, this genotype was classified in Group 2 instead of Group 1 because a low NRE_{leaf} was observed despite a high $Remob_{prot}$ in both N conditions, (Figure D-5B). Group 3 included the genotypes Montégo, Express and Californium, which were characterized by a lower LB_{prod} under LN conditions despite an increase in NUE, NRE_{leaf} , $Remob_{prot}$ and $Remob_{aa}$ under LN compared to HN treatment (Figure D-5B). The genotypes Aviso and Ténor showing a similar LB_{prod} in both N conditions were classed in Group 4 (Figure D-5B).

N remobilization and uptake at the whole plant level in four contrasting genotypes

To better characterize the limiting components of NUE, the N fluxes at the whole plant level (presented in details in Figures D-S3 and D-S4) were specifically studied in a representative genotype from each of the four response profiles (Figure D-5): $Oase_{Gr1}$ (Group 1), $Samourai_{Gr2}$ (Group 2), $Californium_{Gr3}$ (Group 3) and $Aviso_{Gr4}$ (Group 4). Concerning the N uptake (Figure D-6A), it was influenced by N supply and an interaction between N supply and genotype was observed ($p < 0.01$; Table D-S2). Under HN conditions (Figure D-6A), similar to the remobilized N, N uptake was higher in $Oase_{Gr1}$ and $Californium_{Gr3}$ (145 and 148 mg N, respectively) compared to $Aviso_{Gr4}$ (110 mg N) and $Samourai_{Gr2}$ (81 mg N). In response to LN conditions (Figure D-6A), the N uptake was negligible for all genotypes. N supply and genotypes influenced the N remobilization at the whole plant level, and a strong N supply x genotype interaction was observed ($p < 0.001$; Table D-S2). Under HN treatment, the total amount of remobilized N was lower for $Aviso_{Gr4}$ (70 mg N) than for the other three genotypes (95 mg N on average; Figure D-6B). The NRE (N remobilized in % of N stored in source organs) was dependent on the N supply and the genotypes, and an N supply x genotype interaction was found ($p < 0.01$; Table D-S2). Under HN plants, the highest NRE was observed for $Aviso_{Gr4}$, $Oase_{Gr1}$ and $Samourai_{Gr2}$ (65% on average; Figure D-6B). Under LN conditions, an increase in the total amount of remobilized N was observed for $Aviso_{Gr4}$ (+22.4 mg N), $Samourai_{Gr2}$ (+18.5 mg N) and $Californium_{Gr3}$ (+34 mg N) while it remained similar in both N conditions for $Oase_{Gr1}$ (Figure D-6B). Compared to HN conditions, the NRE increased in response to LN treatment and reached 75% for $Oase_{Gr1}$, 78-78.5% for

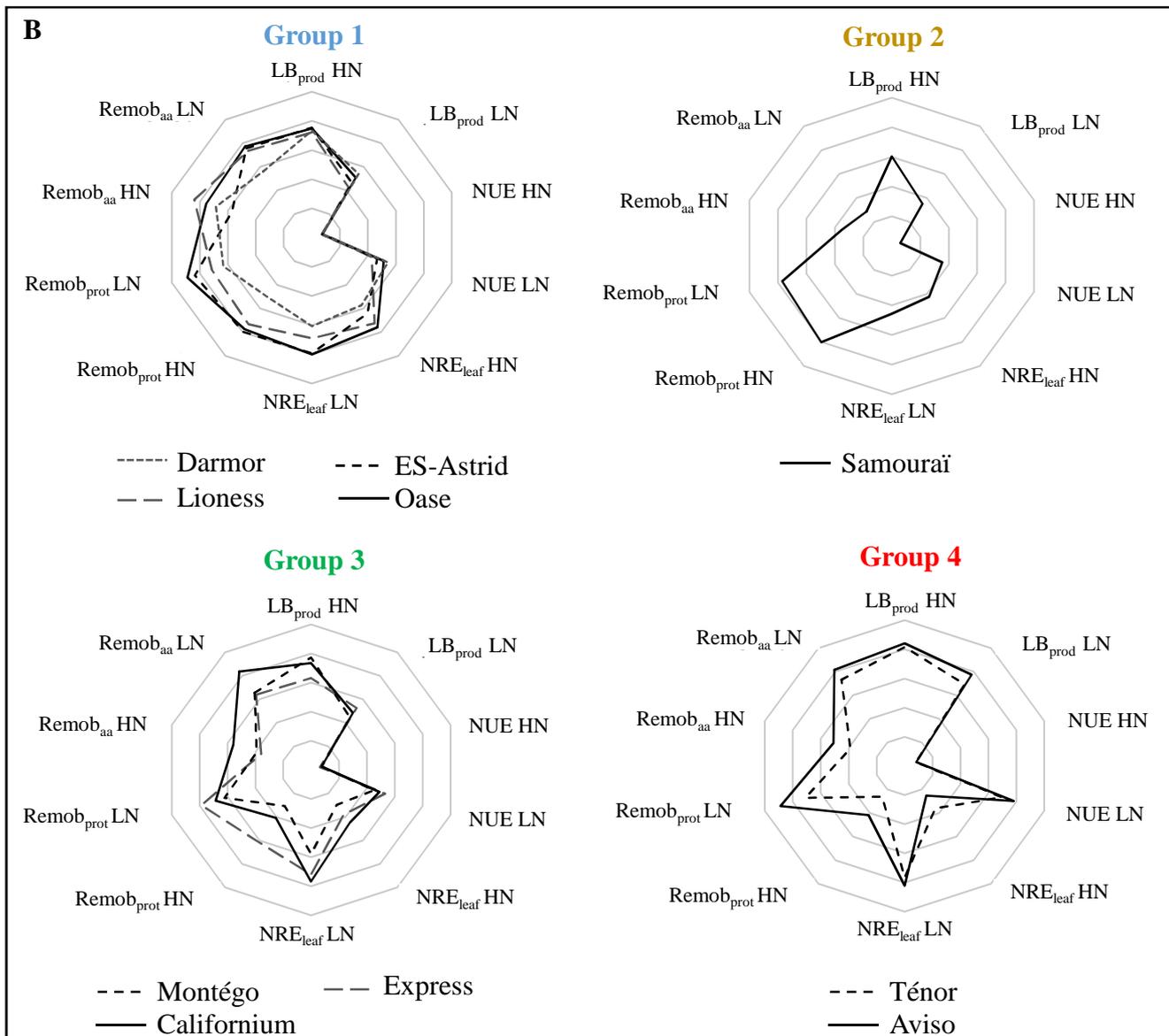
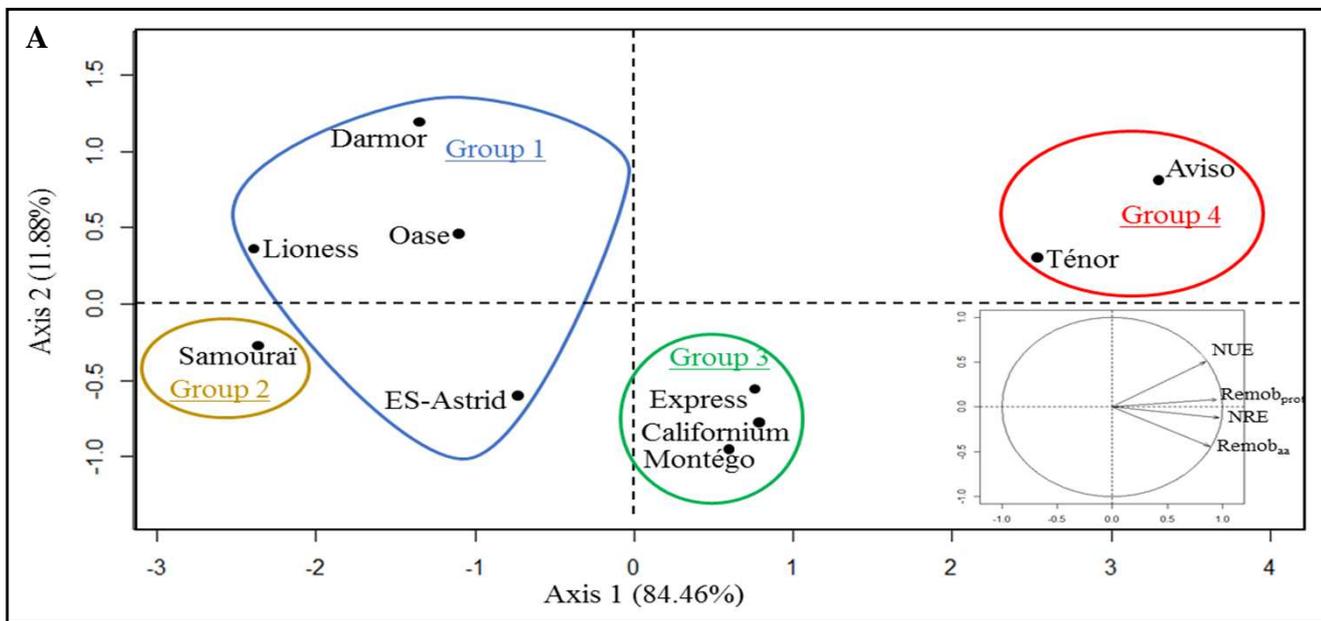


Figure D-5: Individual factor map (A) used for the definition of the four groups of genotypes (Groups 1 to 4, B) based on the differences of NUE, NRE_{leaf}, Remob_{prot} and Remob_{aa} between ample (HN: 3.75 mM) and restricted (LN: 0.375 mM) nitrate supply. The results were obtained from a principal component analysis (PCA). The axis 1 is related to the NUE, NRE_{leaf}, Remob_{prot}, and Remob_{aa} (84.46%) and the second axis (11.88%) is mainly associated to NUE and Remob_{aa}. Diagrams of the four response profiles to nitrate limitation (B). LB_{prod}: leaf biomass production in grams (Figure D-1A). NUE: expressed as the LB_{prod} per milligram of N provided by the nutrient solution (Figures D-1B and D-1C). NRE_{leaf}: N remobilized in % of the initial N amount in the source leaf observed at D0 (Figure D-2). Remob_{prot} and Remob_{aa}: decrease in soluble proteins or amino acids in the source leaf expressed in % of the initial amount at D0 (Figure D-3 and D-4).

Samourai_{Gr2} and Californium_{Gr3}, and more than 94% for Aviso_{Gr4} (Figure D-6B). The analysis of N fluxes from remobilization also revealed that, compared to HN treatment, the amount of N remobilized from leaves towards roots increased in response to LN conditions for Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3} and Aviso_{Gr4} but not for Oase_{Gr1} (Figures D-S3 and D-S4).

Distribution of N to the younger leaves in four contrasting genotypes

The total N (sum of N from uptake and remobilization) distributed to the younger leaves, considered as sink leaves during the experiment, was influenced by the N supply and the genotypes, but there was no N treatment x genotype interaction (Table D-S2). Under HN conditions (Figure D-7), Californium_{Gr3} and Oase_{Gr1} had the highest amount of total N distributed to sink leaves (170 mg N on average) while Samourai_{Gr2} had the lowest (107 mg N). Under LN conditions (Figure D-7), the amount of total N distributed to sink leaves decreased for all genotypes (around -53 %), except for Samourai_{Gr2}. An interaction between N treatment and genotype was observed for the amount of N remobilized to the younger leaves ($p < 0.05$; Table D-S2) but no significant differences were observed between N conditions (Figure D-7). In both N supplies, the N from the remobilization redistributed to the younger leaves was similar in Aviso_{Gr4}, Oase_{Gr1} and Samourai_{Gr2} (60 mg on average), while it was higher for Californium_{Gr3} (77 mg on average; Figure D-7). However, the interaction N treatment x genotype was observed for the N from uptake allocated to the younger leaves ($p < 0.001$; Table D-S2). Under HN treatment (Figure D-7), the highest N from uptake allocation was observed in Californium_{Gr3} and Oase_{Gr1} (101 mg N on average) and the lowest in Samourai_{Gr2} (44 mg). Under LN, the insignificant N uptake led to a negligible allocation of N to the sink leaves (Figure D-7). To compare the capacity of N from remobilization and uptake to be used for growth in sink leaves in the four contrasting genotypes, a NUtE index was defined as the LB_{prod} per mg of N distributed the younger leaves after 21 days of N treatment (including N from remobilization and uptake; Figure D-7). As indicated by the ANOVA test, there was a genotype x N treatment interaction for the NUtE ($p < 0.05$; Table D-S2). The NUtE was similar among the four genotypes under HN conditions (0.42 g FM.mg⁻¹N to 0.60 g FM.mg⁻¹N for Californium_{Gr3} and Aviso_{Gr4}, respectively; Figure D-7). However, under LN conditions, Aviso_{Gr4} had the highest NUtE (1.23 g FM.mg⁻¹ N) compared to the other three genotypes (0.8 g FM.mg⁻¹ N on average for Oase_{Gr1} and Samourai_{Gr2} and 0.58 g FM.mg⁻¹ N for Californium_{Gr3}).

Leaf senescence progression at the whole plant level in four contrasting genotypes

The progression of leaf senescence at the whole plant level was determined using the *SAG12/Cab* indicator (Gombert *et al.*, 2006) on the four contrasting genotypes (Table D-S3). At D0, the theoretical last senescing leaf was leaf rank number 5 for Aviso_{Gr4}, Californium_{Gr3} and Samourai_{Gr2} while it was leaf rank number 7 for Oase_{Gr1} (Table D-S3). After 21 days of N treatment, the theoretical last senescing leaf for Oase_{Gr1} and Samourai_{Gr2} was leaf rank

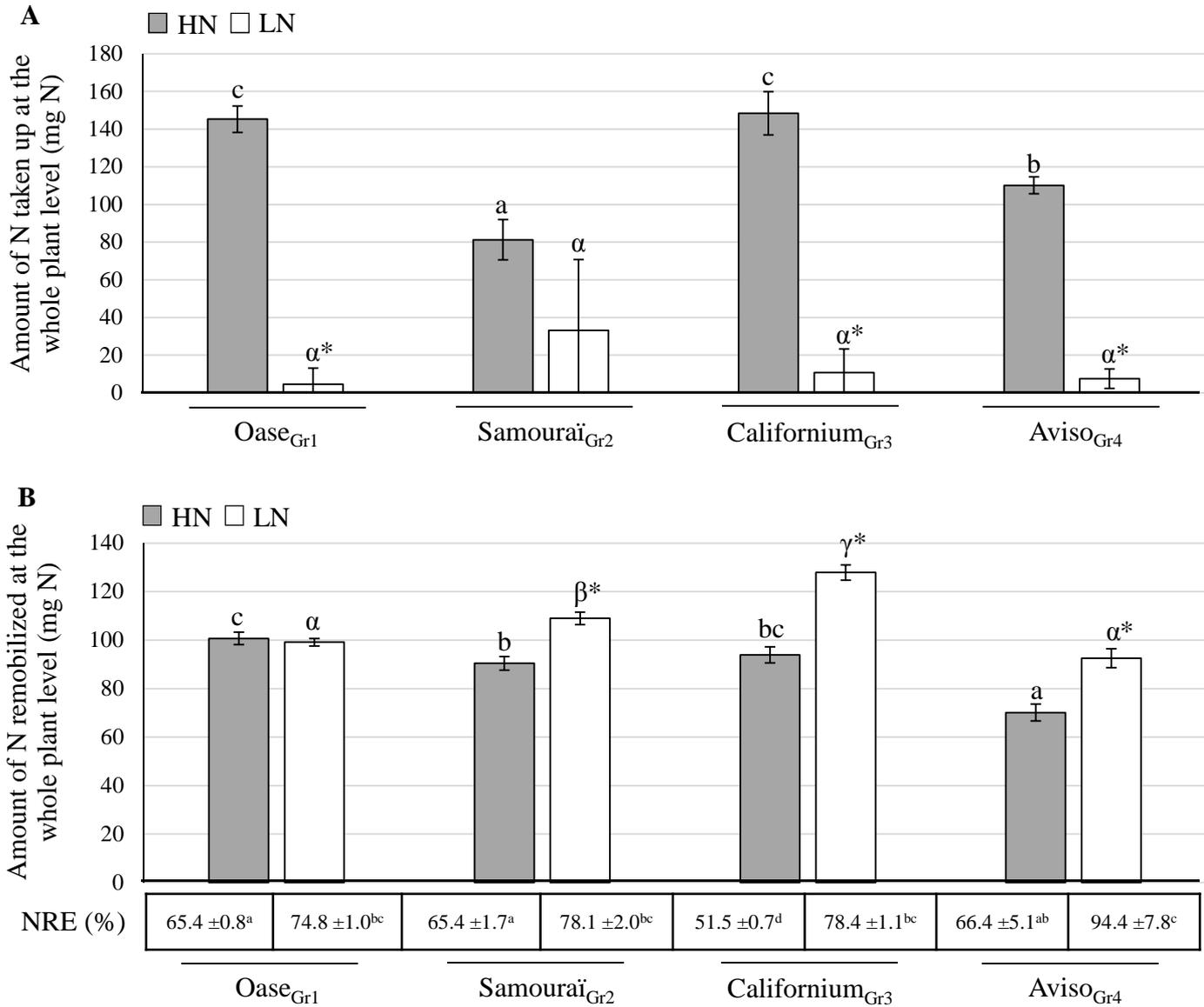


Figure D-6: Amount of N from uptake (A) or N from remobilization (B) at the whole plant level in Oase_{Gr1} (Group 1), Samourai_{Gr2} (Group 2), Californium_{Gr3} (Group 3) and Aviso_{Gr4} (Group 4) after 21 days of culture with ample N (HN: 3.75 mM nitrate) or low N (LN: 0.375 mM nitrate). The 4 groups of genotypes were defined in Figure D-5. The amounts of N from remobilization and uptake were determined *via* data originating from the long-term pulse-chase labelling described in the Materials and Methods. The NRE (B) is expressed as the N remobilized per 100 mg of N stored in source organs. Significant differences ($n=3$, $p<0.05$) were determined between genotypes (indicated by Latin letters a, b, c for HN and Greek letters α, β, γ for LN treatment) and between N treatments (indicated by asterisks).

number 17 in both N conditions while an increased number of senescing leaves between HN and LN conditions was observed in *Aviso*_{Gr4} (from the leaf rank number 13 for HN to 15 for LN) and *Californium*_{Gr3} (from the leaf rank number 12 for HN to 15 for LN; Table D-S3).

DISCUSSION

Deciphering the components of NUE in oilseed rape reveals four groups of genotypes differing by their responses to low nitrate availability

As previously observed in spring oilseed rape genotypes (Balint and Rengel, 2008; Svecnjak and Rengel, 2006), differences in leaf biomass production (LB_{prod}) and NUE (Figure D-1) were found between the ten winter oilseed rape genotypes at the vegetative stages in both N conditions. An interaction N supply x genotype was found for LB_{prod} and NUE (Table D-S1), indicating different responses to N limitation between the ten genotypes. In addition, differences of NRE in the source leaf (NRE_{leaf}) were observed with an interaction N supply x genotypes ($p < 0.001$; Table D-S1). These differences allowed four response profiles to low N supply to be defined on the basis of the NRE_{leaf} and the LB_{prod} under LN compared to HN conditions.

The Group 1 included *Darmor*, *ES-Astrid*, *Lioness* and *Oase* (Figure D-5). These genotypes were characterized by a decrease in LB_{prod} under LN compared to HN (Figure D-1A), despite a high NRE_{leaf} in both N conditions (over 50% of N remobilized; Figure D-2) which was a consequence of efficient remobilization of soluble proteins (greater than 50%; Figure D-3) and amino acid export (greater than 57%; Figure D-4). Whatever the N supply, the genotypes of this group presented a similar NRE_{leaf} (except *ES-Astrid*; Figure D-2), as well as the same amount of remobilized N (Figure D-S1) and N content in the source leaves after 21 d of treatment (data not shown). These data suggest that genotypes of Group 1 are characterized by N remobilization that is insensitive to the low nitrate supply (Figure D-2), a trait that has not been described before in other winter oilseed rape genotypes.

Samourai alone was classified into Group 2 (Figure D-5B). Similar to the genotypes of Group 1, *Samourai*_{Gr2} showed a decrease in the LB_{prod} in response to LN supply (Figure D-1A), but unlike Group 1 the NRE_{leaf} was considered to be inefficient in both N conditions (Figures D-2 and D-S1). Surprisingly, the high level of soluble protein remobilization in *Samourai*_{Gr2} under both N conditions (greater than 70%; Figures D-3 and D-S2) did not lead to an efficient N remobilization (less than 50%; Figure D-2 and D-S1). This was not related to an accumulation of amino acids in response of nitrate limitation (Figure D-4) meaning that amino acid export was not limiting. Therefore, to explain why there was no positive impact on the NRE_{leaf} despite the large remobilization of soluble proteins, the first hypothesis is that the insoluble proteins are weakly degraded in *Samourai*_{Gr2} compared to other genotypes. In fact, the thylakoid-bound proteins may represent 30% of the total proteins in leaf photosynthetic tissue and up to 20% of the N in the cell (Hörttensteiner, 2006; Matile *et al.*,

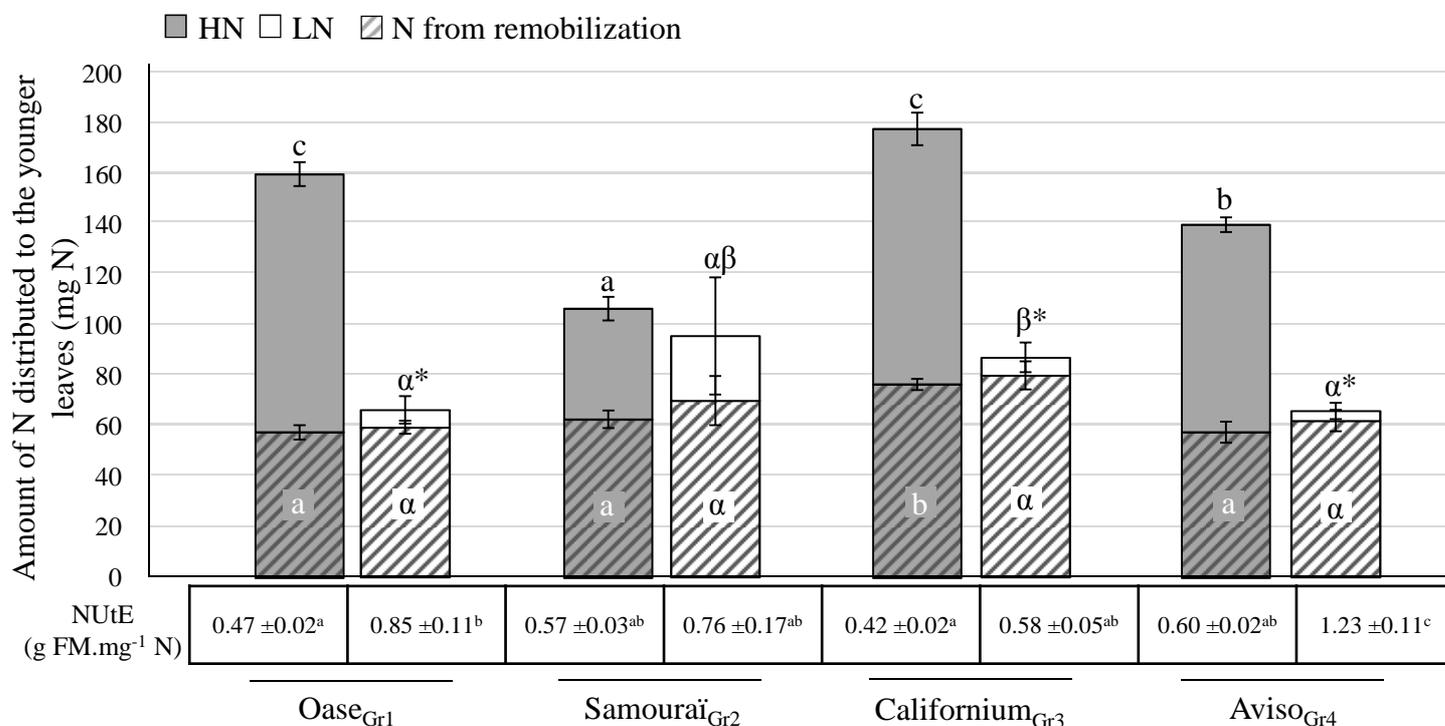


Figure D-7: Amount of total N, N from remobilization and uptake distributed to the younger leaves and N utilization efficiency (NUTe) of Oase_{Gr1} (Group 1), Samurai_{Gr2} (Group 2), Californium_{Gr3} (Group 3) and Aviso_{Gr4} (Group 4) after 21 days of culture with ample N (HN: 3.75 mM nitrate) or low N (LN: 0.375 mM nitrate). The 4 groups of genotypes were defined in Figure D-5. The amount of N from remobilization is represented by the hatched part and the N amount from the uptake by the non-hatched part. The NUTe was defined as the LB_{prod} per milligram of N distributed to the younger leaves ($g\ FM.mg^{-1}\ N$). Significant differences were determined between genotypes for the total N amount distributed (indicated by the upper the bars) and the N amount from remobilization (indicated inside the hatched bars) and represented by Latin letters a, b, c for HN and Greek letters α , β , γ for LN treatment ($n=3$, $p<0.05$). The significant differences between N treatments are indicated by asterisks.

1996), making these proteins a crucial N source for remobilization. Therefore, a low degradation rate of thylakoid-bound proteins can lead to a low N remobilization. Additionally, by using a chlorophyll meter system (SPAD-502 model), it appeared that the chlorophyll content decreased in source leaf of Samouraï after 21 days under LN conditions (SPAD value: 18.63 ± 4.59) compared with HN treatment (SPAD value: 33.93 ± 1.13 , data not shown). These data suggest that chlorophylls are probably well degraded in source leaf of Samouraï in response to N limitation. Even if the degradation of chlorophylls is significant it could be possible that the recycling of N associated to chlorophylls is limiting in senescing leaf of Samouraï, another hypothesis that could explain the default in NRE_{leaf} . The last hypothesis could be related to a weak re-assimilation of ammonia by specific enzymes (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008) or a low degradation and/or export of peptides, which can both be released by proteolysis (Hörtensteiner and Feller, 2002). Further analysis of the proteolysis processes is needed to validate these hypotheses.

Group 3 corresponds to the genotypes Montégo, Express and Californium (Figure D-5), which also showed a lower biomass production under LN conditions (Figure D-1A). As previously observed for oilseed rape (Desclos *et al.*, 2009; Etienne *et al.*, 2007; Gombert *et al.*, 2010; Svecnjak and Rengel, 2006), these genotypes were able to improve their leaf N remobilization in response to LN supply (Figure D-2). This higher N remobilization resulted from an increase in protein degradation (Figure D-3) and amino acid export (Figure D-4). However, compared to Aviso and Ténor under LN conditions, the rate of soluble protein degradation was not the most efficient (Figure D-3), indicating that the mechanisms can probably be improved in the genotypes belonging to Group 3.

Finally, Group 4 included two genotypes (Aviso and Ténor) capable of producing the same leaf biomass in both N conditions (Figure D-1A). This maintenance of LB_{prod} under LN conditions was related to a large increase in NRE_{leaf} (Figure D-2) due to an improvement in soluble protein degradation (Figure D-3) and amino acid export in response to the low N treatment (Figure D-4).

In summary, this profiling approach allowed four response profiles to N limitation to be distinguished and gave clues to determine the physiological traits of efficient N remobilization at the leaf level. After 21 days of N treatment, the amino acid contents in the source leaf (between 1.14 to $11.7 \mu\text{mol.g}^{-1}$ FM; Figure D-4) was similar to those obtained in previous work on oilseed rape cv. Lirajet and Capitot ($11 \mu\text{mol.g}^{-1}$ FM, (Tilsner *et al.*, 2005) ; $6 \mu\text{mol.g}^{-1}$ FM, (Desclos, 2008). Even if a genotype x N treatment interaction was observed for the amounts of amino acids after 21 days (Table D-S1), suggesting that the remobilization of amino acids is of different amplitude for the ten genotypes in response to N limitation, the low amount of amino acids observed for the ten genotypes in both N conditions (Figure D-4) indicated an efficient export. These data confirm the previous results on winter oilseed rape cv. Lirajet (Tilsner *et al.*, 2005) and Capitot (Desclos, 2008). Because the NRE_{leaf} was highly

correlated to the amino acid remobilization under HN treatment ($r= 0.83, p<0.001$) and LN conditions ($r=0.91, p<0.001$; Table D-S4), these results confirmed that the export of amino acids released by proteolysis is crucial for a high NRE. The NRE_{leaf} and the degradation of the soluble proteins were also strongly correlated under HN ($r=0.66, p<0.001$) as well as LN conditions ($r=0.67, p<0.001$; Table D-S4). Indeed, in both N conditions, a high NRE_{leaf} (Figure D-2) was strongly associated with a high $Remob_{prot}$ (Figure D-3), except for the genotype Samourai_{Gr2}. In addition, the enhanced N remobilization of the Group 3 and 4 genotypes was linked to an increase in soluble protein degradation, which is in concordance with previous results obtained on cv. Capitol (Desclos *et al.*, 2008; Desclos *et al.*, 2009; Etienne *et al.*, 2007). Rubisco can represent up to 65% of the soluble proteins in C3 plants (Ellis, 1979) and its degradation can represent 85% of the decrease in soluble proteins in barley leaves (Friedrich and Huffaker, 1980). In addition, its content is quite representative of the N content in various crop plants, such as rice or barley (Evans, 1989; Mae *et al.*, 1983; Makino, 2011; Makino *et al.*, 1984; Srivalli *et al.*, 2001). Consequently, the improvement in Rubisco recycling (*i.e.* degradation and export of amino acids) can be crucial for the optimization of N remobilization (Feller *et al.*, 2008; Mae *et al.*, 1983). Further studies will be required to unravel the current knowledge about the mechanisms involved in Rubisco degradation (Feller *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2001), especially in the case of oilseed rape, for which Rubisco degradation remains largely an enigma.

The high NRE_{leaf} of the genotypes capable of maintaining their LB_{prod} under LN conditions (Aviso and Ténor; Group 4; Figure D-5) highlighted that the leaf NRE may play an important role in NUE. However, the Groups 1 and 3 also showed an efficient NRE_{leaf} under LN conditions (Figure D-2B) without maintaining their LB_{prod} , suggesting that (i) the NRE_{leaf} is not representative of the total N remobilization at the whole plant level and/or (ii) a failure in the redistribution or utilization of this element in the young leaves. To validate these hypotheses, one genotype representing each group was chosen in order to investigate the N fluxes at the whole plant level: Oase_{Gr1}, Samourai_{Gr2} and Californium_{Gr3}, which showed decreases in the LB_{prod} under LN conditions and Aviso_{Gr4}, which was able to produce the same LB_{prod} whatever the level of nitrate supply.

Efficient N remobilization needs to be associated with an efficient NUtE in the young leaves to improve NUE

To identify the limiting factors responsible for the lower LB_{prod} observed in the Groups 1 and 3 genotypes under LN conditions, and therefore, define the components of NUE responsible for maintaining the LB_{prod} of the Group 4 genotypes, the total N amounts from remobilization and absorption at the whole plant level (Figures D-6A and 6B) were estimated for the four selected genotypes thanks to the N fluxes estimated at the whole plant level (Figures D-S3 and D-S4)

Surprisingly, the amount of remobilized N under the LN supply was not higher in Aviso_{Gr4} (able to maintain its LB_{prod} under LN supply; Group 4) than in the genotypes of other three groups (Figure D-6B), despite a higher NRE_{leaf} (Figure D-2). Due to the fact that the amount of remobilized N was highly dependent on the N amount in the source organs, a NRE index was estimated as the amount of remobilized N as a percentage of the N stored in source organs. As shown in Figure D-6B, all the genotypes were able to improve their NRE at the whole plant level under LN supply, as previously observed for *Arabidopsis* (Lemaitre *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse and Chardon, 2011), despite the fact that a similar NRE_{leaf} was observed for Samourai_{Gr2} and Oase_{Gr1} (Figure D-2). Indeed, no significant correlation was found between NRE and NRE_{leaf} under LN conditions ($r=0.20$; Table D-S5), demonstrating that the NRE at the leaf level is not representative of the NRE at the whole plant level. A lower N amount was observed in old leaves of spring (Svecnjak and Rengel, 2006; Yau and Thurling, 1987) and winter (Desclos *et al.*, 2009; Etienne *et al.*, 2007) oilseed rape, and our results confirm that an increase in NRE not only occurs in a single source leaf but also at the whole plant level.

Our investigations on N fluxes of remobilization have also revealed that the amount of N remobilized from leaves towards roots increased in response to LN conditions for Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3} and Aviso_{Gr4} but not for Oase_{Gr1} when compared to HN treatments (Figures D-S3 and D-S4). This increase of N coming from the leaf remobilization to the roots may help to sustain the root proliferation and maximize the N uptake as far as possible. Indeed, in our experimental conditions, the root biomass observed after 21 days of LN treatment was maintained in Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3} and Aviso_{Gr4} to a level not significantly different to HN treatment (data not shown). Nevertheless, under low mineral availability, this increase of N distribution towards the root system is at the expense of the remobilization of N towards the aerial organs that could be used to sustain the growth of young leaves.

The higher NRE of Aviso_{Gr4} under LN led to a lower amount of N lost through senescent leaf drop compared to the other three genotypes (Figure D-S4). The correlation between the NRE and the NUE under LN conditions ($r=0.65$, $p<0.05$; Table D-S5) and the lower N loss by leaf drop associated with the higher NUE in Aviso_{Gr4} confirmed the results obtained previously for four spring oilseed rape genotypes (Svecnjak and Rengel, 2006) and a simulation suggesting that a decrease in residual N in dead leaves may lead to an increase in the NUE (Malagoli *et al.*, 2005a). Consequently, Aviso_{Gr4} wasted less N during the vegetative stages under LN conditions (Figure D-S4), which makes this genotype a good candidate to understand the molecular mechanisms involved in limiting leaf N loss and, therefore, reducing economic cost and risk of environmental pollution of oilseed rape crop.

The processes of proteolysis involved in N remobilization are linked to the mechanisms of senescence. Indeed, for Aviso_{Gr4} and Californium_{Gr3}, the increase in the total

amount of remobilized N (Figure D-6B) was associated with a higher number of senescing leaves (Table D-S3) while Oase_{Gr1} had a similar amount of remobilized N (Figure D-6B) and a similar senescence status (Table D-S3) in both N conditions. The higher number of senescing leaves observed under LN compared to HN conditions for Aviso_{Gr4} and Californium_{Gr3} (Table D-S3) is in concordance with the previous results obtained with cv. Capitol in field (Gombert *et al.*, 2010) and hydroponic conditions (Etienne *et al.*, 2007; Gombert *et al.*, 2006), and with spring oilseed rape in greenhouse conditions (Svecnjak and Rengel, 2006). However, this is the first time, to our knowledge, that a similar senescence status has been observed in response to two contrasting N supplies (genotypes Oase_{Gr1} and Samouraï_{Gr2}; Table D-S3). Surprisingly, a correlation between the number of senescing leaves and the amount of remobilized N was found only under HN conditions ($r=-0.66$, $p<0.05$) and the number of senescing leaves was not correlated to any component of NUE under LN conditions (Table D-S5). Consequently, despite the strong relationship between leaf senescence and N remobilization during the vegetative stages, the number of senescing leaves is not a good indicator to select genotypes with high NUE under a low N supply.

These results showed that Aviso_{Gr4} was able to obtain a higher leaf biomass production under LN conditions than the other genotypes without having the highest amount of remobilized N at the whole plant level. To explain this result, the first hypothesis is that there is a better redistribution of the remobilized N to the young tissues for Aviso_{Gr4} than for the other genotypes. Surprisingly, under LN conditions, the amount of remobilized N redistributed to the younger leaves in Aviso_{Gr4} was similar to Oase_{Gr1} and Samouraï_{Gr2}, but all were lower than in Californium_{Gr3} (Figure D-7). Indeed, no correlations were found between the total N amount distributed to the younger leaves and the total amount of remobilized N ($r=0.25$) or the NRE ($r=-0.16$; Table D-S5). Due to the fact that the N uptake under LN was almost equal to zero (Figure D-6A) for all genotypes, the better LB_{prod} of Aviso_{Gr4} (Figure D-1) therefore cannot be explained by a different total N amount distributed to the younger leaves (Figure D-7). Instead it is due to a better ability to produce leaf biomass with a limited N amount, reflecting an enhanced utilization (NUE) in the young leaves (LB_{prod} per milligram of N distributed to the younger leaves; Figure D-7). Differences in NUE were also previously highlighted for spring oilseed rape (Balint and Rengel, 2008; Balint and Rengel, 2011; Yau and Thurling, 1987) without determining how the remobilization and/or the assimilation in young tissues were involved. Because the NUE index was estimated specifically in growing and emerging leaves, our results showed that the improvement in biomass production at the vegetative stages under restricted N supply is linked to efficient utilization of the remobilized N in young tissues. This result is in accordance with previous work showing that an improvement in the source strength of an oilseed rape mutant over-expressing enzymes of assimilation significantly improved the NUE (Good and Beatty, 2011; Good *et al.*, 2007).

CONCLUSION

Our results confirmed that an enhanced N remobilization during the vegetative stages contributed to improving the NUE by reducing the N loss by leaf drop, but this needs to be associated with an efficient utilization of the remobilized N in young tissues to improve leaf growth. Yield is the product of the growth rate and the duration of the vegetative period (Diepenbrock, 2000) and the biomass production of oilseed rape before flowering appears to be crucial for the yield of 40 genotypes (Yau and Thurling, 1987). Consequently, an enhanced leaf biomass production by improvement in both NRE and NUtE at the vegetative stages may increase seed yield with a reduction of N inputs. These results confirmed the crucial role of NRE (Dejoux *et al.*, 2000; Malagoli *et al.*, 2005b) and the profiling study of ten genotypes showed that the high leaf NRE is associated with amino acid export, which is efficient whatever the genotype and the N supply. In addition, the leaf NRE is strongly correlated with proteolysis, suggesting its key role in leaf NRE improvement, except for one genotype (Samourai). Further studies are in progress to better characterize the proteolysis mechanisms involved in the contrasting leaf remobilization of these genotypes.

ACKNOWLEDEMENTS

This work was funded by the French National Research Agency (ANR-07-GPLA-016 GENERGY: Improvement of the oil yield of the rapeseed crop in the context of bio fuel production; ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input) and by a Ph.D. grant to Mrs Alexandra Girondé from the French Ministry of Research. The authors would like to thank Dr. Nathalie Nési, INRA (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) who is the leader of these two ANR-programs and Ms Marie-Paule Bataillé, Ms Anne-Françoise Ameline, Mr Raphaël Ségura and Mr Cédric Scher for their technical help in plant harvest and N analyses

Table D-S1: Source of variation for LB_{prod} , NUE, NRE_{leaf} , $Remob_{prot}$ and $Remob_{aa}$ and the amount of amino acids (after 21 days of N treatment) in the source leaf of ten genotypes of winter oilseed rape.

	Source of variation			
	N supply (N)		Genotype (G)	N x G
	F_N	r	F_G	F_{NxG}
Leaf biomass production (LB_{prod})	277.46 ***	-0.64 ***	20.89 ***	4.76 ***
N use efficiency (NUE)	2937.02 ***	-0.91 ***	25.21 ***	21.31 ***
N remobilization efficiency in source leaf (NRE_{leaf})	47.09 ***	-0.49 ***	7.83 ***	4.73 ***
Soluble proteins remobilization in source leaf ($Remob_{prot}$)	24.43 ***	-0.24 ***	22.96 ***	2.18 *
Remobilization of amino acids in source leaf ($Remob_{aa}$)	30.53 ***	-0.37 **	15.30 ***	1.11
Amount of amino acids in source leaf after 21 days of N treatment	87.00 ***	0.67 ***	4.80 ***	2.71 *

The main source of variation was deduced from an ANalysis Of VAriance (ANOVA) where N treatment (N), genotype (G), and the N treatment x genotype (NxG) interaction were tested ($n=3$, $p<0.05=*$, $p<0.01=**$, $p<0.001=***$). The resulting F values are presented below. The r values correspond to the coefficient of correlation between the N supply ($n=30$) and (i) the LB_{prod} (data given in Figure D-1A), (ii) the NUE (Figures D-1B and D-1C), (iii) the NRE_{leaf} (Figure D-2), (iv) the $Remob_{prot}$ (Figure D-3), (v) the $Remob_{aa}$ and (vi) the amount of amino acids at Day 21 (Figure D-4).

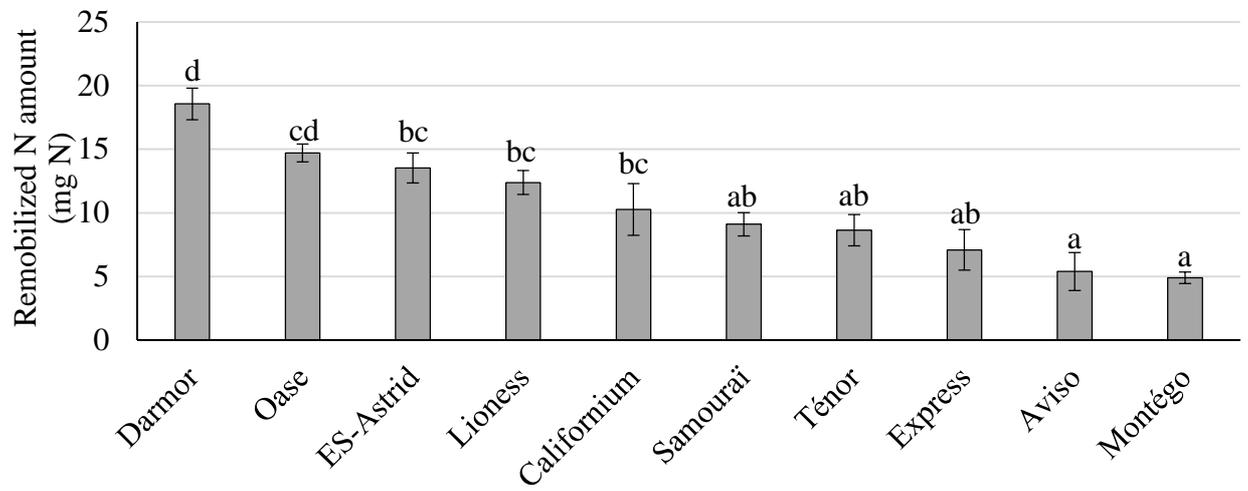
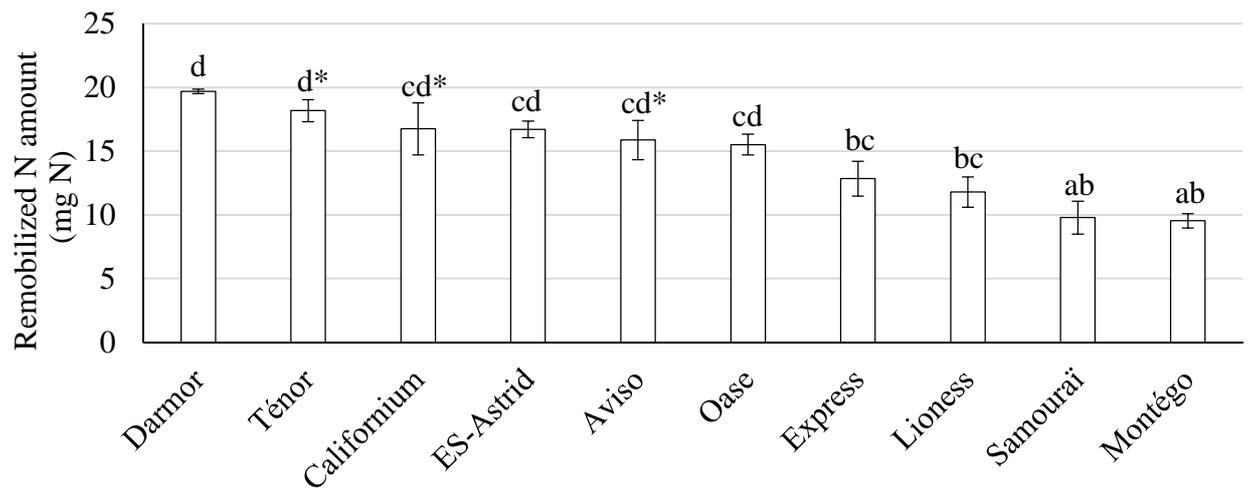
A- HN**B- LN**

Figure D-S1: Amount of N remobilized in a source leaf of ten genotypes supplied with ample N (HN: 3.75 mM nitrate, panel A) or low N (LN: 0.375 mM nitrate, panel B). The data correspond to the N amount (milligrams) remobilized during the 21 days of the experiment. Significant differences between the two N treatments and the genotypes are indicated by asterisks and letters a, b and c respectively ($n=3, p<0.05$).

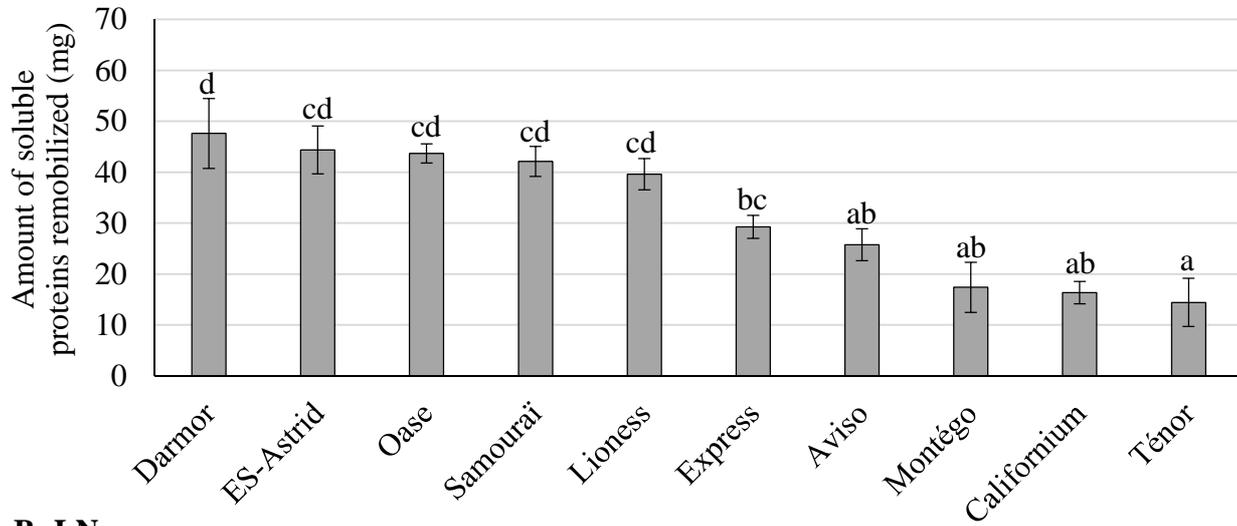
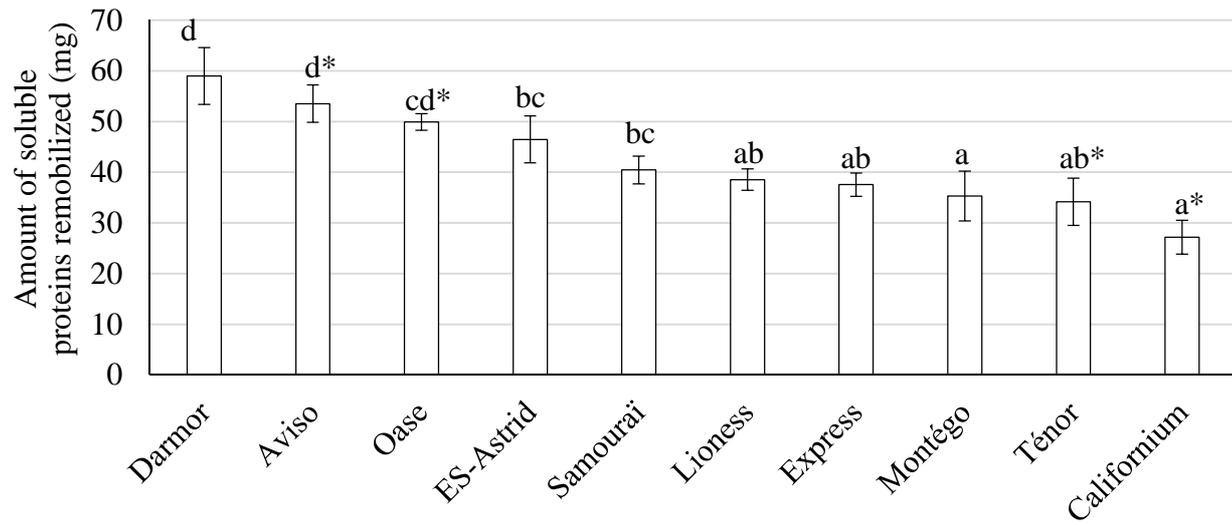
A- HN**B- LN**

Figure D-S2: Amount of soluble proteins remobilized in a source leaf of ten genotypes supplied with ample N (HN: 3.75 mM nitrate, panel A) or low N (LN: 0.375 mM nitrate, panel B). The data correspond to the amount of soluble proteins (milligrams) degraded during the 21 days of the experiment. Significant differences between the two N treatments and the genotypes are indicated by asterisks and letters a, b and c respectively ($n=3$, $p<0.05$).

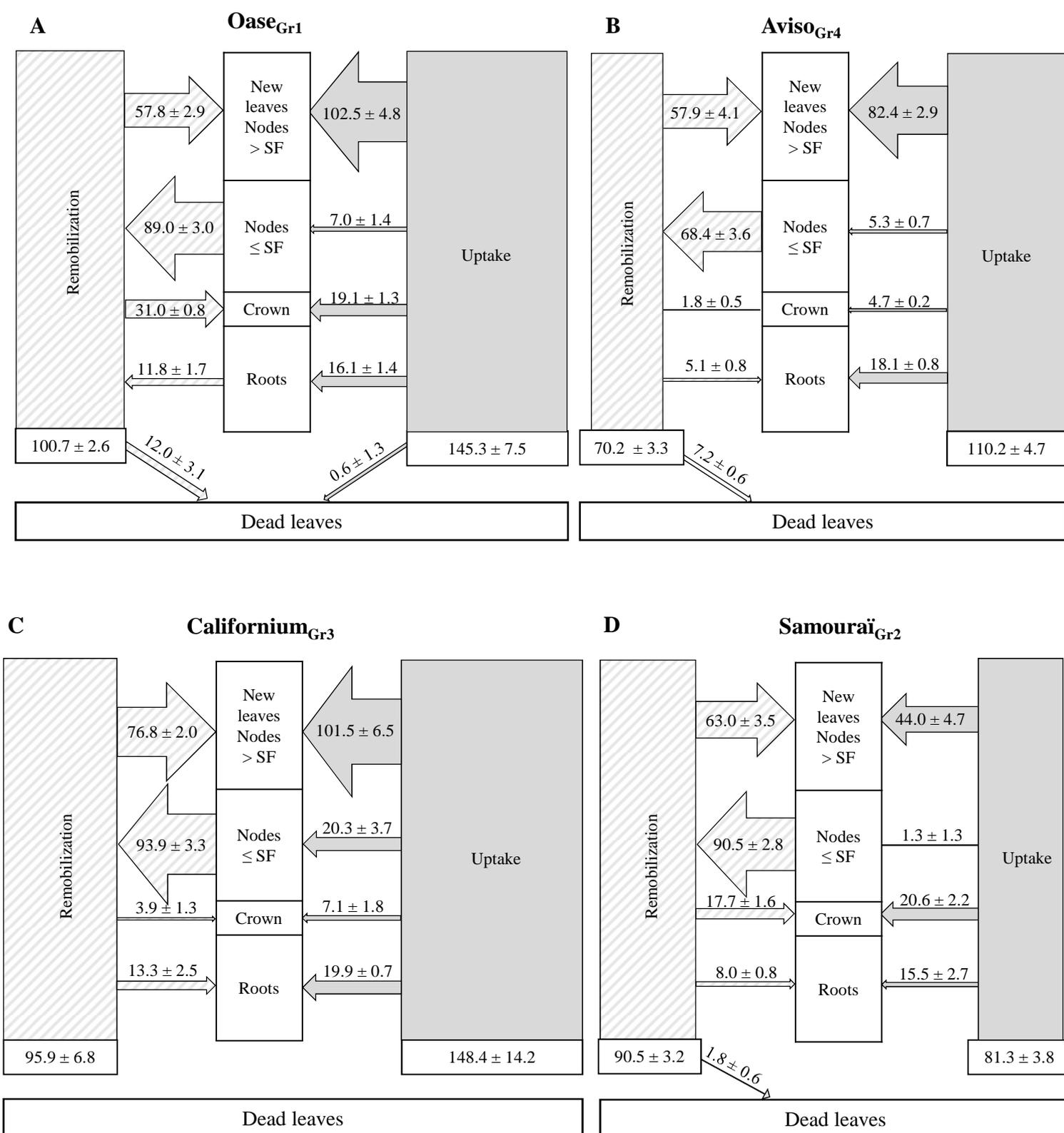


Figure D-S3: N fluxes at the whole plant level of Oase_{Gr1} (A), Aviso_{Gr4} (B), Californium_{Gr3} (C) and Samourai_{Gr2} (D) supplied with ample nitrate (HN: 3.75 mM). The N amount and fluxes coming from remobilization or uptake are expressed in milligrams per plant. SF means “source leaf” which corresponds to a leaf mature at D0 that became senescent during the experiment for all genotypes. The leaves above the source leaf, mainly sink leaves, were pooled as new leaves (nodes > SF) and the leaves below the source leaf, including the source leaf, were also pooled (nodes ≤ SF). The 4 groups of genotypes were defined in Figure D-5.

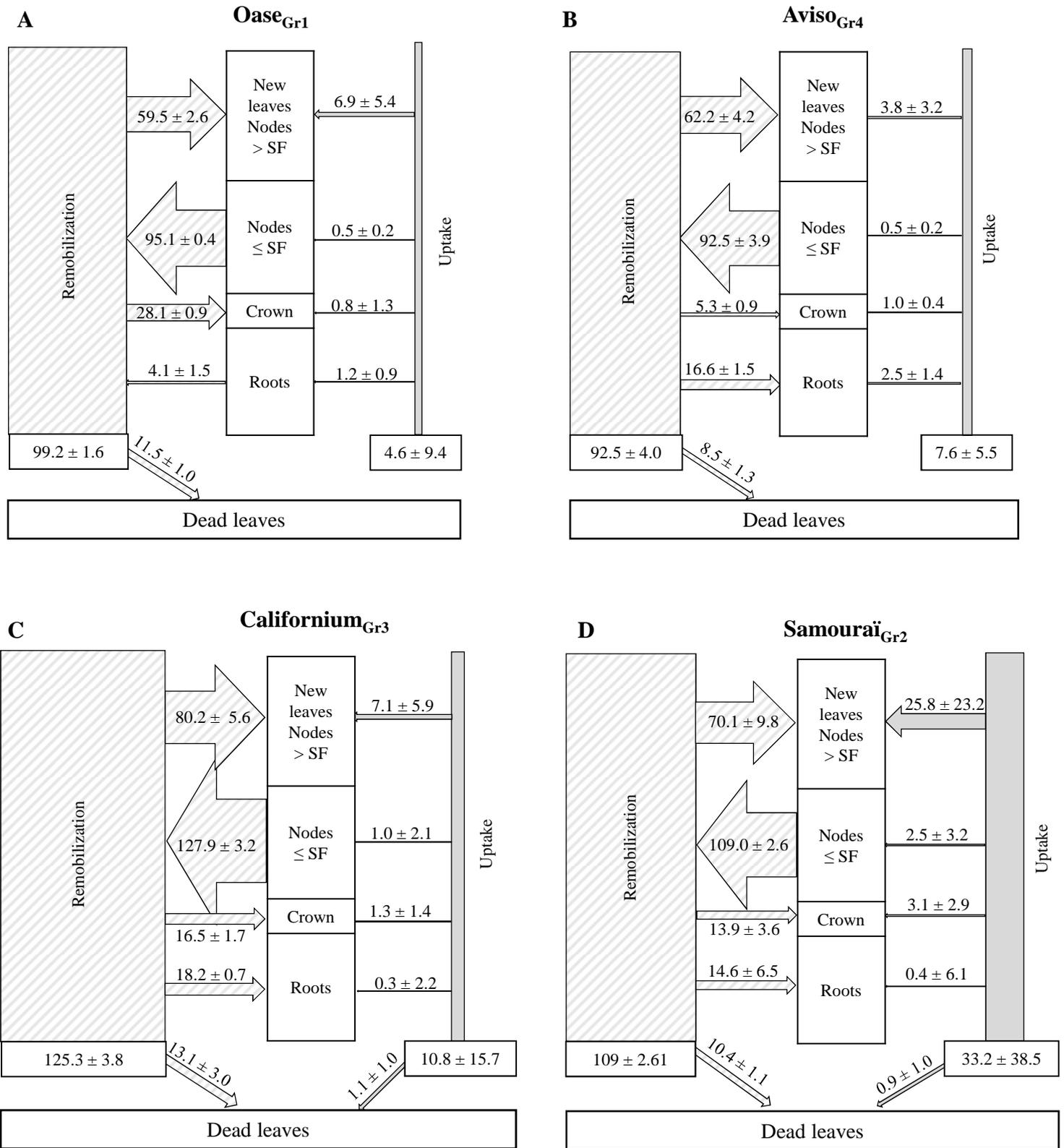


Figure D-S4: N fluxes at the whole plant level of Oase_{Gr1} (A), Aviso_{Gr4} (B), Californium_{Gr3} (C) and Samurai_{Gr2} (D) supplied with low nitrate (LN: 0.375 mM). The N amount and fluxes coming from remobilization or uptake are expressed in milligram per plant. SF means “source leaf” which corresponds to a leaf mature at D0 that became senescent during the experiment for all genotypes. The leaves above the source leaf, mainly sink leaves, were pooled as new leaves (nodes > SF) and the leaves below the source leaf, including the source leaf, were also pooled (nodes ≤ SF). The 4 groups of genotypes were defined in Figure D-5.

Table D-S2: Source of variation for N remobilization and uptake at whole plant level in Oase_{Gr1}, Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3} and Aviso_{Gr4}.

	Source of variation			
	N supply (N)		Genotype (G)	N x G
	F_N	r	F_G	F_{NxG}
Amount of N remobilized at the whole plant level	84.52 ***	-0.56 **	37.74 ***	13.76 ***
Amount of N taken up at the whole plant level	104.41 ***	0.76 ***	1.15	4.21 **
N Remobilization Efficiency (NRE)	91.31 ***	-0.77 ***	10.23 ***	5.69 **
Total N amount distributed to the younger leaves	45.64 ***	0.66 ***	3.68 *	0.58
Remobilized N amount redistributed to the younger leaves	1.35	-0.15	5.54 **	2.88 *
Amount of N taken up and allocated to the younger leaves	130.54 ***	0.76 ***	2.33	8.45 ***
N Utilization Efficiency (NUtE)	36.37 ***	-0.56 **	9.46 ***	3.63 *

The main source of variation was deduced from an ANalysis Of VAriance (ANOVA) test where N treatment (N), genotype (G), and the N treatment x genotype (NxG) interaction were tested ($n=3$, $p<0.05=*$, $p<0.01=**$, $p<0.001=***$). The resulting F values are presented below. The r values correspond to the coefficient of correlation ($n=12$) between the N supply and (i) the amount of N remobilized and taken up at the whole plant level (data given in Figure D-6), (ii) the NRE expressed as the milligrams of N remobilized per 100 mg of N stored in source organs (Figure D-6B), (iii) the amount of total N, N from remobilization and uptake distributed to the younger leaves (Figure D-7) and (iv) the N utilization efficiency (NUtE) expressed as the biomass produced per milligram of N distributed to the younger leaves ($\text{g FM.mg}^{-1} \text{ N}$; Figure D-7).

Table D-S3: Theoretical last senescing leaf rank of Oase_{Gr1}, Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3}, and Aviso_{Gr4}.

Theoretical last senescing leaf rank			
Genotype	Day 0	Day 21	
		HN	LN
Oase	7	17	17 (=)
Samourai	5	13	13 (=)
Californium	5	12	15 (+)
Aviso	5	13	15 (+)

The theoretical last senescing leaf rank was determined using the *SAG12/Cab* indicator previously described by Gombert *et al.* (2006) at D0 and after 21 days of culture with ample N (HN: 3.75 mM nitrate) or low N (LN: 0.375 mM nitrate) supply. The leaves were numbered in order of appearance where 1 was the oldest leaf and a higher number for the theoretical last senescing leaves means an increase in senescence. The plus sign given in parenthesis indicates an acceleration of senescence progression and the equal sign a similar senescence progression in LN compared to HN.

Table D-S4: Correlation between the LB_{prod}, the NUE, the NRE_{leaf}, the Remob_{prot} and the Remob_{aa} in the source leaf of ten genotypes of winter oilseed rape.

	LB prod	NUE	NRE _{leaf}	Remob _{prot}	Remob _{aa}	
LB prod		0.99 ***	-0.17	-0.59	0.18	HN
NUE	0.99 **		-0.18	-0.59	0.18	
NRE _{leaf}	0.62	0.62		0.66 ***	0.83 **	
Remob _{prot}	0.29	0.29	0.67 ***		0.38	
Remob _{aa}	0.51	0.51	0.91 ***	0.23		
	LN					

The correlation was determined by the Pearson test ($n=30$, $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$). LB_{prod}: leaf biomass production in grams (data given in Figure D-1A). NUE: N use efficiency expressed as the LB_{prod} per milligram of N provided by the nutrient solution (Figures D-1B and D-1C). The NRE_{leaf}: N Remobilization efficiency of the source leaf (% of N remobilized; Figure D-2). The Remob_{prot} and the Remob_{aa}: remobilization of the soluble proteins and amino acids in the source leaf, respectively (Figures D-3 and D-4).

Table D-S5: Correlation between the LB_{prod} , the NUE, the amount of N from remobilization and uptake, the NUtE, NRE and leaf senescence status of Oase_{Gr1}, Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3}, and Aviso_{Gr4}.

	LB_{prod}	NUE	N_{remob} whole plant	N_{uptake} whole plant	N_{tot} toward the younger leaves	N_{remob} toward the younger leaves	N_{uptake} toward the younger leaves	NRE whole plant	NUtE whole plant	Senescence status	NRE_{leaf}	
LB_{prod}		0.99***	-0.34	0.26	0.43	-0.10	0.51	-0.07	0.06	-0.10	-0.16	HN
NUE	0.99***		-0.33	0.26	0.43	-0.11	0.51	-0.07	0.05	-0.11	-0.15	
N_{remob} whole plant	-0.49	-0.49		0.16	0.21	0.39	0.10	-0.28	-0.56	-0.66*	0.74*	
N_{uptake} whole plant	-0.07	-0.07	0.04		0.93***	0.22	0.95***	-0.36	-0.84***	-0.73**	0.31	
N_{tot} toward the younger leaves	-0.15	-0.15	0.25	0.95***		0.46	0.95***	-0.54	-0.787*	-0.357	0.23	
N_{remob} toward the younger leaves	-0.14	-0.14	0.60*	0.66*	0.84***		0.17	-0.77**	-0.60*	-0.39	-0.11	
N_{uptake} toward the younger leaves	-0.13	-0.13	0.05	0.99***	0.96***	0.67*		-0.34	-0.73**	-0.74**	0.30	
NRE whole plant	0.65*	0.65*	-0.47	-0.09	-0.16	-0.17	-0.14		0.63*	0.54	-0.05	
NUtE whole plant	0.55	0.55	-0.59*	-0.69*	-0.79**	-0.76**	-0.72**	0.43		0.85***	-0.43	
Senescence status	0.52	0.52	0.27	-0.04	0.01	0.24	-0.10	0.56	0.12		-0.69*	
NRE_{leaf}	0.63*	0.63*	-0.10	-0.56	-0.57*	-0.35	-0.62*	0.20	0.52	0.27		
LN												

The correlation was determined by the Pearson test ($n=12$, $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$). LB_{prod} : leaf biomass production in grams (data given in Figure D-1A). NUE: N use efficiency expressed as grams of LB_{prod} per milligram of N provided by the nutrient solution (Figures D-1B and D-1C). N_{remob} whole plant: amount of N remobilized at the whole plant level, NRE: N remobilization efficiency expressed as milligrams of N remobilized per 100 mg of N in source organs (Figure D-6). N_{uptake} whole plant: total N amount taken up throughout the experiment (Figure D-6). N_{tot} toward the younger leaves: total N distributed to the younger leaves, including the N from remobilization (N_{remob} to the younger leaves) and from uptake (N_{uptake} to the younger leaves; Figure D-7). The NUtE: N utilization efficiency expressed as the grams of LB_{prod} per milligram of N distributed to the younger leaves (Figure D-7). The senescence status: number of senescing leaves at whole plant level (Table D-S3). NRE_{leaf} : the N remobilization efficiency in the source leaf (Figure D-2).

I.II. Article 2 : A comparative study of proteolytic mechanisms during leaf senescence of four genotypes of winter oilseed rape highlighted relevant physiological and molecular traits for NRE improvement

Abstract

Winter oilseed rape is characterized by a low N use efficiency related to a weak leaf N remobilization efficiency (NRE) at vegetative stages. By investigating the natural genotypic variability of leaf NRE, our goal was to characterize the relevant physiological traits and the main proteases classes associated with an efficient proteolysis and high leaf NRE in response to ample or restricted nitrate supply.

The degradation rate of soluble proteins and the protein D1 (a thylakoid-bound protein) were correlated to N remobilization, except for the genotype Samouraï which showed a low NRE despite a high soluble protein proteolysis. In response to restricted nitrate, high degradation of soluble proteins was associated with serine, cysteine and aspartic proteases at acidic pH.

Low leaf NRE was related to a weak proteolysis of both soluble and thylakoid-bound proteins. The results obtained on the genotype Samouraï suggest that the timing between the onset of proteolysis and abscission could be determinant. The specific involvement of acidic proteases suggest that autophagy and/or senescence-associated vacuoles are implied in N remobilization in response to N limitation. Data revealed that rate of D1 degradation could be a relevant indicator of leaf NRE and used as a tool for plant breeding.

Keywords: *Brassica napus*, N remobilization, genotypic variability, proteolysis, acidic proteases.

Abbreviations : N, nitrogen; NUE, nitrogen use efficiency; NUtE, nitrogen utilization efficiency; NRE, nitrogen remobilization efficiency; NAE, nitrogen assimilation efficiency; HN, high nitrogen; LN, low nitrogen; LHCII, light harvesting complex II; PSII, photosystem II; CP, cysteine proteases; SP, serine proteases; AP, aspartic proteases; MP, metalloproteases; CV, chloroplast vesiculation protein; CCV, CV-containing vesicles; SAV, senescence-associated vacuoles; RCB, Rubisco-containing bodies; CND41, chloroplast nucleoid DNA binding protein 41; FtsH, filamentation temperature-sensitive H proteases; lhcb3, LHCII type III chlorophyll a/b-binding protein; Rubisco, Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase; PE, soluble protein extract; LSU, large subunit of Rubisco; SSU, small subunit of Rubisco

1. Introduction

Nowadays, 85-90 million metric tons of nitrogenous fertilizers are used worldwide annually, and it is expected to increase at least 3-fold by 2050 (Good *et al.*, 2004; Tilman, 1999). The N fertilizers in excess may lead to water and soil pollution due to leaching and cause emissions of greenhouse effect gas (nitrous oxide) involved in the global warming. Oilseed rape, which is the third most cultivated oleaginous crop worldwide, needs high level of N fertilizers (160-250 kg.ha⁻¹) to reach the expected seed yield (Rathke *et al.*, 2005). Moreover, the average N use efficiency (NUE) of winter oilseed rape (10 kg DM. kg⁻¹ N available) is lower than other crops, such as winter barley, wheat and oat (23 to 27 kg DM. kg⁻¹ N available) (Sylvester-Bradley and Kindred, 2009). Indeed, despite the high capacity of mineral N absorption of oilseed rape (Lainé *et al.*, 1993), only 50% of the N fertilizer is recovered in seeds at harvest (Schjoerring *et al.*, 1995). Consequently, in order to improve the agro-environmental balance of oilseed rape, the optimization of NUE is becoming one of the main challenges in current breeding programs.

The NUE is the result of the N uptake efficiency (NUpE) and the N utilization efficiency (NUtE). Investigations on 4 spring genotypes (Svecnjak and Rengel, 2006) or 10 winter genotypes (Girondé *et al.*, 2015b) have highlighted that genotypic variations of NUE of oilseed rape at vegetative stages were mainly related to NUtE. In addition, even if a high N uptake is an obvious prerequisite to a high NUE, the improvement of NUtE could lead to optimize the NUE with a similar or a lower amount of N taken up, which is expected in a context of lower N inputs. The NUtE includes two components: the N remobilization efficiency (NRE) and the N assimilation efficiency (NAE). An enhanced NAE can improve the NUE of Brassicaceae, as demonstrated by mutants overexpressing enzymes of the N metabolism (glutamine synthetase, alanine aminotransferase etc.) of oilseed rape and *Arabidopsis* (Good and Beatty, 2011). On the other hand, at the vegetative stages, the leaves of oilseed rape may fall on the soil after abscission with a high residual N (up to 3.5% of N in leaf dry matter) (Malagoli *et al.*, 2005b), which could lead to a N loss of 100 kg N.ha⁻¹.year⁻¹ (Dejoux *et al.*, 2000). In addition, the removal of 50% of leaves during vegetative stages led to a decrease of 30% of pod walls number, despite a higher growth and N uptake (Noquet *et al.*, 2004). Moreover, simulations carried out by modelling studies have suggested that a decrease of the residual N amount in fallen leaves by 1% may lead to an increase by 5-10% of seed yield of winter oilseed rape (Malagoli *et al.*, 2005a). These results demonstrate that the N remobilization from leaves during vegetative stages is crucial for growth and seed yield. Consequently, the characterization of cellular mechanisms associated with an efficient foliar N remobilization would help to identify traits for the selection of genotypes with reduce N loss and higher seed yield with lower N inputs and, therefore, decrease the economic cost and risks of pollution by excessive N fertilization.

In leaf cells of oilseed rape, N is mainly stored as proteins (70 to 90% of reduced N-compounds (Peoples and Dalling, 1988)). During N remobilization, proteins are mainly degraded into peptides and amino acids by different classes of proteases. The resulting amino acids are exported from the source organs to the sink tissues by phloem vessels, after a conversion into their transportable form (Lohaus and Moellers, 2000; Lohaus and Schwerdtfeger, 2014) by enzymes of N metabolism (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). The study of amino acids amount in various subcellular compartments in oilseed rape (including cytosol, vacuole and plastids) did not show any amino acids accumulation during leaf N remobilization (cv. Lirajet (Tilsner *et al.*, 2005)). In addition, no accumulation of amino acids was observed in senescent leaves of 11 genotypes of winter oilseed rape having different leaf NRE (Desclos *et al.*, 2009; Girondé *et al.*, 2015b). As the conversion and export of amino acids appear efficient at vegetative stages, the proteolysis is supposed to be the limiting factor of leaf NRE (Avicé and Etienne, 2014). Indeed, the soluble proteins degradation is highly correlated to the N remobilization in senescent leaves of 10 winter oilseed rape (Girondé *et al.*, 2015b).

The chloroplasts can contain up to 70% of the proteins of the mesophyll cell (Gan and Amasino, 1997; Peoples and Dalling, 1988), making the dismantlement of these organelles a special interest in the study of N remobilization during leaf senescence. The ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (Rubisco) is localized in the stroma and can represent 50% of the soluble proteins in the mesophyll cell (*i.e.* 20-30% of the N in mesophyll cell (Ellis, 1979; Hörtensteiner and Feller, 2002; Kumar *et al.*, 2002; Makino *et al.*, 1984; Matile *et al.*, 1996)). In addition to the Rubisco, the thylakoid-bound proteins of the light harvesting complex II (LHCII) of the photosystem II (PSII) contains up to 20% of the N of the cell, which also made their degradation crucial for N remobilization (Matile, 1992). The thylakoid-bound proteins (such as the PSII proteins) are stabilized in the membrane by chlorophylls, which need to be degraded for proteolysis (Hörtensteiner and Feller, 2002). Despite the high N content of the PSII proteins, their catabolism is less studied than Rubisco one.

The first step of proteolysis of the chloroplastic proteins, such as Rubisco, is supposed to be performed by chloroplastic proteases (Martínez *et al.*, 2008b). No involvement of serine proteases (SP) was clearly highlighted in the degradation of chloroplastic proteins during the senescence processes of oilseed rape leaves. However, SP were characterized during the leaf senescence of other Brassicaceae (*B. oleracea* (Coupe *et al.*, 2003)) and in particular Deg and Clp proteases for *Arabidopsis* (Luciński *et al.*, 2011a; Luciński *et al.*, 2011b; Nakabayashi *et al.*, 1999). The Deg proteases are especially involved in the efficient degradation of the thylakoid-bound protein D1 of the PSII in response to high light conditions (Kato and Sakamoto, 2009). Several Deg proteases are also able to degrade various proteins of the LHCII *in vitro* (Luciński *et al.*, 2011a; Luciński *et al.*, 2011b; Sun *et al.*, 2010a; Zienkiewicz *et al.*, 2012). In addition, the D1 protein is degraded by the filamentation temperature-

sensitive H (FtsH) that belong to the class of metalloproteases (MP) (Wagner *et al.*, 2012). Two FtsHs are accumulated during senescence of oilseed rape leaves in response to nitrate limitation or privation (Desclos *et al.*, 2009). These proteases could also be crucial in the degradation of the proteins lhcb1 and 3 of the LHCII in *Arabidopsis* (Zelisko *et al.*, 2005), even if a recent study contradicts this result (Wagner *et al.*, 2011). In addition, an increase of metalloprotease activity is observed during post-harvest senescence of Broccoli (Coupe *et al.*, 2003) and a metalloprotease zinc-dependent of bean is able to degrade Rubisco *in vitro* (Brushnell *et al.*, 1993). An aspartic protease (AP) from tobacco, CND41 (chloroplast nucleoid DNA binding protein 41), is also supposed to be involved in the Rubisco degradation at pH 7.5. In addition, a delayed senescence and a default in N remobilization were observed in a knock-out CND41 mutant, suggesting a crucial role of this AP for leaf proteolysis associated with senescence in tobacco (Kato *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2005). A CND41 homologue was identified for *Arabidopsis* (56 % identity) with a similar function (Diaz *et al.*, 2008), and few proteins of *Brassica napus* present some similarities to CND41 (up to 52% identity), suggesting that CND41 homologue exists in oilseed rape.

After a first step of degradation in the chloroplasts by SP, AP and MP, a degradation by proteases from vacuole and/or cytosol is supposed, suggesting the involvement of subcellular trafficking. Indeed, proteins of the stroma (such as Rubisco and glutamine synthetase 2) were found in small vesicles (RCB) (Chiba *et al.*, 2003), which are probably addressed to the central lytic vacuole (linked to the mechanisms of autophagy) (Ishida *et al.*, 2014; Ishida *et al.*, 2008) and in small vacuoles (senescence-associated vacuole; SAV), where these proteins can be degraded by cysteine protease (CP; such as SAG12) and SP (Martínez *et al.*, 2008b). The fact that no PSII proteins were found in SAV or RCB (Chiba *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2008a), suggest different pathways of degradation between stromal and thylakoid-bound proteins. Consequently, the proteolysis of thylakoid-bound proteins could be completely performed in chloroplast during the first step of senescence while stromal proteins could be degraded *via* a pathway involving chloroplast and extra-plastidic compartments (Martínez *et al.*, 2008a). However, new vesicles, the CV-containing vesicles (CCV) formed at the final stage of the chloroplast dismantling, potentially addressed to vacuoles, contains the protease FtsH1, a thylakoid-bound protease (Wang and Blumwald, 2014). In addition, these vesicles are associated to protein CV (chloroplast vesiculation), which is supposed to destabilized the photosystem II, leading to a high susceptibility of the thylakoid-bound proteins of the PSII to chloroplastic proteases. Numerous vacuolar proteases of oilseed rape, such as CP and AP (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Desclos *et al.*, 2009; Noh and Amasino, 1999; Stroehrer *et al.*, 1997) are supposed to be involved in the degradation of the chloroplastic proteins during senescence in the lytic vacuole and SAV (Martínez *et al.*, 2008b). More precisely, proteomics analysis have reported that the CP SAG12 and an AP (GI: 1326165) are highly abundant during leaf senescence in response to nitrate limitation or

privation (Desclos *et al.*, 2009) or in dead leaves of oilseed rape cv. Capitol (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014), suggesting a role of these specific proteases in the late phase of senescence. At least, the β 1 subunit of the proteasome 26S, mainly localized in the cytosol, was accumulated in senescent leaves of oilseed rape in response to a limitation/privation of nitrate (Desclos *et al.*, 2009), but its role remains unknown.

By investigating the natural genotypic variability of the leaf N remobilization observed in 4 genotypes of winter oilseed rape at vegetative stages (Aviso, Oase, Samourai and Californium) (Girondé *et al.*, 2015b), the present study aims to characterize the relevant physiological traits and the main proteases classes associated with an efficient protein remobilization, which could be used as a tool for plant breeding. To reach this goal, the dynamics of leaf N remobilization were studied in relation with the changes in the amino acid amount, the degradation of soluble proteins (including Rubisco) and thylakoid-bound proteins of the PSII (D1 and lhcb3), and the proteolytic activities at acidic and neutral pH.

2. Materials and methods

2.1. Experimental Design

Four genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Aviso, Oase, Californium and Samourai), known to present a contrasted foliar N remobilization, were chosen from a preliminary screening of 10 genotypes (Girondé *et al.*, 2015b). Briefly, after germination, plants were transferred in pots (1 plant per pot) in perlite (2v) / vermiculite (1v) under greenhouse conditions (thermoperiod of 20°C (day-16h) and 15°C (night-8h)). Plants were supplied with 90 mL of 25% Hoagland nutrient solution (1.25 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O, 1.25 mM KNO₃, 0.5 mM MgSO₄, 0.25 mM KH₂PO₄, 0.2 mM EDTA, 2NaFe₃H₂O, 14 μM H₃BO₃, 5 μM MnSO₄, 3 μM ZnSO₄, 0.7 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.7 μM CuSO₄, 0.1 CoCl₂) renewed twice a week. From this transfer in pots and during 6 weeks, the nutrient solution contained 3.75 mM of labelled ¹⁵N-nitrate (2.5 atom% excess), in order to estimate precisely the leaf N remobilization (Salon *et al.*, 2014). After the 6 weeks of labelling, the ¹⁵N-nitrate was removed from the nutrient solution and replaced by ¹⁴N-nitrate (corresponding to Day 0 (D0) of the experiment). The plants were then supplied during 21 days with 25% Hoagland solution (90 mL.day⁻¹ per plant) with two different N concentrations: high (HN: 3.75 mM) or low nitrate (LN: 0.375 mM). Along the experiment, all leaves were numbered in order of appearance (leaf rank #1 corresponded to the oldest leaf). To study the processes of N remobilization, a leaf mature at D0 undergoing senescence during the experiment, was chosen on the basis of its leaf area (by LI-COR 300 area meter, LI-COR, Lincoln, NE, USA) and chlorophyll content (determined by SPAD: Soil Plant Analysis Development; Minolta, SPAD-502 model) as previously described by Girondé *et al.* (Girondé *et al.*, 2015b). This leaf, called the “source leaf”, presented a mean value for leaf area of 127.91 cm² (± 18.60% of variation) for leaf area and 52.20 (± 5.52% of variation) for SPAD in the 4 genotypes. This

source leaf corresponded to leaf rank number 11 for Californium and leaf rank number 12 for the other genotypes. The source leaf was harvested after 14 (D14) and 21 (D21) days of N treatments. Half of the source leaf was freeze-dried for dry matter quantification and biochemical analysis, and the other half was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further protein quantification and proteolytic assays.

2.2. Quantification of total N and ¹⁵N amounts

To determine the foliar N remobilization, the N and ¹⁵N amounts in the source leaf of the 4 genotypes were quantified at D0, D14 and D21 by an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) linked to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, IsoPrime GV instruments, Manchester, UK).

2.3. Extraction and quantification of amino acids

For the extraction of amino acids, 1 mL of sodium phosphate 100mM (pH 7.5) was added to 25 mg of freeze-dried leaf samples and incubated twice (30 min, 80°C) with 1 mL of 80% and 50% ethanol, respectively. After each incubation, the resulting mixtures were centrifuged (10 min, 12 000 g, 4°C) and the supernatants containing amino acids were pooled, evaporated and re-suspended in water. To determine the amino acid concentration, 1 mL of ninhydrin reagent (112 mM ninhydrin and 3.85 mM tin chloride in 100 mM citrate buffer pH 5, 50% Dimethylsulfoxide (DMSO), v/v) were added to 100 µL of amino acid extract. After incubation for 20 min in boiling water and 10 min on ice, 5 mL of 50% ethanol were added and the absorbance was read at 570 nm. The concentration of amino acids was calculated using a range of L-leucine standards from 0.2 to 2 mM.

2.4. Extraction and quantification of soluble proteins

The soluble proteins of the source leaf were extracted from 200 mg of fresh matter previously crushed in a mortar with liquid nitrogen in presence of 500 µL of citrate (20 mM)-phosphate (160 mM) buffer (pH 6.8) containing 50 mg of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). The homogenate was centrifuged 1 h at 12 000 g (4°C) and the supernatant, containing the soluble proteins, was adjusted in a microtube to 500 µL with citrate-phosphate buffer. The concentration of the soluble proteins was quantified by protein-dye staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.5. Determination of proteolytic activities using the Rubisco large subunit as substrate

In order to identify the proteases involved in the proteolysis processes associated with leaf N remobilization in the 4 genotypes, a test of proteolytic activities using large subunit (LSU) of Rubisco as a substrate was performed in presence of specific inhibitors of the

different classes of proteases at pH 5 and 7.5 (Girondé *et al.*, 2015a). Because this previous study on senescing leaves of oilseed rape demonstrated that the variations between biological repetitions observed for quantification of soluble protein content and for the proteolytic activity test were not significantly different, the three biological replicates of the soluble protein extract (PE) obtained from source leaf at D14 were pooled for the proteolytic activities. The pool of protein extracts was either incubated at 37°C ($t+\Delta t$) or not (t_0) at pH 5 in sodium acetate buffer (125 mM final concentration containing 0.8% β -mercaptoethanol, v/v) for proteolytic activities at acidic pH (proteases in vacuole and apoplast) or at pH 7.5 in Tris-HCl buffer (125 mM final concentration containing 0.8% β -mercaptoethanol, v/v) for proteolytic activities at neutral pH (proteases in stroma and cytosol). Iodoacetamide (14.5 mM) was used as an inhibitor of cysteine proteases (PE+CPI) and aprotinin (68 μ M) as a serine protease inhibitor (PE+SPI). For characterization of metalloprotease and aspartate protease activities, 11 mM of 1-10 phenanthroline (PE+Me+MPI) and 20.6 μ M of pepstatin A (PE+Me+API) were used, respectively. For the inhibition of proteasome system, 20 μ M of MG132 (benzyloxycarbonyl-leu-leu-leucinol) were used (PE+DMSO+PI) but, due to the localization of proteasome in nucleus and cytosol, the inhibition was only performed at pH 7.5. Because of the solubility of 1-10 phenanthroline (MPI) and pepstatin A (API) in methanol, and the solubility of MG132 in dimethylsulfoxide (DMSO), the total protease activity was also carried out with 0.5% methanol (v/v; PE+Me) and 0.5% DMSO (v/v; PE+DMSO) as control.

The conditions of the proteolysis test had to be carefully adapted to the N treatments and the pH of incubation. Consequently, the amount of proteins used for this test of proteolysis differed between pH conditions: a total of 10 μ g (3.3 μ g of each triplicate) for the proteolytic activities at pH 5, and a total of 6 μ g (2 μ g of each triplicate) for the proteolytic activities at pH 7.5. By the same way, the duration of incubation was adapted at pH 5 as follows: 45 min for HN treatment except for Californium which needed 55 min; 20 min for LN treatment except for Californium which required 30 min. At pH 7.5, the duration of incubation was 60 min for Oase and 90 min for the other genotypes in both N conditions.

At t_0 , or after the incubation at 37°C ($t_0+\Delta t$), Laemmli 2X buffer (Laemmli, 1970) containing β -mercaptoethanol (5% ; v/v) was added to the protein samples (one volume of Laemmli 2X buffer per volume of protein extract) before protein denaturation for 7 min in boiling water. The resulting samples were loaded on Stain Free SDS-PAGE (Mini-PROTEAN TGX Stain Free 4-15% of acrylamide, Bio-rad®). The abundance of Rubisco large subunit (LSU) at t_0 and after the incubation at 37°C ($t_0+\Delta t$) was determined by quantification of the volume of LSU band (V_{LSU}) using Image Lab software (Bio-Rad®). To compare the genotypes, the proteolytic activities (% of degradation of LSU: %Deg) were defined for 20 min at pH 5 and 60 min at pH 7.5, by the following equation:

$$\%Deg = [[(V_{LSU} t_0 - V_{LSU} t_0+\Delta t) / T] \times T_x] \times 100 / V_{LSU} t_0$$

where $V_{LSU} t0$ and $V_{LSU} t0+\Delta t$ corresponds to the peak volume of LSU band at $t0$ and $t0+\Delta t$, respectively, T refers to the time of incubation and T_x is the time of incubation used to compare genotypes (20 min at pH 5 or 60 min at pH 7.5).

The inhibition of LSU proteolysis (%Inh) by the different protease inhibitors was determined as follows:

$$\%Inh = [V_{LSUinh} t0 - (V_{LSUinh} t0 - V_{LSUinh} t0+\Delta t)] \times 100 / (V_{LSUcontrol} t0 - V_{LSUcontrol} t0+\Delta t)$$

where $V_{LSUinh} t0$ and $V_{LSUinh} t0+\Delta t$ correspond to the peak volume of LSU with the proteases inhibitors at $t0$ and $t0+\Delta t$, $V_{LSUcontrol} t0$ and $V_{LSUcontrol} t0+\Delta t$ refer to the peak volume of LSU in the control, *i.e.* without protease inhibitor at $t0$ and $t0+\Delta t$, respectively.

2.6. Detection of proteolytic activities by zymograms

In gelyo protease activities were performed as reported by Dominguez and Cejudo (Dominguez and Cejudo, 1995). For zymograms, the three biological replicates of soluble protein extracts at D14 were pooled and a total of 75 μ g were loaded per lane. After adding Laemmli 2X buffer without β -mercaptoethanol (Laemmli, 1970), the proteins were separated by SDS-PAGE using a 5.5% polyacrylamide (w/v) stacking gel and a 10% polyacrylamide (w/v) resolving gel co-polymerised with gelatin (0.1%, w/v). The resulting gels were incubated 45 min in 25 mL 2-propanol 25% (v/v) and rinsed with water. After a 16 hours incubation (30°C) in 100 mL of sodium acetate buffer 100 mM pH 5 containing 10 mM dithiothreitol (DTT), the gels were stained with 0.25% Coomassie R-250 blue in 50% methanol and 10% acetic acid (v/v). The proteolytic activities were revealed as clear band using a destaining solution (20% methanol, 10% acetic acid, v/v) and the gels were analysed using Image Lab software (Bio-Rad®).

The bands showing a proteolytic activity on the zymograms were excised and washed several times with water. After drying, a trypsin digestion was performed overnight with a dedicated system (MultiPROBE II, Perkin-Elmer). The resulting peptides were extracted from the gel by two incubations period of 15 min in a 0.1% CH₃CN solution (w/v). Peptides were then dried and dissolved in starting buffer (3% CH₃CN and 0.1% HCOOH, w/v) for chromatographic elution. Peptides were enriched and separated using lab-on-a-chip technology (Agilent, Massy, France) and fragmented using an on-line XCT mass spectrometer (Agilent). The ESI LC-MS/MS data were converted into DTA-format files that were further searched for protein identification with MASCOT Daemon (Matrix Science, (<http://www.matrixscience.com/>)) in the NCBI nr-protein sequence database, Viridiplantae (green plants), and in the Brassica EST database (Brassica Genome Gateway 2007, (<http://brassica.bbsrc.ac.uk/>)). The spectra of each peptide were checked manually.

2.7. Immunodetections

The western blot of large (LSU) and small subunit (SSU) of Rubisco were performed using the soluble protein extract described below (2.4). For the immunodetection of insoluble proteins (D1 and lhcb3) that belong to the photosystem II (PSII) and the filamentation temperature-sensitive H proteases (FtsH), a specific method of protein extraction was performed (Desclos *et al.*, 2008): 200 mg of frozen fresh matter were crushed in the presence of liquid nitrogen and 50 mg of PVPP and were re-suspended in 1.75 mL of acetone containing 10% trichloroacetic (v/v). The extract was centrifuged at 16 000 g (3 min, 4°C) and the pellet was rinsed as described in Desclos *et al.* (Desclos *et al.*, 2008). The resulting pellet was resuspended in R2D2 buffer (5 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate, 20 mM dithiothreitol, 5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine, 0.5% IPG buffer pH 4 to 7 (GE Healthcare)) (Mechin *et al.*, 2003). The concentration of the protein extract was quantified by protein-dye staining (Bradford, 1976) as described below for soluble proteins (2.4).

For the western blot, the three biological replicates of protein extracts were pooled and 15 µg were loaded for protein immunodetection. After denaturation with Laemmli 2X buffer (Laemmli, 1970) containing 5% β-mercaptoethanol (v/v), the proteins were separated by SDS-PAGE (5.5% and 10% polyacrylamide (w/v) for the stacking and the resolving gel, respectively) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane as described by Desclos *et al.* (Desclos *et al.*, 2008). The immunodetection was made using specific polyclonal antibodies from rabbit provided by Agrisera® for the LSU (1/10000) and the SSU of Rubisco (1/5000), the lhcb3 (1/2000), the D1 proteins (1/20000) and the FtsH proteases (1/1000). The primary antibodies were detected by secondary antibodies from goat coupled with alkaline phosphatase (1/12000, Bio-Rad®) for LSU, SSU, lhcb3 and FtsH. For D1 protein, secondary antibodies from goat coupled with peroxidase were used (1/10000, Bio-Rad®) and detected by enhanced chemiluminescence using ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Primary and secondary antibodies were diluted in Tris buffer saline, tween 20 (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH8, Tween 20 0.15%, v/v) containing 5% milk (v/v) to avoid non-specific hybridization.

2.8. Statistical analysis

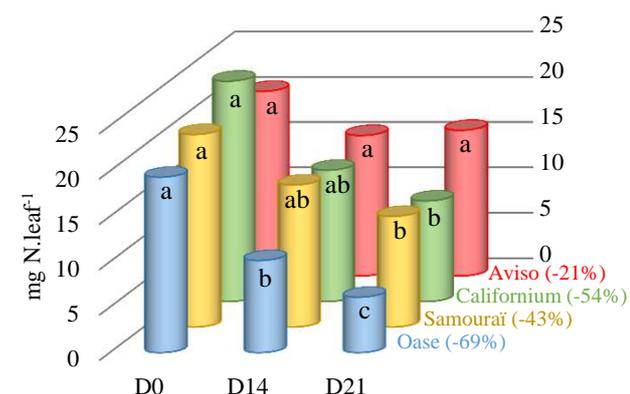
The normality of the data was studied with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test were used to compare the means. When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was carried out. Statistical significance was postulated at $p < 0.05$. The source of variation and the correlations were determined by an ANOVA and the Pearson test, respectively ($*=p < 0.05$, $**=p < 0.01$, $***=p < 0.001$). Three biological repetitions were used ($n=3$) and all the data presented are expressed as the mean ± standard error (SE), when the triplicates were not pooled.

Table D-1: Source of variation for the amount of N, ¹⁵N, soluble proteins and amino acids in the source leaf during all the experiment.

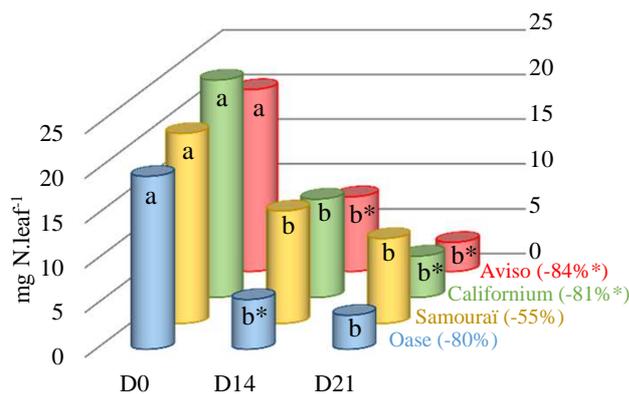
	Source of variation			
	N treatment (N)		Genotype (G)	NxG
	F_N	r	F_G	F_{NxG}
N amount	22.10***	0.45**	8.39***	6.78***
¹⁵ N amount	5.66*	0.29*	4.55**	2.82
Soluble protein amount	5.95*	0.33*	1.28	1.14
Amino acid amount	44.62***	0.63***	5.31**	3.74*

The plants were cultivated in restricted (LN, 0.375 mM) or ample (HN, 3.75 mM) nitrate supply. The main source of variation was deduced from an ANalysis Of VAriance (ANOVA) where N treatment (N), genotype (G), and N treatment x genotype (NxG) interactions were tested ($n=3$, $p<0.05=*$, $p<0.01=**$, $p<0.001=***$). The resulting F values are also presented. The r values correspond to the correlation between the N supply and (i) the N, (ii) the ¹⁵N, (iii) the soluble protein and (iv) the amino acid amounts ($n=12$).

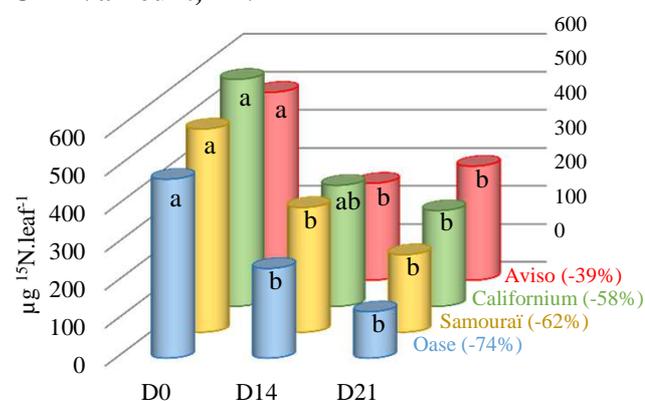
A- N amount, HN



B- N amount, LN



C- ¹⁵N amount, HN



D- ¹⁵N amount, LN

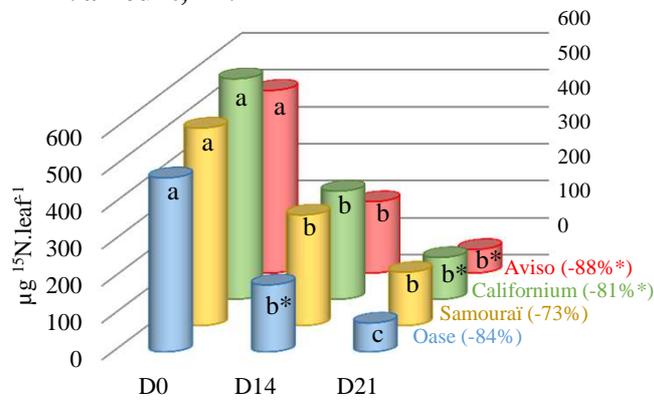


Figure D-8: Changes in N and ¹⁵N amounts in the source leaf in response to restricted (LN, 0.375 mM) or ample (HN, 3.75 mM) nitrate applied during 21 days. The N and ¹⁵N amounts, estimated in HN (A, C) and LN (B, D) conditions, are expressed as mg N.leaf⁻¹ and µg ¹⁵N.leaf⁻¹, respectively. The percentage between brackets corresponds to the N and ¹⁵N decrease at D21 in percentage of the initial level (D0). D0: day 0; D14: day 14; D21: day 21. Data are expressed as the mean ± standard error (SE). For each genotype, the statistical differences in kinetics are indicated by letters a,b,c and a difference between N treatment is indicated by an asterisk ($n=3$, $p<0.05$).

3. Results

3.1. Changes in N and ¹⁵N amounts during N remobilization in the source leaf

The N and ¹⁵N amounts were quantified to study the N remobilization in the source leaf in response to high (HN) or low (LN) nitrate regimes applied during 21 days. As expected, the N and ¹⁵N amounts during all the experiment (at D14 and D21) were correlated to the level of nitrate supply (Table D-1) but an N supply x genotypes interaction was found solely for the N amount ($p < 0.001$). For all genotypes, both N and ¹⁵N amounts showed similar trends during the 21 days of experiment (Fig. D-8). Except Aviso, all the genotypes presented a significant decrease in the N amount after 21 days of HN conditions (from -43% for Samouraï to -69% for Oase; Fig. D-8A). Compared with HN treatment, the N remobilization was enhanced under LN conditions for Aviso (since D14) and Californium (at D21) to reach -84 and -81% at D21, respectively (Fig. D-8B). At D14, leaf N amount in Oase was lower under LN conditions than in HN plants, but the final N remobilization was not significantly different to HN treatment. Similarly, for Samouraï no difference of N amount was observed between HN (-55%) and LN (-43%) conditions after 21 days of treatment. The ¹⁵N amount decreased for all genotypes in HN conditions (Fig. D-8C), with the higher depletion observed for Oase (-74%) and the lower one for Aviso (-39%) at D21. In response to LN conditions (Fig. D-8D), an enhanced ¹⁵N remobilization was observed at D21 only for Aviso (-88%) and Californium (-81%). Contrastingly, Oase and Samouraï showed a similar ¹⁵N remobilization at endpoint (D21) under LN conditions compared to HN treatment.

3.2. Changes in soluble proteins and amino acids amounts during N remobilization in the source leaf

The amount of soluble proteins in the source leaf depend on of the N supply ($p < 0.05$) but no interaction between the N supply and the genotype was found (Table D-1). Under HN conditions, the amount of soluble proteins decreased significantly for all genotypes except Aviso, with the highest decline for Oase (-79% at D21; Fig. D-9A). Compared with HN conditions, a higher decrease of soluble proteins was observed in Aviso and Californium in response to LN treatment (-84% and -69% at D21, respectively; Fig. D-9B), while Oase and Samouraï had a similar decrease under LN conditions.

The amount of amino acids was related to the N supply ($p < 0.001$) and the genotype ($p < 0.01$) and an interaction N supply x genotype was found ($p < 0.05$; Table D-1). Under HN conditions (Fig. D-9C), except for Californium, a significant decrease of the amino acid amount was observed for all genotypes (-77% for Oase, -50% for Aviso and -46% for Samouraï). For Aviso and Californium, the decline of the amino acid amount was higher in LN than in HN treatment since D14 and finally attained -78% and -82% at D21, respectively (Fig. D-9D). Compared with HN conditions, a lower amount of amino acids was observed at

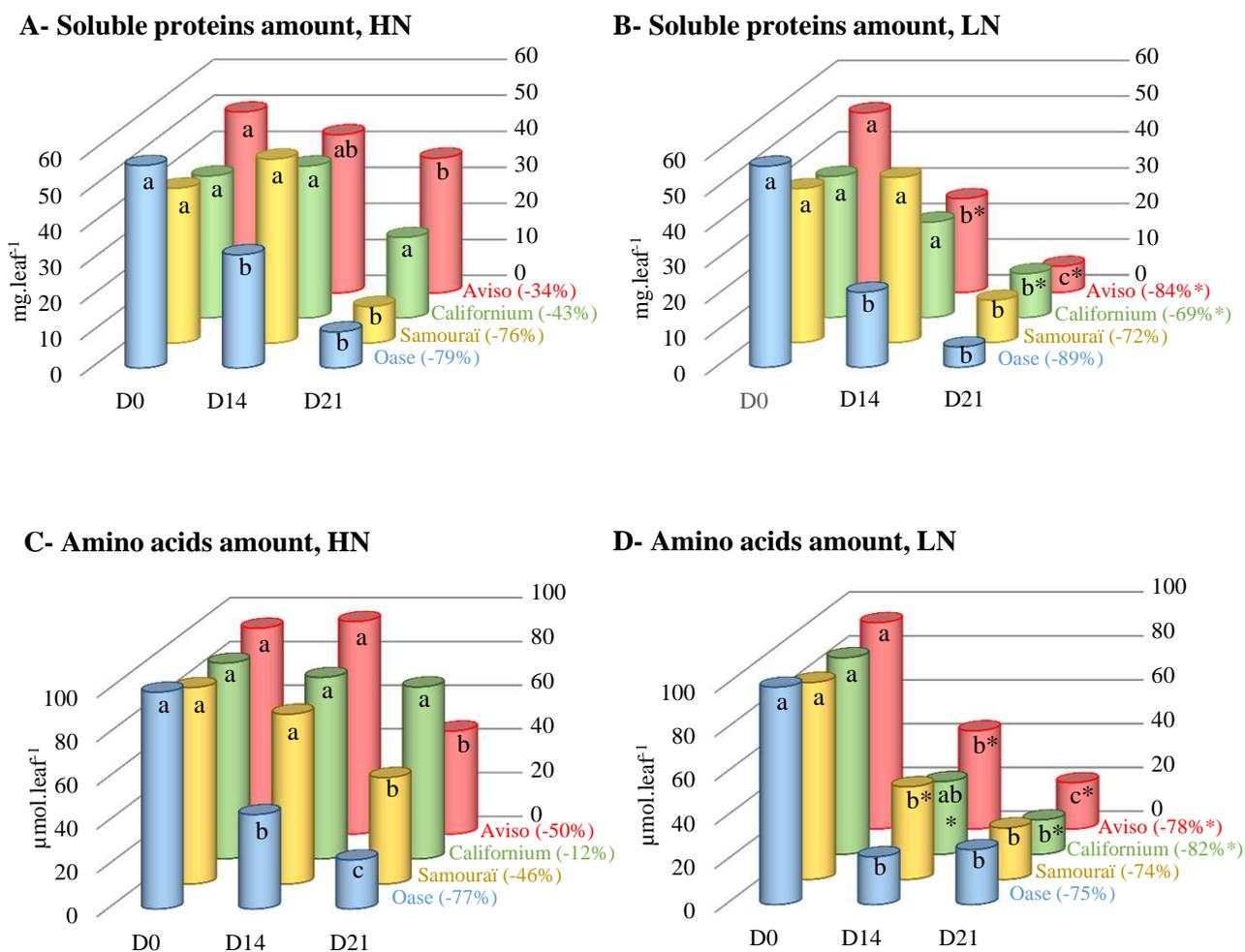


Figure D-9: Changes in soluble proteins and amino acids amounts in the source leaf in response to restricted (LN, 0.375 mM) or ample (HN, 3.75 mM) nitrate applied during 21 days. The amount of the soluble proteins and ¹⁵N, estimated in HN (A, C) and LN (B, D) conditions, are expressed as mg.leaf⁻¹ and μmol.leaf⁻¹, respectively. The percentage between brackets corresponds to the remobilization of soluble proteins and amino acids at D21 in percentage of initial level (D0). D0: day 0; D14: day 14; D21: day 21. Data are expressed as the mean ± standard error (SE). For each genotype, the statistical differences in kinetics are indicated by letters a,b,c and a difference between N treatment is indicated by an asterisk (n=3, p<0.05).

D14 for Samourai under LN supply, but the final amount of amino acids was similar in both N treatments for Oase and Samourai (Fig. D-9D).

3.3. Impact of nitrate supply on the abundance of Rubisco subunits and thylakoid-bound proteins of photosystem II (D1 and lhcb3)

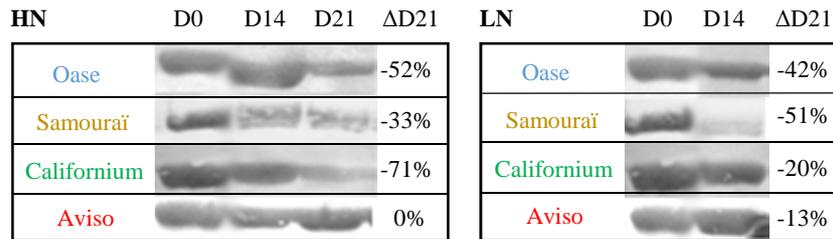
Under HN conditions, the abundance of the Rubisco large subunit (LSU; Fig. D-10A) decreased by 71% for Californium, 52% for Oase and 33% for Samourai, while no change in LSU abundance was observed for Aviso during the 21 days of treatment, meaning that this protein is not preferentially degraded in Aviso. The LSU abundance was similar in both N conditions for Californium and Aviso after 14 days, while a higher decrease of LSU was observed at D14 under LN conditions for Oase and Samourai. For the Rubisco small subunit (SSU; Fig. D-10B), the highest decrease under HN conditions was also observed for Californium (-71% at D21), followed by Oase and Samourai (-50% at D21). The decline of SSU was similar between HN and LN treatments for Samourai, Californium and Aviso, while a larger decrease of SSU abundance was observed in Oase at D14 in response to LN supply.

Under HN conditions, the highest decrease of the D1 protein of the photosystem II (Fig. D-10C) was observed for Oase (-78% at D21) and Californium (-56% at D21) while no change of D1 protein abundance was observed for Aviso during the 21 days of N treatment. Under LN conditions, the decrease of D1 protein abundance occurred earlier for all genotypes and the highest decline was again observed for Oase (-80% at D14). Under HN conditions, the abundance of the protein lhcb3 (Fig. D-10D), a protein that belongs to the light harvesting complex II, highly declined in the source leaf of Oase (-46%) and Samourai (-53%) at D21, but not in Aviso and Californium ones. The abundance of lhcb3 was lower in LN than in HN plants only for Oase (-50% at D14).

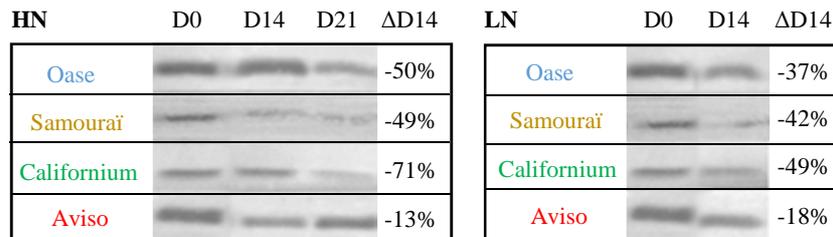
3.4. Proteolytic activities related to Rubisco LSU degradation and identification of the classes of proteases involved in remobilization of the source leaf proteins

Because a significant decrease of the soluble proteins was observed since 14 days under LN conditions (Fig. D-9B), the proteases activities were firstly investigated at D14 through the development of an original method using the LSU of Rubisco as substrate (see materials and methods for details). Due to the large involvement of the vacuolar proteases in the degradation of the stromal proteins (Roberts *et al.*, 2012), the proteolytic activity was firstly characterized at pH 5 (Fig. D-11 and Fig. D-S5). Under HN conditions, Oase and Samourai showed the highest proteolytic activity with a LSU degradation of 22.7% and 21.7% while it was lower for Aviso (16.4%) and Californium (15.6%; Fig. D-11A). Under LN conditions, an increase of the proteolytic activities occurred for all genotypes and, contrary to HN conditions, Aviso had the higher degradation (72%), followed by Oase (66.5%; Fig. D-11B). To define the classes of proteases involved in these proteolytic activities

A- Rubisco large subunit (LSU)



B- Rubisco small subunit (SSU)



C- Protein D1 of the photosystem II



D- Protein lhcb3 of the photosystem II light harvesting complex

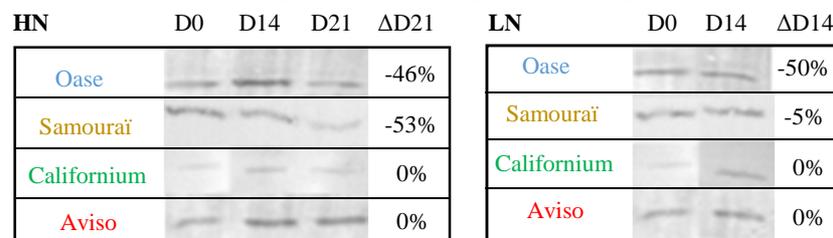


Figure D-10: Immunodetections of large (LSU; A) and small (SSU; B) subunits of Rubisco, D1 protein of the photosystem II (C) and lhcb3 of the light harvesting complex (D) in the source leaf in response to restricted (LN, 0.375 mM) or ample (HN, 3.75 mM) nitrate applied during 21 days. The protein extracts of the three biological repetitions were pooled and 15 μ g were loaded per lane for the immunodetection. The protein abundance was determined with specific antibodies (see material and methods for details). D0: day 0; D14: day 14; D21: day 21. In LN conditions, immunodetection was not performed at D21 because there was not enough proteins. The variation of protein abundance (Δ D21 or Δ D14) between D0 and D21 or D0 and D14 (when D21 is not available) is expressed as % of the abundance observed at D0 and is given on the right of each immunoblot.

at pH 5, the LSU degradation was quantified in presence of inhibitors of cysteine proteases (CPI), serine proteases (SPI), metalloproteases (MPI) and aspartate proteases (API). Under HN conditions, CPI caused the higher inhibition of proteolysis for all genotypes: Californium (50.1%), Aviso (45.6%), Samouraï (29.5%) and Oase (13.1%) (Fig. D-11C). In response to LN conditions, the proteolysis of LSU was strongly inhibited by CPI for all genotypes (from 36.8% of inhibition for Aviso to 99.99% for Californium, Fig. D-11D). In addition, a low inhibition of LSU proteolysis was observed with the SPI for Aviso and Oase (4% and 3.3% of inhibition, respectively) under HN conditions. Under LN treatment, the degradation of LSU was highly inhibited by SPI for all genotypes, from 28.9% to 60.8% of inhibition for Samouraï and Oase, respectively (Fig. D-11D). An inhibition of LSU proteolysis was observed in presence of the MPI for Californium in both N conditions (38.9% and 6.6% of inhibition under HN and LN conditions, respectively; Figs. D-11C and D-11D) and Oase under HN conditions (7.7% of inhibition; Fig. D-11C). The degradation of LSU was inhibited by the API solely for Californium under HN conditions (11.8%; Fig. D-11C). Under LN treatment, a substantial inhibition of LSU proteolysis by API was observed for all genotypes, except Californium (from 62.7% for Samouraï to 83.2% for Aviso) (Fig. D-11D).

Zymograms were also performed at pH 5 to identify the vacuolar proteases whose activity was specifically induced in leaf during N remobilization after 14 days of experiment (Fig. D-12). In both N conditions, proteolytic activities were detected at 70-75 kDa for Samouraï, Californium and Aviso but the proteomic analysis of the corresponding bands by LC-MS/MS did not allow identifying a protease. A proteolytic activity was also found at 37 kDa for all genotypes, especially for Aviso and Oase under HN conditions (Fig. D-12A). In response to LN treatment, this 37 kDa proteolytic activity was enhanced compared to HN conditions for Aviso and Oase (Fig. D-12B). The proteomics analysis by LC-MS/MS showed that these activities under LN conditions were associated with an aspartic protease of *Brassica napus* (GI: 1326165; Table D-S6), previously found in senescing and dead leaves of winter oilseed rape cv. Capitot (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014; Desclos *et al.*, 2009). In addition, another proteolytic activity was found around 30 kDa for Oase and Aviso, higher under LN (Fig. D-12B) than under HN conditions (Fig. D-12A), but the proteases were not identified successfully by proteomics.

The chloroplastic and cytosolic proteases are also supposed to play an important role in N remobilization (Roberts *et al.*, 2012). Consequently, the proteolytic activities were also studied at pH 7.5 (Fig. D-13 and Fig. D-S6). In both N conditions, the highest total proteolytic activity was found for Oase (44.8% and 74.7% of LSU degradation under HN and LN conditions, respectively; Figs. D-13A and D-13B) while the lower one was observed for Californium (28.2 and 35.9% under HN and LN conditions, respectively) and Aviso (30% in both N conditions). The degradation of LSU was inhibited by CPI for all genotypes under HN conditions, with a higher inhibition for Aviso (55.5%) and a lower one for Californium

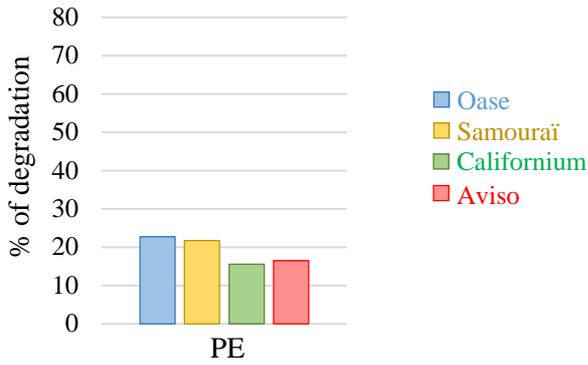
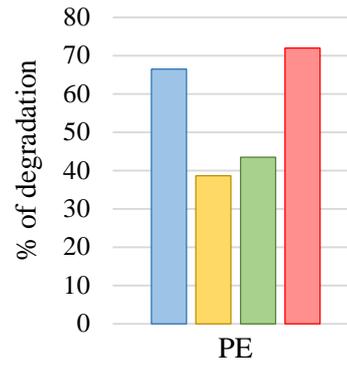
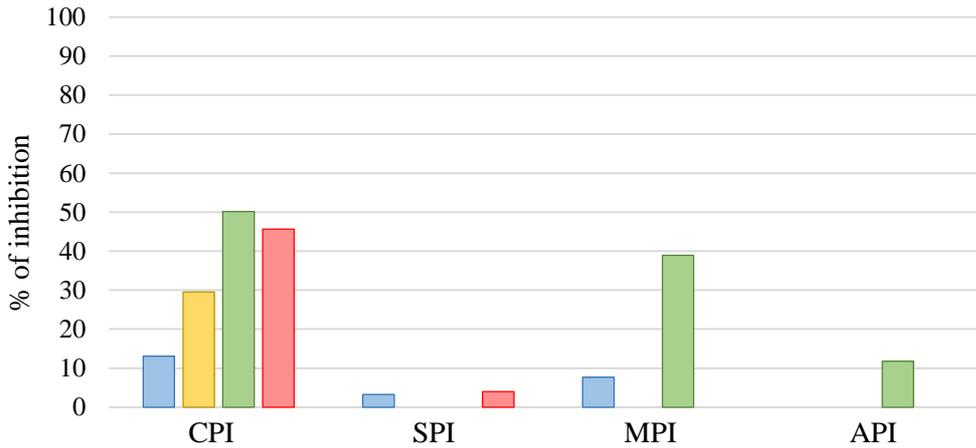
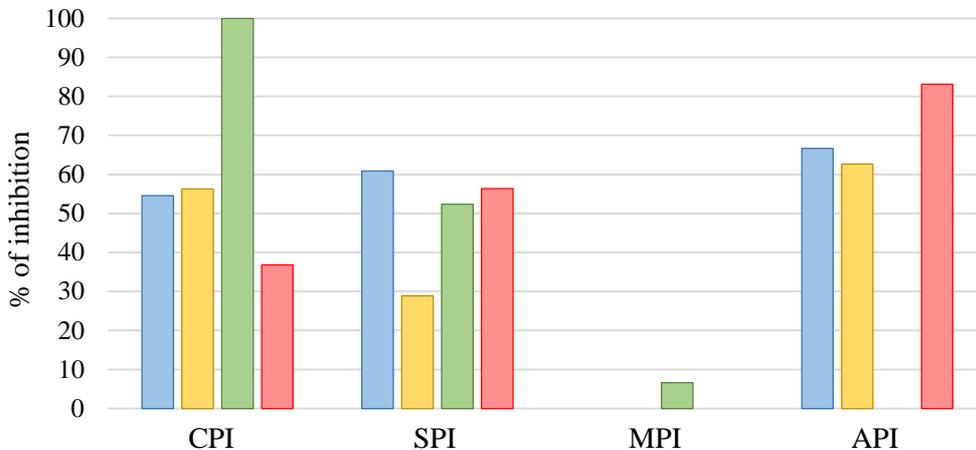
A- Proteolysis of LSU (pH 5, D14, HN)**B- Proteolysis of LSU (pH 5, D14, LN)****C- Inhibition of proteases (pH 5, D14, HN)****D- Inhibition of proteases (pH 5, D14, LN)**

Figure D-11: Total proteolytic activity at pH 5 at day 14 (D14; A,B) and the inhibition of cysteine proteases, serine proteases, metalloproteases and aspartic proteases by specific inhibitors (C,D). The plants were supplied with ample (HN, 3.75 mM; A,C) or restricted (LN, 0.375 mM; B,D) nitrate supply. The proteolytic activity corresponds to the Rubisco large subunit (LSU) degradation visualized on Stain Free gels and quantified by Image Lab software (Bio-Rad) after an incubation at 37°C (for details see Material and Methods). The total proteolytic activity was determined with protein extract (PE) without protease inhibitor and is expressed in percentage of degradation after 20 minutes of incubation. To determine the contribution of the different classes of proteases, the extract was incubated in presence of specific protease inhibitors to determine the percentage of inhibition of LSU proteolysis observed without inhibitor (% inhibition; C,D). The inhibitors used are : iodoacetamide for cysteine proteases (CPI), aprotinine for serine proteases (SPI), 1-10 phenanthroline for metalloproteases (MPI) and pepstatine A for aspartic proteases (API). Due to the solubility of 1-10 phenanthroline and pepstatine A in methanol, the total proteolytic activity was also determine with methanol. The detailed gels are presented in Figure D-S5.

(21.4%; Fig. D-13C). Under LN conditions, as at pH5, the inhibition of LSU degradation by CPI increased for Oase (53.25%), Californium (61.3%) and Samouraï (76.8%), while it decreased for Aviso (22.4%; Fig. D-13D). Under HN conditions, the proteolysis of LSU was weakly inhibited by SPI in the source leaf of Samouraï and Aviso and was much higher inhibited for Californium (25.1%; Fig. D-13C). In response to LN supply, the degradation of LSU was more strongly inhibited by SPI for Oase (44.9%) and Samouraï (49.4%), while it decreased for Californium (17.3% of inhibition) and was not detectable for Aviso (Fig. D-13D). The inhibition of LSU degradation by MPI was only observed under HN conditions for Oase (20.2%; Fig. D-13C) and under LN conditions for Samouraï (24.4%; Fig. D-13D). No inhibition of LSU degradation by API was observed whatever the genotypes and the N conditions, except for Samouraï under LN conditions (17.9%; Fig. D-13D). At least, the highest inhibition of LSU degradation was found in presence of the proteasome inhibitor (PI), whatever the genotype and the N supply (Figs. D-13C and D-13D).

To better understand the involvement of the FtsH proteases (metalloproteases located in chloroplasts), which were supposed to have a role in leaf N remobilization (Avice and Etienne, 2014; Desclos *et al.*, 2009), the abundance of these proteases was also analysed during the 21 days of experiment by immunodetection after western blotting (Fig. D-14). In both N conditions (Fig. D-14), the amount of FtsH remained stable for Aviso and Oase or slightly declined for Californium during the 21 days. Contrastingly, in the source leaf of Samouraï, the abundance of FtsHs strongly decreased in both N treatments between D0 and D14 and became nearly undetectable compared to other genotypes.

4. Discussion

A recent exploration of the genotypic variability of the NUE components of winter oilseed rape at vegetative stages revealed that a high biomass production in restricted N supply is linked to an enhanced NRE in leaves associated with a high N utilization efficiency of the N redistributed in growing leaves (Girondé *et al.*, 2015b). This previous work also confirmed that the amino acids export being generally efficient and the proteolysis mechanisms appeared to be the main limiting factor of leaf NRE during sequential senescence. Consequently, the identification of proteolysis mechanisms associated with a high NRE would help to find new traits of selection to identify genotype with higher biomass production under restricted N supply. To reach this goal, the mechanisms of proteolysis associated with N remobilization was studied in details in a senescing leaf of 4 genotypes (Aviso, Oase, Samouraï and Californium) representing 4 different profiles of response to a limitation of nitrate supply, as previously reported by Girondé *et al.* (Girondé *et al.*, 2015b).

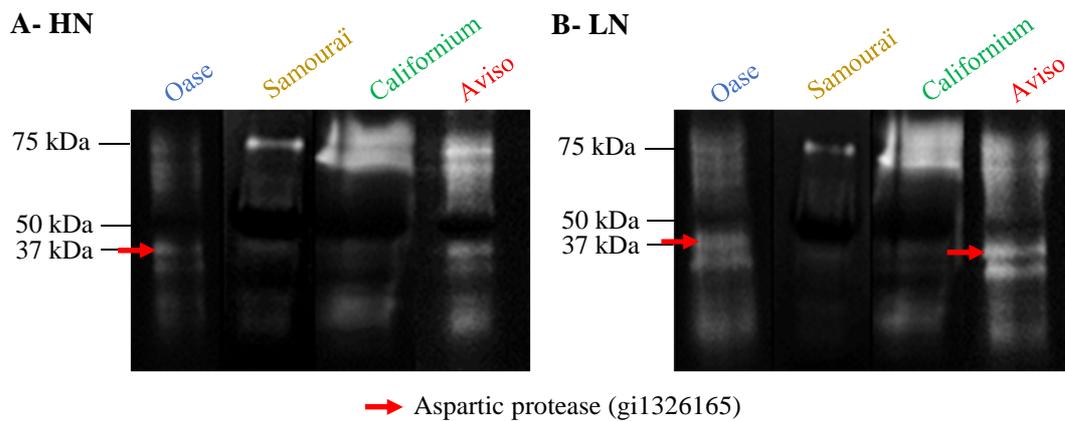


Figure D-12: Zymograms of the proteolytic activities observed at pH 5 in the source leaf in response to ample (HN, 3.75 mM; A) or restricted (LN, 0.375 mM; B) nitrate applied during 14 days. The soluble proteins of the three biological repetitions at day 14 (D14) were pooled and 75 μ g were loaded per lane. The white bands representing proteolytic activities at pH5 were analysed to identify the proteases responsible in HN (A) and LN (B) conditions. One aspartic protease was successfully identified and is indicated by red arrow (see Table D-S6 for details).

4.1. The improvement of leaf NRE in Aviso and Californium in response to LN supply is associated with a higher contribution of acidic proteases

For Aviso and Californium, the N remobilization under HN conditions (Fig. D-8A) is limited by the degradation of the soluble proteins (Fig. D-9A) and, especially for Aviso, by the degradation of the proteins D1 and lhcb3 (Figs. D-10C and D-10D). In addition, the low N remobilization of the genotype Californium under HN conditions (Fig. D-8A) is partially related to a low amino acid export (Fig. D-9C), indicating that amino acids can partially limit the N remobilization. For both genotypes, the massive increase of N remobilization in response to LN supply (Fig. D-8B) is associated with (i) a strong degradation of soluble proteins (Fig. D-9B), (ii) an increase of amino acid export (Fig. D-9D) and, to a lesser extent, (iii) a higher degradation of the membrane protein D1 (Fig. D-10C). Taking together, these results highlight that an efficient proteolysis of soluble and thylakoid-bound proteins, especially the D1 proteins, are needed to reach a high leaf NRE.

For both genotypes, the increase of proteolysis under LN conditions is linked to an increase of proteolytic activity at pH 5 (Fig. D-11B), associated with a large involvement of cysteine and serine proteases (Fig. D-11D). Due to the fact that no clear evidences of the degradation of thylakoid-bound proteins by vacuolar proteases have been found (Martínez *et al.*, 2008b), the high proteolytic activity at pH 5 under LN conditions is probably related to the high degradation of the soluble proteins. This result suggest that the N limitation induced a subcellular trafficking of the chloroplastic proteins to the lytic vacuoles. This traffic could imply the mechanisms of autophagy, known to be involved in the N remobilization in *Arabidopsis* (Avila-Ospina *et al.*, 2014) and/or CCV, vesicles recently observed at the end of the chloroplast dismantling (Wang and Blumwald, 2014). Another possibility is the degradation of the stromal proteins, like Rubisco and glutamine synthetase 2, in the senescence-associated vacuoles (SAV), as observed for tobacco and *Arabidopsis* (Martínez *et al.*, 2008a; Otegui *et al.*, 2005). Among the vacuolar proteases, the cysteine proteases are known to be involved in the senescence processes, and the high contribution of this class of proteases in our experiment confirms the previous studies made on oilseed rape (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997) and *Arabidopsis* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Diaz-Mendoza *et al.*, 2014; Otegui *et al.*, 2005). Among the cysteine proteases, SAG12 was immunolocalized in SAV in *Arabidopsis* (Otegui *et al.*, 2005) and was very abundant in senescent leaves of winter oilseed rape in response to low N supply (Desclos *et al.*, 2009). These data suggest that the protease SAG12 can be involved in the high cysteine proteases activities associated with the high N remobilization observed during leaf senescence in response to LN conditions for both genotypes. On the contrary, no serine proteases were previously identified in vacuoles, except a putative subtilisin-like in *Arabidopsis* (Carter *et al.*, 2004). However, activity of acidic serine proteases have been observed in SAV of tobacco (pH 5.2) (Martínez *et al.*, 2008a). Consequently, the enhanced degradation of the soluble

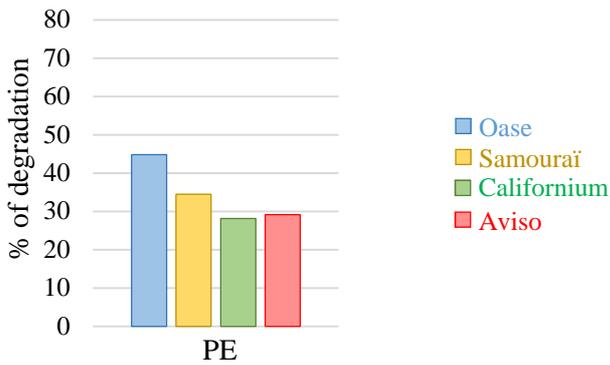
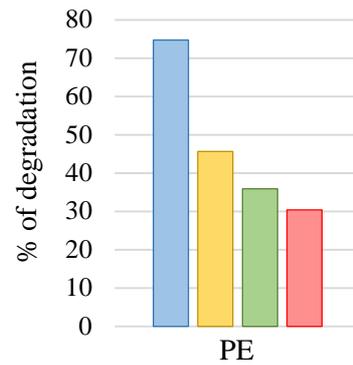
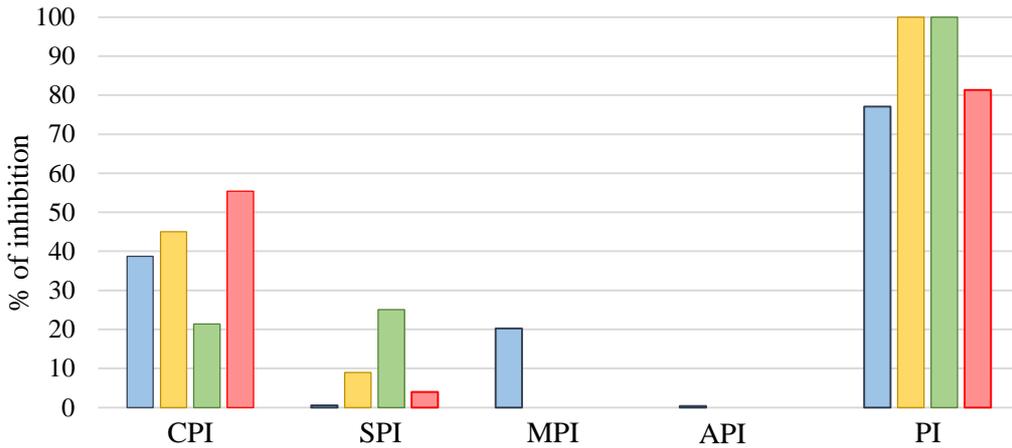
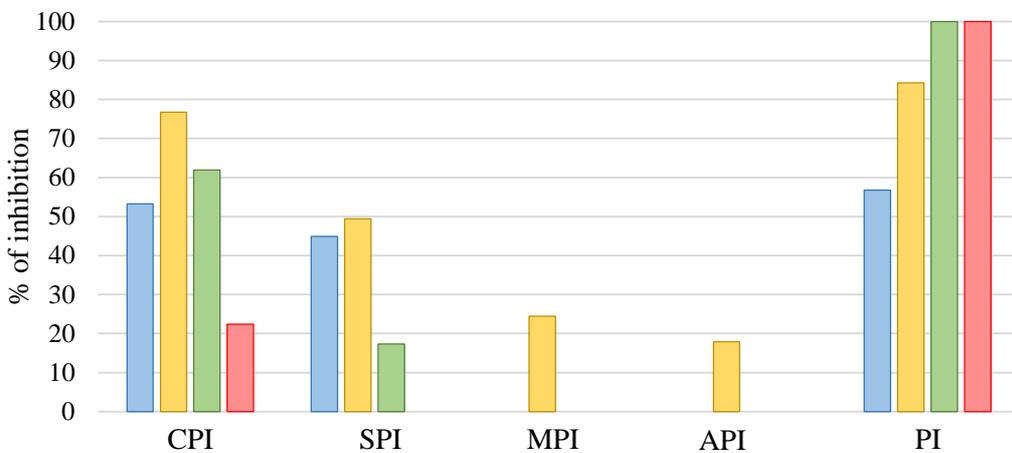
A- Proteolysis of LSU (pH 7.5, D14, HN)**B- Proteolysis of LSU (pH 7.5, D14, LN)****C- Inhibition of proteases (pH 7.5, D14, HN)****D- Inhibition of proteases (pH 7.5, D14, LN)**

Figure D-13: Total proteolytic activity at pH 7.5 at day 14 (D14; A,B) and the inhibition of cysteine proteases, serine proteases, metalloproteases, aspartic proteases and proteasome by specific inhibitors (C,D). The plants were supplied with ample (HN, 3.75 mM; A,C) or restricted (LN, 0.375 mM; B,D) nitrate supply. The proteolytic activity corresponds to the Rubisco large subunit (LSU) degradation visualized on Stain Free gels and quantified by Image Lab software (Bio-Rad) after an incubation at 37°C. The total proteolytic activity was determined with protein extract (PE) without protease inhibitor and is expressed in percentage of degradation after 60 minutes of incubation. To determine the contribution of the different classes of proteases, the extract was incubated in presence of specific protease inhibitors to determine the percentage of inhibition of LSU proteolysis observed without inhibitor (% inhibition; C,D). The inhibitors used are: iodoacetamide for cysteine proteases (CPI), aprotinine for serine proteases (SPI), 1-10 phenanthroline for metalloproteases (MPI), pepstatine A for aspartic proteases (API) and MG132 (carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal) for proteasome (PI). Due to the solubility of 1-10 phenanthroline and pepstatine A in methanol and the solubility of MG132 in DMSO, the total proteolytic activity was also determine with methanol and DMSO. The detailed gels are presented in Fig. D-S6.

proteins of Aviso and Californium under LN conditions (Fig. D-9B) could be due to an increase of subcellular trafficking involving the acidic cysteine and serine proteases of SAV but, to our knowledge, the accumulation of SAV in response to restricted N supply have never been investigated.

In addition, a high contribution of aspartic proteases at pH 5 was found in Aviso in response to LN treatment (Fig. D-11D) and associated with the identification of a putative vacuolar aspartic protease of *Brassica napus* (GI: 1326165) on zymograms (Figure D-12B and Table D-S6), which have numerous homologues in the *Brassica napus* genome (Table D-S6). This protease have been previously highlighted on 2-DE gels in response to nitrate limitation in oilseed rape (Desclos *et al.*, 2009) and seems therefore implied in the efficient leaf proteolysis observed in response to N limitation. However, no aspartic proteases were detected for Californium (Figs. D-11D and D-12B), suggesting that the efficient proteolysis can be reached by the involvement of various sets of proteases.

4.2. The high leaf NRE observed in Oase whatever the level of nitrate supply is related to efficient proteolysis mechanisms at neutral and acidic pH

Whatever the nitrate supply, Oase is characterized by a high N remobilization during senescence (Figs. D-8A and D-8B) consequently to (i) a high amino acids export (Figs. D-9C and D-9D), (ii) an efficient proteolysis of soluble proteins (Figs. D-9A and D-9B) and (iii) a high rate of degradation of D1 and lhcb3 proteins compared to other genotypes (Figs. D-10C and D-10D). These results suggest that the high leaf NRE of Oase is associated with an efficient proteolysis of both stromal and thylakoid-bound proteins. Taken together, the efficient degradation of D1 protein in Oase and the increase of D1 degradation observed in parallel to the improvement of N remobilization in response to LN supply for Aviso and Californium suggest that a high rate of D1 degradation is associated with an efficient N remobilization. To our knowledge, this is the first time that the D1 protein degradation is observed during the time course of senescence in oilseed rape leaves and was clearly associated with a high leaf NRE.

In both N conditions, the highest degradation rate of D1 protein in Oase compared to other genotypes (Fig. D-10C) could be due to the highest proteolytic activities at pH 7.5 (Figs. D-13A and D-13B). Indeed, the degradation of D1 protein in the PSII involves 2 types of chloroplastic proteases: the serine proteases Deg and the metalloproteases FtsH (Kato and Sakamoto, 2009; Wagner *et al.*, 2012). The FtsH amount is not higher than the other genotypes during all the experiment (Fig. D-14A) but the degradation of the chloroplastic proteins is also dependent on the substrate availability to proteolysis (Forsberg *et al.*, 2005; Lindahl *et al.*, 1995; Zelisko *et al.*, 2005). Consequently, the higher degradation of D1 protein in Oase under HN conditions can be partially due to the involvement of neutral metalloproteases, eventually the FtsH. For cyanobacteria, the Deg proteases are known to

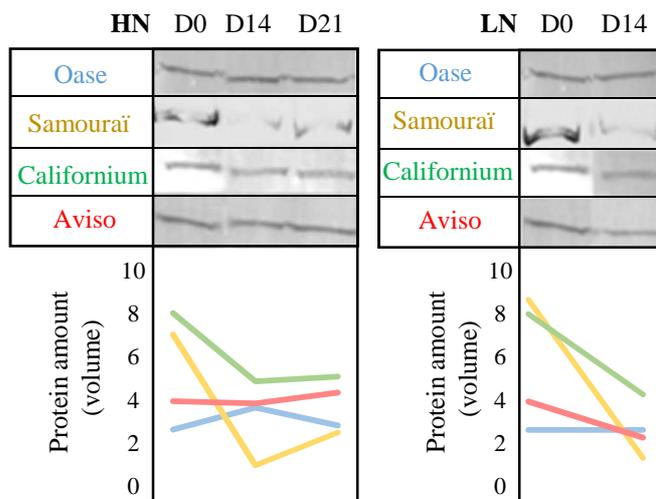


Figure D-14: Abundance of FtsH proteases in the source leaf in response to ample (HN, 3.75 mM) or restricted (LN, 0.375 mM) nitrate applied during 21 days. The protein extracts of the three biological repetitions were pooled and 15 μ g were loaded per lane for the detection of FtsH. The protein abundance was determined with specific antibodies (see Material and Methods for details). D0: day 0; D14: day 14; D21: day 21. In LN conditions, immunodetections was not performed at D21 because there was not enough proteins. The graph below immunoblots represents the changes of protein abundance.

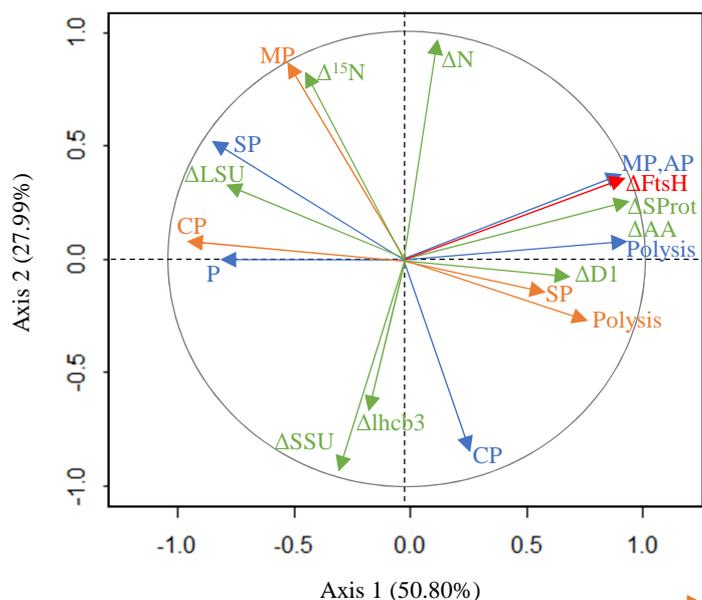
improve the D1 proteolysis by FtsH proteases during the degradation patterns of PSII (Huesgen *et al.*, 2009). Under LN conditions, the large degradation of the D1 protein (Fig. D-10C) is concomitant with a higher involvement of neutral serine proteases (Fig. D-13D) and, as shown by a principal component analysis (Fig. D-15B), is correlated with neutral serine protease activity. Consequently, the preferential degradation of D1 protein observed in Oase in response to N limitation could be related to the high contribution of serine proteases Deg, as observed for cyanobacteria (Huesgen *et al.*, 2009). In addition, this could be associated to a higher involvement of CCV (Wang and Blumwald, 2014). Indeed, these vesicles are associated to the protein CV (chloroplast vesiculation) which is supposed to destabilize the PSII at the last step of senescence, leading to a higher susceptibility of D1 proteins to the degradation by chloroplastic proteases. Consequently, the involvement of CCV in the high degradation of the protein D1 of the genotype Oase need to be further investigated.

The efficient proteolysis in both N conditions is linked to a high protease activity at acidic pH, especially cysteine, aspartic and serine proteases. As suggested below for Aviso and Californium (4.1), their high involvement in proteolysis under LN conditions (Fig. D-11D) suggest an enhancement of autophagy mechanisms and/or CCV in order to address the chloroplastic proteins towards the lytic vacuoles, and/or a higher degradation in SAV.

As reported for Aviso, the high contribution of aspartic proteases at pH 5 observed in Oase in response to N limitation (Fig. D-11D) was associated with an increase of the activity of the putative aspartic protease (GI: 1326165; Fig. D-12B and Table D-S6). This aspartic protease was also found on zymograms under HN conditions for Oase (Fig. D-12A) despite the lack of inhibition of the aspartic proteases (Fig. D-11C). This can be due to the fact that our inhibitor is not fully active on phytepsines, the family of aspartic proteases supposed to be involved in the senescence processes in tobacco (Kato *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2005), wheat (Gregersen and Holm, 2007) and *Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2008). In addition, CND41, the phytepsine of tobacco known to be involved in the Rubisco degradation, is slightly inhibited by the inhibitor pepstatine A (Murakami *et al.*, 2000). The aspartic protease detected on zymograms is not similar to CND41 (26% identity) but this protease is closed to other phytepsine proteases of *Arabidopsis* (92% identity; Table D-S6), and therefore, could be weakly inhibited by pepstatin A. In any case, the high activity of AP in Aviso and Oase under LN conditions is associated with the highest decrease of soluble protein contents, suggesting a crucial role in proteolysis in response to restricted nitrate supply. In addition, the same aspartic protease (GI: 1326165) was identified in senescing leaves of oilseed rape subjected to nitrate limitation (Desclos *et al.*, 2009) and was observed in the thirty most abundant proteins in dead leaves of oilseed rape (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014), making this protease a special interest to understand the proteolysis associated with leaf N remobilization, especially under restricted N supply.

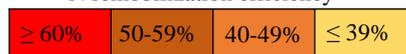
A- HN

Variables factor map (PCA)

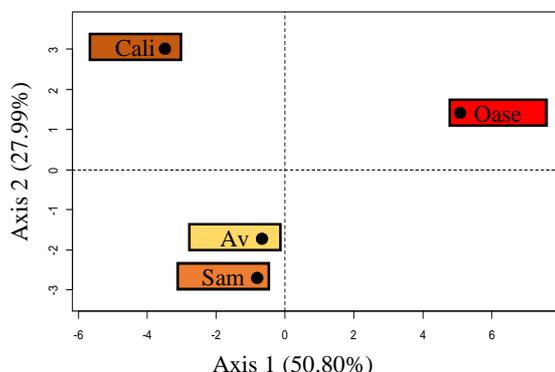


→ pH 5 → Decrease, degradation and/or export
 → pH 7.5 → Increase or accumulation

N remobilization efficiency

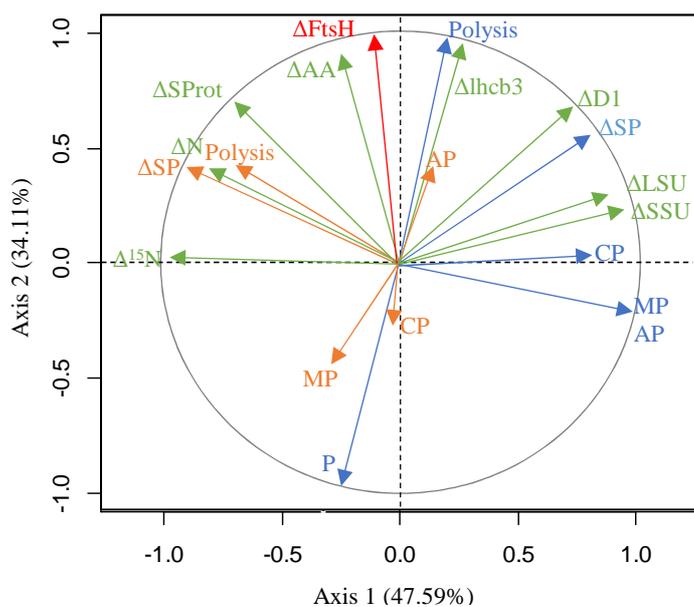


Individuals factor map (PCA)

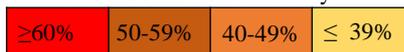


B- LN

Variables factor map (PCA)



N remobilization efficiency



Individuals factor map (PCA)

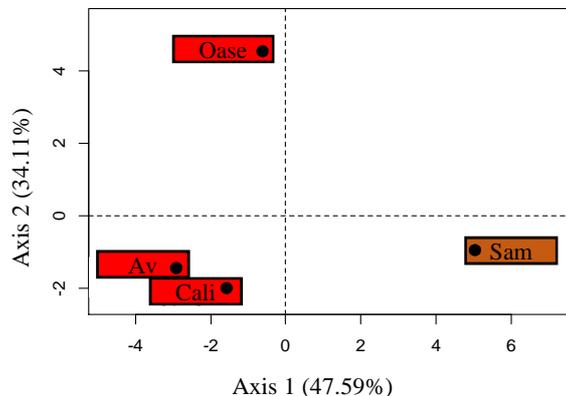


Figure D-15: Principal component analysis (PCA) of the criteria of N remobilization determined in response to ample (HN, 3.75 mM; A) and restricted (LN, 0.375 mM; B) nitrate applied during 21 days. In both case, the first axis is mainly associated to the total proteolysis at pH 7.5 at D14 and the second axis refers to the N remobilization between D0 and D14. On the individual factor map, the N remobilization in the source leaf is indicated by colour for each genotype. $\Delta^{15}\text{N}$: variation of ^{15}N amount between D0 and D14; ΔAA : variation of amino acids amount between D0 and D14; AP: contribution of aspartic proteases at D14; Av: genotype Aviso; Cali: genotype Californium; CP: contribution of cysteine proteases at D14; ΔD1 : variation of protein D1 amount between D0 and D14; ΔFtsH : variation of FtsH amount between D0 and D14; Δlhc3 : variation of lhc3 amount between D0 and D14; ΔLSU : variation of Rubisco large subunit amount between D0 and D14; MP: contribution of metalloproteases at D14; ΔN : variation of N amount between D0 and D14; P: contribution of proteasome at D14; Polysis: total proteolysis activity at D14; Sam: genotype Samourai; SP: contribution of serine proteases at D14; ΔSProt : variation of soluble protein amount between D0 and D14; ΔSSU : variation of Rubisco small subunit amount between D0 and D14.

4.3. The leaf NRE of Samourai is limited between proteolysis and amino acids export

In both N conditions, the genotype Samourai is characterized by an efficient degradation of the soluble proteins (Figs. D-9A and D-9B), associated with a high involvement of the acidic proteases, especially serine and cysteine proteases under LN conditions (Fig. D-11D). These results agreed with the hypothesis of the involvement of autophagy, CCV and/or SAV in the mechanisms associated with N remobilization in restricted nitrate supply. In addition, the aspartic proteases are also important under LN conditions (Fig. D-11D), confirming that they have to be investigated to better understand the response to nitrate limitation. However, this high proteolysis is not correlated to an efficient leaf N remobilization (Figs. D-8A and D-8B). The abundance of D1 and lhcb3 proteins remains high in both N conditions during all the experiment compare to the efficient genotype Oase (Figs D-10C and D-10D). This low degradation rate could be related to the low amount of FtsH (Fig. D-14A), proteases known to be involved in the degradation of the PSII protein D1 and LHCII (Wagner *et al.*, 2012; Zelisko *et al.*, 2005). Consequently, the N remobilization of Samourai could be related to a low degradation of the thylakoid-bound proteins of the PSII. However, a low transmembrane proteins degradation did not explain why the degradation of the soluble proteins did not lead to a decrease of N amount in the source leaf.

Before being transported to the growing organs, the amino acids resulting from the proteolysis have to be converted into their transportable forms (Lohaus and Moellers, 2000; Lohaus and Schwerdtfeger, 2014) by various enzymes of the N metabolism (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). The fact that no accumulation of the amino acid pool was observed in both N conditions (Figs. D-9C and D-9D) suggests that leaf N remobilization in Samourai is not limiting by the conversion and/or the export of amino acids, which confirms the previous results (Desclos *et al.*, 2009; Girondé *et al.*, 2015b; Tilsner *et al.*, 2005). Therefore, the default of leaf N remobilization should be related to a step between the proteolysis mechanisms and the amino acid loading in phloem vessels.

Firstly, proteolysis releases a large amount of ammonium (Damodaran and Ananta-Narayanan, 1938), which has to be detoxified quickly by various enzymes such as glutamine synthetase, glutamate deshydrogenase or asparagine synthase (Givan, 1979). Consequently, a default in the detoxification of ammonium in the source leaf of the genotype Samourai could lead to an ammonium accumulation consequently to the high proteolysis observed. These enzymes have to be investigated to validate or not this hypothesis. On the other hand, in both N conditions, a substantial activity of the proteasome system was observed whatever the genotype (Figs. D-13C and D-13D). The involvement of the proteasome system in leaf senescence was expected and confirms the previous results on *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2004; Park *et al.*, 1998) and oilseed rape (Desclos *et al.*, 2009). In animal cells, the proteasomes can

degrade proteins in peptides, which will be degraded in amino acids by dedicated system (Reits *et al.*, 2004; Saric *et al.*, 2004). A similar pathway is supposed in *Arabidopsis* in response to cadmium toxicity (Polge *et al.*, 2009), but its occurrence in other conditions (such as mineral limitation) cannot be excluded. Consequently, the low N remobilization of Samouraï despite an efficient proteolysis and export of amino acids might be related to a default in the degradation and/or the export of oligopeptides, potentially derived from a proteolysis by the proteasome. The export and catabolism of peptides have to be studied in details to verify if they are involved in the N remobilization processes. However, in both N conditions, the degradation of the soluble proteins in Samouraï occurred later compare to other genotypes (significant decrease at D21) (Figs. D-9A and D-9B). Consequently, the export of the product of proteolysis may limit the N remobilization because of a late proteolysis, which could not allow the implementation of the mechanisms needed to an efficient N export from the cell before abscission.

4.4. Conclusion

The present study confirms that proteolysis is a key factor to improve N remobilization in leaves of oilseed rape (Avice and Etienne, 2014; Girondé *et al.*, 2015b) and that a high N remobilization in leaf at vegetative stages is related to an efficient degradation of both soluble and thylakoid-bound proteins of the chloroplasts. A strong correlation between the leaf NRE and the rate of D1 degradation was observed in both nitrate conditions. Further studies are needed to determine if the rate of D1 degradation can be used as a protein indicator to identify genotypes with high leaf NRE and especially with reduced N loss in fallen leaves. The efficient degradation of the D1 protein seems to be associated with neutral proteolytic activity, especially serine proteases under low N supply. As for cyanobacteria, the serine protease Deg could be involved in the improvement of the degradation of the D1 protein.

The efficient proteolysis of the soluble proteins under restricted N supply was associated with proteolytic activity at acidic pH, especially the activities of serine, cysteine and aspartic proteases. These results suggest an important subcellular traffic of the chloroplastic proteins to the vacuoles, including autophagy mechanisms and/or CCV. In addition, due to the localisation of serine proteases activities in SAVs in *Arabidopsis* leaves, further developments have to be performed to identify SAV in oilseed rape leaves and to characterize their role in N remobilization in response to restricted N supply. At least, the acidic aspartic proteases GI: 1326165, which was identified in the present study during the leaf senescence of 2 genotypes and in two other studies in response to a nitrate limitation for the genotype Capitol, has to be characterized to understand its role in the proteolysis during senescence triggered by N limitation.

Acknowledgements : This work was funded by the French National Research Agency (ANR-07-GPLA-016 GENERGY: Improvement of the oil yield of the rapeseed crop in the context of bio fuel production; ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input) and by a Ph.D. grant to Mrs Alexandra Girondé from the French Ministry of Research. The authors thanks Dr. Nathalie Nési, INRA (UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes) who is the leader of these two ANR-programs. The authors also thanks Mr Laurent Coquet for protein identification by ESI LC-MS/MS, Frédérine Marie for her technical help for the determination of the proteolytic activities and Servane Lemauviel for her valuable help for statistical analysis.

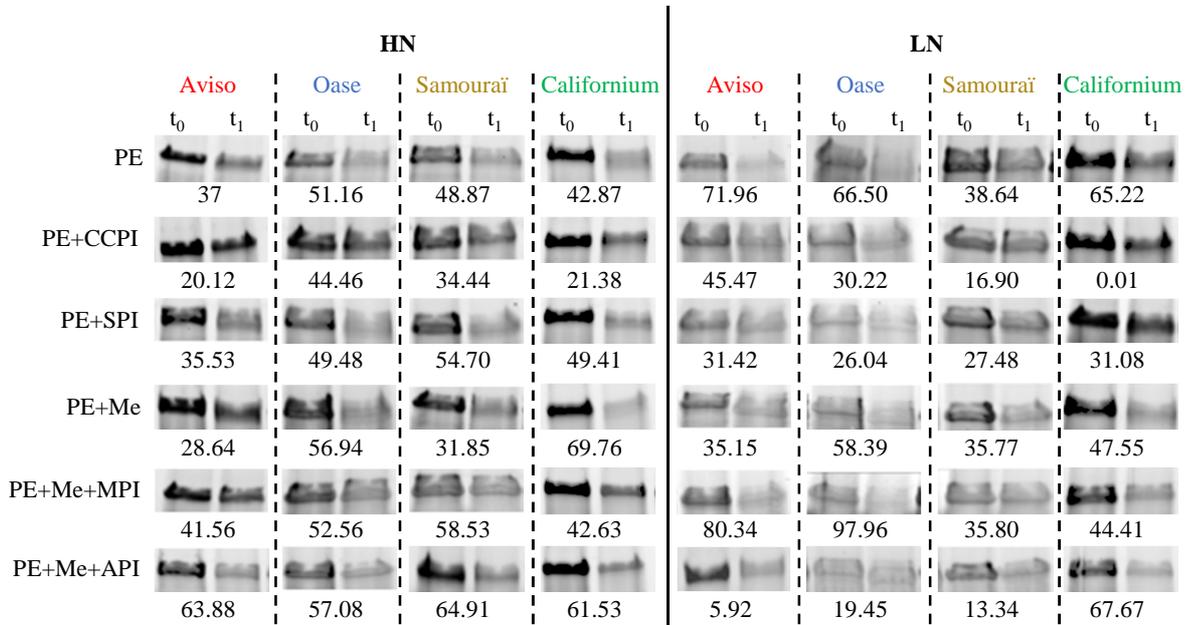


Figure D-S5: Total proteolytic activity at pH 5 (PE) and the inhibition of cysteine proteases (PE+CCPI), serine proteases (PE+SPI), metalloproteases (PE+Me+MPI) and aspartic proteases (PE+Me+API) by specific inhibitors at day 14 (D14). The plants were supplied with ample (HN, 3.75 mM) or restricted (LN, 0.375 mM) nitrate supply. The proteolytic activity corresponds to the Rubisco large subunit (LSU) degradation visualized on Stain Free gels and quantified by Image Lab software (Bio-Rad) after an incubation at 37°C. The incubation was 20 minutes in LN conditions and 45 minutes in HN for all genotypes except Californium which require 30 and 55 minutes, respectively. The percentage of degradation is indicated below the gels. The inhibitors used are: iodoacetamide for cysteine proteases (CPI), aprotinine for serine proteases (SPI), 1-10 phenanthroline for metalloproteases (MPI) and pepstatine A for aspartic proteases (API). Due to the solubility of 1-10 phenanthroline and pepstatine A in methanol (Me), the total proteolytic activity was also determined with methanol (PE+Me).

Table D-S6: Score and number of peptides found in the identification of the proteases from the zymograms and their putative homologue in *Brassica napus* and *Arabidopsis* genomes.

Genotype /N treatment	Score / number of peptides	Proteases name [organisms] / NCBI accession no	Result of BLAST protein-Protein [<i>Brassica napus</i>] / NCBI accession no. / % identity	Result of BLAST protein-Protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] / NCBI accession no. /% identity
Aviso / LN	49 / 7	Aspartic proteases [<i>Brassica napus</i>] / gi 1326165	BnaA09q47450D / gi 674898012 / 98%	AT1G11910 / gi 222424506 / 95 %
			BnaC08g15160D / gi 674901714 / 93%	Aspartic proteinase / gi 1354272 / 93 %
Oase / HN	22 / 3		BnaA08g25040D / gi 674912117 / 92%	Aspartic proteinase A1 / gi 15221141 / 92 %
			BnaC04g19410D] / gi 674924641/ 79%	Aspartic proteinase A2 / gi 22330379 / 80 %
			BnaA03g59920D / gi 674908220/ 78%	Aspartic proteinase A3 / gi 15233518 / 66 %
Oase / LN	132 / 12		BnaA09g20460D / gi 674916523/ 67%	
		BnaC09g22820D / gi 674938912/ 67%		

The band corresponding to proteolytic activities at pH 5 on the zymograms were analysed by LC-MS/MS to identify the proteases responsible of the proteolytic activity. The proteases identified with success are presented with the accession number, the score and the number of peptides identified. The protease of zymograms were blast in the NCBI database to identify the similar proteases in the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* genomes.

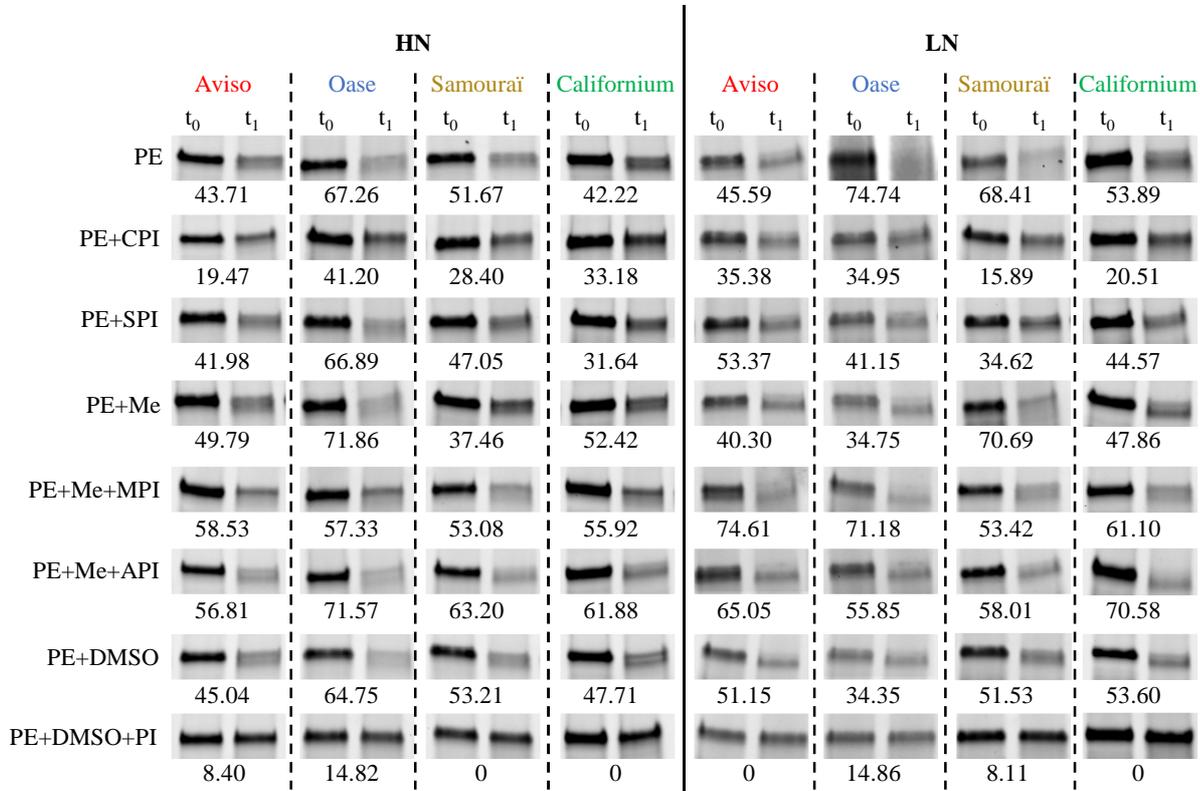


Figure D-S6: Total proteolytic activity at pH 7.5 (PE) and the inhibition of cysteine proteases (PE+CPI), serine proteases (PE+SPI), metalloproteases (PE+Me+MPI), aspartic proteases (PE+Me+API) and proteasome (PE+DMSO+PI) by specific inhibitors at day (D14). The plants were supplied with ample (HN, 3.75 mM) or restricted (LN, 0.375 mM) nitrate supply. The proteolytic activity corresponds to the Rubisco large subunit (LSU) degradation visualized on Stain Free gels and quantified by Image Lab software (Bio-Rad) after an incubation at 37°C. The incubation was 90 minutes in both N conditions for all genotypes except Oase which was incubated only 60 minutes. The percentage of degradation is indicated below the gels. The inhibitors used are: iodoacetamide for cysteine proteases (CPI), aprotinine for serine proteases (SPI), 1-10 phenanthroline for metalloproteases (MPI), pepstatine A for aspartic proteases (API) and MG132 (carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal) for proteasome (PI). Due to the solubility of 1-10 phenanthroline and pepstatine A in methanol (Me) and the solubility of MG132 in DMSO, the total

II. La remobilisation de l'azote post-montaison

Importance de la remobilisation du N foliaire pour le rendement/remplissage des graines et les mécanismes cellulaires qui y sont associés.

La disponibilité en N du sol pouvant diminuer fortement lors du remplissage des graines, le N endogène est la source principale pour le remplissage des graines. Contrairement au stade rosette, la remobilisation du N est considérée comme efficace après la montaison. Cependant, peu d'études ont été effectuées pour définir précisément le niveau de contribution de la remobilisation et des différents organes sources dans le remplissage en N des graines et le rendement. De plus, aucune étude n'a été faite sur les feuilles sénescentes post-montaison pour confirmer l'efficacité de remobilisation du N foliaire et identifier les mécanismes qui y sont associés.

Ces travaux avaient pour objectifs :

- De déterminer le niveau de contribution de la remobilisation du N endogène et le rôle des organes sources dans le remplissage des graines en réponse à une limitation en nitrate appliquée à la montaison.
- De caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans la remobilisation du N (protéolyse et exportation de ses produits) afin d'identifier les mécanismes impliqués dans une remobilisation efficace du N foliaire après la montaison.

La caractérisation de la remobilisation s'est faite *via* la détermination des flux de N plante entière entre les stades montaison et graines matures chez les géotypes Aviso et Oase (identifiés précédemment comme ayant des comportements contrastés en terme d'EUA et d'ERA au stade rosette, cf. §D.II.I.) en s'appuyant sur un marquage isotopique au ^{15}N de type « pulse-chase ». Au niveau cellulaire, les mécanismes de remobilisation ont été étudiés dans une feuille entrant en sénescence entre la montaison et la floraison *via* l'étude de différents processus: la remobilisation du N, la protéolyse (dégradation des protéines solubles et activités protéolytiques des différentes classes de protéases acides), la quantité d'acides aminés et les activités enzymatiques impliquées dans la synthèse d'acides aminés transportables (glutamine synthase et glutamate deshydrogenase).

Ce chapitre comprend l'article suivant:

➤ **Article 3 :**

The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanism of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during the seed filling (2015) *BMC Plant Biologie* (accepté en janvier 2015, ID : 1514664601536833).

Girondé Alexandra^{1, 2, 3}, Etienne Philippe^{1, 2, 3}, Trouverie Jacques^{1, 2, 3}, Bouchereau Alain⁴, Le Cahérec Françoise⁴, Leport Laurent⁴, Orsel Mathilde^{4, 5, 6}, Niogret Marie-Françoise⁴, Nesi Nathalie⁴, Carole Deleu⁴, Soulay Fabienne⁷, Masclaux-Daubresse Céline⁷ and Avice Jean-Christophe^{1, 2, 3}.

¹ *Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen, France*

² *UCBN, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France*

³ *INRA, UMR INRA–UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N.C.S., F-14032 Caen, France*

⁴ *INRA, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRA, Agrocampus Ouest, Université de Rennes 1, F-35653 Le Rheu, France*

⁵ *Université d'Angers, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France*

⁶ *AgroCampus-Ouest, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France*

⁷ *UMR 1318, INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin, Département Adaptation des Plantes à l'Environnement, RD10, 78026 Versailles cedex, France*

The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanism of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during the seed filling.

ABSTRACT

Background

Oilseed rape is the third largest oleaginous crop in the world but requires high levels of N fertilizer of which only 50% is recovered in seeds. This weak N use efficiency is associated with a low foliar N remobilization, leading to a significant return of N to the soil and a risk of pollution. Contrary to what is observed during senescence in the vegetative stages, N remobilization from stems and leaves is considered efficient during monocarpic senescence. However, the contribution of stems towards N management and the cellular mechanisms involved in foliar remobilization remain largely unknown. To reach this goal, the N fluxes at the whole plant level from bolting to mature seeds and the processes involved in leaf N remobilization and proteolysis were investigated in two contrasting genotypes (Aviso and Oase) cultivated under ample or restricted nitrate supply.

Results

During seed filling in both N conditions, Oase efficiently allocated the N from uptake to seeds while Aviso favoured a better N remobilization from stems and leaves towards seeds. Nitrate restriction decreased seed yield and oil quality for both genotypes but Aviso had the best seed N filling. Under N limitation, Aviso had a better N remobilization from leaves to stems before the onset of seed filling. Afterwards, the higher N remobilization from stems and leaves of Aviso led to a higher final N amount in seeds. This high leaf N remobilization is associated with a better degradation/export of insoluble proteins, oligopeptides, nitrate and/or ammonia. By using an original method based on the determination of Rubisco degradation in the presence of inhibitors of proteases, efficient proteolysis associated with cysteine proteases and proteasome activities was identified as the mechanism of N remobilization.

Conclusion

The results confirm the importance of foliar N remobilization after bolting to satisfy seed filling and highlight that an efficient proteolysis is mainly associated with (i) cysteine proteases and proteasome activities and (ii) a fine coordination between proteolysis and export mechanisms. In addition, the stem may act as transient storage organs in the case of an asynchronism between leaf N remobilization and N demand for seed filling.

KEYWORDS

Brassica napus, Leaf senescence, N remobilization efficiency, N use efficiency, Proteolysis, Proteasome

BACKGROUND

Over the last four decades, oilseed rape (*Brassica napus* L.) has become the third most widely grown oleaginous crop worldwide with a 2.4-fold increase in seed production between 1992 and 2012 (Carré and Pouzet, 2014). This crop represents a major renewable resource for human food (oil), animal feed (meal) and numerous non-food uses (biofuel, lubricants, high added-value products derived from green chemistry). To increase the level of seed production with current genotypes, the use of N fertilizers has increased by 430% over the last forty years (Mosier, 2002). Despite the high capacity of mineral N absorption of oilseed rape (Lainé *et al.*, 1993), only 50% of N from fertilizer is recovered in seeds at harvest (Schjoerring *et al.*, 1995). This low N Use Efficiency (NUE) is related to the loss of N by leaf drop (up to 100 kg.N.ha⁻¹.year⁻¹, (Dejoux *et al.*, 2000)), reflecting the weak N Remobilization Efficiency (NRE) of oilseed rape. Therefore, in a context of imposed limitations on N-fertilizer inputs, improving NUE is becoming a priority in order to maintain/increase seed yield and decrease (i) the risk of water pollution by nitrate, (ii) the emission of greenhouse gases contributing to global warming, and (iii) the economic costs of oilseed rape crops.

NUE can be represented as two main components: the N Uptake Efficiency (NUpE) and the N Utilization Efficiency (NUE), itself subdivided into two other components, N Assimilation Efficiency (NAE) and N Remobilization Efficiency (NRE) (Good *et al.*, 2004). Even if N uptake of winter oilseed rape is considered to be efficient at vegetative stages (Lainé *et al.*, 1993), an N uptake that remains significant until flowering is associated with genotypes having high seed yield (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2007). A mineral N input during seed filling increases seed yield of spring oilseed rape (cv. Aries, (Dreccer *et al.*, 2000)) and recent studies on winter oilseed rape (Berry *et al.*, 2010; Kessel *et al.*, 2012; Schulte auf'm Erley *et al.*, 2011; Ulas *et al.*, 2013; Wiesler *et al.*, 2001b) have reported that a N uptake during reproductive stages appears to be a determinant trait for seed yield of winter oilseed rape, especially in restricted N supply. Nevertheless, in field conditions, the mineral N availability highly fluctuates during reproductive stages due to environmental factors such as water deficit in the soil. To obtain a high NUE, the N coming from uptake has to be well managed by the plant. Consequently, an improvement of NUpE is also necessary to enhance NUE. Concerning the NAE, transgenic approaches have been targeted to enzymes involved in N metabolism such as nitrate reductase, nitrite reductase or alanine aminotransferase (AlaT) in various species such as *Arabidopsis* and tobacco, with more or less success (for review (Good and Beatty, 2011)). A promising result was obtained with oilseed rape plants overexpressing an AlaT, which need 40% less N fertilizer to reach similar yield as the wild type (Good and Beatty, 2011). However, a study of 40 spring oilseed rape genotypes has

suggested that NRE is a major determinant of NUtE (Yau and Thurling, 1987) and an efficient assimilation needs to be correlated to an enhanced N remobilization to improve the seed N filling, which is essential to improve/maintain seed yield, in a context of N input reduction.

The N remobilization associated with leaf senescence is considered as crucial for oilseed rape yield (Noquet *et al.*, 2004). During the vegetative stages, N is remobilized from the older leaves to the younger leaves along the axis of the plants *via* the sequential senescence, but senescent leaves can fall with a high level of residual N (up to 3.5% of dry matter) leading to a significant return of N to the soil (Dejoux *et al.*, 2000; Malagoli *et al.*, 2005b). By developing a modelling approach as a mean to identify potential methods for improving the NUE of oilseed rape, it was estimated that a 1% decrease in the residual N in fallen leaves (from 3.5% to 2.5% of dry matter), resulting from an enhanced foliar N remobilization, may increase seed yield by 5-10% (Malagoli *et al.*, 2005a). After bolting, and more especially during monocarpic senescence when the N is remobilized from vegetative organs to seeds, the low soil N availability during spring and at the beginning of summer (Merrien *et al.*, 1988) makes N remobilization crucial for seed yield and seed filling. During this period of development the main source organs are leaves, stems and pod walls (Gombert *et al.*, 2010; Malagoli *et al.*, 2005b; Noquet *et al.*, 2004; Rossato *et al.*, 2001). During reproductive stages, the N amount in source leaves is highly remobilized (86% of N present at the beginning of flowering in field conditions) (Ulas *et al.*, 2013), leading to a low residual N in dead leaves (less than 2% of dry matter; (Malagoli *et al.*, 2005b)) and resulting in the reduction of the risk of N pollution. These results highlight an efficient N remobilization from source organs during monocarpic senescence, but also reveal variations for the residual N amount in stems compared with leaves of four winter oilseed rape genotypes (Ulas *et al.*, 2013). In addition, a genotypic and N-supply interaction for N content in stems was found for 12 genotypes of spring canola (Balint and Rengel, 2008) and the genotype with the best N remobilization was able to better remobilize N from stems and pod walls to seeds (Balint and Rengel, 2011). These results suggest that stems can also be important organ for improving seed N-filling, but the role of stems in N management at the whole plant level for winter oilseed rape remains largely unknown.

Although NRE seems to be a major lever for improving the NUE in oilseed rape, the cellular mechanisms associated with N remobilization from senescing leaves (proteolysis and the N export) remain largely an enigma. During leaf senescence, the degradation of proteins (the main form of N storage in leaves) into amino acids or peptides is performed by different classes of proteases. Studies on *Arabidopsis* reported the predominant involvement of cysteine and serine proteases (for review (Roberts *et al.*, 2012)), but also a role for the proteasome in the degradation of carbonylated proteins, which are accumulated during senescence (Jain *et al.*, 2008). The Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase

(Rubisco; EC 4.1.1.39) can represent up to 65% of the soluble proteins in C3 plants (Ellis, 1979) and 20–30% of total leaf N (Evans, 1989; Kumar *et al.*, 2002; Makino *et al.*, 1984). Consequently, Rubisco is the major source of N for remobilization and its budget is very relevant for the plant. In winter oilseed rape, cysteine, aspartic, and metallo-proteases as well as the 26S proteasome are supposed to play an important role in foliar N remobilization during senescence in the vegetative stages (Avice and Etienne, 2014; Desclos *et al.*, 2009) but there is no evidence concerning the proteolysis activities that are involved in leaf senescence and degradation of Rubisco after the bolting stage.

Among the enzymes involved in the conversion of amino acids into transportable forms, a recent study highlighted the importance of asparagine synthetase (AS; EC 6.3.5.4) in N remobilization during senescence in *Arabidopsis* (Gaufichon *et al.*, 2013). In addition, the glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2) catalyses the assimilation of ammonium into glutamate to synthesize glutamine. Glutamine was found at high levels in phloem sap of oilseed rape (cv. DSV15 and Duplo; (Lohaus and Moellers, 2000)) and consequently, GSs are supposed to be largely involved in N remobilization processes during senescence in winter wheat (Kichey *et al.*, 2007) and maize (Martin *et al.*, 2006), especially the cytosolic form (GS1) in the case of oilseed rape (Ochs *et al.*, 1999; Orsel *et al.*, 2014). In parallel, glutamate dehydrogenase (GDH; EC 1.4.1.2; (Turano *et al.*, 1997)) may catalyse a glutamate deamination (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006; Purnell and Botella, 2007) which provides ammonium for the GS activity in senescing leaves. In addition, in case of high levels of ammonium, GDH can incorporate ammonium on α -ketoglutarate to produce glutamate (Skopelitis *et al.*, 2006). A significant quantity of glutamate has been found in phloem sap of oilseed rape (Lohaus and Moellers, 2000; Lohaus and Schwerdtfeger, 2014) and an increase of both GDH activities in sliced leaves of oilseed rape was associated with a decrease in soluble proteins and ammonium (Watanabe *et al.*, 1994), suggesting an important role for GDH in foliar N remobilization. The phloem loading of the resulting amino acids is regarded as not limiting in oilseed rape at the vegetative stages (Tilsner *et al.*, 2005). The efficient export of amino acids and the involvement of GS1 and GDH in N remobilization need to be confirmed in leaves as they senesce after bolting because they are proposed to have an efficient N remobilization.

The aim of this study was to identify the physiological traits involved in the high NUE and N remobilization in restricted N supply conditions, at whole plant (from bolting to mature seeds) and cellular levels (from bolting to flowering stages). To reach this goal, two genotypes (Aviso and Oase), known to have different strategies following a nitrate limitation at the vegetative stage (Girondé *et al.*, 2015b), were selected. Long term pulse-chase ^{15}N -labelling was performed to precisely define the endogenous and exogenous N fluxes at the whole plant level between the bolting and mature seed stages, under restricted and ample nitrate supply. A specific ^{15}N -labelling was also used in order to determine a relevant estimation of NUE and its different components (NUpE, NUtE and NRE). This study (i)

Figure D-16: Kinetics of dry matter (DM) of Aviso and Oase under ample or low N supply.

The plants were supplied with ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) concentrations of nitrate. Dry matter is expressed in g per plant for Aviso (A, C) and Oase (B, D) at 0 (early bolting), 42 (pod formation), 70 (start of seed filling) and 99 (mature seeds) days after the beginning of bolting (D0). Seeds and pod walls were grouped and called siliques at D42 and they were separated from D70 onwards. Data are indicated as the mean value \pm standard error (vertical bars). Different letters (a, b, c) indicate that the total dry matter is significantly different between two dates. Hashes represent significant differences between genotypes in HN or LN conditions and the asterisks represent significant differences between N treatments (n=4 plants; p<0.05).

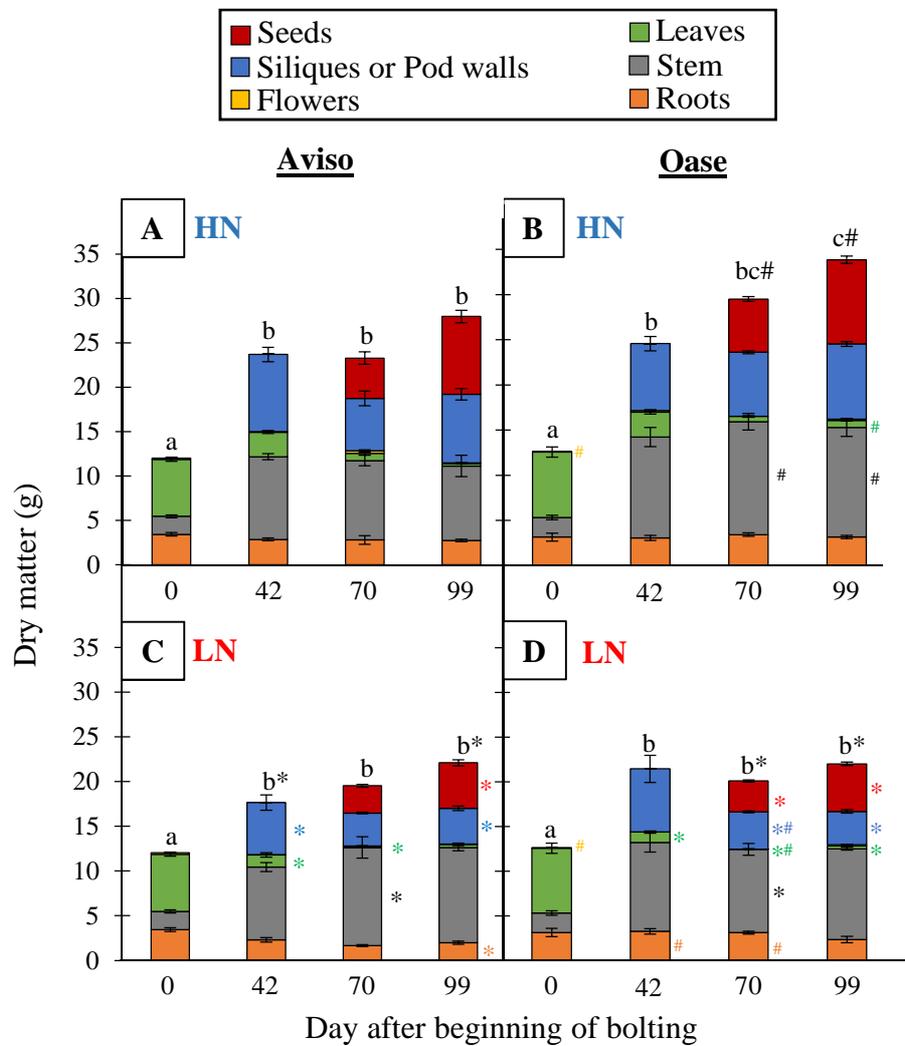


Table D-2: Seed composition and Nitrogen Harvest Index of Aviso and Oase under ample or low N supply.

		Aviso		Oase	
		HN	LN	HN	LN
Yield components	C:N ratio	11.31 \pm 0.19	14.29 \pm 1.01 *	11.19 \pm 0.25	18.36 \pm 0.70 **#
	Seed N amount (mg)	421.48 \pm 40.08	194.36 \pm 8.05 **	432.84 \pm 5.93	168.22 \pm 7.77 **#
	N Harvesting Index (NHI)	63.69 \pm 3.33	72.05 \pm 2.14	65.01 \pm 1.24	73.97 \pm 1.68 *
Seed composition	Proteins (%)	32.20 \pm 0.39	25.83 \pm 1.20 *	31.68 \pm 1.87	19.48 \pm 0.77 *#
	Fatty acids (%)	33.99 \pm 1.31	38.32 \pm 1.45 *	30.10 \pm 4.27	44.37 \pm 1.75 *#
	C18:1 (oleic; %)	53.13 \pm 0.46	55.86 \pm 0.8	58.76 \pm 3.13	64.61 \pm 1.08 *#
	C18:2 (linolenic ω 6; %)	21.91 \pm 0.34	21.43 \pm 0.33	15.34 \pm 0.40 #	17.29 \pm 0.29 *#
	C18:3 (linoleic ω 3; %)	11.53 \pm 0.19	10.91 \pm 0.22	8.05 \pm 0.59 #	7.56 \pm 0.29 #
	C22:1 (erucic; %)	2.13 \pm 0.13	8.26 \pm 0.83 *	3.57 \pm 2.39	4.28 \pm 2.19 #

The plants were supplied with an ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) nitrate concentration. The N amount in seed is estimated in milligrams. C:N ratio: ratio C:N in seeds; NHI: N Harvesting Index (mg N in seeds per mg N in shoot). The seed composition (percentage of proteins and fatty acids) and the oil composition (percentage in oleic, linolenic, linoleic and erucic acids) was determined by NIRS method. Asterisks represent significant differences between N treatments and hashes represent significant differences between the two genotypes (n=4 plants; #, * = p<0.05; ** = p<0.01).

highlights the role of leaves and stems in the remobilization of N towards seeds and (ii) allows the identification of the physiological traits associated with a high NUE in response to restricted N supply. Moreover, a study of foliar N remobilization in source leaves was performed through the analysis of foliar N compounds, the GS and GDH activities, and the development of a new method to study proteolytic activities, using endogenous Rubisco as a substrate, in order to determine the involvement of different classes of proteases in the N remobilization which occurs during this growth stage.

RESULTS

Impact of N limitation on growth, yield components, seed and oil composition

When plants were well supplied with nitrate (HN), the total DM (Figures D-16, D-16B and Table D-S7) was higher for Oase (34 g) compared with Aviso (28 g) during seed filling (D70 to D99), mainly due to differences in the stem DM (12.1 g for Oase vs 8.4 g for Aviso). Under our experimental conditions, the occurrence of the different stages of development was not significantly different between both genotypes or between both N treatments for a given genotype. In low nitrate (LN) conditions, no difference in the total DM was observed between genotypes (Figures D-16C, D-16D and Table D-S7). As expected, compared with HN, DM was reduced in leaves from D42, in stems at D70 and in pod walls at D99. In addition, DM declined significantly in siliques at D42 and increased in stems at D70 for Aviso while DM of siliques and stems declined at D70 for Oase. The root DM at D99 was lower in Aviso under LN compared with HN. Under LN supply, a similar decrease in seed production was observed for both genotypes (-41.8% for Aviso, -42.8% for Oase; Figures D-16C and D-16D).

In HN plants, the yield components (C:N ratio, seed N amount, N Harvest Index (NHI); Table D-2) as well as the seed composition (proteins and oil in % of dry matter (DM); Table D-2) were similar for both genotypes, except for the percentage of omega-3 (C18:3) and omega-6 (C18:2) precursors, which were higher for Aviso than Oase. However, the C18:2 / C18:3 ratio was similar for both genotypes (1.9). As expected, an N limitation led to a strong decrease in the N amount of seeds (-53% in Aviso, -61% in Oase; Table D-2). Compared with HN conditions, NHI significantly increased in Oase and tended to increase in Aviso ($p=0.06$) in response to LN treatment (Table D-2). Seeds of Oase LN plants had a higher C:N ratio associated with a higher oil percentage, which was to the detriment of proteins (20% proteins in DM vs 26% for Aviso). For oil composition, an increase of oleic acid (C18:1) proportion was observed under N limitation for both genotypes (Table D-2). While C18:3 and C18:2 percentages did not differ under both N conditions for Aviso, an increase in C18:2 (+2%) and in the C18:2 / C18:3 ratio (2.3) occurred under LN for Oase. The proportion of erucic acid also increased under LN conditions for Aviso (8% of oil).

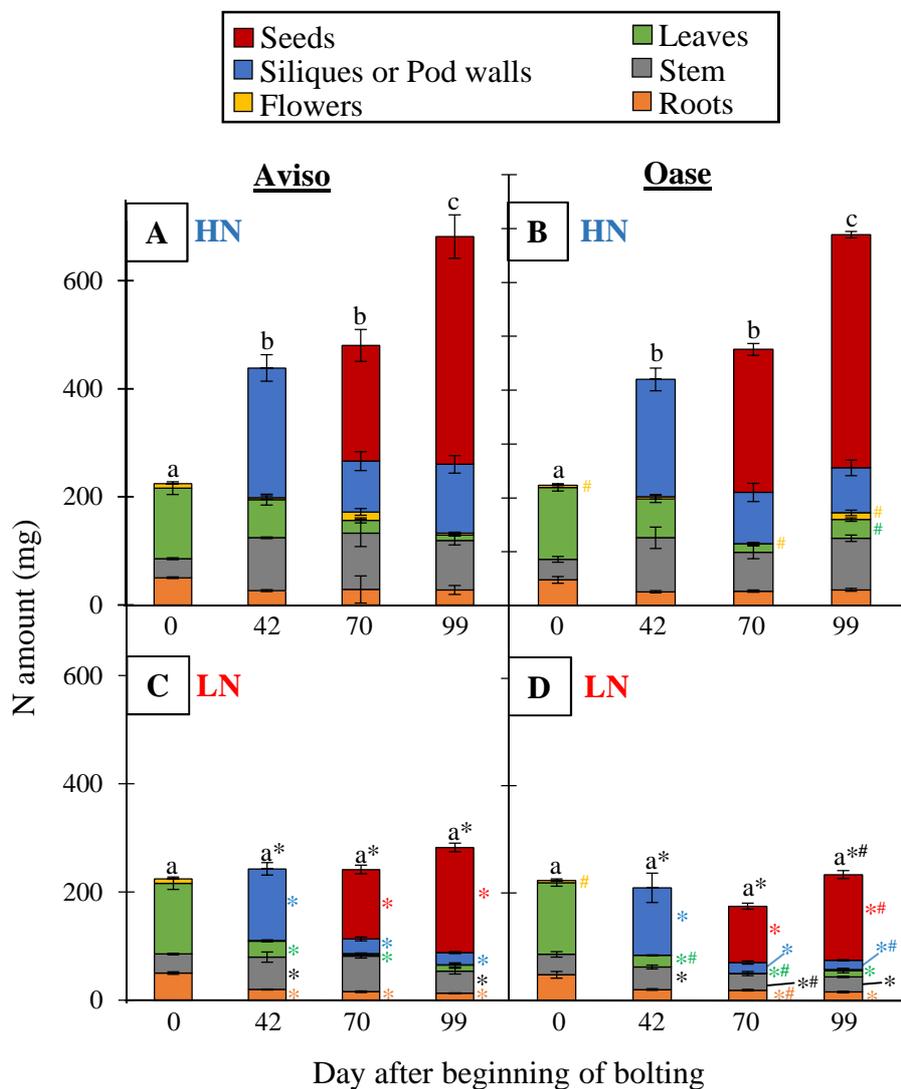


Figure D-17: Kinetics of the N amount in Aviso and Oase under ample or low N supply. The plants were supplied with ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) concentrations of nitrate. The N amount is expressed in mg per plant for Aviso (A, C) and Oase (B, D) at 0 (early bolting), 42 (pod formation), 70 (start of seed filling) and 99 (mature seeds) days after the beginning of bolting (D0). Seeds and pod walls were grouped and called siliques at D42 and they were separated from D70 onwards. Data are indicated as the mean value \pm standard error (vertical bars). Different letters (a, b, c) indicate that the total N amount is significantly different between two dates. Hashes represent significant differences between genotypes in HN or LN conditions and the asterisks represent significant differences between N treatments ($n=4$ plants; $p<0.05$).

Effects of nitrate limitation on N amount and NUE components

In HN plants, the total N amount did not differ between the genotypes (Figures D-17A, D-17B and Table D-S8). However, the N amount in leaves and flowers at the final stage of development was significantly higher for Oase than for Aviso. As expected, the total N amount was reduced for both genotypes in LN conditions (Figures D-17C, D-17D and Table D-S8), resulting from a decline in the N amount in nearly all organs from D42. Exceptions were flowers present at any time during the experiment, roots at D42 for Oase, stems at D70 and leaves at D99 for Aviso, which all showed a similar N amount in both N conditions. In LN plants, the final N amount in seeds and pod walls of Oase was lower than in Aviso (D99).

The N use efficiency (NUE), N utilization efficiency (NUtE), and N remobilization efficiency (NRE) were negatively correlated to N supply while the N uptake efficiency (NUpE) was positively correlated to N supply (Table D-3). The NUE was higher for Oase (2.29) than for Aviso (1.98) in HN conditions while no differences were observed in the LN treatment (2.86 for Oase and 3 for Aviso). The NUtE increased in response to LN supply but no differences were observed between the genotypes, whatever the N supply. A strong genotype/treatment interaction effect was observed for NUpE between D70 and D99. In HN conditions, the NUpE of Oase was around 81%, suggesting that the N distributed to seeds during this period is mainly provided by the N that is newly taken up by the roots. The NUpE of Oase is about 2-fold higher than Aviso in both N conditions. The global NRE, *i.e.* the NRE calculated on the whole growing cycle (D0-D99; Table D-3), reached about 55-60% for both genotypes, indicating that a large part of the N stored in source organs at the bolting stage (D0) is remobilized during the experiment. When NRE was calculated stepwise (*i.e.* between D0-D42, D42-D70 and D70-D99), a regular decrease occurred throughout the steps, whatever the treatment and the genotype. In HN plants, NRE was 1.2-fold higher in Oase than Aviso between D42 and D70 while it was reduced by about 50% after D70 (32.7 for Aviso vs 14.9 for Oase). In response to LN supply, global NRE increases for both genotypes, but a genotypic effect was highlighted between D70 and D99, where the NRE of Aviso was 1.4-fold higher than Oase (Table D-3). However, no genotype/treatment interaction was observed for NRE.

N fluxes at the whole plant level in HN conditions

The ¹⁵N labelling method used in this study gave the opportunity to determine precisely the N fluxes at the whole plant level (remobilization and uptake) between D0-D42, D42-D70 and D70-D99. Due to the fact that genotype and N treatment effects were observed for NRE solely between D70 and D99 in HN plants (Table D-3), only the N fluxes between these two growing stages are given in Figure D-18 (for other growing stages, N fluxes are given in Figure D-S7 and DS-8). In HN conditions, N remobilization was around 3-fold higher in Aviso (Figure D-18A) than Oase (Figure D-18B). For both genotypes, the stems was the main source organ: 47% (*i.e.* 57.32 mg N) and 59% (*i.e.* 24.70 mg N) of the total N remobilized in

Table D-3: NUE, NUtE, NUpE and NRE of Aviso and Oase under ample or low N supply.

		Genotypes (G)				Source of variation			
		Aviso		Oase		G	N		G x N
N treatment (N)		HN	LN	HN	LN	F _G	F _N	r	F _{GxN}
NUE ^a		1.98 ±0.06	3.00 ±0.12**	2.29 ±0.11#	2.86 ±0.08**	1.048	89.81***	-0.90	7.13*
NUtE ^b		13.25 ±0.66	20.27 ±2.00*	13.67 ±0.50	23.45 ±0.55*	3.38	73.78***	-0.90	1.10
NUpE ^c (%; D70-D99)		45.86 ±8.10	32.00 ±5.30	81.57 ±4.25#	70.32 ±7.88#	8.72*	60.81***	0.76	22.96**
NRE ^d (%)	Global								
	0-99	59.12 ±1.99	74.10 ±3.22**	52.83 ±2.03	76.08 ±4.10**	0.70	55.28***	-0.89	2.59
	Stepwise								
	0-42	72.28 ±3.48	86.62 ±4.37*	77.59 ±4.52	83.26 ±4.16	0.07	7.74*	-0.60	1.45
	42-70	51.17 ±1.46	77.80 ±4.16**	59.90 ±2.92#	75.65 ±11.29	0.37	15.40**	-0.73	1.01
	70-99	32.70 ±2.75	39.96 ±2.19	14.91 ±1.13#	27.70 ±1.75**#	71.99***	31.99***	-0.52	2.43

The plants were supplied with an ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) nitrate concentration. D0 corresponds to the early bolting stage, D42 to pod formation, D70 to seed filling and D99 to mature seeds. The main source of variation is deduced from an ANOVA test where genotypes, N treatment, and genotype x N treatment interaction were tested. The resulting F values are presented below. The r values correspond to the correlation between N supply and NUE, NUtE, NUpE and NRE, respectively.

^a: NUE (Nitrogen Use Efficiency) corresponds to the mg of N in seeds per mg of the N amount in the whole plant relative to the seed DM (g) produced per g of total DM (including roots, pod walls and seeds).

^b: NUtE (Nitrogen Utilization Efficiency) corresponds to the g of seed DM produced per mg of N in shoots (including pod walls and seeds).

^c: NUpE (Nitrogen Uptake Efficiency) is estimated as the percentage of N derived from uptake in the total N (from remobilization and uptake) distributed to seeds between D70 and D99 (% of N distributed to seeds that derived from uptake).

^d: NRE (Nitrogen Remobilization Efficiency) is determined as the percentage of N stored in all source organs which is remobilized (the total remobilized N amount relative to the total N amount in all sources) between D0 (bolting stage) and final harvest (D99) or between D0 and D42, D42 and D70 and D70 and D99.

Asterisks represent significant differences between N treatments and hashes represent significant differences between the two genotypes ($n=4$ plants; #, *= $p<0.05$; ** = $p<0.01$; *** = $p<0.001$).

Aviso and Oase, respectively. For Aviso, the other source organs were the leaves, pod walls, flowers and roots while for Oase the source organs were leaves and roots. For Oase, the N amount remobilized from leaves was 4.4-fold lower than for Aviso. The N remobilized from source organs was mainly distributed to the seeds with a significantly greater amount in Aviso (119.18 mg N) than Oase (31.66 mg N). Contrary to Aviso, the flowers of Oase are sink organs (7.46 mg N) for remobilized N. There was no significant difference in the amount of N uptake between genotypes (202.8 mg N for Aviso and 217.6 mg N for Oase; Figure D-18). However, the allocation of N towards seeds is more important for Oase (135.6 mg N) than for Aviso (87.97 mg N). Despite this higher allocation of N towards seeds in Oase, the total N distributed to Oase seeds was not the same as in Aviso (-40 mg N for Oase compared with Aviso; Figure D-18).

N fluxes at the whole plant level in response to nitrate limitation

Between D0 and D42, N remobilization increased for Aviso in response to LN treatment (+20.6 mg N; Figure D-19A) compared with HN (Figure D-S7), due to a larger N remobilization from source leaves (+18 mg N). This remobilized N was mainly redistributed towards siliques, allowing a similar amount of N to be redistributed as HN plants (around 110 mg N). In contrast to Aviso, Oase showed a similar total amount of remobilized N in both N conditions (154.4 mg and 150.6 mg N in LN and HN conditions, respectively; Figure D-19B and Figure D-S7B). However, compared with HN, the redistribution of this remobilized N to siliques was higher in Oase LN plants (+28 mg N) due to a lower loss *via* dead leaves and a lower redistribution to sink leaves (Figure D-19B). The N remobilization in Oase was lower than Aviso (-12 mg N) due to a lower contribution of roots and flowers. As expected, in LN plants the N uptake strongly decreased for Aviso (only 37.82 mg N) and was not detected for Oase (Figure D-19). In Aviso LN plants, the main sink organs for the N uptake were siliques, leaves and stems (Figure D-19A). Thanks to the N uptake in Aviso, which supplemented the N remobilization, the total N amount distributed to siliques was similar in both genotypes (around 130 mg N; Figure D-19).

Between D42 and D70, no N uptake was detectable and the total remobilized N amount decreased for both genotypes under N limitation (Figure D-20) contrary to HN plants (Figure D-S8). This was mainly related to lower contributions of leaves and pod walls, leading to a lower N redistribution to seeds. The N remobilization was 1.2-fold higher for Aviso than Oase (Figure D-20), mainly due to a 2-fold higher N remobilization from leaves. Nevertheless, the N redistribution to seeds was not significantly different between the genotypes (144.73 mg N for Aviso and 127.75 mg N for Oase). These results can be explained by the fact that flowers and stems are sink organs for Aviso contrary to Oase, and a higher N loss by dead leaves occurs for Aviso.

Between D70 and D99, the N remobilization from all source organs was low for both genotypes (Figure D-21), leading to a lower total N remobilization in LN compared with HN

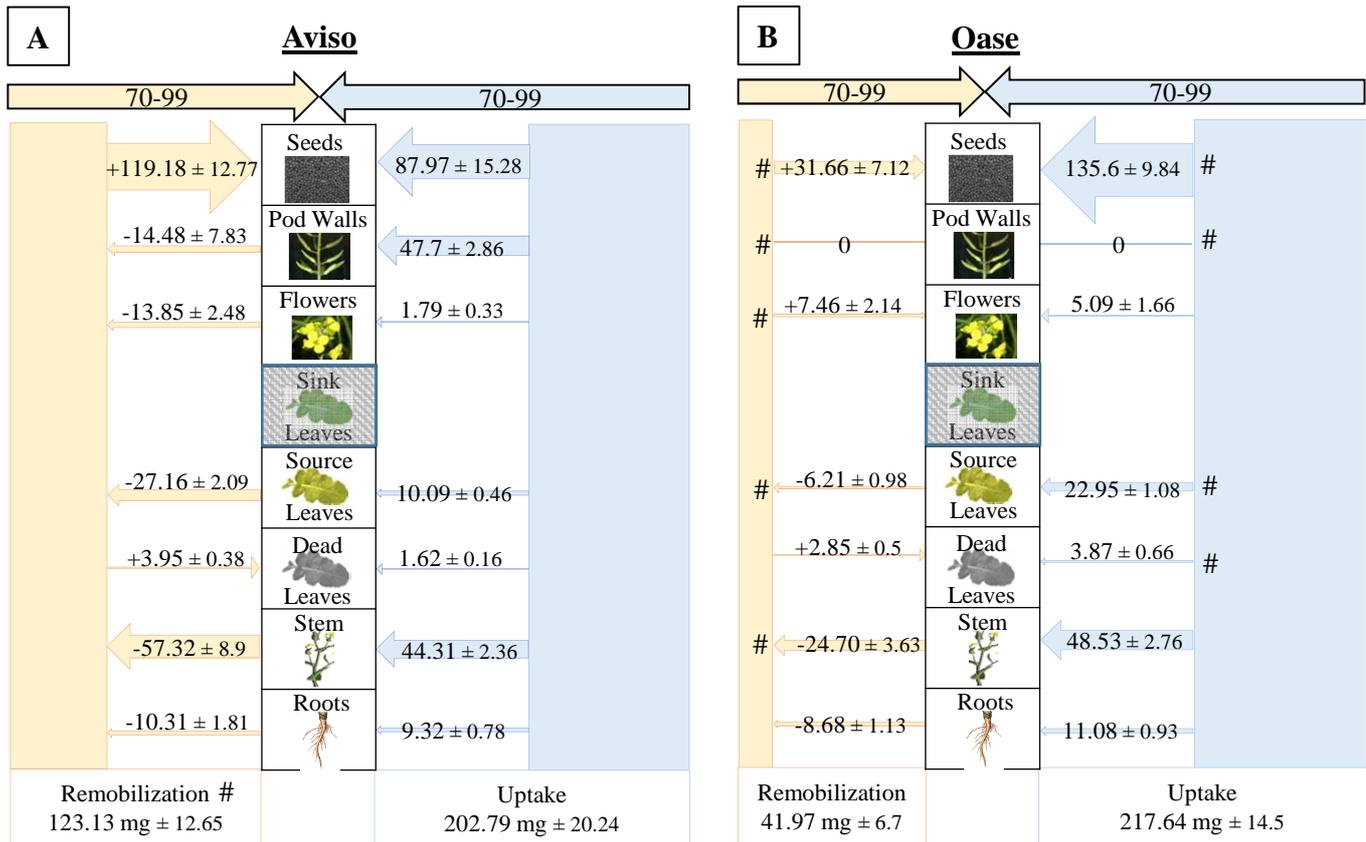


Figure D-18: N fluxes in Aviso (A) and Oase (B) in HN conditions between D70 and D99. The plants were supplied with an ample concentration of nitrate (HN, 3.75 mM of nitrate). D70 corresponds to the start of seed filling and D99 to the mature seed stage. Fluxes of N from remobilization or uptake in the different organs are expressed as mg of N remobilized or taken up, respectively. A shaded box means that the organ was not present during these growing stages. For fluxes of N remobilization, the N amount is indicated with a minus sign (-) when N is remobilized from a source organ, or it is indicated with a plus sign (+) when remobilized N is redistributed towards a sink organ. Data are indicated as the mean value ± standard error. Hashes represent significant differences between genotypes (n=4 plants; p<0.05).

plants (-59% for Aviso and -43% for Oase; Figure D-18). Consequently, a lower N amount was redistributed to seeds (-73.13 mg N for Aviso and -14.22 mg N for Oase; Figure D-21). Under LN conditions, Aviso had a higher amount of total remobilized N than Oase (+27 mg N) resulting in a higher redistribution of remobilized N to seeds (+29 mg N). This was related to a higher remobilization from stems (+21.81 mg N) and source leaves (+2.42 mg N) for Aviso compared with Oase. The flowers were sink organs for remobilized N in Oase LN plants (Figure D-21B) in contrast to Aviso LN plants. It is noteworthy that contrary to the HN treatment, sink leaves were present for both genotypes (Figure D-21). Unlike the previous period (D42-D70, Figure D-20), a significant N uptake occurred in both genotypes under LN conditions (Figure D-21). The N uptake and allocation of N taken up into seeds were respectively 1.57- and 1.86-fold higher for Oase than for Aviso. Nevertheless, the total N amount distributed to the seeds of Oase LN plants (*i.e.* from N uptake and N remobilization, 54.8 mg N) remained lower than the total N amount distributed to seeds of Aviso LN plants (66.2 mg N, Figure D-21).

Impacts of nitrate limitation on chlorophyll levels, N compounds and amino acid metabolism during N remobilization in a selected source leaf

In order to study the remobilization at the foliar level in response to N limitation applied at the bolting stage (D0), selected mature leaves undergoing senescence during the experiment (called “source leaves”) were analysed in detail over 28 days. The leaf biomass (at D0), leaf area (from D0 to D28; Figure D-S9) and chlorophyll content (at D0; Figure D-22A) in these selected source leaves were not significantly different between Aviso and Oase, meaning that the leaf initial status was similar between both genotypes. Consequently, it was possible to compare the processes involved in the N remobilization of source leaves of both genotypes. In HN conditions, the chlorophyll content decreased at D7 and remained constant for Aviso until D28, while it decreased all along the experiment for Oase. In response to LN treatment, a decrease in chlorophyll content was observed from D21 for both genotypes (Figure D-22A). In HN conditions, the N amount in the source leaf was 2-fold higher for Aviso than for Oase and remained nearly constant during the 28 days for both genotypes (Figure D-22B). In response to LN conditions, the leaf N amount decreased significantly from D21 in Aviso alone, resulting in a decline of 83% (-6.13 mg N) between D0 and D28 (Figure D-22B).

Considering the different N fractions, it is noteworthy that whatever the genotype, a similar pattern of soluble protein degradation (strong decrease at D7) was observed for both N conditions. However, the only available biological replicate at D28 ($n=1$) suggested a lower amount of soluble proteins at D28 in LN plants compared with HN for both genotypes (Figure D-22C). Even though the level of free amino acids was 1.7-fold higher in Aviso than in Oase, it decreased strongly in both genotypes at D28 in HN conditions (Figure D-22D). In LN conditions, a lower amount of N-amino acids was observed for both genotypes at D21 compared with the HN treatment. Surprisingly, the fraction corresponding to the other N

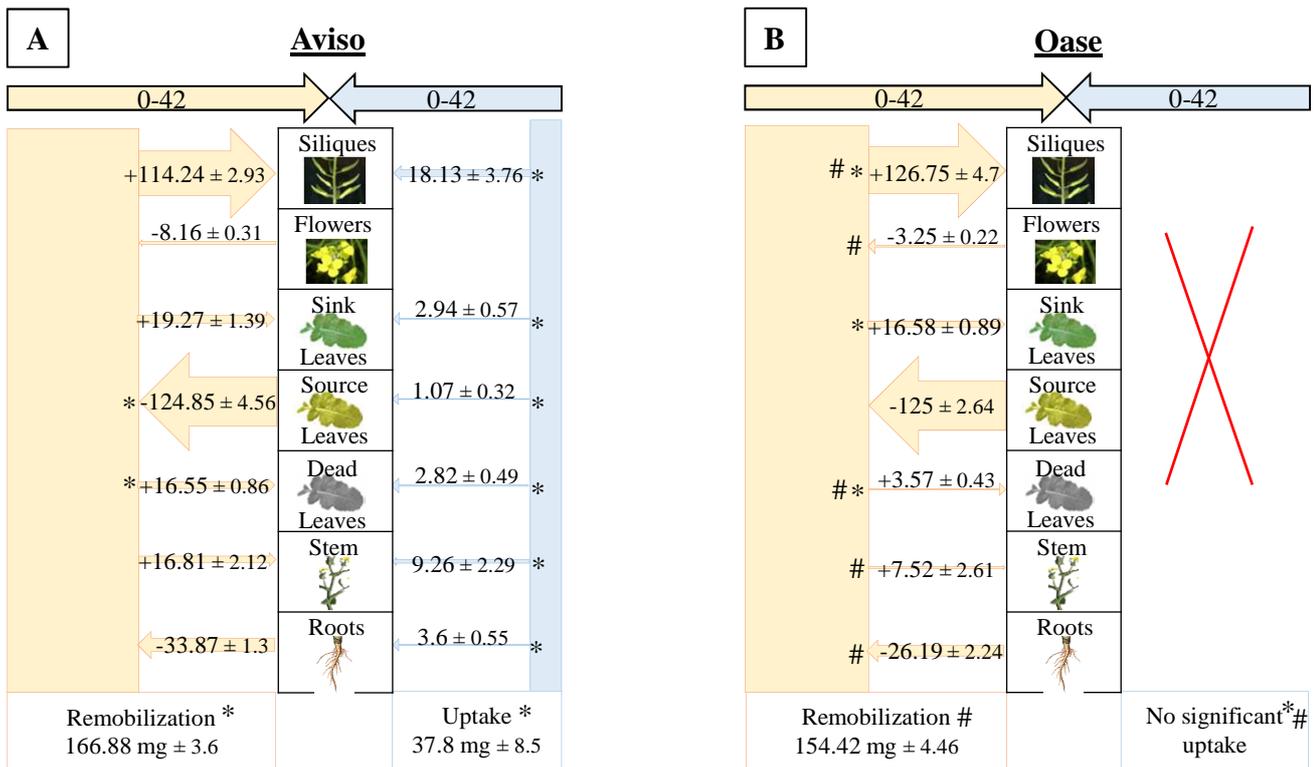


Figure D-19: N fluxes in Aviso (A) and Oase (B) in LN conditions between D0 and D42. The plants were supplied with a low concentration of nitrate (LN, 0.375 mM of nitrate). D0 corresponds to early bolting and D42 to pod formation. Fluxes of N from remobilization or uptake in the different organs are expressed as mg of N remobilized or taken up, respectively. For fluxes of N remobilization, the N amount is indicated with a minus sign (-) when N is remobilized from a source organ, or it is indicated with a plus sign (+) when remobilized N is redistributed towards a sink organ. Data are indicated as the mean value ± standard error. Asterisks represent significant differences between treatments and hashes represent significant differences between genotypes (n=4 plants; p<0.05).

compounds increased in Aviso between D0 and D14 in both N conditions (+64% and +80% in HN and LN, respectively; Figure D-22E). Thereafter, the fraction of other N compounds in the source leaf of Aviso remained almost stable in HN plants while it decreased strongly in LN plants (-82% between D14 and D28). Concerning Oase, the other N compounds remained low and constant during all the experiments, whatever the N supply.

The activities of glutamate dehydrogenase (GDH) and glutamine synthetase (GS), involved in the metabolism and remobilization of amino acids during senescence, were similar and constant in both N conditions for Aviso, except for a 50% decrease in GS activity at D28 in both N conditions and a putative 6-fold increase ($n=1$) of GDH activity at D28 in LN conditions (Figures D-23A and D-23B). Concerning Oase, the GDH activity remained low until D21 and increased by 1.5-fold at D28 in both N conditions (Figure D-23A). In HN plants, the GS activity remained constant until D21 and decreased by 43% at D28 ($n=1$). In LN plants, the GS activity increased (1.5-fold) at D21 and putatively decreased at D28 ($n=1$, Figure D-23B). The immunoblots of cytosolic (GS1) and chloroplastic (GS2) glutamine synthetase (Figure D-23C) revealed that the proportion of GS1 was not impacted by LN treatment in both genotypes, but it remained higher for Oase throughout the experiment (53% for Oase and 39% for Aviso on average).

Proteolytic activities in the source leaves

Different protease inhibitors (against cysteine, serine, aspartic or metalloproteases and proteasome) were used in order to identify the class of proteases involved in the strong degradation of soluble proteins occurring in the source leaf at D7 (Figure D-22C). Due to the fact that Rubisco represents a large proportion of the soluble proteins in leaves (Ellis, 1979), the characterization of proteases was determined *via* the analysis of the degradation of the Rubisco large subunit (LSU, Figure D-24A). In source leaf of HN plants (Figure D-24B), the LSU proteolysis was strongly inhibited by iodoacetamide for Aviso and Oase (35.5 and 31.3% of inhibition, respectively) and by MG132 for Oase (46.22% of inhibition), suggesting that the proteolysis is mainly carried out by cysteine proteases for Aviso and by the proteasome and cysteine proteases for Oase. The contribution of cysteine and aspartic proteases to the LSU degradation in Aviso was the same in both N conditions, while a slight increase of serine proteases (from 6.1 to 12.1% of inhibition; $p = 0.12$) and metalloproteases (from 7.9 to 14.1% of inhibition; $p = 0.17$) and a significant increase of proteasome activity (60% of inhibition) were observed (Figure D-24B) in response to the LN treatment. The contribution of proteasome, cysteine and serine proteases for Oase remained similar in both N conditions. Compared with HN plants, the contribution of aspartic proteases decreased (4% of inhibition) while the participation of metalloproteases increased (27% of inhibition) in Oase LN plants (Figure D-24B).

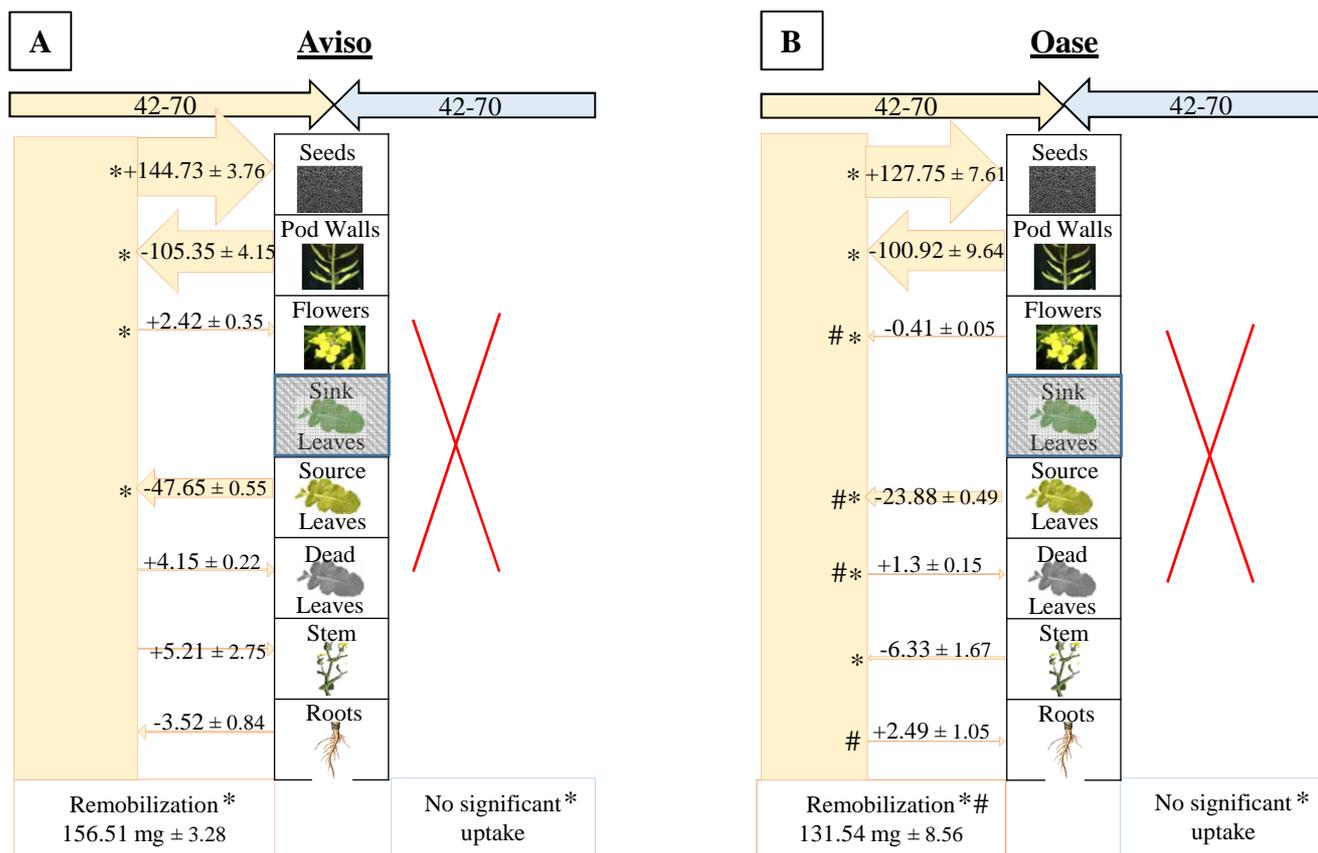


Figure D-20: N fluxes in Aviso (A) and Oase (B) in LN conditions between D42 and D70. The plants were supplied with a low concentration of nitrate (LN, 0.375 mM of nitrate). D42 corresponds to pod formation and D70 to the start of seed filling. Fluxes of N from remobilization or uptake in the different organs are expressed as mg of N remobilized or taken up, respectively. A shaded box means that the organ was not present during these growing stages. For fluxes of N remobilization, the N amount is indicated with a minus sign (-) when N is remobilized from a source organ, or it is indicated with a plus sign (+) when remobilized N is redistributed towards a sink organ. Data are indicated as the mean value \pm standard error. Asterisks represent significant differences between treatments and hashes represent significant differences between genotypes (n=4 plants; $p < 0.05$).

DISCUSSION

Evidence of two different N management strategies that lead to a similar seed yield under ample nitrate nutrition

The ¹⁵N-labelling method performed in this study allowed the distinction between endogenous and exogenous N fluxes and, therefore, the relevant determination of the involvement of N uptake and remobilization during seed filling. Despite no significant differences in seed yield (Figure D-16), the two genotypes of winter oilseed rape investigated in the present work showed contrasting N management during seed filling under ample nitrate supply. In fact, even if both genotypes used exogenous and endogenous N for seed filling (Figure D-18), Oase had the highest NUpE (82%) while Aviso had the highest NRE (32%) during seed filling (Table D-3). Our data suggest that allocation of N taken up into seeds is more efficient in Oase than Aviso, while the processes of N remobilization from source organs towards seeds during the final reproductive phases is higher in Aviso. In fact, during seed filling, the total N remobilization was 3-fold higher for Aviso than for Oase, which was a consequence of a higher remobilization from leaves, stems and pod walls (Figure D-18), leading to a higher amount of N redistributed towards seeds (Figures D-17C and D-17D). These results confirm that leaves, stems and pod walls are the main source organs for N remobilization after flowering (Dreccer *et al.*, 2000; Hocking *et al.*, 1997; Malagoli *et al.*, 2005b; Noquet *et al.*, 2004; Rossato *et al.*, 2001).

Under nitrate limitation, N management in Aviso is more efficient than Oase for seed filling

Despite an increase of NHI (Table D-2), a decrease of seed yield was observed for Oase and Aviso in response to nitrate limitation (LN treatment) applied at the early bolting stage (Figure D-16). The seed oil percentage increased in response to LN conditions for both genotypes (Table D-2) but the nutritional quality of oil of both genotypes was affected: increase of (i) C18:2 / C18:3 ratio for Oase and (ii) proportion of erucic acid for Aviso (Table D-2). These results confirm the strong relationship between N supply and oil quality (Ahmad and Abdin, 2000) and suggest a genotypic variability about the oil quality in response to N limitation.

As expected, in response to LN treatment, the N uptake was lower throughout the experiment (Figures D-19, D-20 and D-21) and the total N amount in seeds (mg N in total seeds) decreased for both genotypes (Table D-2), leading to a lower protein content in parallel to the increase in oil content (Asare and Scarisbrick, 1995; Taylor *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 2006). Nevertheless, a significant N uptake occurred during seed filling despite the low N supply, especially in Oase (Figure D-21), supporting the fact that there is a significant N uptake capacity after flowering in oilseed rape (Malagoli *et al.*, 2005b; Noquet *et al.*, 2004). Interestingly, growth of new leaves was observed during seed filling in response to LN conditions (Figure D-21). Even if these new organs represent a sink for N, new leaves may

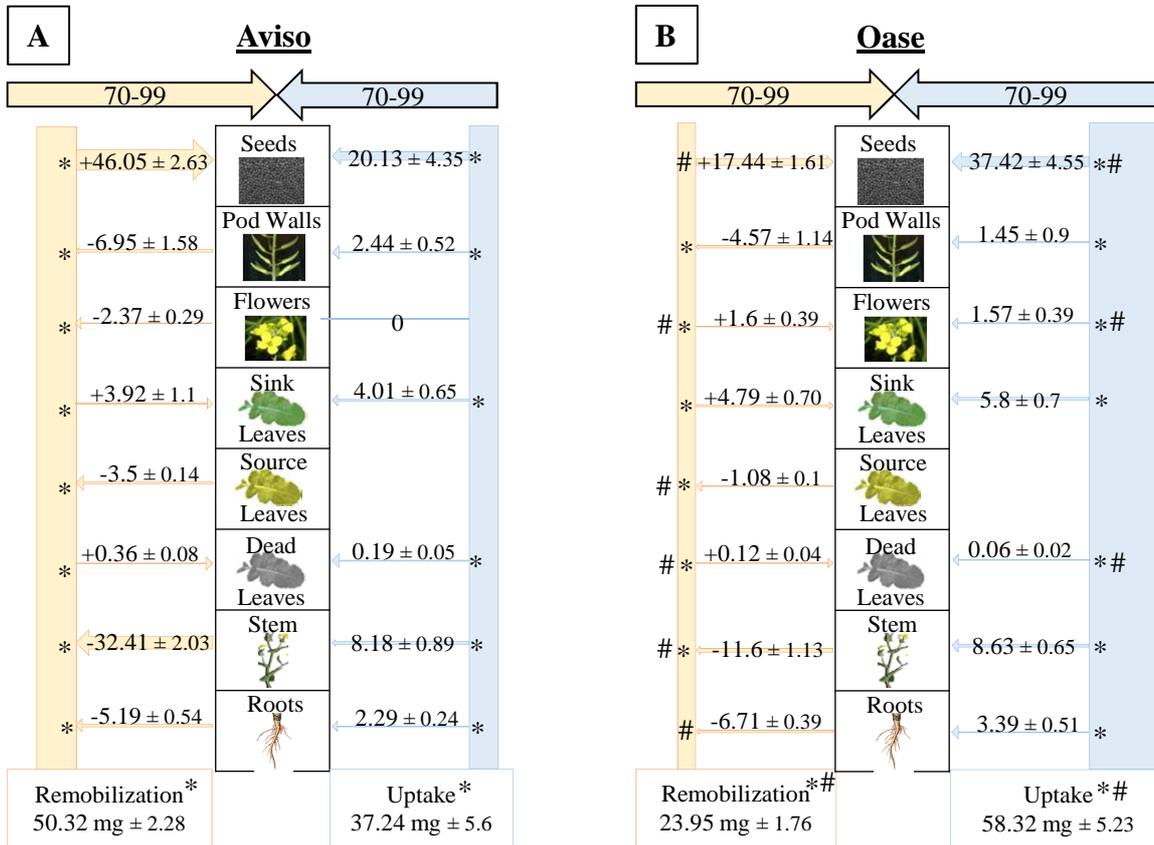


Figure D-21: N fluxes in Aviso (A) and Oase (B) in LN conditions between D70 and D99. The plants were supplied with a low concentration of nitrate (LN, 0.375 mM of nitrate). D70 corresponds to the start of seed filling and D99 to mature seeds. Fluxes of N from remobilization or uptake in the different organs are expressed as mg N remobilized or taken up, respectively. For fluxes of N remobilization, the N amount is indicated with a minus sign (-) when N is remobilized from a source organ, or it is indicated with a plus sign (+) when remobilized N is redistributed towards a sink organ. Data are indicated as the mean value ± standard error (vertical bars). Asterisks represent significant differences between treatments and hashes represent significant differences between genotypes (n=4 plants; p<0.05).

help maintaining photosynthetic capacities during seed filling and raise the potential seed yield by increasing the allocation of C to seeds (Long *et al.*, 2006; Schulte auf'm Erley *et al.*, 2007). In addition, photosynthetically active leaves could participate in the improvement of N uptake (Dreccer *et al.*, 2000), as previously suggested for winter oilseed rape (Wiesler *et al.*, 2001a). Indeed, the N uptake is associated with the availability of photoassimilates in the roots (Wardlaw, 1968). Consequently, the higher N uptake of Oase during seed filling (Figure D-21) may be related to the significantly higher C content observed under N limitation in Oase roots at D70 and D99 (+4% and +5% respectively compared with Aviso; data not shown).

As in HN conditions, N from uptake is mainly used for seed filling in Oase, but due to the low N supply, a lower N amount is distributed to seeds compared with Aviso (Figure D-21). In addition, even though Oase had the highest N uptake during seed filling, Aviso had the highest total N uptake from the bolting to mature seeds stages (75 mg N) in comparison with Oase (58 mg N) (Figures D-19, D-20 and D-21). This result agrees with the previous studies reporting that the genotypic variability of N uptake is mainly observed under restricted N supply (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2011; Yau and Thurling, 1987). However, because both genotypes have the same seed yield under LN conditions (Figure D-16), the positive correlation between N uptake and seed yield demonstrated in previous works on oilseed rape (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2011; Ulas *et al.*, 2013; Wiesler *et al.*, 2001b; Yau and Thurling, 1987) was not confirmed in our experimental conditions. The higher N amount in seeds of Aviso could be due to the fact that, as in HN treatment, endogenous N is mainly used for seed filling. Indeed, Aviso had a higher NRE during seed filling (Table D-3), leading to a higher redistribution of the N remobilized from leaves and stems toward seeds in comparison with Oase (Figure D-21). In order to better understand the importance of N remobilization from leaves and stems in Aviso with its superior NRE, these organs were studied in detail.

Impact of leaf N remobilization and its associated cellular processes in coping with N limitations

As previously observed for oilseed rape cv. Capitot (Malagoli *et al.*, 2005b; Rossato *et al.*, 2001), leaves are the main source organs between bolting and early pod formation, whatever the genotype or the N supply (Figure D-19 and Table D-S7). In fact, the maintenance of the amount of N distributed to siliques in Aviso under LN conditions is linked to an increase in N remobilization from source leaves (Figure D-19A) associated with an increase in the number of dead leaves (Table D-S9). The N remobilization in leaves of Oase (Figures D-19B and D-22B) and the number of dead leaves (Table D-S9) were similar in both N conditions whatever the N supply, suggesting a similar progression of senescence for this genotype whatever the N supply, which has never been highlighted previously.

The mechanisms involved in N remobilization were then investigated in a selected source leaf, becoming senescent between the bolting and the flowering stages. Proteins are the main

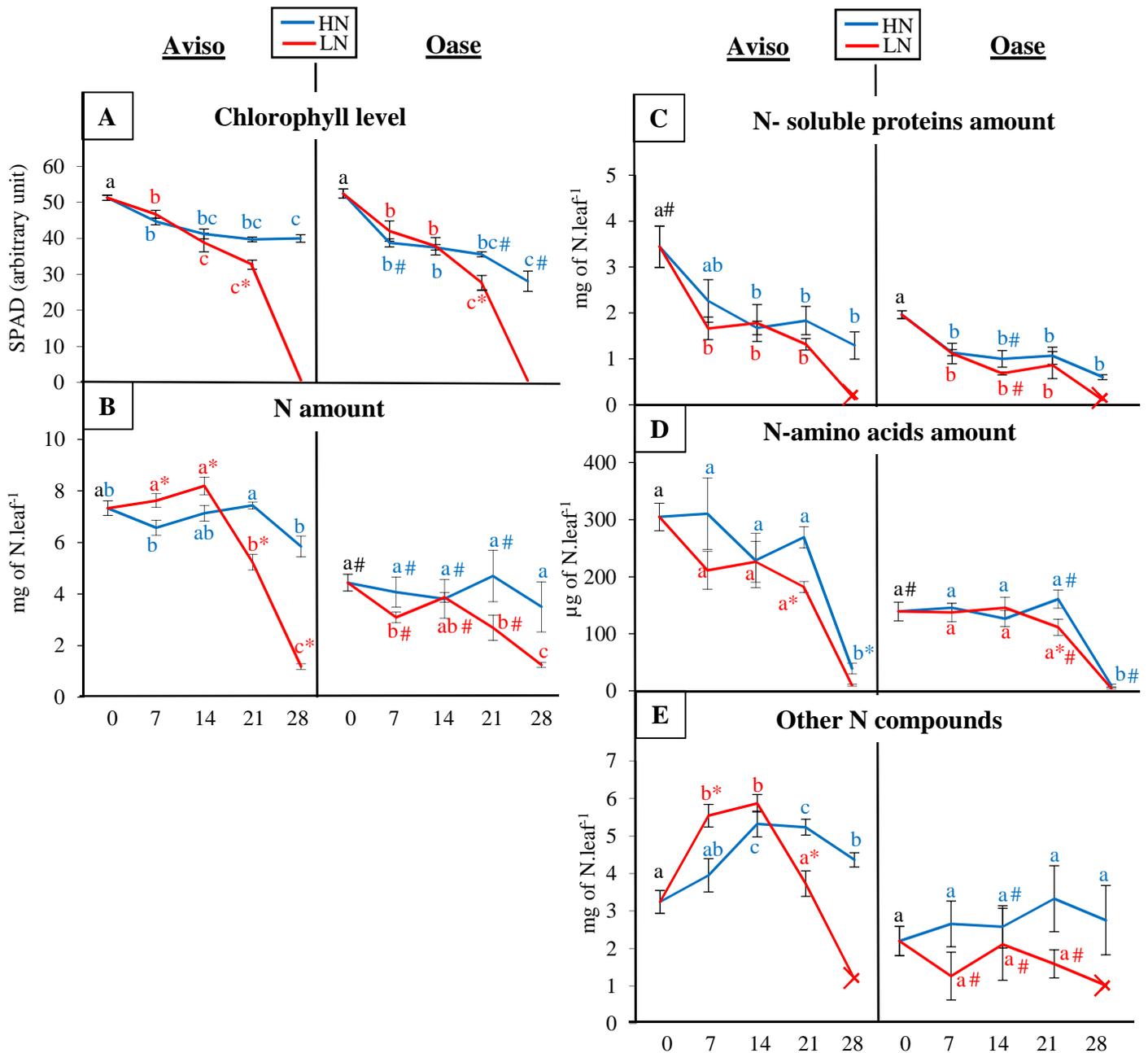


Figure D-22: Changes in chlorophyll level, total N, N-soluble proteins, N-amino acids and other N compounds in a source leaf. Plants of Aviso and Oase were supplied with ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) nitrate concentrations. These data were obtained on a selected “source leaf”, determined as mature at D0 (early bolting) and becoming senescent during the experiment. The chlorophyll amount (A; SPAD value) is expressed in an arbitrary unit. The amount of total N (B), soluble proteins (C), amino acids (D) and other N compounds (E) are expressed as mg of N per leaf for each fraction. The fraction of other N compounds that mainly corresponded to insoluble proteins, oligopeptides and ammonia, was determined as follows: mg of total N amount - (mg of N-soluble proteins + mg of N-amino acids). All these data were quantified at 0, 7 (bolting stage), 14 (flower buds raised above the youngest leaves), 21 (first petals visible, but flower buds still closed) and 28 (flowering) days after the beginning of bolting (D0). Concerning the soluble proteins and the other N compounds, only one biological replicate remained at D28, and its value is indicated by a cross (x). Data are indicated as the mean value \pm standard error (vertical bars). Letters a, b and c represent differences in kinetics, asterisks indicate significant differences between treatments and hashes represent significant differences between genotypes ($n=4$ plants; $p<0.05$).

form of N storage in source leaves, especially the soluble protein Rubisco (Makino *et al.*, 1992), and for both genotypes a massive degradation of the soluble proteins occurs 7 days after bolting under both N conditions (Figure D-22C). The aspartic and serine proteases seem to contribute at a low level to the proteolysis in both genotypes (Figure D-24B), contrary to previous results reported for *Arabidopsis* (Roberts *et al.*, 2012). Our study reveals a higher involvement of metalloproteases during N remobilization in the source leaves of Oase in response to LN supply (Figure D-24B). These results are consistent with previous proteomics studies which showed the induction of metalloproteases (FtsH) during leaf senescence at the vegetative stages of winter oilseed rape (cv. Capitol) in response to limitation/privation in nitrate (Desclos *et al.*, 2009). Because FtsHs are involved in the proteolysis of D1 or Lhcb3 proteins localized in the thylakoid membrane (Wagner *et al.*, 2012), our results suggests that a nitrate limitation may lead to an improvement in the degradation of thylakoid-bound proteins.

Except for Aviso in HN conditions, the classes of proteases having the greatest involvement in the massive *in vitro* proteolysis observed 7 days after bolting are cysteine proteases and the proteasome system (Figure D-24B). The importance of cysteine proteases in leaf proteolysis is in agreement with previous studies on winter oilseed rape demonstrating that the cysteine protease SAG12 is highly induced at the transcriptomic (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997) and proteomic (Desclos *et al.*, 2009) levels during leaf senescence. The efficient N remobilization observed for Oase in both N conditions and for Aviso in LN treatment seems to be correlated to a high contribution of the proteasome in the proteolysis mechanisms (Figure D-24B), which confirm the previous studies on oilseed rape (Desclos *et al.*, 2009) and *Arabidopsis* (Roberts *et al.*, 2012). In addition, in our *in vitro* conditions, the proteasome seems to be able to degrade the LSU of Rubisco. However, in cell, the proteasome complex is involved in degradation of proteins previously tagged with ubiquitin and is mainly localized in the nucleus and cytosol (around pH 7.5, (Sullivan *et al.*, 2003)). Some studies in *Arabidopsis* shown that Rubisco is degraded in acidic organelles such as lytic vesicles or vacuoles (around pH 5, (Hörttensteiner and Feller, 2002; Martínez *et al.*, 2008b)) and/or directly in the stroma (characterized by a pH of 7.5 and a low amount of ubiquitin (Beers *et al.*, 1992)). Taken together, these studies suggest that Rubisco is probably not degraded *in planta* by the proteasome system. However, a chloroplastic E3 enzyme, involved in the selectivity of the ubiquitin-proteasome system during plastid formation was recently found in the outer membrane of chloroplasts (Ling *et al.*, 2012). In addition, the proteolysis by the proteasome can occur without the involvement of ubiquitin in animal cells (Vierstra, 1996), suggesting that could also happen in plant cells. Consequently, the involvement of the proteasome pathway in the degradation of chloroplastic proteins seems to be possible and should be investigated further.

The efficient degradation of soluble proteins observed in the senescing leaf of Aviso under both N conditions (Figure D-22C) was not correlated with a concomitant decrease in the total

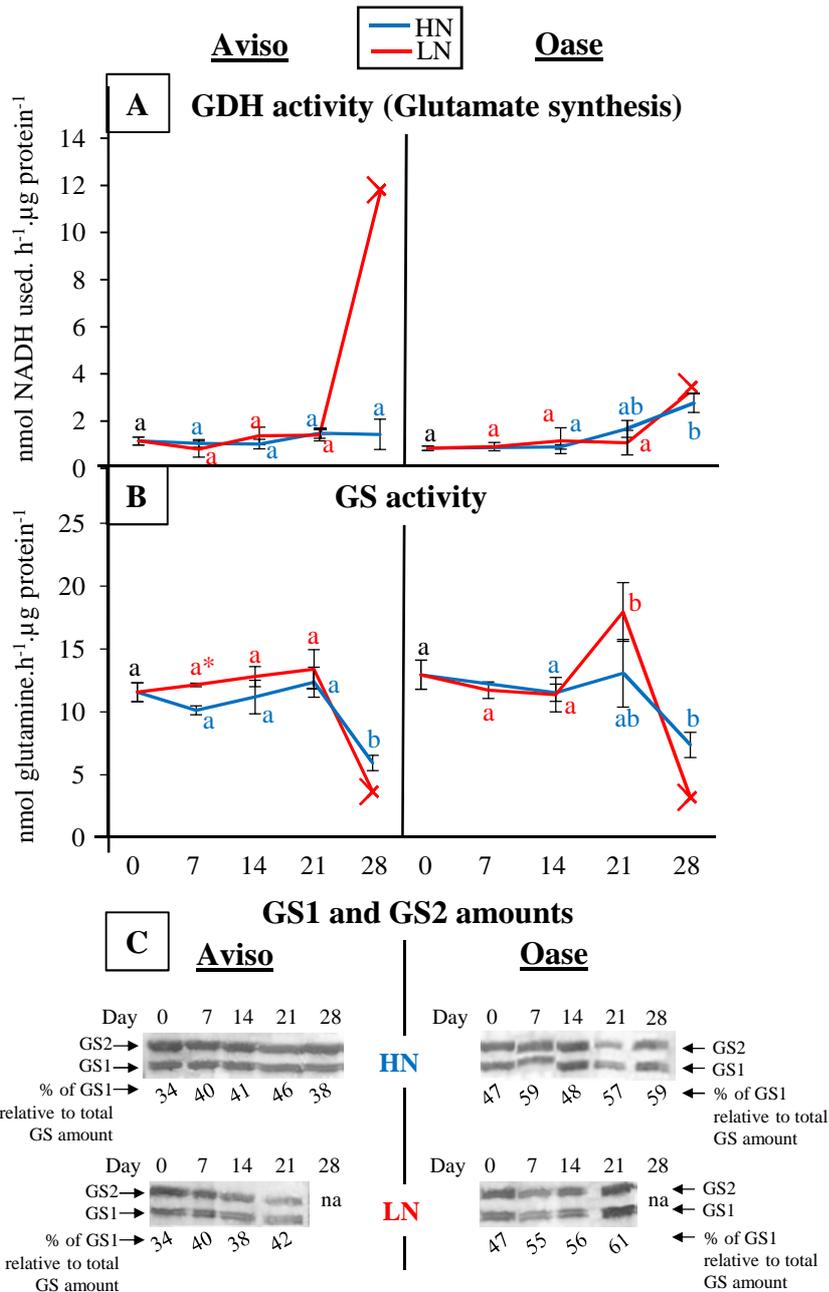


Figure D-23: Changes in glutamate dehydrogenase activity, glutamine synthetase activity and their amounts (GS1, GS2) in a source leaf. Plants were supplied with ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) nitrate concentrations. These data were obtained from a selected ‘source leaf’, determined as mature at D0 (early bolting) and becoming senescent during the experiment. The activity of glutamate dehydrogenase (GDH; A) as quantified was the synthesis of glutamate and is expressed as nmol of NADH used.h⁻¹.μg⁻¹ proteins. The activity of glutamine synthetase (GS; B) was determined by the nmol of glutamine produced.h⁻¹.μg⁻¹ proteins. The GS1 and GS2 amounts (C) were quantified after western blotting with specific antibodies and the percentage of GS1 among the total GS amount was estimated. Data were observed at 0, 7 (early bolting), 14 (flower buds raised above the youngest leaves), 21 (first petals visible, but flower buds still closed) and 28 (flowering) days after the beginning of bolting (D0). Only one biological replicate remained at D28, and its value is indicated by a cross (x). In panels A and B, data are indicated as the mean value ± SE (vertical bars). Letters a, b and c represent differences in kinetics, asterisks mean significant differences between treatment and hashes represent significant differences between genotypes (n=4 plants; p<0.05).

N amount (Figure D-22B). In our study, there was no transient accumulation of N in the amino acid fraction (Figure D-22D), confirming that the export of amino acids was not limiting, as indicated in earlier results obtained for winter oilseed rape cv. Lirajet (Tilsner *et al.*, 2005). Consequently, despite the decline in N-soluble proteins, the stability of total N in senescing leaf was related to a transient accumulation of other N compounds (Figure D-22E), including transmembrane proteins, peptides, nitrate and/or ammonia. In addition, the degradation and/or export of these other N compounds seem to be responsible of the higher N remobilization of the source leaf observed at D21 under LN conditions (Figure D-22E). In Aviso LN plants, the high decrease of other N compounds at D21 is followed by an increase of the amination activity related to GDH (Figure D-23A), which catalyses the incorporation of ammonium on α -ketoglutarate to produce glutamate in case of accumulation of ammonium (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010) released by the catabolism of proteins and peptides (Damodaran and Ananta-Narayanan, 1938). The better degradation of transmembrane proteins and peptides in LN conditions could lead to an ammonium accumulation and, therefore, may explain the increase of amination by the GDH in order to detoxify the cell and produce glutamate, which is found in phloem sap of oilseed rape (Lohaus and Moellers, 2000). If this hypothesis is true, the lower level of other N compounds observed in source leaf of Oase in both N conditions (Figure D-22E) could be due to an efficient degradation of transmembrane proteins and/or peptides into amino acids. The amino acids are not accumulated in the source leaf (Figure D-22D), suggesting that they are well exported towards the phloem vessels. This could be related to the fact that GS1, the cytosolic isoform of GS which is known to be involved in N remobilization processes (Ochs *et al.*, 1999), is present in higher proportions in the source leaf of Oase than in Aviso one (Figure D-23C). These data suppose that an efficient degradation of transmembrane proteins and/or peptides and a rapid conversion of amino acids into their transportable forms (such as glutamate and glutamine) by enzymes like GDH or GS1 in order to enhance their exportation from the mesophyll cells towards the phloem is an important physiological trait for the optimization of NRE. These results have to be confirmed and other enzymes involved in the conversion of amino acids, such as asparagine synthetase in *Arabidopsis* (Gaufichon *et al.*, 2013), have to be investigated in oilseed rape leaves.

Stems play a pivotal role in N management as a transient N storage organ

In LN supply, the highest N amount in seeds of Aviso compared with Oase is linked to a large N remobilization (3-fold higher) from the stem to seeds during seed filling (Figure D-21). As previously observed (Wiesler *et al.*, 2001b), the highest N remobilization is not related to a lower residual N in the stem at D99 (Figures D-S7 and D-S8), but to a significant higher distribution of N towards the stem before seed filling (Figures D-19 and D-20). Consequently, the increase of N storage capacity in stems before the onset of seed filling may significantly improve the N remobilization from stems towards seeds. The same conclusion

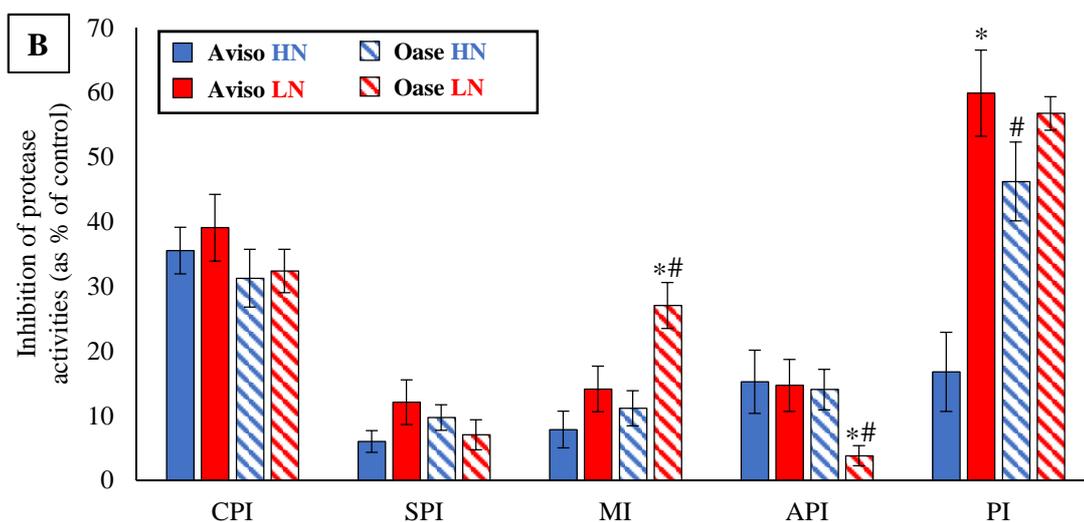
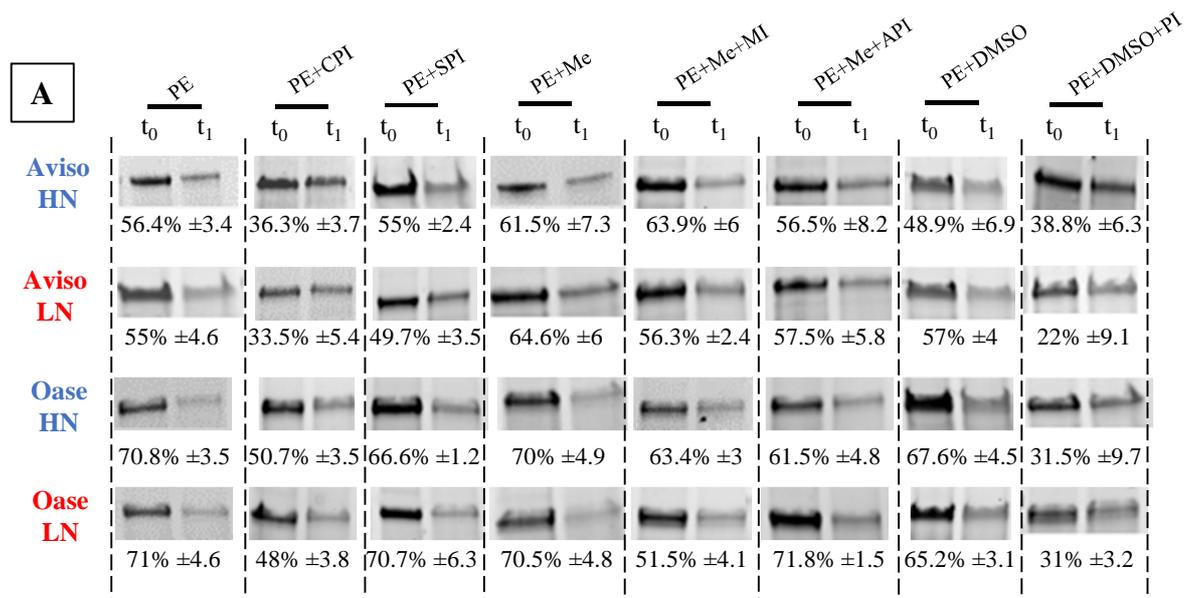


Figure D-24: Rubisco large subunit degradation in a source leaf with or without protease inhibitors (A) and the inhibition of the protease activities by protease inhibitors (B). The Rubisco large subunit (LSU) in the soluble protein extract (PE) of the source leaf (7 days after bolting) is visualized on Stain Free SDS-PAGE and quantified for the four biological repetitions (see Fig. D-S10) by Image Lab software (Bio-Rad) at (t₀) and after 1h of incubation at 37°C (t₁) without inhibitors (PE, control conditions) or with specific protease inhibitors: iodoacetamide (PE+CPI; cystein protease inhibitor), aprotinin (PE+SPI; serine protease inhibitor), methanol (PE+Me), methanol and 1-10 phenanthroline (PE+Me+MI; metalloprotease inhibitor), methanol and pepstatin A (PE+Me+API; aspartic protease inhibitor), DMSO (PE+DMSO) or DMSO and MG132 (PE+DMSO+PI; proteasome inhibitor). The most representative biological repetition is shown in panel A and the percentage of degradation (mean value ± SE, n=4 plants) are indicated below. Panel B presents the inhibition of the protease activities by the proteases inhibitors (expressed as % of LSU degradation observed in control conditions (PE)). In panel B, data are indicated as the mean value ± SE. An asterisks means that the LSU degradation is significantly different between N treatment and # means a significant differences between genotypes (n=4 plants; * or # =p<0.05).

was observed about leaves during seed filling. However, while leaves were crucial source organs before early silique formation, their participation remained low during seed filling (only 7 and 5% of total N remobilization for Aviso and Oase, respectively; Figure D-21). A high N remobilization from leaves towards the stem was previously associated with a high NUE in spring oilseed rape (Balint and Rengel, 2011). Taken together, results suggest that the stem is a crucial buffering organ for transient N storage in order to compensate the delay between the large N remobilization from leaves and the sink N demand for seed filling.

CONCLUSIONS

As previously observed under restricted N supply, the higher N uptake from bolting to flowering is associated with the most efficient genotype for seed N filling (Aviso in our study). Nevertheless, under field conditions, the mineral N availability strongly fluctuates and is usually low during seed filling, meaning that a higher N uptake could not be sufficient to significantly improve the NUE. The investigation of the contrasting N management in Aviso and Oase genotypes confirms that remobilization during monocarpic senescence is efficient for leaves and stems. Consequently, an efficient remobilization and utilization of N taken up and N stored before the onset of seed filling is probably one of the main physiological trait for attaining a high NUE in an agronomic context of mineral N restriction. Up to the early phase of seed filling, N is mainly stored in leaves, and therefore an efficient foliar N remobilization is important to limit N loss from dead leaves and improving seed N filling together with a limitation of pollution risk. Our findings suggest that an efficient foliar NRE is mainly associated to (i) a high proteolysis by the cysteine proteases and proteasome system and (ii) a strong coordination between proteolysis, the export/degradation of oligopeptides and the export of amino-acids (involving the enzymes GS and GDH). Future developments are needed to confirm the relevance of these classes of proteases before their potential use in a "candidate protein-strategy" to identify QTLs related to high NRE. Our study also highlights that the improvement of NUE and seed N filling under low mineral N availability is highly related to an efficient storage of the N remobilized from leaves into the stem. Thus, it is likely that the stem may act as a transient storage organ in case of asynchronism between the massive remobilization of N coming from source leaves and its further utilization by seeds. Such physiological traits (efficient leaf N remobilization, transient N storage in stems) may be particularly relevant to breeding programs aimed at identifying *Brassica napus* genotypes having high NUE in response to the fluctuation of nitrate availability and low N fertilizer inputs.

METHODS

Greenhouse experimentation

Two genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Aviso and Oase) were cultivated in greenhouse conditions (Figure D-S9). After sterilization, seeds were sown on

watered vermiculite and when the first leaf appeared, plantlets were supplied for the first 2 months with a 25% Hoagland solution (1.25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1.25 mM KNO_3 ; 0.5 mM MgSO_4 ; 0.25 mM KH_2PO_4 ; 0.2 mM $\text{EDTA-2NaFe-3H}_2\text{O}$; 14 μM H_3BO_3 ; 5 μM MnSO_4 ; 3 μM ZnSO_4 ; 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$; 0.7 μM CuSO_4 ; 0.1 μM CoCl_2). Thereafter, plants were vernalized for 8 weeks under a long photoperiod and low temperature (day: 10 h, 10°C; night: 14 h, 4°C; 90 mL of 25% Hoagland solution per plant renewed twice a week). During pre-culture and vernalization, light was supplied by High Pressure Sodium Lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) with a PAR (Photosynthetically Active Radiation) of 400 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ at the top of the canopy. After vernalization, plants were transferred to a greenhouse in pots containing perlite and vermiculite (2:1, v/v; one plant per pot; 40 plants per square metre), and exposed to a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). To estimate the N fluxes at the whole plant level, long term pulse chase ^{15}N -labelling (at 2% atom excess) was applied from the first days of germination until the early bolting stage (Day 0 of the experiment (D0) corresponding to GS31, a growth stage determined from the scale of BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie)). At D0, $^{15}\text{N-NO}_3$ labelling was stopped and two N treatments with unlabelled- NO_3 were applied until the final harvest stage (D99; corresponding to GS99 *i.e.* the final stage of development with mature seeds and the whole plant in senescence): high nitrate (HN, 3.75 mM) and low nitrate (LN, 0.375 mM). Each day the nutrient solution was supplied automatically in an increasing volume as a function of the growth stages: 90, 120, 150, and 180 mL per plant at the start of the bolting, visible bud, flowering, and seed maturation stages, respectively.

Plants were harvested at different growing stages: D0 (GS31), D7 (GS32: bolting stage), D14 (GS53: flower buds raised above the youngest leaves), D21 (GS59: first petals are visible), D28 (GS60: flowering), D42 (GS70: end of flowering), D70 (GS73: pod filling) and D99 (GS99: mature seeds, whole plant in senescence). Plants were separated into roots (including taproot and secondary roots), leaves, stem (including the ramifications), siliques, seeds and pod walls (when siliques were dehiscent). The dry matter of each organ was determined after freeze-drying. The thousand seed weight and the total seed number were deduced from the weight of one hundred seeds after 48h at 30°C.

In order to analyse foliar N remobilization, leaves were classified into three groups (dead leaves, old+mature leaves and young leaves) on the basis of their nodal position, their leaf area was determined by a LI-COR 300 area meter (LI-COR, Lincoln, NE, USA) and their chlorophyll content measured by SPAD (Soil Plant Analysis Development; Minolta, SPAD-502 model). Throughout the experiment, dead leaves were counted and harvested. Moreover, at D0, a mature leaf that had become senescent during the experiment (*i.e.* a “source” leaf for N) was tagged and studied in order to characterize the processes associated with leaf N remobilization from bolting (D0) to flowering (D28) (see Figure D-S9 for more details about the selection of these source leaves). One half of this mature leaf was freeze-dried, weighed

for dry matter and ground to a fine powder for further biochemical analyses. The other half of the mature leaf was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further protein and molecular analyses.

Determination of oil content, fatty acid composition and protein contents in seeds

As previously described by Dubousset *et al.* (Dubousset *et al.*, 2010), seed samples (about 3 g) were scanned on a monochromator Near Infra-Red System (NIRSystem model 6500, FOSS NIRSystem Inc, Silver Spring, MD, USA) equipped with the transport module, in the reflectance mode. The results were predicted from an external calibration established for oil content and composition of fatty acids (CRAW, Gembloux, Belgium). Three determinations were performed for each biological replicate.

Total N and ¹⁵N quantification, whole plant N fluxes and determination of NUE components

The total N and ¹⁵N amounts in each organ were analysed by an elemental analyser (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) linked to a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, IsoPrime GV instruments, Manchester, UK). Due to the long term pulse chase labelling described below, the ¹⁵N amount is representative of the total N amount in every organ; the variation of the ¹⁵N amount allows estimation of the endogenous N fluxes related to N remobilization and the exogenous N flux coming from uptake. The determination of source or sink status of leaves or other organs was done on the basis of their ¹⁵N amount, where a sink organ is characterized by a gain of ¹⁵N and a source organ by a decrease in the ¹⁵N amount. The calculation of the whole plant N fluxes are described in detail in Salon *et al.* (Salon *et al.*, 2014).

The N use efficiency (NUE) was calculated as:

$$\text{NUE} = (\text{QN}_{\text{seed}} / \text{QN}_{\text{whole plant}}) / (\text{DM}_{\text{seed}} / \text{DM}_{\text{whole plant}})$$

where QN_{seed} corresponds to the N amount (mg) in seeds, $\text{QN}_{\text{whole plant}}$ to the N in the whole plant (including roots and seeds), DM_{seed} to the seed dry matter (g) and $\text{DM}_{\text{whole plant}}$ refers to the whole plant dry matter (g) observed at the final stage (including roots and seeds; GS99).

The N utilization efficiency (NUtE) corresponds to the seed dry matter (DM_{seed}) production per g of N in shoots (QN_{shoot}) and was estimated by the following calculation:

$$\text{NUtE} = \text{DM}_{\text{seed}} / \text{QN}_{\text{shoot}}$$

Based on the calculation of endogenous and exogenous N fluxes, the N remobilization efficiency (NRE; total remobilized N amount relative to the total N stored in source organs) and N uptake efficiency (NUpE; N amount allocated to seeds from uptake relative to total N distributed to seeds) were defined as follows (as a percentage):

$$\text{NRE} = \Sigma \text{QN}_{\text{remobilization}} * 100 / (\Sigma \text{QN}_{\text{source } t} + \Sigma \text{QN}_{\text{uptake}})$$

$$\text{NUpE} = \text{QN}_{\text{uptake}} * 100 / \text{QN}_{\text{distributed}}$$

where $\Sigma QN_{\text{remobilization}}$ corresponds to the total N amount remobilized between t and $t+\Delta t$, $\Sigma QN_{\text{source } t}$ is the N amount in all source organs at t and $\Sigma QN_{\text{uptake}}$ corresponds to the amount of N taken up that is allocated to all source organs between t and $t+\Delta t$. The QNS_{uptake} corresponds to the N amount allocated to seeds from the uptake and the $QNS_{\text{distributed}}$ to the total N amount distributed to seeds (from uptake and remobilization).

Analysis of N-soluble proteins, N-free amino acids and other N compounds in leaves

Soluble proteins were extracted from 200 mg of frozen fresh matter previously ground in a mortar with liquid nitrogen and 500 μL of citrate-phosphate buffer (20 mM citrate, 160 mM phosphate, pH 6.8 containing 50 mg of polyvinylpyrrolidone (PVPP)). After centrifugation (1h, 12 000 g, 4°C), the resulting supernatant, containing the soluble proteins (protein extract, PE), was transferred to a microtube and completed to 500 μL . The concentration of the soluble proteins was determined in an equivalent of bovine serum albumin (BSA) using protein-dye staining (Bradford, 1976). To obtain the protein amount in equivalent nitrogen, an average N content of 16% was applied. For amino acid extraction, 1 mL of sodium phosphate 100 mM (pH 7.5) was added to 25 mg of leaf powder obtained after grinding of freeze-dried leaf samples. The mixture was incubated twice (30 min at 80°C) with 1 mL of 80% ethanol and 1 mL of 50% ethanol, respectively. After each incubation, the resulting mixtures were centrifuged (10 min, 12 000 g, 4°C) and the resulting supernatants containing amino acids were pooled, evaporated and re-suspended in 500 μL water. To quantify the amino acid concentration, 10 μL of amino acid extract were added to 90 μL of water and 1 mL of ninhydrin reagent (112 mM ninhydrin and 3.85 mM tin chloride in 100 mM citrate buffer pH 5, 50% (v/v) DMSO). After incubation for 20 min in boiling water and 10 min on ice, 5 mL of 50% ethanol were added and the absorbance was read at 570 nm. The amino acid concentration was calculated using L-leucine as standards. The N-amino acid amounts were deduced by using an average value for molecular mass (110 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) and the N ratio (7.86) obtained from previous studies in leaf samples of oilseed rape was used to determine the N-amino acid amounts. In order to determine the amount of other N compounds (including insoluble proteins, oligopeptides, nitrate and ammonia), the N-soluble protein and N-amino acid amounts have been subtracted from the total N amount.

Analysis of glutamate dehydrogenase (GDH) and glutamine synthetase (GS) in the source leaf

For GS and GDH analysis, proteins were extracted from 150 mg of fresh matter of leaves (previously ground in a mortar with liquid nitrogen) with 1 mL of extraction buffer (10 mM Na-EDTA, 10 mM MgCl_2 , 250 mM Tris-HCl pH 7.6, 13.3 mM β -mercaptoethanol and 2 mM leupeptine) containing 50 mg of polyvinylpyrrolidone (PVP). The GDH activity in the sense of glutamate synthesis (expressed in $\text{nmol of NAD(H) used}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g protein}^{-1}$) was performed as previously described by Masclaux *et al.* (Masclaux *et al.*, 2000). The same protein extract was used to determine the GS activity ($\text{nmol glutamine}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g protein}^{-1}$) by the method of O'Neal

and Joy (O'Neal and Joy, 1973). In order to monitor the kinetic evolution of GS1 and GS2, a western blot was performed. For this, the four biological replicates of protein extracts were pooled and 10 µg were denatured with Laemmli 2X buffer (Laemmli, 1970) containing β -mercaptoethanol (5% (v/v)). The proteins were separated on an SDS-PAGE gel (5.5% polyacrylamide (w/v) for the stacking gel and 10% polyacrylamide (w/v) for the resolving gel) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The protein detection of both GS (GS1 at 39 kDa and GS2 at 44 kDa) was made using rabbit polyclonal antibodies (1/100[°]) derived by Eurogenetec (Seraing, Belgium) against the peptide AYGNERRLTG. The antibodies were detected by secondary antibodies from goat (1/12 000[°]) coupled with alkaline phosphatase. The relative amount of GS1 (cytosolic isoform) and GS2 (chloroplastic isoform) was quantified by Image Lab software (Bio-Rad).

Analysis of protease activities involved in Rubisco large subunit (LSU) degradation in the source leaf

In order to identify the proteases involved in the degradation of the Rubisco LSU, a new method using Stain Free gels (Bio-Rad®) was performed. These gels allow the detection of proteins immediately after the end of the SDS-PAGE and in less than 2 min, and the method is based on a UV-induced trihalo-compound modification of tryptophan residues contained in proteins (for details, see Kazmin *et al.* (Kazmin *et al.*, 2002)). In order to identify the protease classes involved in the LSU degradation, the soluble protein extract (PE, 6 µg) obtained from source leaves at D7 were either incubated for 1 h at 37°C (t_{1h}) or not (t_0) in sodium acetate buffer 250 mM (pH 5, 0.16% β -mercaptoethanol (v/v)) with or without specific protease-class inhibitors. Iodoacetamide (14.5 mM) was used as an inhibitor of cysteine proteases (PE+CPI) and aprotinin (34 µM) was the serine proteases inhibitor (PE+SPI). For analysis of metalloprotease and aspartate protease activities, 5.5 mM of 1-10 phenanthroline (PE+Me+MI) and 10.2 µM of pepstatin A (PE+Me+API) were used, respectively. Finally, 40 µM of MG132 (benzyloxycarbonyl-leu-leu-leucinol) were used to inhibit proteasome (PE+DMSO+PI). Due to the solubility of 1-10 phenanthroline and pepstatin inhibitors in 1% methanol, the total protease activity was also quantified with 0.5 % methanol (v/v; PE+Me). In the same way, due to the solubility of MG132 in DMSO, the total protease activity was carried out with 0.5 % DMSO (PE+DMSO). At t_0 or after incubation for 1 h at 37°C (t_{1h}), Laemmli 2X buffer (Laemmli, 1970) containing β -mercaptoethanol (5% (v/v)) was added to the protein samples (one volume of Laemmli 2X buffer per volume of proteins) before protein denaturation for 7 min in boiling water. The resulting samples were loaded on SDS-PAGE (Mini-PROTEAN TGX Stain Free Gels 4-15%, Bio-Rad®) and the LSU amount at t_0 (LSU _{t_0}) and after 1 h of incubation (LSU _{t_{1h}}) were visualized and quantified using Image Lab software (Bio-Rad®). The percentage of LSU degradation (% Deg) with or without protease inhibitors was firstly determined and used to deduce the inhibition of LSU proteolysis (% Inh) by the different protease inhibitors as follows:

$$\% \text{ Deg} = (\text{LSU}_{t_0} - \text{LSU}_{t_1}) \times 100 / \text{LSU}_{t_0}$$

$$\% \text{ Inh} = (\text{LSU}_{\text{PE}}) - (\text{LSU}_{\text{PE+Inh}}) * 100 / (\text{LSU}_{\text{PE}})$$

where LSU_{PE} is the amount of LSU degraded without inhibitor and $\text{LSU}_{\text{PE+Inh}}$, is the amount of LSU degraded in the presence of protease inhibitors.

STATISTICAL ANALYSIS

The normality of the data was studied with the Ryan-Joiner test at 95%. Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test were used to compare the means. When the normality law of data was not respected, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was carried out. Statistical significance was postulated at $P < 0.05$. Four biological repetitions corresponding to four different plants ($n=4$) were used and the data presented here are expressed \pm standard error (SE).

LIST OF ABBREVIATIONS

N; Nitrogen; HN, High nitrogen; LN, Low nitrogen; DM, Dry matter; TSW, Thousand seed weight; LSU, Rubisco large subunit; GS, Glutamine synthetase; GDH, Glutamate dehydrogenase; NUE, Nitrogen use efficiency; NUtE, Nitrogen utilization efficiency; NAE, Nitrogen assimilation efficiency; NRE, Nitrogen remobilization efficiency; NUpe, Nitrogen uptake efficiency; FtsH, Filamentation temperature-sensitive H.

COMPETING INTERESTS

The authors have declared no conflict of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTION

AG, PE, JT, AB, FLC, LL, MO, MFN, NN, DC and JCA have made substantial contributions to conception and design of experiment. AG, JT and JCA carried out the N flux calculations. AG, CMD and FS performed the GS and GDH analysis. AG made other measurements and analyses, including statistical analyses, interpretation of data and drafting the article. All authors have been involved in revising the article critically for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the French National Research Agency (ANR-07-GPLA-016 GENERGY: Improvement of the oil yield of the rapeseed crop in the context of bio fuel production; ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input) and by a Ph.D. grant to Mrs Alexandra Girondé from the French Ministry of Research. The authors would like to thank Ms Marie-Paule Bataillé, Ms Anne-Françoise Ameline, Mr Raphaël Ségura and Mr Cédric Scher for their technical help in plant harvest and N analyses. The authors also thank Sophie Rolland for her valuable help in NIRS analysis.

Table D-S7: Dry matter of every organs of Aviso and Oase in LN and HN conditions.

Genotype & treatment	Date	Roots	Stem	Leaves	Flowers	Pod Walls	Seeds
Aviso HN	D0	3.44 ± 0.21 ^a	2.02 ± 0.18 ^a	6.41 ± 0.23 ^a	0.15 ± 0.02 ^a		
	D42	2.87 ± 0.17 ^a	9.31 ± 0.36 ^b	2.76 ± 0.17 ^b	0.07 ± 0.06 ^a	8.67 ± 0.8 ^a	
	D70	2.81 ± 0.5 ^a	8.94 ± 0.59 ^b	0.79 ± 0.17 ^c	0.29 ± 0.11 ^a	5.91 ± 0.84 ^b	4.54 ± 0.70 ^a
	D99	2.74 ± 0.15 ^a	8.40 ± 1.21 ^b	0.26 ± 0.02 ^c	0.08 ± 0.03 ^a	7.73 ± 0.64 ^{ab}	8.75 ± 0.69 ^b
Aviso LN	D42	2.31 ± 0.25 ^{ab}	8.13 ± 0.51 ^b	1.36 ± 0.24 ^{b*}	0.03 ± 0.02 ^a	5.82 ± 0.84 ^{a*}	
	D70	1.66 ± 0.09 ^b	10.96 ± 1.19 ^{b*}	0.13 ± 0.01 ^{b*}	0.04 ± 0.02 ^a	3.69 ± 0.10 ^a	3.04 ± 0.16 ^a
	D99	1.99 ± 0.16 ^{b*}	10.64 ± 0.38 ^b	0.35 ± 0.14 ^b	0.02 ± 0.02 ^a	3.99 ± 0.25 ^{a*}	5.10 ± 0.35 ^{b*}
Oase HN	D0	3.15 ± 0.46 ^a	2.17 ± 0.26 ^a	7.25 ± 0.57 ^a	0.07 ± 0.01 ^a		
	D42	3.06 ± 0.27 ^a	11.15 ± 1.06 ^b	2.78 ± 0.23 ^b	0.16 ± 0.07 ^a	7.41 ± 0.80 ^a	
	D70	3.42 ± 0.20 ^a	12.50 ± 0.93 ^{b#}	0.59 ± 0.08 ^c		7.10 ± 0.15 ^a	5.90 ± 0.27 ^a
	D99	3.17 ± 0.19 ^a	12.11 ± 0.98 ^{b#}	0.77 ± 0.07 ^{c#}	0.15 ± 0.07 ^a	8.33 ± 0.25 ^a	9.33 ± 0.41 ^b
Oase LN	D42	3.27 ± 0.31 ^{a#}	9.92 ± 1.06 ^b	1.19 ± 0.12 ^{b*}	0.01 ± 0.00 ^a	7.04 ± 1.51 ^a	
	D70	3.13 ± 0.15 ^{a#}	9.32 ± 0.66 ^{b*}	0.02 ± 0.02 ^{c*#}	0.01 ± 0.01 ^a	4.15 ± 0.1 ^{b*#}	3.46 ± 0.14 ^{a*}
	D99	2.35 ± 0.35 ^a	10.15 ± 0.16 ^b	0.37 ± 0.1 ^{c*}	0.08 ± 0.06 ^a	3.73 ± 0.20 ^{b*}	5.33 ± 0.18 ^{b*}

The data are expressed in grams. The plants were cultivated in ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) nitrate concentrations and the data obtained at D0 (early bolting stage), D42 (pod formation), D70 (start of seed filling) and D99 (mature seed stage) are presented in this table. Grey box means that the organ was absent at this growing stage. Letters a, b, c represent the significant differences of organs between two harvest dates, the asterisks indicate significant differences between N treatments and hashes indicate differences between genotypes ($n=4$ plants; $p<0.05$).

Table D-S8: N amount of every organs of Aviso and Oase in LN and HN conditions.

Genotype & treatment	Date	Roots	Stem	Leaves	Flowers	Pod Walls	Seeds
Aviso HN	D0	50.25 ± 2.40 ^a	35.04 ± 1.61 ^a	130.73 ± 11.55 ^a	8.16 ± 0.78 ^a		
	D42	26.15 ± 1.91 ^b	97.98 ± 1.67 ^b	70.69 ± 10.03 ^b	3.60 ± 3.24 ^a	240.05 ± 24.31 ^a	
	D70	28.41 ± 4.10 ^b	104.56 ± 25.06 ^b	23.16 ± 4.83 ^c	15.62 ± 6.15 ^a	94.31 ± 17.45 ^b	214.33 ± 29.53 ^a
	D99	27.42 ± 2.67 ^b	91.55 ± 8.43 ^b	10.09 ± 1.16 ^c	3.56 ± 1.62 ^a	127.53 ± 16.42 ^b	421.48 ± 40.08 ^b
Aviso LN	D42	19.98 ± 0.88 ^{b*}	59.74 ± 9.62 ^{a*}	29.16 ± 0.98 ^{b*}	1.38 ± 1.14 ^a	132.38 ± 11.43 ^{a*}	
	D70	15.67 ± 1.49 ^{b*}	65.50 ± 3.32 ^a	3.42 ± 0.43 ^{b*}	1.78 ± 0.99 ^a	26.84 ± 3.72 ^{a*}	128.19 ± 7.94 ^{a*}
	D99	12.80 ± 0.83 ^{b*}	40.65 ± 5.28 ^{b*}	11.36 ± 4.25 ^b	0.68 ± 0.61 ^{a*}	22.33 ± 1.96 ^{a*}	194.36 ± 8.05 ^{b*}
Oase HN	D0	47.74 ± 6.11 ^a	38.15 ± 5.14 ^a	133.62 ± 6.71 ^a	3.73 ± 0.50 ^{a#}		
	D42	25.71 ± 2.30 ^b	100.26 ± 19.89 ^b	72.16 ± 6.83 ^b	3.98 ± 3.99 ^a	218.07 ± 21.09 ^a	
	D70	26.85 ± 2.24 ^b	72.06 ± 11.84 ^b	15.84 ± 2.59 ^c		95.41 ± 16.83 ^b	265.57 ± 10.96 ^a
	D99	29.95 ± 2.67 ^b	95.89 ± 5.89 ^b	34.64 ± 3.34 ^{c#}	12.55 ± 5.06 ^{a#}	83.56 ± 14.49 ^b	432.84 ± 5.93 ^b
Oase LN	D42	20.16 ± 1.53 ^b	41.88 ± 3.65 ^{a*}	21.92 ± 0.89 ^{b*#}	0.41 ± 0.12 ^a	125.26 ± 27.38 ^{a*}	
	D70	18.89 ± 1.41 ^{b*#}	30.98 ± 3.77 ^{a*#}	0.37 ± 0.36 ^{c*#}	0.15 ± 0.17 ^{a*}	20.14 ± 2.76 ^{a*}	104.95 ± 5.52 ^{a*}
	D99	15.57 ± 1.37 ^{b*}	28.17 ± 1.25 ^{a*}	11.34 ± 3.39 ^{b*}	2.37 ± 2.15 ^{a*}	17.02 ± 1.14 ^{a*#}	159.81 ± 7.39 ^{b*#}

The data are expressed in milligrams. The plants were cultivated in ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) nitrate concentrations and the data obtained at D0 (early bolting stage), D42 (pod formation), D70 (start of seed filling) and D99 (mature seed stage) are presented in this table. Grey box means that the organ was absent at this growing stage. Letters a, b, c represent the significant differences of organs between two harvest dates, the asterisks mean significant differences between N treatments and hashes mean differences between genotypes ($n=4$ plants; $p<0.05$).

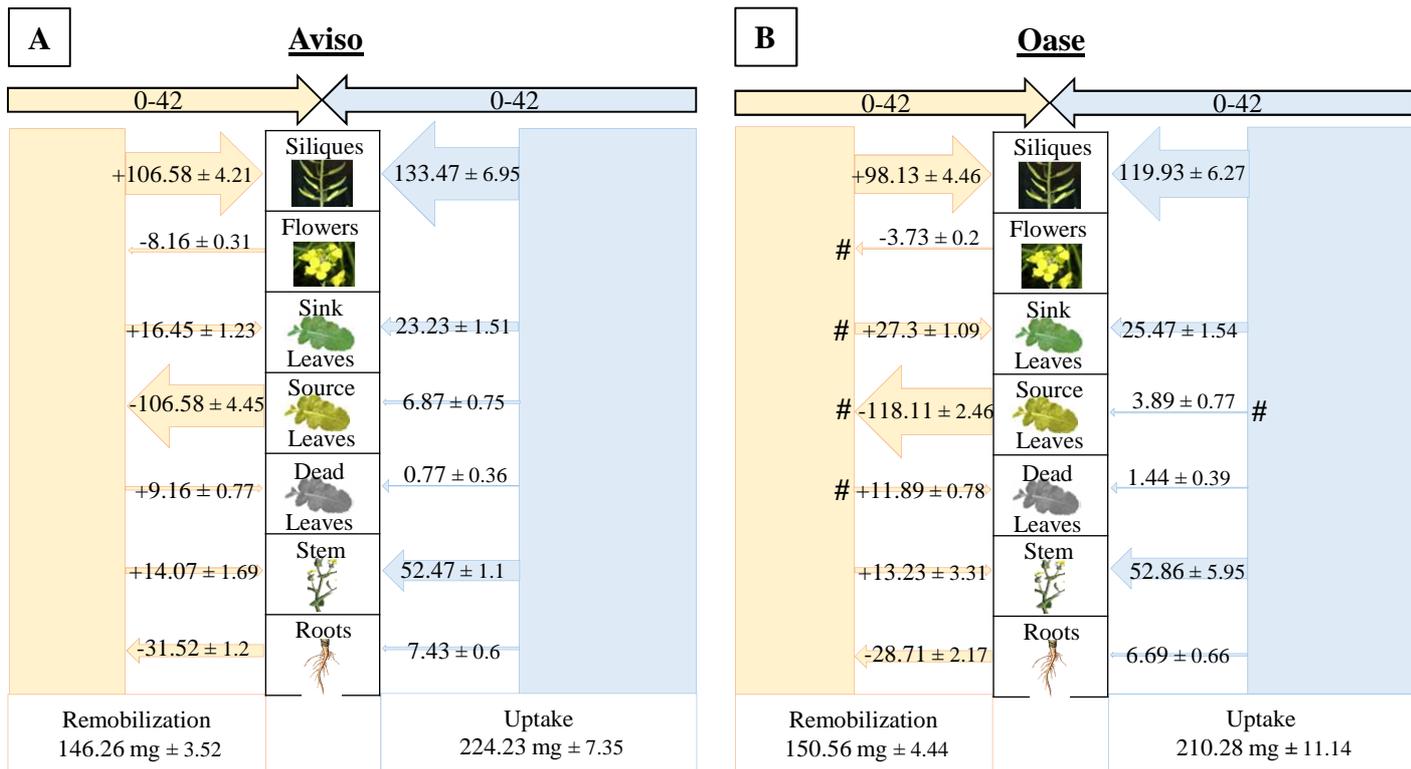


Figure D-S7: N fluxes in Aviso (A) and Oase (B) in HN condition between D0 and D42. The plants were supplied with high concentration of nitrate (HN, 0.375 mM of nitrate) and D0 corresponds to early bolting and D42 to pod formation. Fluxes of N from remobilization or uptake in the different organs are expressed as mg of N remobilized or taken up, respectively. For fluxes of N remobilisation, N amount is indicated with a minus sign (-) when N is remobilized from a source organ while it is indicated with a plus sign (+) when remobilized N is redistributed towards a sink organ. Asterisks represent significant differences between genotypes ($n=4$ plants; $*=p<0.05$).

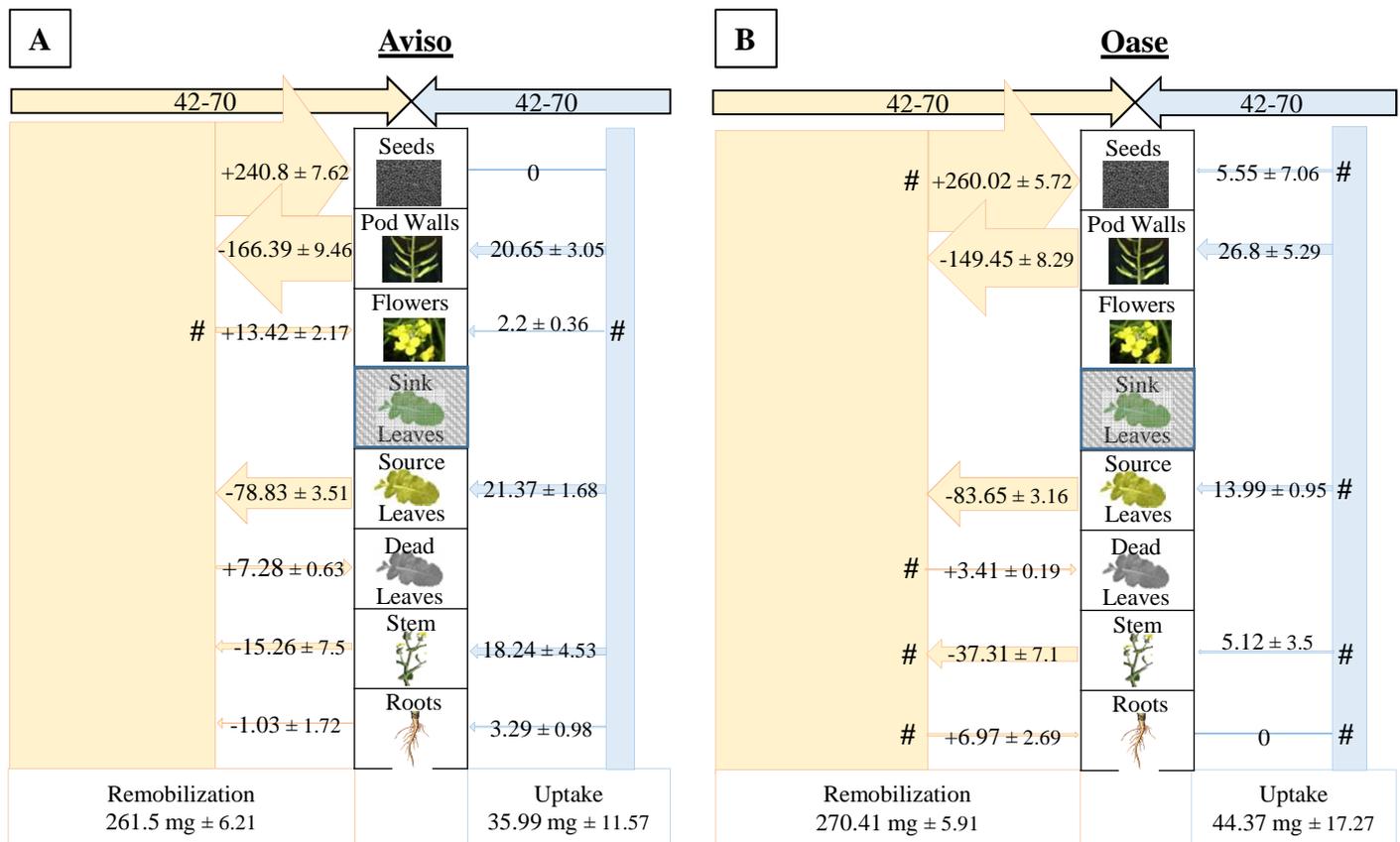


Figure D-S8: N fluxes in Aviso (A) and Oase (B) in HN condition between D42 and D70. The plants were supplied with high concentration of nitrate (HN, 0.375 mM of nitrate) and D42 corresponds to pod formation and D70 to the start of seed filling. Fluxes of N from remobilization or uptake in the different organs are expressed as mg of N remobilized or taken up, respectively. A shaded box means that the organ is not present during these growing stages. For fluxes of N remobilisation, N amount is indicated with a minus sign (-) when N is remobilized from a source organ while it is indicated with a plus sign (+) when remobilized N is redistributed towards a sink organ. Asterisks represent significant differences between genotypes ($n=4$ plants; $*=p<0.05$).

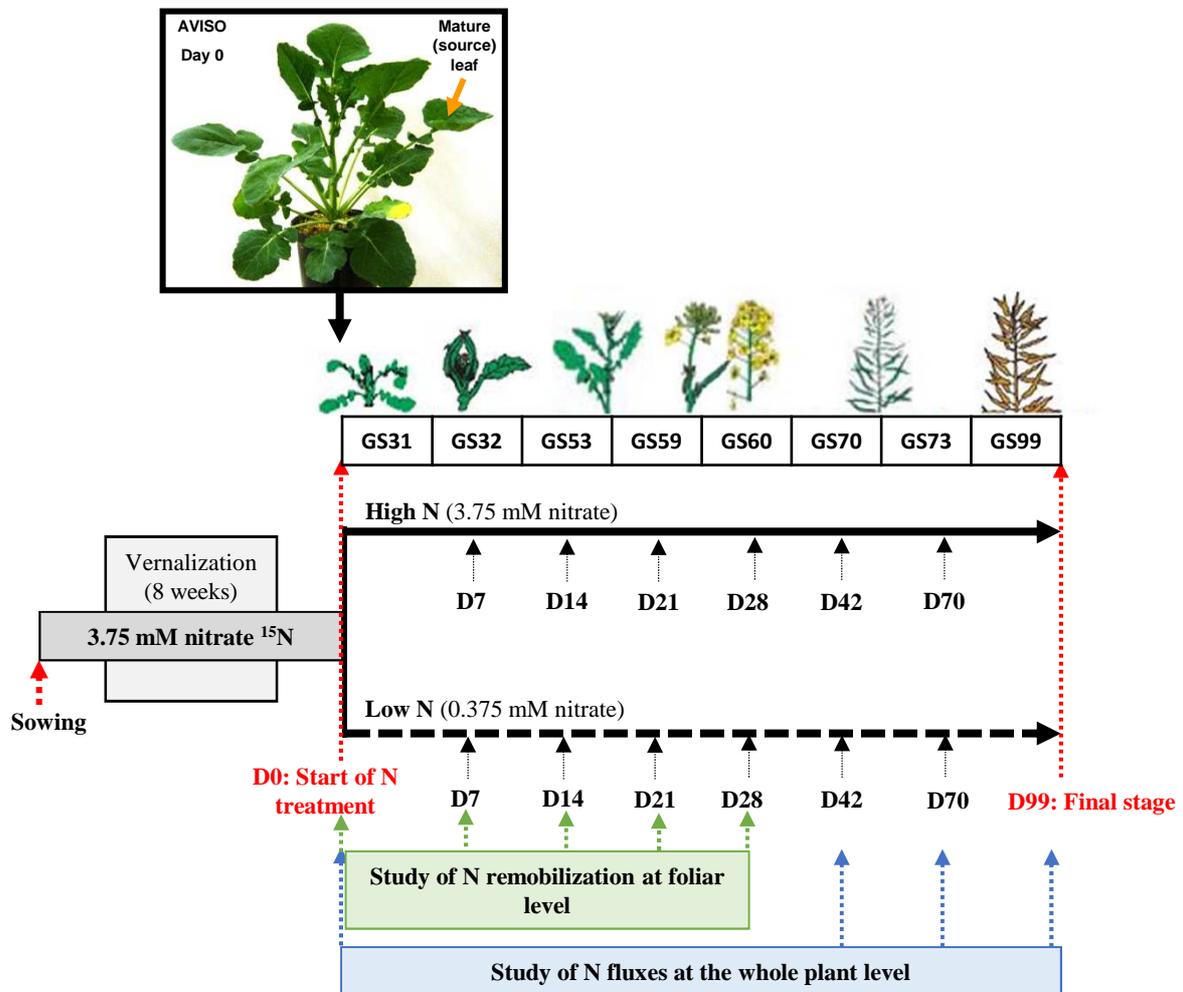


Figure D-S9: Description of the experimental design. Two genotypes of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. cv. Aviso and Oase) were cultivated in greenhouse conditions. After sterilization, seeds were sowed on watered vermiculite and when the first leaf appeared, plantlets were supplied during 2 months with a 25% Hoagland solution (for details see Material and Methods). Thereafter, plants were vernalized during 8 weeks under long photoperiod and low temperature (day: 10 h, 10°C; night: 14 h, 4°C; 90 mL of 25% Hoagland solution per plant renewed twice a week). After vernalization, plants were transferred under greenhouse in pot containing perlite and vermiculite (2:1, v/v; one plant per pot; 40 plants per square meter), and submitted to a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). To estimate the N fluxes at whole plant level, a long term pulse chase labelling (at 2% atom excess) was applied from 43 days after sowing until early bolting growing stage (Day 0 of the experiment (D0) corresponding to GS31), including the vernalization period (8 weeks). At D0, ¹⁵N-NO₃ labelling was stopped and two N treatments with unlabelled-NO₃ were applied until the final harvest stage (D99; corresponding to mature seeds *i.e.* GS99 stage): high nitrate (HN, 3.75 mM) and low nitrate (LN, 0.375 mM). Plants were harvested at different dates corresponding to different growing stage (GS): D0 (GS31), D7 (GS32: bolting stage), D14 (GS53: flower buds raise above the youngest leaves), D21 (GS59: first petals are visible), D28 (GS60: flowering), D42 (GS70: end of flowering), D70 (GS73: pod filling) and D99 (GS99). At D0, leaves were classified into 3 groups (dead, old+mature and young leaves) on the basis of their nodal position, their leaf area and their chlorophyll content. Before the start of N limitation (Day 0), one mature leaf undergoing senescence during the 28 days of experiment (called “source leaf“, see picture showing the source leaf selected in Aviso plants) was studied in details for analysis of the physiological and molecular processes involved in leaf N remobilization. Among the rosette leaves, the “source leaf” was selected on the following criteria: leaf that attained its maximal expansion (leaf area), with a high chlorophyll content and having the same position in the canopy in both genotypes. The leaf biomass at D0 (3.03±0.06 g FW for Aviso vs 2.77±0.13 g FW for Oase), leaf area from D0 to D28 (103.57±4.71 cm² for Aviso vs 99.45±3.89 cm² for Oase) and chlorophyll content at D0 (SPAD value of 51.25±0.71 for Aviso vs 52.53±1.28 for Oase) in these selected source leaves were not significantly different between Aviso and Oase.

Table D-S9: Number and residual N in dead leaves of Aviso and Oase.

		Genotypes			
		Aviso		Oase	
		HN	LN	HN	LN
Number of dead leaves	D0-D42	10 ± 2	18.25 ± 2*	16 ± 1 [#]	17.75 ± 3
	D42-D70	5.25 ± 2	6 ± 1	3 ± 0	5.5* ± 1
Residual N in dead leaves (% of DM)	D0	0.36 ± 0.01	0.56 ± 0.11	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.02
	D28	0.46 ± 0.02	0.53 ± 0.05	0.60 ± 0.01 [#]	0.52 ± 0.08
	D42	0.46 ± 0.01	0.55 ± 0.06	0.44 ± 0.02	0.46 ± 0.03
	D70	1.05 ± 0.07	1.06 ± 0.09	0.89 ± 0.04	0.89 ± 0.05
	D99	1.78 ± 0.08	1.44 ± 0.16	1.71 ± 0.12	1.04 ± 0.12*

The plants were cultivated in ample (HN, 3.75 mM) or low (LN, 0.375 mM) nitrate concentrations and the data obtained at D0 (early bolting stage), D42 (pod formation), D70 (start of seed filling) and D99 (mature seed stage) are presented in this table. Asterisks represent differences between N treatments and hashes differences between genotypes ($n=4$ plants; $*=p<0.05$).

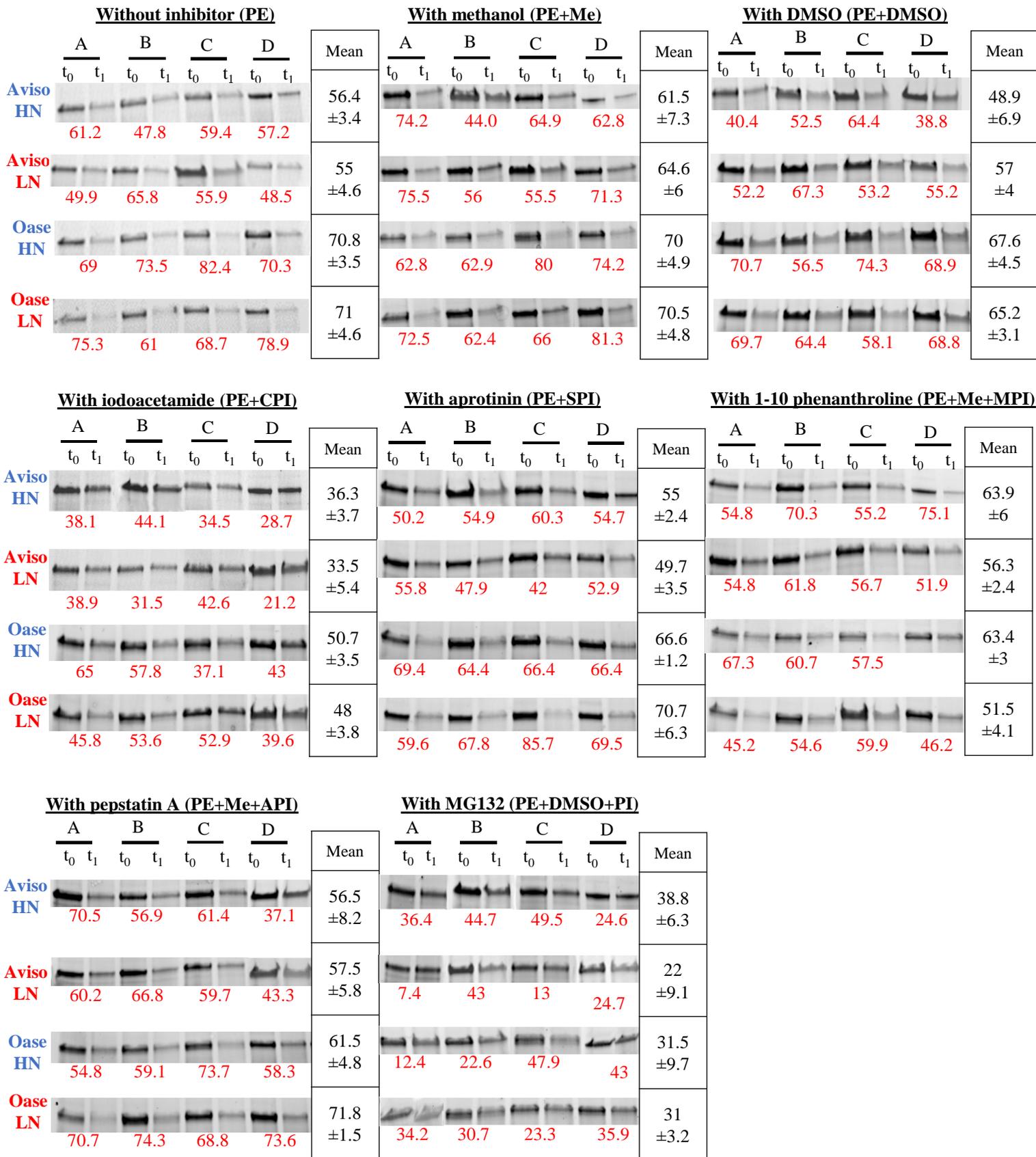


Figure D-S10: Rubisco large subunit degradation in a selected source leaf with or without protease inhibitors. The Rubisco large subunit (LSU) in the soluble protein extract (PE) of the source leaf (7 days after bolting) is visualized on Stain Free SDS-PAGE and quantified for the four biological repetition (A, B, C and D) by Image Lab software (Bio-Rad) at (t₀) and after 1h of incubation at 37°C (t_{1h}) without inhibitors (PE) or with iodoacetamide (PE+CPI; cystein protease inhibitor), aprotinin (PE+SPI; serine protease inhibitor), methanol (PE+Me), methanol and 1-10 phenanthroline (PE+Me+MPI; metalloprotease inhibitor), methanol and pepstatin A (PE+Me+API; aspartic protease inhibitor), DMSO (PE+DMSO) or DMSO and MG132 (PE+DMSO+PI; proteasome inhibitor). The percentage of degradation is indicated below the gel (in red). The mean of the percentage of degradation of the 4 biological repetitions ± standard error is indicated in the table on the right of the gel.

CHAPITRE E

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

CHAPITRE E : DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES
--

L'ajustement de la fertilisation azotée permet de réduire le coût économique des cultures exigeantes en azote tout en permettant de limiter la pollution environnementale par eutrophisation ou émission de gaz à effet de serre. Le colza est une des plantes de grande culture avec l'efficacité d'usage du N (EUA) la plus faible, et la réduction des intrants azotés impacte fortement sa croissance et son rendement. Par conséquent, des critères de sélection de variétés à haut rendement en conditions de N limitant doivent être identifiés afin d'améliorer le bilan économique et agro-environnemental de cette culture.

Au stade rosette, la faible EUA du colza semble majoritairement limitée par l'efficacité d'utilisation de l'azote (EUtA), et plus particulièrement l'efficacité de remobilisation de l'azote (ERA) (Malagoli *et al.*, 2005a, b), et non par l'efficacité d'absorption de l'azote (EAbA) (Lainé *et al.*, 1993) ou une faible disponibilité du N dans le sol. En plus des pertes de N importantes associées à la chute des feuilles riches en N (faible ERA foliaire) (Dejoux *et al.*, 2000), de bonnes conditions de croissance au printemps ne permettent pas de compenser la perte de rendement provoquée par une production de biomasse réduite en automne (Koeslin-Findeklee *et al.*, 2014). Par conséquent, une amélioration de l'EUA aux stades végétatifs est cruciale pour le bilan agro-environnemental et le rendement du colza.

De récentes études ont mis en avant un rôle prépondérant de l'absorption durant le remplissage des graines pour le rendement en situation de N limitant (Berry *et al.*, 2010). Cependant, toutes ces études sont basées sur de simples bilans et nécessitent confirmation. De plus, le N étant faiblement disponible (Merrien *et al.*, 1988) et/ou faiblement absorbé (Malagoli *et al.*, 2005b; Noquet *et al.*, 2004) durant le remplissage des graines, une amélioration de l'EUtA semble le principal levier pour augmenter le rendement dans un contexte de réduction des intrants N. A l'inverse de ce qui est observé au stade rosette, la remobilisation du N lors de la sénescence monocarpique durant les derniers stades de développement semble efficace chez plusieurs génotypes de colza d'hiver (Malagoli *et al.*, 2005b; Ulas *et al.*, 2013). Cependant, la remobilisation foliaire est également soumise à des variations génotypiques (Koeslin-Findeklee *et al.*, 2014) et les génotypes de printemps à forte EUA sont caractérisés par une remobilisation du N de la tige et des péricarpes plus élevée (Balint and Rengel, 2011), suggérant que les processus impliqués dans la remobilisation du N post-montaison sont améliorables.

Que ce soit au stade rosette ou reproducteur, une amélioration de la remobilisation du N permettrait d'augmenter l'EUA *via* (i) une augmentation de la quantité de N disponible pour le remplissage des graines sans pour autant augmenter l'apport/l'absorption de N et (ii) une réduction des pertes de N par les tissus végétatifs non récoltés (feuilles et tige). Par conséquent, **l'objectif de ces travaux de thèse était de caractériser les traits physiologiques et moléculaires associés à une forte EUA (et plus particulièrement à une forte ERA) chez des colzas soumis à une limitation en N minéral, que ce soit au stade rosette ou reproducteur.**

Pour répondre à ces objectifs, une étude de la variabilité génotypique du colza d'hiver a été réalisée (i) au stade rosette sur 10 géotypes (culture « **Rosette** ») et (ii) au stade reproducteur (de la montaison jusqu'au stade « graines matures » ; culture « **Graines** ») sur 2 géotypes présentant des comportements différents au cours de la culture au stade rosette (Aviso et Oase).

I. L'étude de la variabilité génotypique de l'EUA aux stades végétatif et reproducteur révèle de nouvelles pistes pour définir les critères de sélection de variétés de colza adaptées à une limitation en nitrate

I.I. Mise en évidence d'une variabilité génotypique de l'EUA dès le stade rosette : identification des géotypes les plus adaptés à une limitation en nitrate et des composantes de l'EUA impliquées dans une forte EUA au stade végétatif

Les 10 géotypes de colza d'hiver de la culture « Rosette » présentent des réponses variables de l'EUA et de l'ERA_{feuille source} (ERA d'une feuille entrant en sénescence au cours de la culture) en réponse à la limitation en N, mettant en évidence 4 profils contrastés :

- **Groupe 1 (Gr1)** : géotypes présentant une ERA_{feuille source} élevée (supérieure à 50 %) quel que soit le niveau d'alimentation azotée, avec une diminution de la production de biomasse foliaire en situation de nitrate limitant : Darmor, Lioness, ES-Astrid et **Oase**
- **Groupe 2 (Gr2)** : géotype présentant une ERA_{feuille source} faible (inférieure à 50 %) dans les 2 conditions de nutrition azotée et une diminution de la production de la biomasse foliaire en faible N : **Samourai**
- **Groupe 3 (Gr3)** : géotypes présentant une augmentation significative de l'ERA_{feuille source} en réponse à une limitation en N sans pour autant maintenir leur production de biomasse foliaire : Montégo, Express et **Californium**
- **Groupe 4 (Gr4)** : géotypes avec une augmentation significative de l'ERA_{feuille source} couplée à un maintien de la production de biomasse foliaire en faible N : Ténor et **Aviso**

Les flux de N au niveau plante entière ont ensuite été déterminés par marquage au ¹⁵N sur un des géotypes de chaque groupe (Oase_{Gr1}, Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3} et Aviso_{Gr4}) afin d'estimer avec précisions le rôle de l'ERA dans les variations de l'EUA observées en faible N.

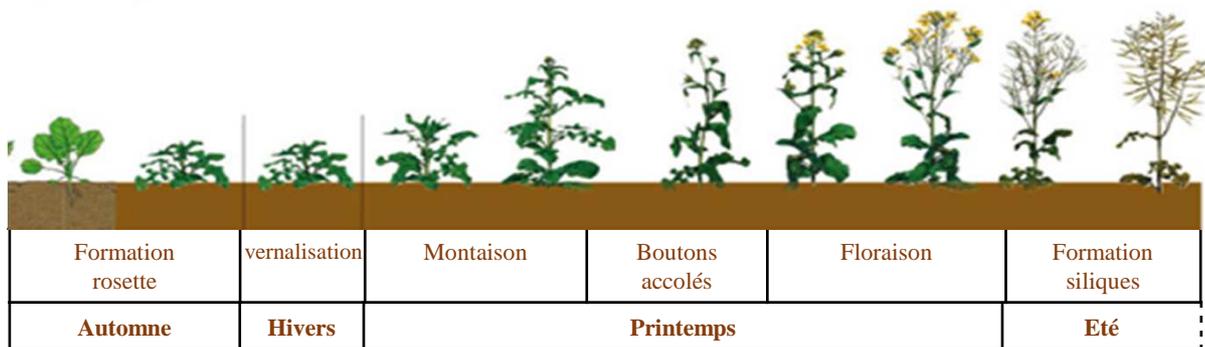
Cette étude a montré que la ERA_{feuille source} n'est pas représentative de l'ERA_{plante entière} ni de la quantité totale de N remobilisé. Par conséquent, **l'étude de la remobilisation d'une unique feuille n'est pas l'indicateur le plus pertinent de l'ERA_{plante entière} au stade rosette, plus particulièrement en situation de N limitant.** De plus, cette étude a également mis en avant le rôle crucial de l'ERA_{plante entière} dans la production de biomasse, permettant ainsi de

confirmer les travaux précédents (Malagoli *et al.*, 2005a) et les suppositions faites sur le colza de printemps (Svecnjak and Rengel, 2006). En effet, par rapport aux autres génotypes, **la très forte ERA_{plante entière} du génotype Aviso en conditions de N limitant (94,4 %) permet de limiter la perte de N par les feuilles chutées**. En revanche, la quantité totale de N remobilisé au niveau plante entière chez Aviso est similaire à celle d'Oase et Samourai (environ 100 mg), voire inférieure à celle de Californium (128 mg). De plus, la meilleure production de biomasse d'Aviso en faible N n'est pas liée à une distribution plus importante du N remobilisé vers les jeunes tissus. Grâce au traceur ¹⁵N, nos travaux ont permis la détermination précise d'un indice d'utilisation du N (provenant de la remobilisation et de l'absorption) dans les jeunes tissus. Ce nouvel indice d'EUtA (production de biomasse par mg de N distribué aux tissus en croissance, Figure D-7) a permis de montrer qu'en conditions de nitrate limitant, le génotype Aviso est capable de produire plus de biomasse foliaire avec moins de N (1,23 g de matière fraîche par mg de N distribué aux feuilles en croissance) comparé aux autres génotypes (entre 0,58 et 0,85 g de MF par mg de N). **Ces données démontrent que le génotype de colza d'hiver le plus performant en cas de limitation en nitrate au stade rosette présente une optimisation (i) de la remobilisation du N des feuilles sénescentes, limitant la perte de N par les feuilles chutées, et (ii) de l'utilisation du N issu de la remobilisation dans les feuilles en croissance, permettant une production de biomasse plus élevée.**

I.II. Le N accumulé dans les feuilles avant la montaison doit être remobilisé efficacement vers la tige pour y être stocké transitoirement, puis remobilisé vers les graines au moment de leur formation/remplissage

L'étude des flux de N chez les génotypes Aviso et Oase après la montaison, montre qu'il existe **différentes stratégies de remplissage des graines, y compris en conditions de nitrate non limitant**. En effet, en situation de forte disponibilité en nitrate, le N des graines d'Aviso provient en grande partie de la remobilisation (54 %) alors que le N des graines d'Oase est majoritairement issu de l'absorption (81 %) (Tableau D-3). Comme montré précédemment (Ahmad and Abdin, 2000), la limitation en N altère à la fois le rendement et la qualité de la graine (proportions d'acides gras et ratio C/N) chez les 2 génotypes. Cependant, une plus grande quantité de N est distribuée aux graines dans le cas d'Aviso par rapport à Oase, démontrant une EUA plus forte pour Aviso. Du fait de ces différences de remplissage des graines, l'étude de ces 2 génotypes à EUA contrastées permet de caractériser les mécanismes post-montaison impliqués dans une forte EUA.

Contrairement aux travaux précédents (Berry *et al.*, 2010; Ulas *et al.*, 2013; Wiesler *et al.*, 2001b), notre étude ne met pas en avant de corrélation entre la quantité du N absorbé et le rendement, mais **une corrélation entre la quantité totale de N absorbé post-montaison et la quantité de N finale dans les graines est observée**. Cependant, le N issu de l'absorption ne représente que 32 % du N retrouvé dans les graines matures d'Aviso soumis à une



Stade rosette

Transition végétatif/reproducteur

Sénescence monocarpique

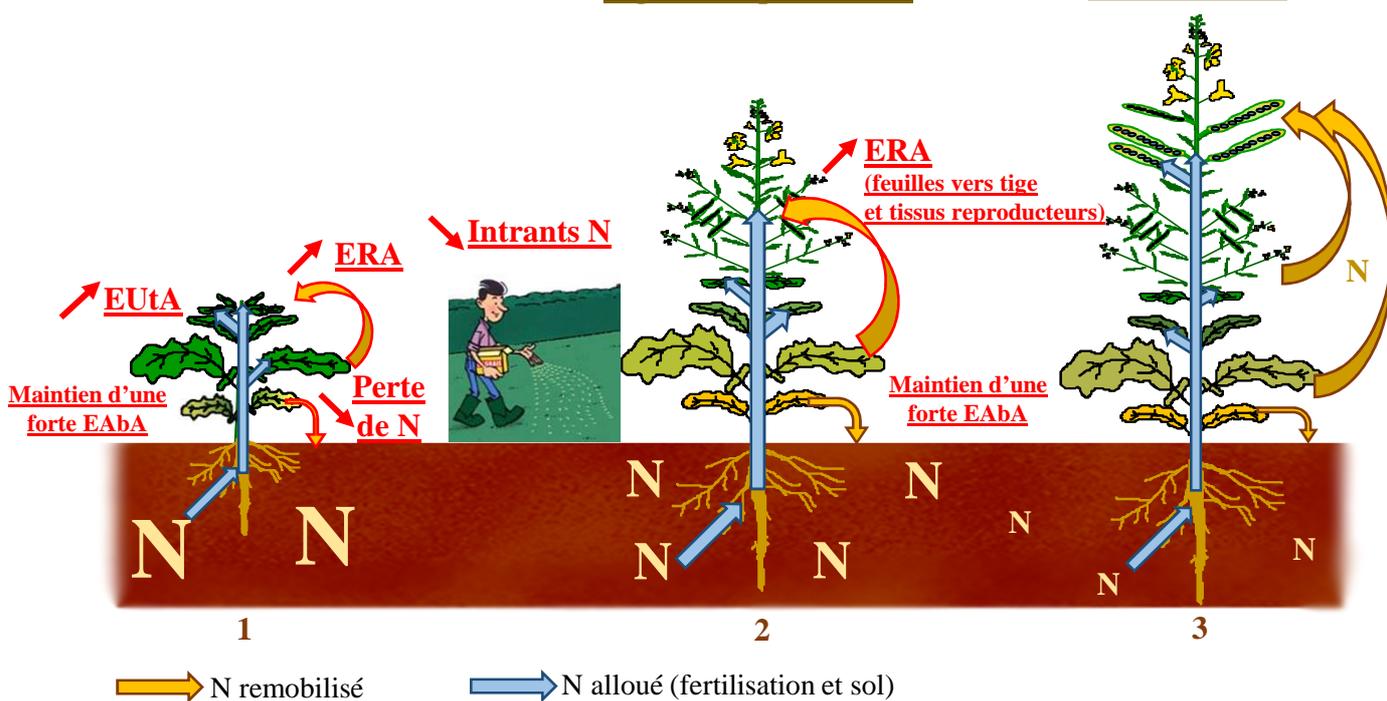


Figure E-1 : Exemple d'un idéotype de colza d'hiver présentant une efficacité d'usage du N (EUA) élevée en situation de limitation en nitrate.

1 : Au stade rosette, où le N du sol est hautement disponible, l'idéotype (génotype virtuel) de colza est caractérisé par le maintien d'une forte efficacité d'absorption (EAbA) couplée à une augmentation (i) de l'efficacité de remobilisation du N (ERA) des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles (lors de la sénescence séquentielle), permettant de réduire les pertes de N par les feuilles mortes et (ii) de l'efficacité d'utilisation du N (EUA) dans les jeunes tissus en croissance afin de maintenir la production de biomasse aérienne malgré une réduction de la disponibilité en N (limitation des intrants azotés).

2 : Lors de la transition phase végétative/phase reproductive, l'idéotype de colza présente une meilleure remobilisation des feuilles vers la tige, tout en maintenant une forte EAbA afin de prélever le N minéral encore disponible au niveau du sol. Cette meilleure remobilisation vers la tige permet de limiter les pertes par la chute de feuilles riches en N, mais également de stocker transitoirement le N dans la tige avant le remplissage des graines. De part ce rôle d'organe « tampon », la tige permettrait de pallier un asynchronisme entre la fourniture massive de N (issu de la remobilisation des feuilles et de l'absorption au cours de l'automne et du printemps) et les besoins de N des graines en développement au printemps et au début de l'été.

3 : Les travaux issus de cette thèse confirment que l'ERA est particulièrement élevée au cours des stades ultimes de la phase reproductrice correspondant à la sénescence monocarpique. Cela sous-entend que le rendement et la qualité des graines en cas de limitation en nitrate dépendent principalement des processus mis en place avant le début du remplissage des graines.

limitation en nitrate. Par conséquent, l'absorption joue bien un rôle dans la compensation de la limitation en N minéral, mais il ne s'agit pas de la composante de l'EUA la plus importante. En effet, le meilleur remplissage des graines d'Aviso est majoritairement lié à une remobilisation plus élevée, démontrant **le rôle prépondérant de la remobilisation post-montaison en situation de faible apport en nitrate.**

Grâce aux flux déterminés entre la montaison et la floraison, entre l'apparition des siliques et le début de formation des graines puis durant le remplissage des graines (sénescence monocarpique), la participation des différents organes dans la forte ERA observée chez Aviso a pu être caractérisée. Cette étude approfondie a confirmé que les mécanismes de remobilisation associés à la sénescence monocarpique étaient efficaces (Malagoli *et al.*, 2005b; Ulas *et al.*, 2013; Wiesler *et al.*, 2001b). La différence de remplissage des graines observée entre nos 2 génotypes n'est donc pas liée à la sénescence monocarpique. En revanche, Aviso présente un stockage important de N dans la tige avant le début du remplissage des graines : 2 fois plus de N dans la tige d'Aviso que dans celle d'Oase, sans augmentation de biomasse. Cette accumulation de N dans la tige est la conséquence d'une plus forte remobilisation du N foliaire vers la tige avant le début du remplissage des graines, permettant ainsi un stockage temporaire de N, en attendant sa remobilisation vers les graines au cours de la sénescence monocarpique. **Ces résultats montrent que la tige est un organe de stockage transitoire important pour pallier un asynchronisme entre la remobilisation du N foliaire et la forte disponibilité du N du sol au printemps et la faible disponibilité/absorption du N pendant la formation des graines.**

En résumé, l'ensemble de nos travaux permet de proposer un idéotype (génotype virtuel) de colza adapté à des conditions de nutrition N limitante (Figure E-1).

Cet idéotype est caractérisé au stade rosette par une remobilisation du N efficace des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles, permettant ainsi de réduire les pertes de N liées aux feuilles chutées. En parallèle, le N distribué aux jeunes tissus puits, issu de l'absorption et de la remobilisation, doit être utilisé de manière optimale par les tissus en croissance pour une production de biomasse élevée avant montaison. De plus, l'étude des flux plante entière a permis de confirmer la remobilisation efficace du N au cours de la sénescence monocarpique, soulignant qu'un fort rendement et qu'un bon remplissage des graines (forte EUA) en situation de nitrate limitant nécessite une gestion efficace du N stocké dans la plante avant le début du remplissage des graines. En effet, le N foliaire de la rosette doit être remobilisé efficacement vers la tige au cours du printemps pour un stockage temporaire pendant la transition stade végétatif / stade reproducteur. L'optimisation du stockage transitoire dans la tige permettrait (i) de conserver au sein de la plante le N accumulé dans les feuilles avant montaison, et (ii) de redistribuer ultérieurement ce N endogène vers les tissus reproducteurs pour le développement et le remplissage des graines.

I.III. Perspectives à envisager pour la sélection variétale de colza à forte EUA

Notre étude montre qu'une variabilité génotypique de l'EUA en réponse à une limitation en nitrate se manifeste dès les stades végétatifs (stade rosette). La sélection variétale aux premiers stades de développement présente les avantages d'être plus rapide et moins onéreuse qu'une sélection sur les paramètres de rendement (cultures menées jusqu'aux graines matures). La biomasse foliaire avant l'automne serait cruciale pour le rendement (Koeslin-Findeklee *et al.*, 2014) et, par conséquent, notre étude suggère que la sélection de génotypes à forte EUtA et ERA au stade végétatif permettrait d'avoir des colzas présentant un potentiel de rendement plus élevé en situation d'azote limitant, du fait d'une production de biomasse plus élevée. Par conséquent, de plus amples expérimentations doivent être faites pour confirmer le lien entre l'ERA et l'EUtA avant l'automne et le rendement et ainsi, confirmer qu'une sélection variétale peut se faire au stade végétatif.

En parallèle, en conditions de plein champ, les apports en nitrate effectués au moment de la montaison (stades C2-D2 (boutons accolés) à E (boutons séparés)) sont généralement les plus importants (jusqu'à 160 kg de N.ha⁻¹). Dans un contexte de réduction des intrants N, c'est probablement au moment de cet apport qu'il sera nécessaire d'ajuster le niveau de fertilisation au plus bas. Nos travaux réalisés en conditions contrôlées suggèrent qu'un génotype capable de stocker efficacement le N foliaire dans la tige avant le début du remplissage des graines présente une forte EUA en conditions de limitation en nitrate. Dès lors, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'utilisation d'un tel génotype permettrait de diminuer l'apport de fertilisants N à la montaison sans pour autant impacter le rendement et/ou la qualité des graines. Afin de vérifier cette hypothèse, des travaux réalisés dans le cadre du programme Investissement d'Avenir RAPSODYN seront menés pour confirmer **le lien entre l'EUA et quantité de N stocké dans la tige avant le remplissage des graines en conditions de plein champ**. Ces études complémentaires pourraient permettre à terme de **déterminer une teneur minimale en N de la tige en conditions de faible disponibilité en nitrate qui serait représentative d'un génotype à forte EUA, plus adapté à une restriction des apports en N minéral au printemps**.

De plus, l'ensemble de ces travaux met en avant que **l'efficacité de remobilisation du N foliaire est primordiale dans la compensation d'une limitation en N minéral, que ce soit au stade rosette ou après la montaison**. Il est donc important de choisir des génotypes de colza présentant une remobilisation du N foliaire élevée pour limiter les pertes de N au sol. Les processus associés à une remobilisation efficace du N foliaire ont donc été étudiés plus en détail dans un second temps.

Tableau E-1 : Synthèse des paramètres de remobilisation du N foliaire étudiés dans une feuille source chez 4 génotypes (Aviso, Oase, Californium et Samourai) représentatifs de la variabilité génotypique de la réponse à une limitation en nitrate appliquée au stade rosette.

Variables observées	Traitements	Aviso	Oase	Californium	Samourai
Variation de la quantité de N entre J0 et J21	HN	- 21 %	- 69 %	- 54 %	- 43 %
	LN	++	=	++	=
Variation de la quantité de protéines solubles entre J0 et J21	HN	- 34 %	- 79 %	- 43 %	- 76 %
	LN	++	=	+	=
Variation de l'abondance de la GSU (à gauche) et de la PSU (à droite) de la Rubisco	HN (entre J0 et J21)	0 / - 13 %	- 52 % / - 50 %	- 71 % / - 71 %	- 33 % / - 49 %
	LN (entre J0 et J14)	+ / =	= / +	= / +	+ / =
Variation de l'abondance des protéines D1 (à gauche) et lhcb3 (à droite)	HN (entre J0 et J21)	0 % / 0 %	-78 % / - 46 %	- 56 % / 0 %	- 35 % / - 53 %
	LN (entre J0 et J14)	+ / =	++ / +	+ / =	++ / =
Activité totale à pH 5 (à J14)	HN	16 %	23 %	16 %	22 %
	LN	++	++	+	+
Contribution des protéases à cystéine	HN	46 %	13 %	50 %	30 %
	LN	-	++	++	+
Contribution des protéases à sérine	HN	4 %	3 %	/	/
	LN	++	++	++	++
Contribution des métalloprotéases	HN	/	8 %	39 %	/
	LN	/	/	-	/
Contribution des protéases à aspartate	HN	/	/	12 %	/
	LN	++	++	/	++
Activité de la protéase à aspartate GI: 1326165	HN	/	+	/	/
	LN	+	++	/	/
Activité totale pH 7,5 (à J14)	HN	29 %	45 %	28 %	34 %
	LN	=	++	+	+
Contribution des protéases à cystéine	HN	55 %	39 %	21 %	45 %
	LN	-	+	-	++
Contribution des protéases à sérine	HN	4 %	/	25 %	9 %
	LN	/	++	-	++
Contribution des métalloprotéases	HN	/	20 %	/	/
	LN	/	/	/	++
Contribution des protéases à aspartate	HN	/	/	/	/
	LN	/	/	/	+
Contribution du protéasome	HN	81 %	77 %	100 %	100 %
	LN	-	-	=	-
Variation de l'abondance des métalloprotéases FtsH	HN (entre J0 et J21)	+10 %	+8 %	-36 %	-65 %
	LN (entre J0 et J14)	-	=	=	=

Les différents paramètres sont issus du chapitre D.I.II. (article 2) et ont été estimés dans la feuille source de plantes cultivées avec une solution nutritive riche en nitrate (High N (HN) ; 3,75 mM nitrate) ou pauvre en nitrate (Low N (LN) ; 0,375 mM nitrate). Les données en conditions HN sont exprimées en pourcentage de l'état initial (J0) et les variations observées en conditions LN sont indiquées par rapport aux plantes HN de la manière suivante : augmentation (+), forte augmentation (++), diminution (-), forte diminution (--) ou similaire à HN (=). Un slash (/) signifie « non détecté ». Lorsque la date J21 n'était pas disponible, les données observées à la date J14 ont été retenues. D1 et lhcb3 : protéines de la membrane thylakoïdienne ; FtsH : métalloprotéases « filamentation temperature-sensitive H » ; GSU : grande sous-unité de la Rubisco ; PSU : petite sous-unité de la Rubisco.

II. La protéolyse est le principal levier d'amélioration de la remobilisation du N foliaire au stade rosette alors que le devenir des produits de protéolyse jouerait un rôle prépondérant dans la remobilisation du N foliaire post-montaison

Au niveau cellulaire, l'azote est majoritairement stocké sous forme de protéines. La remobilisation du N foliaire implique donc des mécanismes de protéolyse qui sont étroitement associés aux processus de la sénescence. Le chloroplaste contient jusqu'à 70 % des protéines des cellules du mésophylle et représente donc une source majeure de N durant la remobilisation (Gan and Amasino, 1997; Peoples and Dalling, 1988). Parmi celles-ci, la Rubisco, protéine soluble du stroma, représente 20 à 30 % du N de la cellule (Hörtensteiner and Feller, 2002; Kumar *et al.*, 2002) et les protéines insolubles associées aux membranes thylakoïdiennes représentent jusqu'à 20 % du N des cellules mésophylliennes (Matile, 1992). Les dernières avancées suggèrent que la remobilisation du N est limitée par les mécanismes de protéolyse et non par l'exportation des produits de cette protéolyse (acides aminés, oligopeptides) (Avice and Etienne, 2014). Cette hypothèse découle de mesures de quantité d'acides aminés faites sur 2 variétés de colza d'hiver, cv. Capitot et Lirajet (Desclos *et al.*, 2009; Tilsner *et al.*, 2005), étudiés uniquement au stade rosette. Afin de confirmer cette hypothèse, les dynamiques de dégradation des protéines solubles et d'exportation des acides aminés ont été déterminées dans une feuille sénescente (dite « feuille source ») sur les 10 géotypes de la culture « Rosette » et les 2 géotypes de la culture « Graines », où la feuille source devient sénescente entre la montaison et la floraison.

Même si une augmentation de l'exportation des acides aminés est associée aux géotypes à forte ERA que ce soit avant (culture « Rosette ») ou après la montaison (culture « Graines »), nos travaux ont montré que la quantité finale d'acides aminés dans les feuilles avant l'abscission est faible quel que soit le géotype ou l'alimentation en N. **L'exportation des acides aminés ne serait donc pas le facteur limitant majeur de la remobilisation du N foliaire, que ce soit au stade rosette ou entre la montaison et la formation des siliques.**

De plus, au stade rosette, la dégradation des protéines solubles est hautement corrélée à la remobilisation du N pour 9 géotypes sur 10. **Ce résultat confirme le rôle crucial de la protéolyse, notamment des protéines solubles, au stade rosette** (Avice and Etienne, 2014). L'identification des mécanismes impliqués dans une protéolyse efficace au stade rosette permettrait d'identifier des critères de sélection de géotypes à forte ERA foliaire. Pour cela, la remobilisation du N foliaire des 4 géotypes représentant les 4 profils contrastés de réponse à la limitation en nitrate (Oase_{Gr1}, Samourai_{Gr2}, Californium_{Gr3} et Aviso_{Gr4}) a été étudiée en détails : dégradation des protéines solubles (dont les 2 sous-unités de la Rubisco), dégradation des protéines du photosystème II (D1 et lhcb3), activités protéolytiques à pH 5 et 7,5 et niveau des protéases FtsH, métalloprotéases accumulées dans les feuilles de colza cv. Capitot limité/privé en nitrate (Desclos *et al.*, 2009) (Tableau E-1).

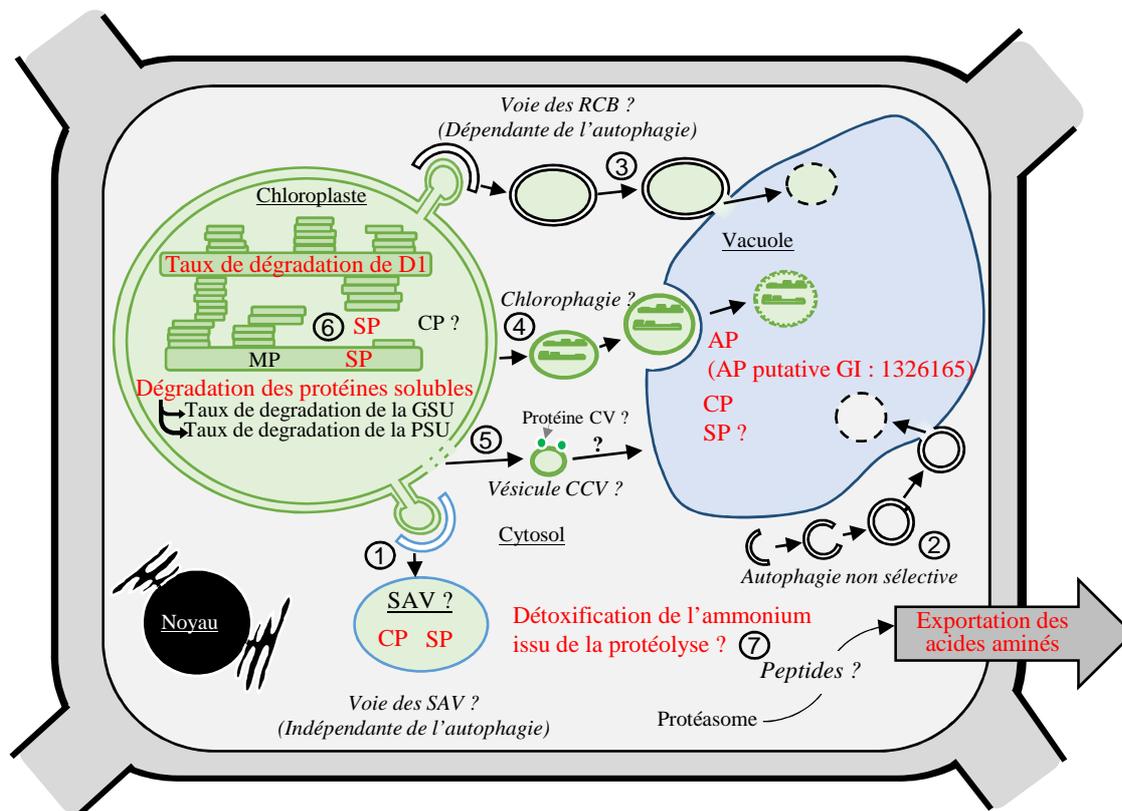


Figure E-2 : Représentation schématique des processus cellulaires associés à une remobilisation efficace du N dans une feuille de colza en réponse à une limitation en nitrate (0,375 mM) au stade rosette.

Les mécanismes potentiellement impliqués dans la remobilisation efficace du N foliaire sont indiqués en rouge. Les mécanismes qui n'ont pas encore été mis en évidence chez le colza sont suivis d'un point d'interrogation (?). Les processus cellulaires ont été déduits de la comparaison de 4 génotypes (Aviso, Oase, Californium et Samourai) cultivés au stade rosette en conditions d'alimentation en nitrate limitantes (0,375 mM) ou non limitantes (3,75 mM) durant 21 jours. Une amélioration de l'exportation des acides aminés est importante pour la remobilisation du N mais la dégradation des protéines solubles apparaît comme le principal facteur limitant. Nos travaux indiquent qu'une protéolyse efficace semble être liée à la contribution spécifique de protéases acides (protéases à aspartate, à cystéine et à sérine) suggérant l'implication des « senescence-associated vacuole » (SAV) (1) et/ou des processus d'autophagie (2 et 3) pour adresser les protéines plastidiales vers la vacuole lytique, mais ces mécanismes n'ont pas encore été caractérisés chez le colza. Les mécanismes hypothétiques de chlorophagie peuvent également jouer un rôle (4). Les « CV-containing vesicles » (CCV), impliquant la protéine CV (« chloroplast vesiculation ») et intervenant dans la dégradation du chloroplaste après le démantèlement de son enveloppe (récemment mis en évidence chez *Arabidopsis*, Wang et Blumwald, 2014), pourraient également participer à la protéolyse en adressant des portions de chloroplastes vers la vacuole lytique (5). Les CCV sont supposées jouer un rôle dans la remobilisation des protéines du stroma et des thylakoïdes (notamment la protéine D1), mais ce type de vésicule n'a pas encore été identifiée chez le colza. Le taux de dégradation de la protéine D1, associée à la membrane des thylakoïdes, est fortement corrélé à la remobilisation du N et l'implication des protéases à sérine localisées au niveau du stroma et/ou du lumen (6) dans l'amélioration de la dégradation de cette protéine en réponse à la limitation en nitrate est supposée. Enfin la détoxification de l'ammonium et/ou la dégradation/l'exportation des peptides (7) peuvent éventuellement jouer un rôle dans l'efficacité de remobilisation. AP : protéases à aspartate, incluant la protéase GI : 1326165 ; CP : protéases à cystéine ; GSU : grande sous-unité de la Rubisco ; MP : métalloprotéases ; RCB : « Rubisco containing bodies » ; SP : protéases à sérine ; PSU : petite sous-unité de la Rubisco.

Après la montaison (culture « Graines »), la dégradation des protéines solubles est efficace quel que soit le génotype (Aviso ou Oase) et le niveau d'alimentation en nitrate, malgré des différences de remobilisation entre les 2 traitements azotés. **Par conséquent, après la montaison, la remobilisation du N foliaire ne semble pas limitée par la dégradation des protéines solubles.** Cependant, la caractérisation des activités protéolytiques associées à la sénescence foliaire post-montaison à tout de même été effectuée afin de caractériser les mécanismes impliqués dans cette protéolyse efficace.

II.I. L'étude de la variabilité génotypique de la remobilisation du N foliaire permet d'identifier des mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans une protéolyse élevée au stade rosette

a. Les génotypes Californium_{Gr3} et Aviso_{Gr4} présentent une augmentation de la remobilisation du N foliaire en réponse à la limitation en nitrate et illustrent le lien étroit entre les mécanismes de protéolyse et l'ERA foliaire

Par rapport aux conditions d'alimentation nitrique pléthorique, les génotypes Californium et Aviso présentent une augmentation significative de la remobilisation du N foliaire après 21 jours de limitation en nitrate (de 21 % à 84 % de N remobilisé entre J0 et J21 pour Aviso et de 54 % à 81 % pour Californium ; Tableau E-1). Cette augmentation de la remobilisation est associée à un accroissement de l'exportation des acides aminés et une chute de la quantité des protéines solubles, mais également du niveau d'accumulation de la protéine D1, localisée dans la membrane des thylakoïdes. Ces résultats **confirment le lien fort entre remobilisation du N et protéolyse des protéines chloroplastidiales** (Avice and Etienne, 2014).

Cette meilleure protéolyse est liée à une augmentation de l'activité protéolytique acide (pH 5). Etant donné qu'aucune implication des protéases vacuolaires dans la dégradation des protéines associées à la membrane thylakoïdienne n'a encore été mise en évidence (Martínez *et al.*, 2008b), cette augmentation de l'activité des protéases acides est probablement liée à une dégradation plus efficace des protéines solubles. Cet accroissement des activités protéolytiques à pH acide **suggère un important trafic cellulaire en réponse à une limitation en nitrate, notamment un transport des protéines chloroplastidiales vers la vacuole lytique.** Ce trafic cellulaire peut correspondre à (i) des processus d'autophagie, connus pour être impliqués dans la remobilisation du N chez *Arabidopsis* (Avila-Ospina *et al.*, 2014), (ii) des « Rubisco-containing bodies », dépendants de l'autophagie ou des « senescence associated vacuoles » (SAV) indépendantes de l'autophagie (Ishida *et al.*, 2014), et/ou (iii) des « CV-containing vesicles » (CCV) (Wang and Blumwald, 2014) spécifiques de la dégradation des chloroplastes et récemment mises en évidence chez *Arabidopsis* (Figure E-2).

Parmi les activités protéolytiques testées à pH acide, nos travaux ont mis en évidence une participation importante des protéases à cystéine, confirmant de précédentes études chez

le colza (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997) et *Arabidopsis* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005; Diaz-Mendoza *et al.*, 2014). De plus, la protéase à cystéine SAG12, localisée dans les SAV chez *Arabidopsis* (Otegui *et al.*, 2005), s'accumule dans les feuilles sénescents en réponse à une limitation ou une privation en nitrate chez le génotype de colza Capitot (Desclos *et al.*, 2009), et pourrait donc être impliquée dans la forte activité des protéases à cystéine observée dans notre étude. Une participation importante des protéases à sérine acides en cas de limitation en nitrate est également observée chez les 2 génotypes. A l'exception d'une protéase à sérine putative chez *Arabidopsis* (Carter *et al.*, 2004), aucune activité de protéases à sérine acide n'a clairement été identifiée dans les vacuoles centrales de plusieurs plantes. En effet, des activités de protéases à sérine à pH acide ont seulement été localisées chez le tabac dans les SAV (Martínez *et al.*, 2008a). Des protéines du stroma, telles la Rubisco et la glutamine synthétase (GS2), ont également été localisées dans les SAV de cellules foliaires d'*Arabidopsis* et de tabac, et la Rubisco peut être dégradée dans les SAV du tabac (Martínez *et al.*, 2008a; Otegui *et al.*, 2005). **Par conséquent, la forte implication des protéases à sérine à pH acide pourrait constituer une preuve indirecte de l'implication des SAV dans les mécanismes de remobilisation des protéines foliaires.** Il a été prouvé récemment que le trafic cellulaire des protéines du stroma associé à l'autophagie augmente au cours de la sénescence et joue un rôle important dans la remobilisation du N chez *Arabidopsis* (Avila-Ospina *et al.*, 2014; Ishida *et al.*, 2014), mais l'implication des SAV dans la remobilisation du N en réponse à une limitation en nitrate n'a encore jamais été caractérisée. De plus, aucun compartiment cellulaire semblable aux SAV n'a encore été identifié chez le colza. Des travaux complémentaires sont donc nécessaires afin de préciser les mécanismes impliqués dans l'éventuel trafic subcellulaire des feuilles sénescents de colza (cf. §E.II.III.).

L'augmentation des activités protéolytiques fonctionnant à pH acide est également fortement liée à l'augmentation des activités des protéases à aspartate chez le génotype Aviso, notamment une protéase à aspartate de *Brassica napus* (GI: 1326165), identifiée sur zymogrammes (Tableau E-1). Cette protéase a également été caractérisée dans une feuille sénescence en réponse à une privation/limitation en N chez le génotype Capitot (Desclos *et al.*, 2009). **Cette protéase à aspartate semble donc jouer un rôle dans les mécanismes associés à la remobilisation foliaire en réponse à une limitation en nitrate.** Cependant, Californium ne présente pas d'augmentation des activités des protéases à aspartate, suggérant qu'**une remobilisation du N efficace peut impliquer des classes de protéases qui diffèrent en fonction des génotypes.**

b. Quel que soit le niveau alimentation en nitrate appliqué au stade rosette, le géotype Oase_{Gr1} présente une remobilisation élevée du N, associée à une protéolyse efficace impliquant des protéases neutres et acides

Au stade rosette, le géotype Oase présente une remobilisation du N foliaire considérée comme efficace (supérieure à 70 %) par rapport aux autres géotypes. Néanmoins, la remobilisation du N foliaire chez Oase n'est pas augmentée en réponse à une limitation en N (Tableau E-1). Cette remobilisation du N efficace dans les 2 conditions de nutrition nitrique est associée à une dégradation élevée des protéines solubles, dont la Rubisco, et des protéines des membranes thylakoïdiennes (plus particulièrement D1). **Ce résultat suggère qu'une remobilisation du N foliaire efficace au stade rosette est liée à une dégradation de l'ensemble des protéines chloroplastidiales (solubles et membranaires), confirmant les résultats observés pour les géotypes Aviso et Californium.** De plus, le taux de dégradation de la protéine D1 semble hautement corrélé au taux de remobilisation du N : en effet, chez nos 4 géotypes cultivés au stade rosette, un taux de dégradation élevée de la protéine D1 est associé à une remobilisation efficace du N, alors qu'à l'inverse, un taux de dégradation de D1 faible est observé chez les géotypes présentant une remobilisation du N peu élevée. **Par conséquent, une faible abondance de la protéine D1 à l'abscission pourrait servir d'indicateur d'une forte efficacité de remobilisation du N foliaire au stade rosette.**

La plus forte dégradation de D1 constatée chez Oase dans les 2 conditions d'alimentation nitrique par rapport aux autres géotypes est associée à une plus forte activité protéolytique à pH neutre (7,5), notamment les activités métalloprotéases en conditions fort N et protéases à sérine en réponse à une limitation en N (Tableau E-1). Il est admis que la dégradation de la protéine D1 implique des métalloprotéases de type FtsH et des protéases à sérine Deg (« degradation of periplasmic proteins ») (Kato and Sakamoto, 2009; Wagner *et al.*, 2012). La quantité de FtsH n'est pas plus élevée chez Oase que chez les 3 autres géotypes, mais la dégradation des protéines de la membrane thylakoïdienne peut dépendre de la disponibilité du substrat aux protéases (Forsberg *et al.*, 2005; Zelisko *et al.*, 2005). En conséquence, la dégradation élevée de D1 en fort N pourrait être due à une plus forte activité des métalloprotéases de type FtsH. De plus, il a été démontré que chez les cyanobactéries, la dégradation de D1 est améliorée par l'intervention de protéases à sérine Deg (Huesgen *et al.*, 2009). Dans nos conditions, Oase (ainsi que Samourai) présente la dégradation de la protéine D1 et l'activité des protéases à sérine à pH neutre les plus fortes en réponse à la limitation en nitrate. De plus, l'analyse en composante principale (Figure D-15) montre clairement un lien fort entre la diminution de l'abondance de D1 et l'activité des protéases à sérine neutre. **Ce résultat suggère que la dégradation efficace de D1 en réponse à la limitation en N impliquerait des protéases Deg, de la même manière que chez les cyanobactéries.** L'amélioration de la dégradation de D1 pourrait également être liée à un mécanisme récemment mis en évidence chez *Arabidopsis* impliquant la formation de vésicules spécifiques (« CV-containing vesicles »; CCV) issues du chloroplaste lors des dernières étapes de la sénescence. En effet, la protéine CV (« chloroplast vesiculation ») associée

à ces vésicules provoquerait une déstabilisation du PSII, rendant les protéines membranaires, et notamment D1, plus accessibles à la dégradation par les protéases Deg et FtsH. La déstabilisation du chloroplaste est ensuite suivie par la formation de vésicules contenant des protéines du stroma mais également des protéines des thylakoïdes (Wang and Blumwald, 2014). La protéine CV et les vésicules CCV associées pourraient avoir un rôle dans la forte dégradation de D1 observée chez le génotype Oase dans les 2 conditions d'alimentation en nitrate.

Une forte activité protéolytique acide est également observée au cours de la remobilisation du N foliaire chez le génotype Oase dans les 2 conditions de nutrition azotée (Tableau E-1). En faible N, tout comme Aviso et Californium, une forte contribution des activités des protéases à sérine et cystéine est observée chez Oase. **La question d'une augmentation du trafic cellulaire des protéines du chloroplaste vers la vacuole via l'autophagie et/ou une augmentation de la dégradation au sein de SAV en réponse à une limitation en nitrate est alors de nouveau posée.**

De plus, tout comme Aviso, une augmentation de l'activité des protéases à aspartate à pH acide est observée, associée à une augmentation de l'activité de la protéase à aspartate (GI 1326165 ; Tableau E-1). Contrairement à Aviso, cette protéase a également été identifiée en conditions fort N alors qu'aucune activité de protéase à aspartate n'est constatée *via* l'utilisation de l'inhibiteur pepstatine A. La famille de protéases à aspartate supposée être impliquée dans la sénescence du tabac (Kato *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2005), du blé (Gregersen and Holm, 2007) et d'*Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2008) est celle des phytépsines. Parmi les phytépsines, la protéase à aspartate du tabac CND41, impliquée dans la dégradation de la grande sous-unité de la Rubisco (Kato *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2004), n'est que faiblement inhibée par la pepstatine A (Murakami *et al.*, 2000). Une comparaison des séquences d'acides aminés indique que la protéase à aspartate GI 1326165 présente une faible similitude avec la protéase CND41 (26 % d'identité) mais de fortes similitudes avec la phytépsine A1 d'*Arabidopsis* (GI : 15221141 ; 92 % d'identité). Si la protéase à aspartate GI 1326165 est proche d'une phytépsine, cela pourrait partiellement expliquer la faible inhibition des protéases à aspartate par la pepstatine A dans les extraits foliaires du génotype Oase cultivé en conditions de fort N, malgré la détection de l'activité de la protéase GI 1326165 sur zymogrammes. Quoi qu'il en soit, dans nos conditions, cette protéase à aspartate est associée à une dégradation des protéines solubles et une remobilisation du N efficace chez les génotypes Aviso et Oase. De plus, cette protéase a déjà été identifiée en réponse à une limitation/privation en N chez le génotype Capitot (Desclos *et al.*, 2009) et elle est retrouvée parmi les 30 protéines les plus abondantes dans des feuilles chutées de ce même génotype (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014). **Par conséquent, cette protéase à aspartate GI 1326165 semble jouer un rôle important dans la réponse à une limitation en nitrate, probablement jusqu'aux étapes les plus tardives de la sénescence, et pourrait être impliquée dans une protéolyse efficace chez de nombreux génotypes.**

c. La protéolyse élevée observée chez le géotype Samourai_{Gr2} est associée à une forte activité des protéases acides mais ne se traduit pas par une forte remobilisation du N foliaire

Quel que soit le niveau d'alimentation en nitrate, le géotype Samourai présente une remobilisation du N relativement faible entre J0 et J21 (43 % en fort N et 55 % en faible N) au regard de la dégradation élevée des protéines solubles (76 % en fort N et 72 % en faible N ; Tableau E-1). La faible remobilisation du N malgré la protéolyse élevée pourrait être liée à la faible dégradation des protéines des membranes thylakoïdiennes. En effet, le taux de dégradation de la protéine D1 est relativement faible (31 %) comparé aux autres géotypes (78 % pour Oase et 56 % pour Californium), tout comme l'activité protéolytique à pH 7,5. **Ces résultats suggèrent une faible dégradation des protéines associées aux membranes des thylakoïdes chez le géotype Samourai.** Cependant, cette faible protéolyse des protéines membranaires ne peut expliquer à elle seule le fait que la dégradation des protéines solubles ne conduise pas à une diminution de la quantité de N foliaire chez ce géotype. **Par conséquent, la remobilisation du N chez le géotype Samourai au stade rosette semble limitée par un ou des mécanismes qui se manifestent entre les processus de protéolyse et le chargement des acides aminés dans le phloème.**

Pour tous les géotypes au stade rosette, le protéasome semble fortement impliqué dans la protéolyse (Tableau E-1). Chez l'animal, il a été démontré que le protéasome dégradait les protéines en peptides qui seront ensuite dégradés en acides aminés par des systèmes de peptidases (amino et carboxy-peptidases) dédiés (Reits *et al.*, 2004; Saric *et al.*, 2004). Récemment, ce modèle de dégradation a été fortement suspecté chez *Arabidopsis* en réponse à une exposition au cadmium (Polge *et al.*, 2009). L'existence d'un tel mode de dégradation pourrait également se produire au cours de la sénescence et/ou en réponse à une limitation en N. Dans ce cas, **la faible remobilisation du N associée à une forte protéolyse observée chez le géotype Samourai pourrait s'expliquer par une accumulation de peptides, résultant de leur faible exportation et/ou d'une dégradation inefficace par des amino- ou carboxy-peptidases.**

Une autre hypothèse pourrait être liée à une accumulation d'ammonium. En effet, l'ammonium est libéré en grande quantité lors de la dégradation des protéines et des peptides (Damodaran and Ananta-Narayanan, 1938). Si une accumulation d'ammonium se produit au cours de la sénescence du fait d'une protéolyse et/ou d'une dégradation de peptides importante(s), ce composé toxique pour la cellule doit être assimilé sous forme d'amides pour être détecté, notamment grâce aux différentes enzymes du métabolisme N, principalement la glutamine synthase (GS), la glutamine oxoglutarate aminotransférase (GOGAT) et la glutamate deshydrogénase (GDH) (Givan, 1979). Par conséquent, **la faible remobilisation du N foliaire constatée chez le géotype Samourai peut être due à une faible activité de détoxification de l'ammonium par ces différentes enzymes, provoquant son accumulation.**

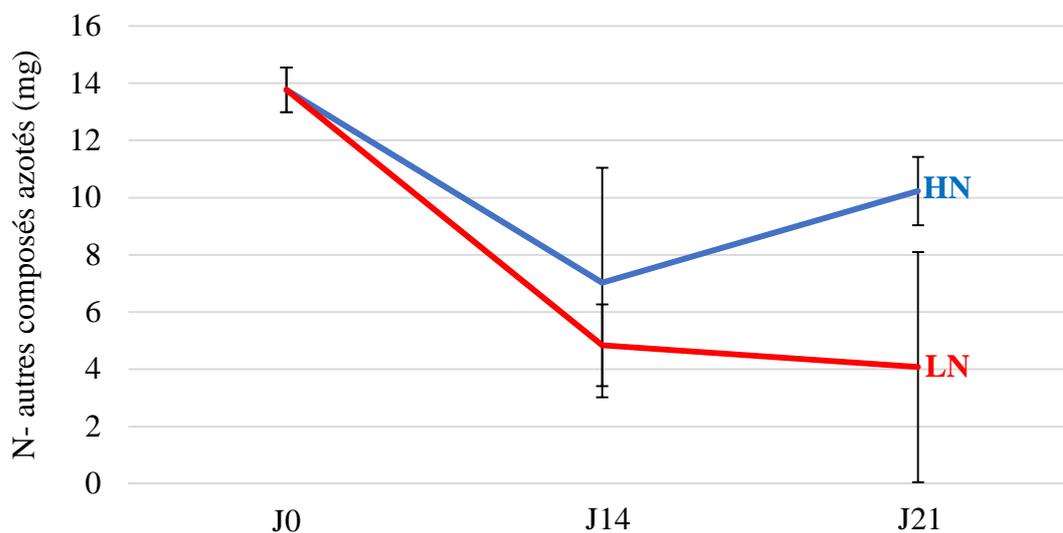


Figure E-3 : Quantité de N dans les composés azotés autres que protéines solubles et acides aminés dans la feuille source du génotype Samourai.

La quantité de N dans les autres composés azotés correspond à la quantité de N des protéines solubles et des acides aminés soustraite à la quantité de N total de la feuille. La quantité des autres composés azotés a été estimée après 14 (J14) et 21 (J21) jours de limitation en nitrate (LN ; 0,375 mM) ou non (HN ; 3,75 mM). La quantité de N dans les protéines solubles a été estimée sur la base d'un contenu en N moyen des protéines de 16 %. La quantité de N dans les acides aminés a été obtenue *via* l'utilisation de la masse molaire moyenne d'un acide aminé (110 g.mol⁻¹) et le ratio moyen pour le contenu en N (7,86), obtenu grâce aux données récoltées sur les 10 génotypes de la culture « Rosette ». Ces autres composés azotés regroupent principalement l'ammonium, les protéines insolubles, le nitrate et les peptides. Les données indiquées sont les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard et aucune différence significative n'a été observée, que ce soit entre traitement ou en cinétique.

Cependant, en estimant la part de N dans les autres composés azotés *via* la soustraction de la quantité de N des protéines solubles et des acides aminés à la quantité totale de N, aucune accumulation n'est visible au cours de la sénescence (Figure E-3), suggérant une exportation et/ou une dégradation efficace des autres composés azotés. Or, la dégradation des protéines solubles dans la feuille source est très tardive dans les 2 conditions d'alimentation en N (seulement à partir du 14^{ème} jour de traitement). Par conséquent, **la faible remobilisation du génotype Samouraï pourrait être liée à une protéolyse trop tardive qui ne permet pas la mise en place des mécanismes nécessaires à l'exportation des oligopeptides et/ou à la détoxification de l'ammonium issus de la protéolyse.**

Tout comme les 3 autres génotypes, la dégradation efficace des protéines solubles est associée à une activité protéolytique acide importante, notamment des protéases à cystéine quel que soit le niveau d'alimentation en nitrate, et des protéases à sérine et à aspartate en réponse à une limitation en nitrate. Ces résultats **appuient l'hypothèse d'une implication de SAV et/ou de l'autophagie dans les mécanismes de protéolyse observés en réponse à une limitation en N. De plus, ces résultats accréditent l'hypothèse selon laquelle les protéases à aspartate joueraient un rôle prépondérant dans la protéolyse élevée observée en réponse à une limitation en nitrate.**

En résumé, au stade rosette (Figure E-2), le principal facteur limitant la remobilisation du N n'est pas la conversion/l'exportation des acides aminés mais la dégradation de l'ensemble des protéines (solubles et insolubles) du chloroplaste. Cependant, l'étude du génotype Samouraï montre qu'une protéolyse massive des protéines solubles n'est pas garante d'une forte remobilisation du N et suggère que les processus impliqués dans la remobilisation du N soit finement coordonnés afin d'optimiser la remobilisation des composés N. Enfin, nos analyses révèlent pour la première fois que le niveau d'abondance de la protéine D1 en fin de sénescence pourrait constituer un indicateur protéique pertinent de l'ERA foliaire du colza.

De plus, la forte activité protéolytique à pH acide en réponse à une limitation en N suggère l'induction du trafic cellulaire des protéines du chloroplaste vers les vacuoles, pouvant impliquer les processus d'autophagie, les CCV et/ou des SAV. Les protéases à aspartate acides, et notamment la protéase GI 1326165, semblent également jouer un rôle dans la protéolyse associée à une forte remobilisation en réponse à une limitation en N, et nécessitent donc des investigations plus poussées. Enfin, comme cela a été démontré chez des cyanobactéries, les protéases à sérine actives à pH neutre pourraient être impliquées dans l'amélioration de la dégradation de la protéine D1 (à l'intérieur du chloroplaste) en réponse à une limitation en nitrate.

Tableau E-2 : Synthèse des paramètres de remobilisation du N foliaire étudiés dans une feuille source chez 2 génotypes (Aviso et Oase) présentant une variabilité génotypique de la réponse à une limitation en nitrate appliquée entre la montaison et la formation des siliques.

Variables observées	Traitements	Aviso	Oase
Variation de la quantité de N entre J0 et J28	HN	- 20 % ns	- 16 % ns
	LN	++	=
Variations de la quantité de protéines solubles entre J0 et J28	HN	- 63 %	- 71 %
	LN (n=1)	-	-
Variation de la quantité d'acides aminés entre J0 et J28	HN	- 99 %	- 94 %
	LN	=	=
Variation de la quantité des autres composés azotés (peptides, ammonium, nitrate et/ou protéines insolubles, etc.) entre J0 et J28	HN	+ 34 %	+ 0 %
	LN (n=1)	--	-
Variations de l'activité GDH aminante entre J0 et J28	HN	+ 0%	+ 219 %
	LN (n = 1)	+++	=
Variations de l'activité GS entre J0 et J28	HN	- 49 %	- 44 %
	LN (n = 1)	=	=
Ratio moyen GS1 / (GS1 + GS2)	HN (de J0 à J28)	Environ 40	Environ 54
	LN (de J0 à J21)	=	=
Activité protéolytique totale à pH5 (à J7)	HN	56 %	71 %
	LN	=	=
Contribution des protéases à cystéine	HN	36 %	31 %
	LN	=	=
Contribution des protéases à sérine	HN	6,1 %	10 %
	LN	=	=
Contribution des métalloprotéases	HN	8 %	11 %
	LN	=	+
Contribution des protéases à aspartate	HN	15 %	14 %
	LN	=	-
Contribution du protéasome à J7	HN	17 %	46 %
	LN	++	=

Les différents paramètres sont issus du chapitre D.II. (article 3) et ont été estimés dans la feuille source de plantes cultivées avec une solution nutritive riche en nitrate (High N (HN) ; 3,75 mM nitrate) ou pauvre en nitrate (Low N (LN) ; 0,375 mM nitrate). Les données en conditions HN sont exprimées en pourcentage de l'état initial et les variations observées en conditions LN sont indiquées par rapport aux plantes HN de la manière suivante : augmentation (+), forte augmentation (++), diminution (-), forte diminution (--) ou similaire à HN (=). Lorsque qu'une seule répétition biologique était disponible à J28, n=1 est indiqué dans la colonne traitement (au lieu de n=4). Lorsque la variation n'est pas significative, elle est indiquée par ns (non-significative). GS : glutamine synthétase cytosolique (GS1) ou chloroplastidiale (GS2) ; GDH : glutamate déshydrogénase.

II.II. Au cours des premiers stades reproducteurs, la protéolyse élevée est associée à une forte activité des protéases à cystéine et du protéasome, mais la remobilisation du N foliaire semble principalement limitée par l'exportation/la dégradation des produits de protéolyse

Les mêmes comportements en terme de remobilisation du N de la feuille source sont observés pour les 2 géotypes au stade végétatif (culture « Rosette ») et après la montaison (culture « Graines»). En effet, Aviso présente une faible remobilisation du N en cas de forte alimentation en nitrate (20 % après 28 jours) et une forte amélioration de la remobilisation du N en réponse à une limitation en nitrate (84 % après 28 jours). Oase est caractérisé par une remobilisation du N foliaire similaire dans les 2 conditions d'alimentation en nitrate ($p=0,07$; Table E-2). Comme au stade rosette, la forte remobilisation des 2 géotypes en réponse à la limitation en nitrate est associée à une forte dégradation des protéines solubles. En revanche, la faible remobilisation chez Aviso cultivé en fort N n'est pas majoritairement due à une faible dégradation des protéines solubles. **La protéolyse des protéines solubles n'est donc pas le facteur limitant la remobilisation du N foliaire chez Aviso entre la montaison et la formation des siliques** (Figure E-4).

Ce défaut de remobilisation malgré une forte protéolyse chez Aviso rappelle les résultats observés chez le géotype Samourai au stade rosette (cf. §E.II.I.c). De la même manière, **l'absence d'accumulation d'acides aminés durant la sénescence suppose une conversion et/ou une exportation des acides aminés efficaces. Cela suggère que la remobilisation du N est limitée par des processus qui se déroulent entre la protéolyse et le chargement des acides aminés dans le phloème.** En revanche, contrairement à Samourai au stade rosette, les « autres composés azotés » (protéines insolubles, peptides, nitrate et/ou ammonium) s'accumulent en situation d'apport en nitrate pléthorique, et diminuent fortement en situation de limitation en nitrate (Figure D22-E). En effet, nos résultats suggèrent que **la dégradation et/ou l'exportation des composés azotés hors protéines solubles et acides aminés sont déterminantes pour la remobilisation du N foliaire post-montaison.**

En étudiant l'activité des enzymes GS et GDH dans le sens de l'amination (synthèse de glutamate à partir de l'incorporation d'ammonium sur un α -cétoglutarate), il est apparu que la diminution des autres composés azotés serait concomitante à une augmentation de l'activité de la GDH (observation faite sur une seule répétition biologique). De l'ammonium étant libéré par la protéolyse (Damodaran and Ananta-Narayanan, 1938), il pourrait s'accumuler transitoirement au cours de la sénescence avant d'être pris en charge par la GDH, une des enzymes détoxifiantes de l'ammonium. De plus, cette activité aminante de la GDH permet la production du glutamate, une des formes transportables du N chez le colza (Lohaus and Schwerdtfeger, 2014). **Ces résultats suggèrent que la GDH peut jouer un rôle crucial dans la remobilisation du N foliaire post-montaison via un double rôle : détoxification de**

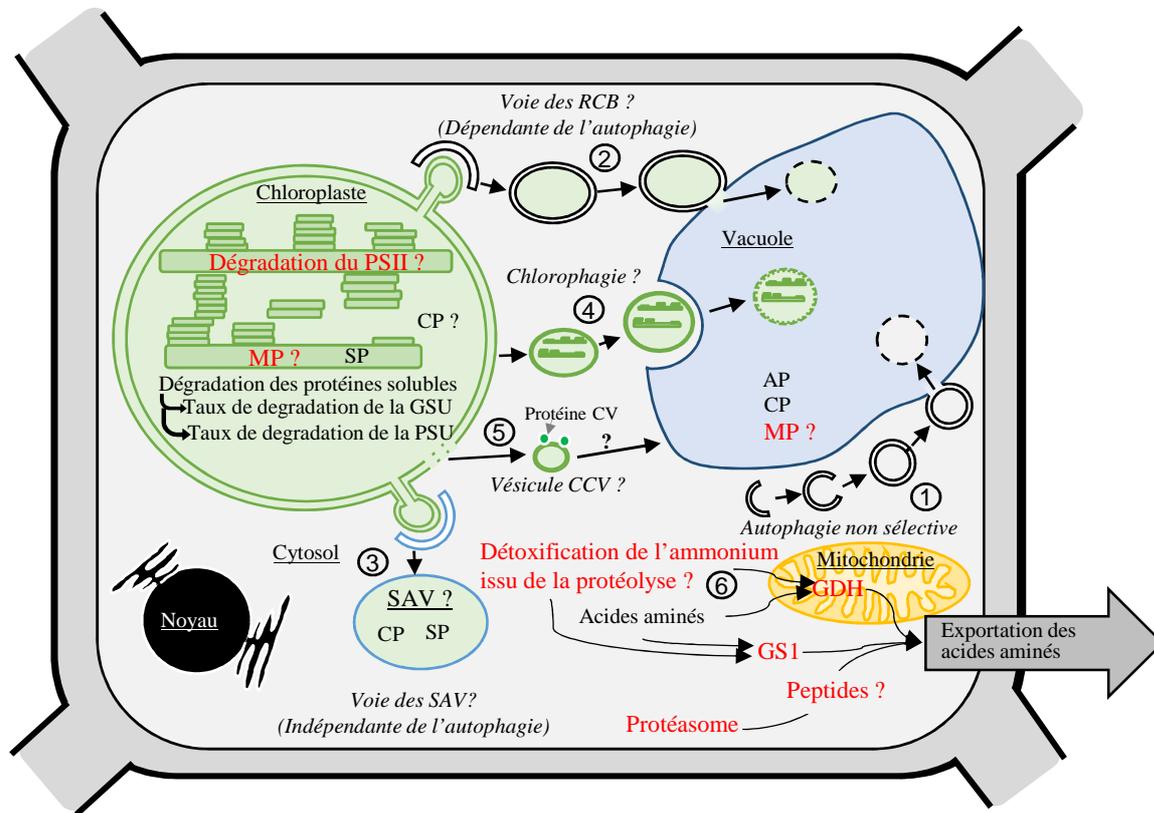


Figure E-4 : Représentation schématique des processus cellulaires associés à une remobilisation efficace du N dans une feuille de colza en réponse à une limitation en nitrate (0,375 mM) entre la montaison et la formation des siliques.

Les mécanismes potentiellement impliqués dans la remobilisation efficace du N foliaire sont indiqués en rouge. Les mécanismes qui n'ont pas encore été mis en évidence chez le colza sont suivis d'un point d'interrogation (?). Les données sont issues d'une comparaison de 2 géotypes (Aviso et Oase) cultivés en conditions limitantes (0,375 mM) ou non limitantes (3,75 mM) en nitrate à partir de la montaison jusqu'au stade « graines matures ». L'exportation des acides aminés et la dégradation des protéines solubles sont efficaces quel que soit le géotype ou le niveau d'alimentation azotée. Du fait de la forte contribution des protéases acides dans la remobilisation du N, la dégradation des protéines solubles semblent impliquer les processus d'autophagie (1), associés ou non aux « Rubisco containing bodies » (RCB ; (2)) et/ou des « senescence-associated vacuoles » (SAV; (3)). Les mécanismes de chlorophagie (4) et les « CV-containing vesicles » (CCV ; (5)), pas encore mis en évidence chez le colza, pourraient également jouer un rôle. La dégradation des protéines insolubles n'a pas été étudiée, mais les métalloprotéases (6) étant associées à une forte remobilisation chez le géotype Oase, leur contribution dans la protéolyse des protéines associées aux membranes thylakoidiennes pourrait être associée à une remobilisation efficace. Le géotype Aviso présente une accumulation de composés azotés non identifiés, comprenant majoritairement les peptides, nitrate, ammonium et/ou protéines insolubles, et leur dégradation/exportation est cruciale pour la remobilisation du N. Des preuves indirectes suggèrent que les processus responsables de la détoxification de l'ammonium et/ou de la dégradation/exportation des peptides seraient incriminés dans les étapes finales de remobilisation du N foliaire (7). Ainsi, les enzymes du métabolisme azoté GS et GDH, impliquées dans la détoxification de l'ammonium et la conversion des acides aminés en forme transportable dans le phloème, semble associer à une remobilisation du N efficace. AP : protéases à aspartate ; CP : protéases à cystéine ; CV : protéine « chloroplast vesiculation » ; GDH : glutamate déshydrogénase ; GS1 : glutamine synthétase cytosolique ; GSU : grande sous-unité de la Rubisco ; MP : Métalloprotéases ; PSII : photosystème II ; SP : protéases à sérine ; PSU : petite sous-unité de la Rubisco.

l'ammonium issu de la protéolyse et production d'un acide aminé transportable, le glutamate.

L'étude du niveau d'accumulation des 2 formes de GS (GS1, forme cytosolique et GS2, forme chloroplastidiale), montre qu'Oase présente une plus forte proportion de GS cytosolique par rapport à Aviso. De nombreux travaux ont montré que GS1 est particulièrement impliquée dans les mécanismes de sénescence et de remobilisation du N (Ochs *et al.*, 1999; Orsel *et al.*, 2014). Par conséquent, **cette plus forte proportion de GS1 pourrait conduire à une plus forte exportation des acides aminés et/ou une plus grande détoxification de l'ammonium.** En effet, la quantité d'acides aminés et d'autres composés azotés dans la feuille est plus faible tout au long de la sénescence chez le génotype Oase comparé au génotype Aviso, confortant ainsi **l'hypothèse d'une meilleure exportation du N foliaire chez Oase.** Cependant, l'ensemble des travaux de thèse réalisés sur le métabolisme azoté reste incomplet, notamment avec l'absence de quantification de l'asparagine synthétase récemment décrite comme ayant un rôle crucial dans la remobilisation du N chez *Arabidopsis* (Gaufichon *et al.*, 2013).

La forte protéolyse des protéines solubles observée chez les 2 génotypes quel que soit le niveau d'alimentation en nitrate est liée à une forte activité des protéases acides (principalement les protéases à cystéine ; Tableau E-2) confirmant les résultats obtenus précédemment chez le colza (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Desclos *et al.*, 2009). Comme au stade rosette, **l'implication de protéases actives à pH acide accrédite l'hypothèse d'une implication des SAV et/ou de l'autophagie dans les mécanismes de remobilisation du N foliaire chez le colza.**

De plus, la forte participation du protéasome en parallèle de la forte remobilisation constatée chez Oase conforte **l'hypothèse d'un rôle important du protéasome dans la remobilisation efficace des protéines foliaires.** Malgré l'absence de différence de dégradation des protéines solubles en réponse à la carence en N, une très forte induction du protéasome est observée chez Aviso (de 17 % à 60 % d'inhibition par le MG132 ; Tableau E-2). Par conséquent, **le protéasome pourrait avoir un rôle dans la remobilisation du N foliaire post-montaison en réponse à une limitation en nitrate, mais en agissant sur un mécanisme indépendant de la dégradation des protéines solubles, éventuellement au niveau du contrôle des processus associés à la sénescence** (Avila-Ospina *et al.*, 2014; Gregersen, 2011). Cependant, le MG132 étant un inhibiteur pouvant également inhiber les protéases à cystéine papain-like *in vivo* (Kaschani *et al.*, 2009), ce résultat reste à confirmer avec un inhibiteur plus spécifique.

La limitation en nitrate induit également l'activité des métalloprotéases chez Oase (Tableau E-2). Une augmentation de la quantité de FtsH a déjà été mise en évidence lors d'une limitation/privation en nitrate chez le colza (cv. Capitot) (Desclos *et al.*, 2009).

L'augmentation de la remobilisation du N observée en cas de limitation en nitrate pourrait ainsi être associée à une augmentation de la dégradation des protéines membranaires du photosystème II, comme suggéré pour ce génotype au stade rosette.

En résumé, entre la montaison et la formation des siliques (Figure E-4), la dégradation des protéines solubles et l'exportation/la conversion des acides aminés ne limitent pas la remobilisation du N foliaire. En revanche, l'optimisation du recyclage de certains composés azotés (incluant les peptides, les protéines membranaires, le nitrate et/ou l'ammonium) pourrait conduire à une efficacité de remobilisation du N plus forte. Des éléments de réponse indirects suggèrent que la gestion de l'ammonium par la glutamate deshydrogénase et l'activité glutamine synthétase cytosolique serait importante pour la remobilisation du N à ce stade de développement.

Enfin, la dégradation efficace des protéines solubles étant associée à une activité importante des protéases fonctionnant à pH acide, l'hypothèse d'une implication des SAV, des CCV et/ou des processus d'autophagie (permettant l'adressage des protéines plastidiales vers la vacuole lytique) dans la remobilisation du N foliaire du colza peut être avancée.

II.III. Perspectives à envisager pour la caractérisation/validation de nouvelles pistes de sélection de colza à forte ERA en conditions de bas intrants N

Nos analyses permettent de mettre en avant plusieurs pistes d'amélioration de la remobilisation du N foliaire du colza. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour identifier plus précisément des déterminants physiologiques et moléculaires associés à une forte ERA foliaire qui pourront, par la suite, être utilisés dans le cadre d'une sélection de variétés à forte EUA en situation d'apport en nitrate réduit. Quelques suggestions d'analyses complémentaires sont détaillées ci-dessous :

- (1) Notre étude met en avant **l'importance du devenir des produits de la protéolyse, essentiellement après la montaison**. Pour répondre à ces questions, une comparaison génotypique de la protéolyse mais également de ses produits (acides aminés, peptides, ammonium) sur **une cinétique plus fine** pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse et de déterminer si le devenir des produits de protéolyse peut limiter la remobilisation du N avant et/ou après la montaison. Ces résultats permettront d'identifier quels composés azotés sont incriminés et les enzymes associées : leucine aminopeptidase, tripeptidylpeptidase II, thimet oligopeptidase dans le cas de la dégradation de peptides, enzymes de la détoxification de l'ammonium etc.
- (2) La forte implication des protéases vacuolaires suppose un trafic cellulaire très actif des protéines du chloroplaste vers les vacuoles. **L'autophagie étant impliquée dans les**

mécanismes associés à la remobilisation du N chez *Arabidopsis* (Avila-Ospina *et al.*, 2014), **les processus d'autophagie devront être recherchés et caractérisés chez le colza**. De plus, l'activité de protéases à sérine à pH 5 identifiée dans notre étude en réponse à une limitation en nitrate est une preuve indirecte de l'implication des SAV dans la remobilisation du N. **Il sera donc nécessaire de vérifier l'existence des SAV au sein des feuilles sénescents de colza, afin de mieux comprendre les mécanismes associés à la sénescence, notamment en situation de nitrate limitant**. Des analyses par microscopie confocale couplées à des techniques d'immunodétection de protéases à cystéine (dont SAG12) et des analyses d'activité de protéases à sérine (Martínez *et al.*, 2008a), permettraient de mettre en évidence de telles vacuoles (collaborations avec l'équipe de Céline Masclaux-Daubresse¹²). De plus, parmi les protéases vacuolaires, les protéases à cystéine et sérine semblent hautement impliquées dans la remobilisation du N foliaire que ce soit au stade rosette ou après la montaison. **Identifier les types de protéases à sérine et cystéine associés à une forte ERA permettrait d'avoir des éléments de réponse sur leur(s) rôle(s) et de comprendre les mécanismes permettant une remobilisation efficace du N**. De nouvelles méthodes d'analyses permettent aujourd'hui de mettre en évidence les activités des différentes classes de protéases à cystéine *via* l'utilisation de sondes se liant spécifiquement aux sites actifs des protéases (van der Hoorn and Kaiser, 2012). En effet, les activités spécifiques des protéases à cystéine VPE (intervenant dans la maturation de protéases vacuolaires) ou Papaïn-like (impliquées dans la protéolyse), peuvent être quantifiées indépendamment des autres protéases à cystéine. Ces analyses permettront de mieux comprendre la séquence des événements associés à la sénescence et sont actuellement réalisées dans le cadre du travail doctoral de Marine PORET, adossé au programme Investissement d'Avenir RAPSODYN.

- (3) Les protéases à aspartate actives à pH acide semblent également jouer un rôle important dans la réponse à la limitation en N, notamment la protéase à aspartate putative GI 1326165. Il serait donc intéressant d'étudier **cette protéase afin d'apporter des précisions sur son rôle**. Pour cela, une vérification de son activité *in vitro* et la détermination de sa localisation cellulaire doivent être effectuée chez le colza. Une validation fonctionnelle chez la plante modèle *Arabidopsis* pourrait également permettre de **connaître son niveau d'implication dans la sénescence et la remobilisation du N**, comme cela a été fait pour la protéase à aspartate CND41 du tabac (Kato *et al.*, 2004).
- (4) Enfin, d'après nos travaux, une protéolyse efficace, que ce soit avant ou après la montaison, reposerait sur une dégradation efficace des protéines solubles et des

¹² Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA Versailles

membranes thylakoïdiennes (notamment du PSII). Parmi les protéines du PSII, la protéine D1 apparait comme un indicateur prometteur de l'efficacité de remobilisation de N foliaire au stade rosette. Il serait intéressant de **vérifier la pertinence de la protéine D1 comme indicateur des capacités de remobilisation des protéines (forte ERA) sur un plus grand nombre de géotypes**. En parallèle, des études d'activités protéolytiques pourraient permettre de **conclure sur le rôle des protéases à sérine neutres dans l'optimisation de la dégradation de la protéine D1 en réponse à une limitation en nitrate**.

CHAPITRE F

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE F : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

<http://brassica.bbsrc.ac.uk/> Brassica genome gateway.

<http://www.matrixscience.com/>. Matrix Science.

Abdallah M, Etienne P, Ourry A, Meuriot F. 2011. Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape ? *Plant Science* **180**, 511-520.

Adam Z, Clarke AK. 2002. Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends In Plant Science* **7**, 451-456.

Adam Z, Zaltsman A, Sinvany-Villalobo G, Sakamoto W. 2005. Ftsh proteases in chloroplasts and cyanobacteria. *Physiologia Plantarum* **123**, 386-390.

Ahmad A, Abdin MZ. 2000. Interactive effect of sulphur and nitrogen on the oil and protein contents and on the fatty acid profiles of oil in the seeds of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassica juncea* L. Czern. and Coss.). *Journal of Agronomy and Crop Science* **185**, 49-54.

Albert B, Le Cahérec F, Niogret M-F, Faes P, Avice J-C, Leport L, Bouchereau A. 2012. Nitrogen availability impacts oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant water status and proline production efficiency under water-limited conditions. *Planta* **236**, 659-676.

Alonso JM, Granell A. 1995. A putative vacuolar processing protease is regulated by ethylene and also during fruit ripening in *Citrus* fruit. *Plant Physiology* **109**, 541-547.

Andersson A, Keskitalo J, Sjödin A, Bhalerao R, Sterky F, Wissel K, Tandré K, Aspeborg H, Moyle R, Ohmiya Y, Bhalerao R, Brunners A, Gustafsson P, Karlsson J, Lundberg J, Nilsson O, Sandberg G, Strauss S, Sundberg B, Uhlen M, Jansson S, Nilsson P. 2004. A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biology* **5**.

Antão CM, Malcata FX. 2005. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 637-650.

Asare E, Scarisbrick DH. 1995. Rate of nitrogen and sulphur fertilizers on yield, yield components and seed quality of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Research* **44**, 41-46.

Avice J-C, Etienne P. 2014. Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* **65**, 3813-3824.

Avila-Ospina L, Moison M, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C. 2014. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3799-3811.

Ay N, Janack B, Humbeck K. 2014. Epigenetic control of plant senescence and linked processes. *Journal of Experimental Botany*, eru132.

Balint T, Rengel Z. 2008. Nitrogen efficiency of canola genotypes varies between vegetative stage and grain maturity. *Euphytica* **164**, 421-432.

- Balint T, Rengel Z.** 2011. Nitrogen and sulfur uptake and remobilisation in canola genotypes with varied N- and S-use efficiency differ at vegetative and maturity stages. *Crop & Pasture Sciences* **62**, 299-312.
- Bayer RG, Stael S, Csaszar E, Teige M.** 2011. Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics* **11**, 1287-1299.
- Beers EP, Jones AM, Dickerman AW.** 2004. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* **65**, 43-58.
- Beers EP, Moreno TN, Callis J.** 1992. Subcellular localization of ubiquitin and ubiquitinated proteins in *Arabidopsis thaliana*. *The journal of Biological Chemistry* **267**, 15432-15439.
- Beers EP, Woffenden BJ, Zhap C.** 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. In: Lam E, Fukuda H, eds. *Programmed cell death in higher plants*. New York, USA: Springer.
- Behrens T, Horst WL, Wiesler F.** 2001. Effect of rate, timing and form of nitrogen application on yield formation and nitrogen balance in oilseed rape production. *Plant nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems*, 800-801.
- Belenghi B, Acconcia F, Trovato M, Perazzolli M, Bocedi A, Polticelli F, Ascenzi P, Belledonne M.** 2003. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *European Journal of Agronomy* **270**, 2593-2604.
- Bell GE, Howell BM, Johnson GV, Raun WR, Solie JB, Stone ML.** 2004. Optical sensing of turfgrass chlorophyll content and tissue nitrogen. *Hortscience* **39**, 1130-1132.
- Bernard SM, Habash DZ.** 2009. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist* **182**, 602-620.
- Berry PM, Spink J, Foulkes MJ, White PJ.** 2010. The physiological basis of genotypic differences in nitrogen use efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Research* **119**, 365-373.
- Beuve N, Rispaill N, Laine P, Cliquet J-B, Ourry A, Le Deunff E.** 2004. Putative role of γ -aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant, Cell and Environment* **27**, 1035-1046.
- Biswal B, Mohapatra PK, Biswal UC, Raval MK.** 2012. Leaf senescence and transformation of chloroplasts to gerontoplasts. In: Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD, eds. *Photosynthesis: plastid biology, energy conversion and carbon assimilation, advances in photosynthesis and respiration*, Vol. 34. Netherlands: Springer, 217-230.
- Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gotschlich EC.** 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-body on Western blots. *Analytical Biochemistry* **13**, 6175-6179.
- Bonneau L, Ge Y, Drury GE, Gallois P.** 2008. What happened to plant capases ? *Journal of Experimental Botany* **59**, 491-499.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Brunel-Muguet S, Beauclair P, Bataillé M-P, Avice J-C, Trouverie J, Etienne P, Ourry A. 2013. Light restriction delays leaf senescence in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* **32**, 506-518.

Brushnell TP, Brushnell D, Jagendorf AT. 1993. A purified zinc protease of pea chloroplasts, EP1, degrades the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology* **103**, 585-591.

Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C. 1997. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Molecular Biology* **33**, 821-834.

Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin J-F, Wu S-H, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ. 2005. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **42**, 567-585.

Cambra I, Garcia FJ, Martinez M. 2010. Clan CD of cystein peptidases as an example of evolutionary divergences in related protein families across plant clades. *Gene* **449**, 59-69.

Caputo C, Barneix AJ. 1999. The relationship between sugar and amino acid export to the phloem in young wheat plants. *Annals of Botany* **84**, 33-38.

Carré P, Pouzet A. 2014. Rapeseed market, worldwide and in Europe. *Oilseeds & fats Crops and Lipids* **21**, 1-12.

Cartelat A, Cerovic ZG, Goulas Y, Meyer S, Lelarge C, Prioul JL, Jeuffroy MH, Gate P, Agati G, Moya I. 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* **91**, 35-49.

Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV. 2004. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell* **16**, 3285-3303.

Chardon F, Noël V, Masclaux-Daubresse C. 2012. Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3401-3412.

Chauhan S, Srivalli S, Nautiyal AR, Khanna-Chopra R. 2009. Wheat cultivars differing in heat tolerance show a differential response to monocarpic senescence under high-temperature stress and the involvement of serine proteases. *Photosynthetica* **47**, 536-547.

Chen H-J, Su C-T, Lin C-H, Huang G-J, Lin Y-H. 2010. Expression of sweet potato cystein protease *SPCP2* altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Journal of Plant Physiology* **167**, 838-847.

Chen J, Burke JJ, Velten J, Xin Z. 2006. FtsH11 protease plays a critical role in Arabidopsis thermotolerance. *The Plant Journal* **48**, 73-84.

Chen Z, Pang Q, Dai S, Wang Y, Chen S, Yan X. 2011. Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* in response to methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* **168**, 995-1008.

Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T. 2003. Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiology* **44**, 914-921.

Chichkova NV, Shaw J, Galiullina RA, Drury GE, Tuzhikov AI, Kim SH, Kalkum M, Hong TB, Gorshkova EN, Torrance L, Vartapetian AB, Taliansky M. 2010. Phytaspase, a relocalisable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *The EMBO Journal* **29**, 1149-1161.

Chichkova NV, Tuzhikov AI, Taliansky M, Vartapetian AB. 2012. Plant phytaspases and animal caspases: structurally unrelated death proteases with a common role and specificity. *Physiologia Plantarum* **145**, 77-84.

Cho K, Masaba L, Fowler AW, Walsh DM, Park CS. 2010. Canola oil inhibits breast cancer cell growth in cultures and *in vivo* and acts synergistically with chemotherapeutic drugs. *Lipids* **45**, 777-784.

Christ B, Hörtensteiner S. 2014. Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. *Journal of Plant Growth Regulation* **33**, 4-20.

Clarke AK. 2012. The chloroplast ATP-dependent Clp protease in vascular plants – new dimensions and future challenges. *Physiologia Plantarum* **145**, 235-244.

Coffeen WC, Wolpert TJ. 2004. Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell* **16**, 857-873.

Colnenne C, Meynard JM, Reau R, Justes E, Merrien A. 1998. Determination of critical nitrogen curve for winter oilseed rape. *Annals of Botany* **81**, 311-317.

Cornah JE, Smith SM. 2002. Synthesis and function of glyoxylate cycle enzymes. In: Baker A, Graham IA, eds. *Plant Peroxisomes*: Kluwer Academic Publishers, 57-101.

Coupe SA, Sinclair BK, Watson LM, Heyes JA, Eason JR. 2003. Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1045-1056.

Craft-Brandner SJ, Hölzer R, Feller U. 1998. Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **102**, 192-200.

Damaraju S, Schlede S, Eckhardt U, Lokstein H, Grimm B. 2011. Functions of the water soluble chlorophyll-binding protein in plants. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1444-1451.

Damodaran M, Ananta-Narayanan P. 1938. Enzymic proteolysis. Liberation of ammonia from proteins. *Biochemical Journal* **32**, 1877-1889.

Dejoux J-F, Recous S, Meynard J-M, Trinsoutrot I, Leterme P. 2000. The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil* **218**, 257-272.

Del Rio LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **54**, 923-933.

Delorme VGR, McCabe PF, Kim D-J, Leaver CJ. 2000. A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiology* **123**, 917-927.

Desclos-Théveniau M, Coquet L, Jouenne T, Etienne P. 2014. Proteomic analysis of residual proteins in blades and petioles of fallen leaves of *Brassica napus*. *Plant Biology*.

Desclos M. 2008. Modifications physiologiques et protéomique associées à la remobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle chez le colza (*Brassica napus* L.). *PhD thesis, University of Caen*, 214.

Desclos M, Dubousset L, Etienne P, Le Caherec F, Satoh H, Bonnefoy J, Ourry A, Avice JC. 2008. A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology* **147**, 1830-1844.

Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice J-C. 2009. A combined ¹⁵N tracing/proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated with N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Proteomics* **9**, 3580-3608.

Desimone M, Wagner E, Johannimgeler U. 1998. Degradation of active-oxygen-modified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by chloroplastic proteases requires ATP-hydrolysis. *Planta* **205**, 459-466.

Diaz-Mendoza M, Velasco-Arroyo B, Gonzalez-Melendi P, Martinez M, Diaz I. 2014. C1A cysteine protease-cystatin interactions in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3825-3833.

Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry JF, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C. 2008. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. *Plant Physiology* **147**, 1437-1449.

Diepenbrock W. 2000. Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Field Crops Research* **67**, 35-49.

Dominguez F, Cejudo FJ. 1995. Pattern of endoproteolysis following wheat grain germination. *Physiologia Plantarum* **95**, 253-259.

- Donnison IS, Gay AP, Thomas H, Edwards KJ, Edwards D, James CL, Thomas AM, Ougham H.** 2007. Modification of nitrogen remobilization, grain fill and leaf senescence in maize (*Zea mays*) by transposon insertional mutagenesis in a protease gene. *New Phytologist* **173**, 481-494.
- Downing WL, Mauxion F, Fauvarque MO, Reviron MP, de Vienne D, Vartanian N, Giraudat J.** 1992. A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *The Plant Journal* **2**, 685-693.
- Dreccer MF, Schapendonk AHCM, Slafer GA, Rabbinge R.** 2000. Comparative response of wheat and oilseed rape to nitrogen supply: absorption and utilisation efficiency of radiation and nitrogen during the reproductive stages determining yield. *Plant and Soil* **220**, 189-205.
- Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, Etienne P, Meuriot F, Hawkesford MJ, Gombert J, Ségura R, Bataillé M-P, Rezé S, Bonnefoy J, Ameline A-F, Ourry A, Le Dily F, Avice J-C.** 2009. Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. *Journal of Experimental Botany* **60**, 3239-3253.
- Dubousset L, Etienne P, Avice J-C.** 2010. Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? *Journal of Experimental Botany* **61**, 4313-4324.
- Ellis RJ.** 1979. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences* **4**, 241-244.
- Elmore S.** 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**, 495-516.
- Etienne P, Desclos M, Le Gou L, Gombert J, Bonnefoy J, Maurel K, Le Dily F, Ourry A, Avice J-C.** 2007. N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology* **34**, 895-906.
- Evans JR.** 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* **78**, 9-19.
- Feller U, Anders I, Mae T.** 2008. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1615-1624.
- Flinn BS.** 2008. Plant extracellular matrix metalloproteinases. *Functional Plant Biology* **35**, 1183-1193.
- Forsberg J, Ström J, Kieselbach T, Larsson H, Alexciiev K, Engström A, Akerlund H-E.** 2005. Protease activities in the chloroplast capable of cleaving an LCHII N-terminal peptide. *Physiologia Plantarum* **123**, 21-29.
- Friedrich JW, Huffaker RC.** 1980. Photosynthesis, leaf resistances, and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase degradation in senescing barley leaves. *Plant Physiology* **65**, 1103-1107.

- Fuentes SI, Allen DJ, Ortiz-Lopez A, Hernández G.** 2001. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1071-1081.
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G.** 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1592**, 63-77.
- Gan S, Amasino RM.** 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* **113**, 313-319.
- Garcia-Lorenzo M, Sjödin A, Jansson S, Funk C.** 2006. Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **6**, 30.
- Gaufichon L, Masclaux-Daubresse C, Tcherkez G, Reisdorf-Cren M, Sakakibara Y, Hase T, Clément G, Avice J-C, Grandjean O, Marmagne A, Boutet-Mercey S, Azzopardi M, Soulay F, Suzuki A.** 2013. *Arabidopsis thaliana* ASN2 encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant Cell and Environment* **36**, 328-342.
- Gehringer A, Snowdon R, Spiller T, Basunanda P, Friedt W.** 2007. New oilseed rape (*Brassica napus*) hybrids with levels of heterosis for seed yield under nutrient-poor conditions. *Breeding Science* **57**, 315-320.
- Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Neshe MFO, Yariv I, Dor C, Bassani M.** 2003. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *The Plant Journal* **36**, 629-642.
- Girondé A, Etienne P, Trouverie J, Bouchereau A, Le Cahérec F, Leport L, Orsel M, Niogret M-F, Nesi N, Deleu C, Soulay F, Masclaux-Daubresse C, Avice J-C.** 2015a. The contrasting management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilisation during seed filling. *BMC Plant Biology*, 1514664601536833
- Girondé A, Poret M, Etienne P, Trouverie J, Bouchereau A, Le Cahérec F, Leport L, Orsel M, Niogret M-F, Deleu C, Avice J-C.** 2015b. A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. *Journal of Experimental Botany*, JEXBOT/2014/137661.
- Givan CV.** 1979. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry* **18**, 375-382.
- Glass AD.** 2003. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraint upon nitrogen absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**, 453-470.
- Golldack D, Popova OV, Dietz K-J.** 2002. Mutation of the matrix metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in *Arabidopsis*. *The journal of Biological Chemistry* **277**, 5541-5547.
- Golldack D, Vera P, Dietz K-J.** 2003. Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiologia Plantarum* **118**, 64-73.

Gombert J, Etienne P, Ourry A, Le Dily F. 2006. The expression patterns of *SAG12/Cab* genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1949-1956.

Gombert J, Le Dily F, Lothier J, Etienne P, Rossato L, Allirand J-M, Jullien A, Savin A, Ourry A. 2010. Effect of nitrogen fertilization on nitrogen dynamics in oilseed rape using ¹⁵N-labeling field experiment. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **173**, 875-884.

Good AG, Beatty PH. 2011. Biotechnological approaches to improving nitrogen use efficiency in plants: alanine aminotransferase as a case study. In: Hawkesford MJ, Barraclough P, eds. *The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., 5-19.

Good AG, Johnson SJ, Pauw MD, Carroll RT, Savidov N, Vidmar J, Lu Z, Taylor G, Stroehrer V. 2007. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian Journal of Botany* **85**, 252-262.

Good AG, Shrawat AK, Muench DG. 2004. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends In Plant Science* **9**, 597-605.

Grbic V. 2003. SAG and SAG12 protein expression in senescing *Arabidopsis* plants. *Physiologia Plantarum* **119**, 263-269.

Gregersen PL. 2011. Senescence and nutrient remobilization in crop plants. In: Hawkesford MJ, Barraclough P, eds. *The Molecular and Physiological basis of nutrient use efficiency in crop*: John Wiley & Sons Inc, 83-102.

Gregersen PL, Cutelic A, Boschian L, Krupinska K. 2013. Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology* **82**, 603-622.

Gregersen PL, Holm PB. 2007. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal* **5**, 192-206.

Guo Y, Cai Z, Gan S. 2004. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant, Cell and Environment* **27**, 521-549.

Guo Y, Gan S. 2005. Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Current Topic in Developmental Biology* **71**, 83-112.

Hara-Nishimura I, Hatsugai N. 2011. The role of vacuole in plant cell death. *Cell death and Differentiation* **18**, 1298-1304.

Harrak H, Azelmat S, Baker EN, Tabaeizadeh Z. 2001. Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome* **44**, 368-374.

Hawkesford MJ. 2011. An overview of nutrient use efficiency and strategies for crop improvement. In: Hawkesford MJ, Barraclough P, eds. *The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops*. Oxford, UK: John Wiley & Son, Inc, 3-19.

Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Kato A, Mano S, De Bellis L, Hayashi-Ishimaru Y, Yamaguchi K, Hayashi H, Nishimura M. 2000. Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochemistry and Biophysics* **32**, 295-304.

He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S. 2002. Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *American Society of Plant Physiologists* **128**, 3876-3884.

He R, Drury GE, Rotary VI, Gordon A, Willer M, Farzaneh T, Woltering EJ, Gallois P. 2008. Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **283**(2), 774-783.

Hirel B, Bertin P, Quilleré I, Bourdoncle W, Attagnant C, Dellay C, Gouy A, Cadiou S, Retalliau C, Falque M, Gallais A. 2001. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiology* **125**, 1258-1270.

Hocking PJ, Randall PJ, DeMarco D. 1997. The response of dryland canola to nitrogen fertilizer: partitioning and mobilization of dry matter and nitrogen, and nitrogen effects on yield components. *Field Crops Research* **54**, 201-220.

Hollman J, Gregersen PL, Kuprinska K. 2014. Identification of predominant genes involved in regulation and execution of senescence-associated nitrogen remobilization in flag leaves of field grown barley. *Journal of Experimental Botany* **65**(14), 3963-3973.

Hörtensteiner S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 55-77.

Hörtensteiner S, Feller U. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**, 927-937.

Huesgen PF, Schumann H, Adamska I. 2009. Deg/HtrA proteases as components of a network for photosystem II quality control in chloroplasts and cyanobacteria. *Research in Microbiology* **160**, 726-732.

Hunter A, Smith RG. 1925. The liberation of ammonia in tryptic digestion. *The journal of Biological Chemistry* **62**, 649-665.

Ilami G, Nespoulous C, Huet J-C, Vartanian N, Pernollet JC. 1997. Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochemistry* **45**, 1-8.

Ishida H, Izumi M, Wada S, Makino A. 2014. Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1837**, 512-521.

Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T. 2008. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiology* **148**, 142-155.

Izumi M, Wada S, Makino A, Ishida H. 2010. The autophagic degradation of chloroplasts via rubisco-containing bodies is specifically linked to leaf carbon status but not nitrogen status in Arabidopsis. *Plant Physiology* **154**, 1196-1209.

Jain V, Kaiser W, Huber SC. 2008. Cytokinin inhibits the proteasome-mediated degradation of carbonylated proteins in *Arabidopsis* leaves. *Plant and Cell Physiology* **49**, 843-852.

Jannin L, Arkoun M, Etienne P, Laine P, Goux D, Garnica M, Fuentes M, San Francisco S, Baigorri R, Cruz F, Houdusse F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A. 2013. Growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. seaweed extract: microarray analysis and physiological characterization of N, C and S metabolisms. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**, 31-52.

Jordi W, Schapendonk AHCM, Davelaar E, Stoopen GM, Pot CS, De Visser R, Van Rhijn JA, Gan S, Amasino RM. 2000. Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell and Environment* **23**(3), 279-289.

Jukanti AK, Heidlebaugh NM, Parrott DL, Fischer IA, McInnerney K, Fischer AM. 2008. Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytologist* **177**, 333-349.

Jung T, Catalgol B, Grune T. 2009. The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine* **30**, 191-296.

Jusko AK, Kosciak B. 2002. Possible use of the chlorophyll meter (SPAD-502) for evaluating nitrogen nutrition of the Virginia tobacco. *Electronic Journal of Polish Agricultural universities* **5**.

Kant S, Bi Y-M, Rothstein SJ. 2011. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1499-1509.

Kant S, Burch D, Badenhorst P, Palanisamy R, Mason J, Spangenberg G. 2015. Regulated expression of a cytokinin biosynthesis gene IPT delays leaf senescence and improves yield under rainfed and irrigated conditions in Canola (*Brassica napus* L.). *PLoS One* **10**, e0116349.

Kaschani F, Verhelst SHL, van Swieten PF, Verdoes M, Wong C-S, Wang Z, Kaiser M, Overkleeft HS, Bogyo M, van der Hoorn RAL. 2009. Minitags for small molecules: detecting targets of reactive small molecules in living plant tissues using "click chemistry". *The Plant Journal* **57**, 373-385.

Kato Y, Murakami S, Nakano T, Sato F. 2001. CND41, a chloroplast DNA-binding protease, is involved in Rubisco degradation. *Science Access* **3**, 1-4.

Kato Y, Murakami S, Yamamoto Y, Chatani H, Kondo Y, Nakano T, Yokota A, Sato F. 2004. The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* **220**, 97-104.

Kato Y, Sakamoto W. 2009. Protein quality control in chloroplasts: A current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *Journal of Biochemistry* **146**, 463-469.

- Kato Y, Sakamoto W.** 2010. New insights into the types and function of proteases in plastids. In: Jeon KW, ed. *International review of cell and molecular biology*, Vol. 280: Elsevier Inc., 185-218.
- Kato Y, Yamamoto Y, Murakami S, Sato F.** 2005. Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. *Planta* **222**, 643-651.
- Kazmin D, Edwards RA, Turner RJ, Larson E, Starkey J.** 2002. Visualization of proteins in acrylamide gels using ultraviolet illumination. *Analytical Biochemistry* **301**, 91-96.
- Keech O, Pesquet E, Ahad A, Askne A, Nordvall D, Vodnala SM, Tuominen H, Hurry V, Dizengremel P, Gardeström P.** 2007. The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell and Environment* **30**, 1523-1534.
- Kessel B, Schierholt A, Becker HC.** 2012. Nitrogen use efficiency in a genetically diverse set of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Crop Science* **52**, 2546-2554.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J.** 2007. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crop Research* **102**, 22-32.
- Kim D-Y, Scalf M, Smith LM, Vierstra RD.** 2013. Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 1523-1540.
- Kim M, Ahn J-W, Jin U-H, Choi D, Paek K-H, Pai H-S.** 2003. Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 19406-19415.
- Koeslin-Findeklee F, Meyer A, Girke A, Beckmann K, Horst WJ.** 2014. The superior nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) hybrids is not related to delayed nitrogen starvation-induced leaf senescence. *Plant Soil* **384**, 347-362.
- Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H, Shinozaki K.** 1993. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **129**, 175-182.
- Koyama T.** 2014. The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. *Frontiers in Plant Science* **5**, 650.
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A-S, Chaillou S, Ferrario-Mery S, Meyer C, Daniel-Vedele F.** 2014. Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 789-798.
- Kumar PA, Parry MAJ, Mitchell RAC, Ahmad A, Abrol YP.** 2002. Photosynthesis and nitrogen-use efficiency. In: Foyer CH, Noctor G, eds. *Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism.*, Vol. 12. Netherlands: Springer, 23-34.
- Kurepa J, Smalle JA.** 2008. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie* **90**, 324-335.

- Kusaba M, Tanaka A, Tanaka R.** 2013. Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynthesis Research* **117**, 221-234.
- Kwasniak M, Pogorzelec L, Migdal I, Smakowska E, Janska H.** 2012. Proteolytic system of plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **145**, 187-195.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the heat bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lainé P, Ourry A, Macduff J, Boucaud J, Salette J.** 1993. Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum* **88**, 85-92.
- Lee RH, Wang CH, Huang LT, Grace Chen SH.** 2001. Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes. *Journal of Experimental Botany* **52**(358), 1117-1121.
- Lemaire G, Durand JL, Lila M.** 1989. Effet de la sécheresse sur la digestibilité *in vitro*, la teneur en ADF et la teneur en azote de la luzerne. *Agronomie* **9**, 841-848.
- Lemaitre T, Gaufichon L, Boutet-Mercey S, Christ A, Masclaux-Daubresse C.** 2008. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant Cell Physiology* **49**, 1056-1065.
- Lequeu J, Simon-Plas F, Fromentin J, Etienne P, Petitot A-S, Blein J-P, Suty L.** 2005. Proteasome comprising a $\beta 1$ inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS Letters* **579**, 4879-4886.
- Leterme P.** 1988. Croissance et développement du colza d'hiver : les principales étapes. *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*. Paris: CETIOM-INRA, 23-33.
- Lin J-F, Wu S-H.** 2004. Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **39**, 612-628.
- Lindahl M, Yang D-H, Andersson B.** 1995. Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *European Journal of Agronomy* **231**, 503-509.
- Ling Q, Huang W, Baldwin A, Jarvis P.** 2012. Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science* **338**, 655-659.
- Liu L, Zhou Y, Zhou G, Ye R, Zhao L, Li X, Lin Y.** 2008. Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. *Plant Molecular Biology* **67**(1-2), 37-55.
- Liu L, Zhou Y, Szczerba MW, Li X, Lin Y.** 2010. Identification and Application of a Rice Senescence-Associated Promoter. *Plant Physiology* **153**(3), 1239-1249.
- Lohaus G, Moellers C.** 2000. Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* **211**, 833-840.

- Lohaus G, Schwerdtfeger M.** 2014. Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*. *PLoS One* **9**, e87689.
- Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM.** 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **92**, 322-328.
- Long SP, Zhu X-G, Naidu SL, Ort DR.** 2006. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? *Plant, Cell and Environment* **29**, 315-330.
- Lu Q, Wen X, Lu C, Zhang Q, Kuang T.** 2003. Photoinhibition and photoprotection in senescent leaves of field-grown wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 749-754.
- Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G.** 2011a. Involvement of Deg5 protease in wounding-related disposal of PsbF apoprotein. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**, 311-320.
- Luciński R, Misztal L, Samardakiewicz S, Jackowski G.** 2011b. The thylakoid protease Deg2 is involved in stress-related degradation of the photosystem II light-harvesting protein Lhcb6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **192**, 74-86.
- Lv X, Pu X, Qin G, Zhu T, Lin H.** 2014. The roles of autophagy in development and stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Apoptosis* **19**, 905-921.
- Mae T, Makino A, Ohira K.** 1983. Changes in the amounts of ribulose biphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* **24**, 1079-1086.
- Makino A.** 2011. Rubisco and nitrogen relationships in rice: Leaf photosynthesis and plant growth. *Soil Science and Plant Nutrition* **49**, 319-327.
- Makino A, Mae T, Ohira K.** 1984. Relation between nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves from emergence through senescence. *Plant and Cell Physiology* **25**, 429-437.
- Makino A, Sakashita H, Hidema J, Mae T, Ojima K, Osmond B.** 1992. Distinctive responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to CO₂-transfer resistance. *Plant Physiology* **100**, 1737-1743.
- Malagoli P, Laine P, Le Deunff E, Rossato L, Ney B, Ourry A.** 2004. Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv capitoll during a growth cycle using kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology* **134**, 388-400.
- Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A.** 2005a. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II. An ¹⁵N-labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany* **95**, 1187-1198.
- Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A.** 2005b. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to

harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* **95**, 853-861.

Marino G, Funk C. 2012. Matrix metalloproteinase in plants: a brief overview. *Physiologia Plantarum* **145**, 196-202.

Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, Tercé-Laforgue T, Quilleré I, Coque M, Gallais A, Gonzalez-Moro AB, Bethencourt L, Habash DZ, Lea PJ, Charcosset A, Perez P, Murigneux A, Sakakibara H, Edwards KJ, Hirel B. 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *The Plant Cell* **18**, 3252-3274.

Martínez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui M, Guamet JJ. 2008a. Senescence-associated vacuoles are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leave. *The Plant Journal* **56**, 196-206.

Martínez DE, Costa ML, Guamet JJ. 2008b. Senescence-associated degradation of chloroplast proteins inside and outside the organelle. *Plant Biology* **10**, 15-22.

Martínez M, Cambra I, González-Melendi P, Santamaria ME, Diaz I. 2012. C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiologia Plantarum* **145**, 85-94.

Masclaux-Daubresse C, Chardon F. 2011. Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2131-2142.

Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gauffichon L, Suzuki A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**, 1141-1157.

Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M. 2008. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**, 23-36.

Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier M-H, Feraud M, Jouglet T, Suzuki A. 2006. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology* **140**, 444-456.

Masclaux C, Valadier M-H, Brugière N, Morot-Gaudry J-F, Hirel B. 2000. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **21**, 510-518.

Masferrer A, Arro M, Manzano D, Schaller H, Fernandez-Busquets X, Moncalean P, Fernandez B, Cunillera N, Boronat A, Ferrer A. 2002. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal* **30**, 123-132.

Matile P. 1992. Chloroplast senescence. In: Baker NR, Thomas H, eds. *Crop photosynthesis: spatial and temporal determinants*. Amsterdam: Elsevier, 413-440.

Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H, Kräutler B. 1996. Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiology* **112**, 1403-1409.

- Matsui M, Fowler JH, Walling LL.** 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry* **387**, 1535-1544.
- Mechin V, Consoli L, Le Guilloux M, Damerval C.** 2003. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3**, 1299-1302.
- Mendham NJ, Salisbury PA.** 1995. Physiology: crop development, growth and yield. In: Kimber DS, Mc Gregor DI, eds. *Production and utilization of Brassica Oilseeds*. Oxford: CAS International, 11-63.
- Merrien A, Palleau JP, Maisonneuve C.** 1988. Mineral element requirements of rape cultivated in France. *Physiologie et élaboration du rendement du colza*. Paris: Cetiom Editions, 34-46.
- Merrien A, Pouzet A.** 1988. Principaux facteurs limitant les rendements de colza d'hiver dans les conditions française *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*. Paris: CETIOM-INRA, 16-22.
- Miao Y, Laun T, Zimmermann P, Zentgraf U.** 2004. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **55**, 853-867.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends In Plant Science* **9**, 490-498.
- Morris K, Mackerness SA-H, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V.** 2000. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* **23**, 677-685.
- Mosier AR.** 2002. Environmental challenges associated with needed increases in global nitrogen fixation. *Nutrient Cycling in Agrosystems* **63**, 101-116.
- Mueller-Roeber B, Balazadeh S.** 2014. Auxin and its role in plant senescence. *Journal of Plant Growth Regulation* **33**, 21-33.
- Munné-Bosch S, Alegre L.** 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* **31**, 203-216.
- Murakami S, Kondo Y, Nakano T, Sato F.** 2000. Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Letters* **468**, 15-18.
- Musse M, De Franceschi L, Cambert M, Sorin C, Le Cahérec F, Burel A, Bouchereau A, Mariette F, Lepoint L.** 2013. Structural changes in senescing oilseed rape leaves at tissular and sub-cellular levels monitored by NMR relaxometry through water status. *Plant Physiology* **163**, 392-406.
- Nakabayashi K, Ito M, Kiyosue T, Shinozaki K, Watanabe A.** 1999. Identification of *clp* genes expressed in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiology* **40**, 504-514.
- Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, Mackerness SA-H, Buchanan-Wollaston V.** 2003. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2285-2292.

- Nesi N, Delourme R, Brégeon M, Falentin C, Renard M.** 2008. Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *C.R. Biologies* **331**, 763-771.
- Noh Y-S, Amasino RM.** 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology* **41**, 181-194.
- Noodén LD, Guiamet JJ, Singh S, Letham DS, Tsuji J, Schneider MJ.** 1988. Hormonal control of senescence. In: Pharis RP, Rood SB, eds. *Plant Growth Substances*: Springer-Verlag GmbH & Co KG, 537-546.
- Noodén LD, Hillsberg JW, Schneider MJ.** 1996. Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiologia Plantarum* **96**, 491-495.
- Noquet C, Avice J-C, Rossato L, Beauclair P, Henry M-P, Ourry A.** 2004. Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Science* **166**, 1007-1018.
- O'Neal D, Joy KW.** 1973. Glutamine synthetase of Pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **159**, 113-122.
- Ochs G, Schock G, Trischler M, Kosemund K, Wild A.** 1999. Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **39**, 395-405.
- Olinares PDB, Kim J, van Wijk KJ.** 2011. The Clp protease system: a central component of the chloroplast protease network. *Biochimica et Biophysica Acta* **1807**, 999-1011.
- Orsel M, Moison M, Clouet V, Thomas J, Leprince F, Canoy A-S, Just J, Chalhoub B, Masclaux-Daubresse C.** 2014. Sixteen cytosolic glutamine synthetase genes identified in the *Brassica napus* L. genome are differentially regulated depending on nitrogen regimes and leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3927-3947.
- Otegui M, Noh Y-S, Martinez DE, Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guiamet JJ.** 2005. Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* **41**, 831-844.
- Panchuk II, Zentgraf U, Volkov RA.** 2005. Expression of the *Apx* gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **222**, 926-932.
- Park J-H, Oh SA, Kim YH, Woo HR, Nam HG.** 1998. Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **37**, 445-454.
- Parrott D, Yang L, Shama L, Fisher AM.** 2005. Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon “feast” conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta* **222**, 989-1000.
- Parrott DL, McInnerney K, Feller U, Fischer AM.** 2007. Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf

senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New Phytologist* **176**, 56-59.

Pastori GM, Del Rio LA. 1997. Natural senescence of pea leaves. *Plant Physiology* **113**, 411-418.

Pathak RR, Ahmad A, Lochab S, Raghuram N. 2008. Molecular physiology of plant nitrogen use efficiency and biotechnological options for its enhancement. *Current Science* **94**, 1394-1403.

Peoples MB, Dalling MJ. 1988. The interplay between proteolysis and amino acids metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In: Noodén LD, Leopold AC, eds. *Senescence and aging in plants*. San Diego: Academic Press, 181-217.

Petzold HE, Zhao M, Beers EP. 2012. Expression and functions of proteases in vascular tissues. *Physiologia Plantarum* **145**, 121-129.

Polge C, Jaquinod M, Holzer F, Bourguignon J, Walling L, Brouquisse R. 2009. Evidence for the existence in *Arabidopsis thaliana* of the proteasome proteolytic pathway. *The journal of Biological Chemistry* **284**, 35412-35424.

Pontier D, Gan S, Amasino RM, Roby D, Lam E. 1999. Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Molecular Biology* **39**, 1243-1255.

Prins A, van Heerden PDR, Olmos E, Kunert KJ, Foyer CH. 2008. Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1935-1950.

Prochazkova D, Wilhelmova N. 2004. Changes in antioxidative protection in bean cotyledon during natural and continuous irradiation-accelerated senescence. *Biologia plantarum* **48**, 33-39.

Purnell MP, Botella JR. 2007. Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo. *Plant Physiology* **143**, 530-539.

Quirino BF, Noh Y-S, Himelblau E, Amasino RM. 2000. Molecular aspects of leaf senescence. *Trends In Plant Science* **5**, 278-282.

Raab S, Drechsel G, Zarepour M, Hartung W, Koshiba T, Bittner F, Hoth S. 2009. Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **59**, 39-51.

Rathke G-W, Behrens T, Diepenbrock W. 2006. Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **117**, 80-108.

Rathke G-W, Christen O, Diepenbrock W. 2005. Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown in different crop rotations. *Field Crops Research* **94**, 103-113.

- Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijhout WJ, Neeffjes J.** 2004. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* **20**, 495-506.
- Renault H, Rouselle V, El Amrani A, Arzel M, Renault D, Bouchereau A, Deleu C.** 2010. The *Arabidopsis pop2-1* mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology* **10**, 20.
- Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M.** 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters* **581**, 2281-2289.
- Reviron M-P, Vartanian N, Sallantin M, Huet J-C, Pernollet J-C, de Vienne D.** 1992. Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiology* **100**, 1486-1493.
- Roberts IN, Caputo C, Criado MV, Funk C.** 2012. Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum* **145**, 130-139.
- Roberts IN, Murray PF, Caputo CP, Passeron S, Barneix AJ.** 2003. Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **118**, 483-490.
- Roberts IN, Passeron S, Barneix AJ.** 2006. The two main endopeptidases present in dark-induced senescent wheat leaves are distinct subtilisin-like proteases. *Planta* **224**, 1437-1447.
- Rojo E, Martin R, Carter C, Zouhar J, Pan S, Plotnikova J, Jin H, Paneque M, Sanchez-Serrano JJ, Baker B, Ausubel FM, Raikhel NV.** 2004. VPE γ exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology* **14**, 1897-1906.
- Rossano R, Larocca M, Riccio P.** 2011. 2-D zymographic analysis of Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica) florets proteases: Follow up of cysteine protease isotypes in the course of post-harvest senescence. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1517-1525.
- Rossato L, Laine P, Ourry A.** 2001. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1655-1663.
- Rossato L, MacDuff JH, Laine P, Le Deunff E, Ourry A.** 2002. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1131-1141.
- Rotari VI, He R, Gallois P.** 2005. Death by proteases in plants : whodunit. *Physiologia Plantarum* **123**, 376-385.
- Rothstein SJ.** 2007. Returning to our roots: Making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. *Plant Cell* **19**, 2695-2699.
- Ruuska SA, Lewis DC, Kennedy G, Furbank RT, Jenkins CLD, Tabe LM.** 2008. Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* **66**, 15-32.

- Salon C, Bataillé M-P, Gallardo K, Jeudy C, Santoni A-L, Trouverie J, Voisin A-S, Avice J-C.** 2014. ^{34}S and ^{15}N labelling to model S and N flux in plants and determine the different components of N and S use efficiency. *Plant Metabolic Flux Analysis Methods in Molecular Biology* **1090**, 335-346.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Saric T, Graef CI, Goldberg AL.** 2004. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes. A key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *The journal of Biological Chemistry* **279**, 46723-46732.
- Schaller A.** 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**, 183-197.
- Schaller A, Stintzi A, Graff L.** 2012. Subtilases – versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment. *Physiologia Plantarum* **145**, 52-66.
- Schiltz S, Gallardo K, Huart M, Negroni L, Sommerer N, Burstin J.** 2004. Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. *Plant Physiology* **135**, 2241-2260.
- Schjoerring JK, Bock JGH, Gammelvind L, Jensen CR, Mogensen VO.** 1995. Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil* **177**, 255-264.
- Schuhmann H, Adamska I.** 2012. Deg proteases and their role in protein quality control and processing in different subcellular compartments of the plant cell. *Physiologia Plantarum* **145**, 224-234.
- Schulte auf'm Erley G, Behrens T, Ulas A, Wiesler F, Horst WJ.** 2011. Agronomic traits contributing to nitrogen efficiency of winter oilseed rape cultivars. *Field Crops Research* **124**, 114-123.
- Schulte auf'm Erley G, Wijaya K-A, Ulas A, Becker H, Wiesler F, Horst WJ.** 2007. Leaf senescence and N uptake parameters as selection traits for nitrogen efficiency of oilseed rape cultivars. *Physiologia Plantarum* **130**, 519-531.
- Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Kruschke M, Mueller MJ, Berger S.** 2010. Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology* **152**, 1940-1950.
- Shahri W.** 2011. Senescence: concepts and synonyms. *Asian Journal of Plant Sciences* **10**, 24-28.
- Sheokand S, Dahiya P, Vincent JL, Brewin NJ.** 2005. Modified expression of cystein protease affects seed germination, vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*. *Plant Science* **169**, 966-975.
- Shibatan M, Oikawan K, Yoshimoto K, Goto-Yamada S, Mano S, Yamada K, Kondo M, Hayashi M, Sakamoto W, Ohsumi Y, Nishimura M.** 2014. Plant autophagy is responsible

for peroxisomal transition and plays an important role in the maintenance of peroxisomal quality. *Autophagy* **10**, 936-937.

Simeonova E, Garstka M, Koziak-Lipinska J, Mostowska A. 2004. Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence. *Protoplasma* **223**, 143-153.

Skopelitis DS, Paranychianakis NV, Paschalidis KA, Pliakonis ED, Delis ID, Yakoumakis DI, Kouvarakis A, Papadakis AK, Stephanou EG, Roubelakis-Angelakis KA. 2006. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant Cell* **18**, 2767-2781.

Smalle J, Vierstra RD. 2004. The ubiquitine 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 555-590.

Sorin C, Musse M, Mariette F, Bouchereau A, Leport L. 2014. Assessment of nutrient remobilization through structural changes of palisade and spongy parenchyma in oilseed rape leaves during senescence. *Planta*, 1-14.

Srivalli B, Bharti S, Khanna-Chopra R. 2001. Vacuole cysteine proteases and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase degradation during monocarpic senescence in cowpea leaves. *Photosynthetica* **39**, 87-93.

Stressman D, Miller A, Spalding M, Rodermeel SR. 2002. Regulation of photosynthesis during leaf development in continuous light. *Photosynthesis Research* **72**, 27-37.

Stroeher V, Maclagan JL, Good AG. 1997. Molecular cloning of a *Brassica napus* cysteine protease gene inducible by drought and low temperature stress. *Physiologia Plantarum* **101**, 389-397.

Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW. 2003. The diverse roles of ubiquitine and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Review Genetic* **4**, 948-958.

Sun W, Gao F, Fan H, Shan X, Sun R, Liu L, Gong W. 2013. The structures of *Arabidopsis* Deg5 and Deg8 reveal new insights into HTrA proteases. *Acta Crystallographica* **69**, 830-837.

Sun X, Fu T, Chen N, Guo J, Ma J, Zou M, Lu C, Zhang L. 2010a. The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **152**, 1263-1273.

Sun X, Ouyang M, Guo J, Ma J, Lu C, Adam Z, Zhang L. 2010b. The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem-II assembly in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **62**, 240-249.

Sun Y-L, Zhu H-Z, Zhou J, Dai Y-R, Zhai Z-H. 1999. Menadione-induced apoptosis and the degradation of lamin-like proteins in tobacco protoplasts. *CMLS Cellular and Molecular Life Science* **55**, 310-316.

Svecnjak Z, Rengel Z. 2006. Canola cultivars differ in nitrogen utilization efficiency at vegetative stage. *Field Crops Research* **97**, 221-226.

- Swartzberg D, Dai N, Gan S, Amasino R, Granot D.** 2006. Effects of cytokinin production under two SAG promoters on senescence and development of tomato plants. *Plant Biology* **8**(5), 579-586.
- Sylvester-Bradley R, Kindred DR.** 2009. Analysis nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1939-1951.
- Tan-Wilson AL, Wilson K.** 2012. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum* **145**, 140-151.
- Taylor AJ, Smith CJ, Wilson IB.** 1991. Effect of irrigation and nitrogen fertilizer on yield, oil content, nitrogen accumulation and water use of canola (*Brassica napus* L.). *Fertilizer research* **29**, 249-260.
- Thoenen M, Herrmann B, Feller U.** 2007. Senescence in wheat leaves: is a cysteine endopeptidase involved in the degradation of the large subunit of Rubisco? *Acta Physiologia Plantarum* **29**, 339-350.
- Thomas H, Ougham H.** 2014. The stay-green trait. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3889-3900.
- Tilman D.** 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 5995-6000.
- Tilsner J, Kassner N, Struck C, Lohaus G.** 2005. Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* **221**, 328-338.
- Tittonel ED, Chaput JP, Letoublon F, Bonnot O.** 1988. Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. *Physiologie et élaboration du rendement Colza*. Paris: CETIOM, 68-72.
- Toyooka K, Okamoto T, Minamikawa T.** 2000. Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *The journal of Cell Biology* **148**, 453-463.
- Tripathi LP, Sowdhamini R.** 2006. Cross genomic of serine proteases in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics* **7**, 200.
- Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K.** 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* **581**, 2290-2300.
- Tsuchiya T, Ohta H, Okawa K, Iwamatsu A, Shimada H, Masuda T, Takamiya K-I.** 1999. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 15362-15367.
- Turano FJ, Thakkar SS, Fang T, Weisemann JM.** 1997. Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate deshydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **113**, 1329-1341.

U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. *Journal of Japanese Botany* **7**, 389-452.

Ulas A, Behrens T, Wiesler F, Horst WJ, Schulte auf'm Erley G. 2013. Does genotypic variation in nitrogen remobilisation efficiency contribute to nitrogen efficiency of winter oilseed-rape cultivars (*Brassica napus* L.). *Plant Soil* **371**, 463-471.

Uren AG, O'Rourke K, Aravind L, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM. 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell* **6**, 961-967.

van der Hoorn RAL. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review Plant Biology* **59**, 191-223.

van der Hoorn RAL, Kaiser M. 2012. Probes for activity-based profiling of plant proteases. *Physiologia Plantarum* **145**, 18-27.

van der Hoorn RAL, Leeuwenburgh MA, Bogyo M, Joosten MHAJ, Peck SC. 2004. Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiology* **135**, 1170-1178.

Vartapetian AB, Tuzhikov AI, Chichkova NV, Taliansky M, Wolpert TJ. 2011. A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell death and Differentiation* **18**, 1289-1297.

Velasco L, Möllers C, Becker HC. 1999. Estimation of seed weight, oil content and fatty acid composition in intact single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica* **106**, 79-85.

Vercammen D, Declercq W, Vandenaabeele P, Van Breusegem F. 2007. Are metacaspases caspases ? *The journal of Cell Biology* **179**, 375-379.

Vierstra RD. 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology* **32**, 275-302.

Vincent R, Fraissier V, Chaillou S, Limami MA, Deleens E, Phillipson B, Douat C, Boutin J-P, Hirel B. 1997. Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta* **201**, 424-433.

Waditee-Sirisattha R, Shibato J, Rakwal R, Sirisattha S, Hattori A, Nakano T, Takabe T, Tsujimoto M. 2011. The Arabidopsis aminopeptidase LAP2 regulates plant growth, leaf longevity and stress response. *New Phytologist* **191**, 958-969.

Wagner R, Aigner H, Funk C. 2012. FtsH proteases located in the plant chloroplast. *Physiologia Plantarum* **145**, 203-214.

Wagner R, Aigner H, Pružinská A, Jänkänpää HJ, Jansson S, Funk C. 2011. Fitness analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling. *New Phytologist* **191**, 449-458.

- Wang S, Blumwald E.** 2014. Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell*, tpc. 114.133116.
- Wang YT, Yang CY, Chen Y-T, Lin Y, Shaw J-F.** 2004. Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 663-670.
- Wardlaw IF.** 1968. The control and pattern of movement of carbohydrates in plants. *The Botanical Review* **34**, 79-105.
- Watanabe N, Lam E.** 2011. Arabidopsis metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses. *The Plant Journal* **66**, 969-982.
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Giavalisco P, Kopka J, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Hoefgen R.** 2013. Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology* **162**, 1290-1310.
- Watanabe M, Nakayama H, Watanabe Y, Shimada N.** 1994. Mechanical slicing-induced alteration of GDH isoenzyme patterns in *Brassica napus* leaf protoplasts. *Journal of Plant Physiology* **143**, 87-91.
- Wiesler F, Behrens T, Horst WJ.** 2001a. The role of nitrogen-efficiency cultivars in sustainable agriculture. *The Scientific World* **1**, 61-69.
- Wiesler F, Behrens T, Horst WL.** 2001b. Nitrogen efficiency of contrasting rape ideotypes. In: Horst WJ, ed. *Plant nutrition - Food security and sustainability of agro-ecosystems*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 60-61.
- Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N.** 2006. The role of sugars in integrating environmental signal during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**, 391-399.
- Woltering EJ.** 2004. Death proteases come alive. *Trends In Plant Science* **9**, 469-472.
- Woltering EJ, van der Bent A, Hoeberichts FA.** 2002. Do plant caspases exist ? *Plant Physiology* **130**, 1764-1769.
- Woo HR, Chung KM, Park J-H, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK, Nam HG.** 2001. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell* **13**, 1779-1790.
- Xie Z, Klionsky DJ.** 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* **9**, 1102-1109.
- Yamada K, Matsushima R, Nishimura M, Hara-Nishimura I.** 2001. A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* **127**, 1626-1634.

- Yau SK, Thurling N.** 1987. Variation in nitrogen response among spring rape (*Brassica napus*) cultivars and its relationship to nitrogen uptake and utilization. *Field Crops Research* **16**, 139-155.
- Yoshida T, Minamikawa T.** 1996. Successive amino-terminal proteolysis of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *European Journal of Agronomy* **238**, 317-324.
- Young TE, Giesler-Lee J, Gallie DR.** 2004. Senescence-induced expression of cytokinin reverses pistil abortion during maize flower development. *The Plant Journal* **38**(6), 910-922.
- Zelisko A, Garcia-Lorenzo M, Jackowski G, Jansson S, Funk C.** 2005. AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 13699-13704.
- Zhang H, Zhou C.** 2013. Signal transduction in leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **82**, 539-545.
- Zhang WY, Xu YC, Li WL, Yang L, Yue X, Zhang XS, Zhao XY.** 2014. Transcriptional analyses of natural leaf senescence in maize. *PLoS One* **9**, e115617.
- Zhao D, Derkx AP, Liu D-C, Buchner P, Hawkesford MJ.** 2014. Overexpression of a NAC transcription factor delays leaf senescence and increases grain nitrogen concentration in wheat. *Plant Biol (Stuttg)*.
- Zhao J, Becker HC, Zhang D, Zhang Y, Ecke W.** 2006. Conditional QTL mapping of oil content in rapeseed with respect to protein content and traits related to plant development and grain yield. *Theoretical and Applied Genetics* **113**, 33-38.
- Zienkiewics M, Ferenc A, Wasilewska W, Romanowska E.** 2012. High light stimulates Deg1-dependent cleavage of the minor LHCII antenna proteins CP26 and CP29 and the PsbS protein in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **235**, 279-288.
- Zimmermann P, Zentgraf U.** 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters* **10**, 515-534.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : ACTE DE CONGRES rédigé pour le « XVII International Plant Nutrition Colloquium » du 19 au 22 août 2013 à Istanbul, Turquie
(communication orale)**

Natural Variability of Nitrogen Remobilization Efficiency at the Vegetative Stage Reveals the Physiological Process Involved in the High Nitrogen Use Efficiency of Winter Oilseed Rape

Girondé Alexandra¹, Etienne Philippe¹, Le Caherec Françoise², Orsel Mathilde², Leport Laurent², Bouchereau Alain², Avice Jean-Christophe¹

¹UMR INRA/UCBN 950 Plant Ecophysiology Agronomy and N,C,S nutritions, University of Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, Caen, F-14032, France (jean-christophe.avice@unicaen.fr)

²UMR 1349 INRA-Agrocampus Ouest-Université de Rennes 1, Institute of Genetics, Environment and Plant Protection, F-35653 Le Rheu Cedex, France. (alain.bouchereau@univ-rennes1.fr)

INTRODUCTION

As the third main oil crop worldwide (58.5 Mt in 2011), oilseed rape (*Brassica napus* L.) represents a major renewable resource for food (oil, meal) and non-food uses (green energy and chemistry). This crop requires high level of nitrogen (N) fertilizers (140 to 180 kg N ha⁻¹ year⁻¹) but only 50% of N fertilizers is recovered by the crop in the seeds (Schjoerring et al. 1995). This poor N use efficiency (NUE) is mainly related to the loss of N-rich leaves as they age and detach. This is highly ascribed to the weak N remobilization efficiency (NRE) observed in leaves that appears during the vegetative phase of development when the process of sequential leaf senescence occurs. Consequently, this low N remobilization can contribute to the pollution of the environment by N-leaching, a concern that has seriously emerged in agriculture. To maintain or improve the seed production with respect of environment and limitation of N inputs, it will be necessary to increase NUE and optimization of NRE is probably one of the main lever to improve NUE. Although it was reported that spring (Svecnjak and Rengel 2006) or winter (Schulte auf'm Erley et al. 2007) oilseed rape cultivars can differ in NUE at vegetative stage, the characterization of the physiological processes that might contribute to improve NRE remain largely unknown. Then, our goals were to study the link between the observed genetic variability for NUE and the underlying physiological processes of N remobilisation associated to sequential leaf senescence in 11 winter oilseed rape parental lines grown under two N regimes.

METHODS

Seedlings of 15 days-old were transplanted on pot containing perlite (2V) and vermiculite (1V) and grown under greenhouse conditions (day: 20°C, 16h; night: 15°C, 8h) on 25%

Hoagland nutrient solution renewed twice a week. A long term pulse-chase ^{15}N -labeling was performed to determine the N remobilization at whole plant level and in a specific leaf rank, from its maturation up to the abscission. Plants were supplied with $3.75\text{mM } ^{15}\text{NO}_3^-$ (2 atom% excess) during 6 weeks in order to obtain homogeneous ^{15}N labelling. After labelling period, plants received high (+N: 3.75mM) or low nitrate (LN: 0.375mM) during 21 d (corresponding to the chase period). N and ^{15}N amounts were quantified with an elemental analyser linked to an isotopic ratio mass spectrometer (IsoPrime, GV Instrument, Manchester, UK). Leaf amino acids analysis was determined by ninhydrine method. Leaf soluble proteins were extracted from 200 mg fresh weight with citrate/sodium-phosphate buffer (pH 6.8) and quantified by protein-dye staining and analysed by SDS-PAGE.

RESULTS AND DISCUSSION

While the NUE (evaluated by the production of leaf fresh matter during the 21d of experiment) was not significantly different between the 11 genotypes under +N conditions, a high genotypic variability was observed for NUE in response to LN nutrition (Fig. 1A). This is strongly related to a high genetic variability for NRE expressed as the remobilization of total N (Fig. 1B) or ^{15}N (data not shown) in mature leaves during the 21d of experiment. Plant response to N limitation depends on the genotype. For instance, despite Samourai has a medium NRE (Fig. 1B) associated to a high remobilization of soluble proteins and low level of amino-acids in mature leaf (data not shown), this genotype cannot maintain its growth as control, suggesting that phloem loading of proteolysis products is efficient but recycling of N insoluble compounds in old leaves and/or sink strength of growing organs are limited under LN conditions. Conversely, in response to LN treatment Aviso shows an increase of (1) NRE (+N: -25%, LN: -84%; Fig. 1B), (2) remobilization of soluble proteins (+N: -42%, LN: -88%), (3) hydrolysis of large subunit of Rubisco (Fig. 1C) and (4) remobilization of amino acids in mature leaf. This led to a biomass production similar to the control (Fig. 1A), demonstrating that Aviso was able to optimize its NUE under low N availability by the improvement of the NRE associated to sequential leaf senescence.

CONCLUSIONS

This work reveals that a variability of NUE and NRE in oilseed rape exists at the rosette stage, paving the way for screening genotypes with high NUE capacity since the rosette developmental stage. Some genotypes, such as Aviso, are particularly efficient under LN condition because they exhibit (i) a marked senescence, (ii) an efficient proteolysis (including plastidial proteins) and (iii) a strong remobilization of amino acids leading to high rates of N transfert towards sink organs and to the maintenance of aerial growth. These accessions will constitute the basis for further analyses to determine the genetic and molecular determinants of high NUE, NRE, and oil yield potential.

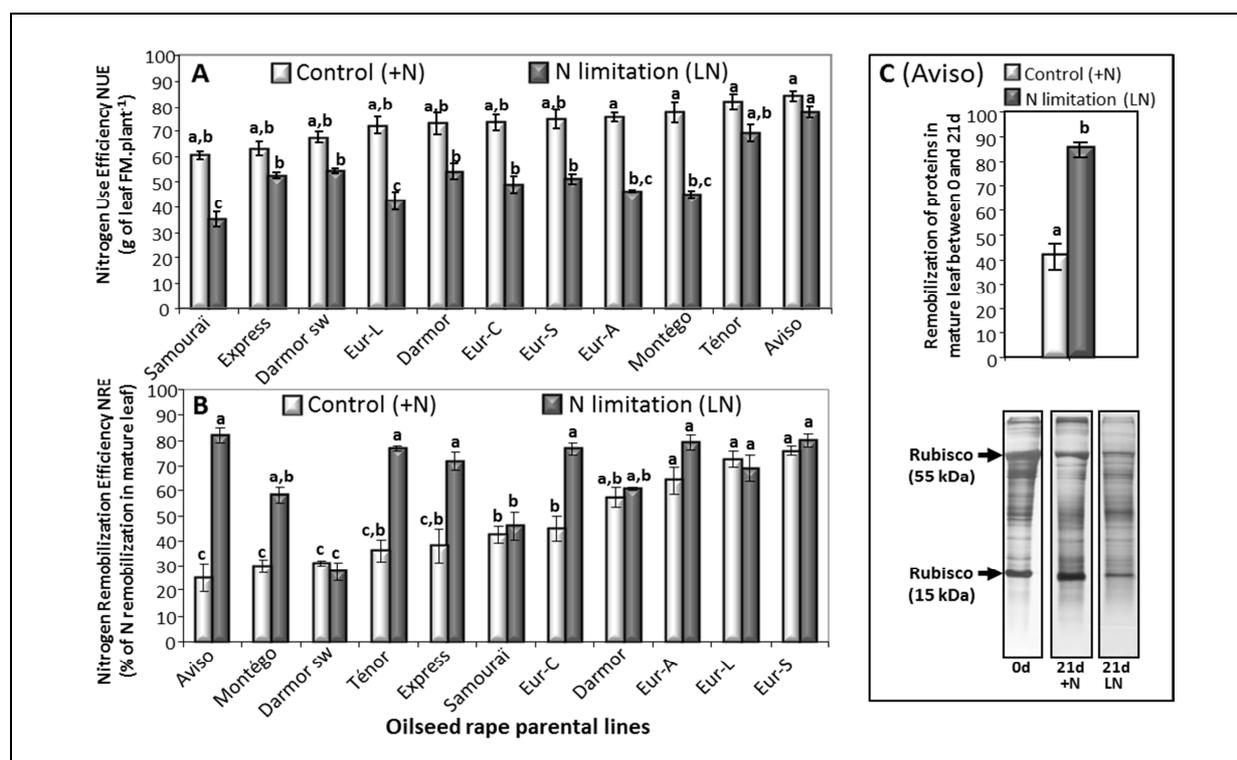


Figure 1. NUE (A) and NRE (B) in 11 winter oilseed rape (parental lines), remobilization of soluble proteins and SDS-PAGE profiles in mature leaf of Aviso (C) observed at rosette stage after 21d under high (+N, 3.75mM) or low nitrate (LN, 0.375mM) regimes. NUE was evaluated as the production of leaf fresh matter (g FM.plant⁻¹) and NRE was expressed as the rate (%) of total N remobilization in mature leaf during the 21d of experiment. Data (mean ± SE for n=3) are significantly different when the letters are different.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by ANR-GPLA07056C-GENERGY and by a PhD grant to Alexandra Girondé.

REFERENCES

- Schjoerring, J.K., Bock, J.G.H., Gammelvind, L., Jensen, C.R. and Mogensen, V.O. (1995) Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant Soil* 177: 255-264.
- Svecnjak, Z. and Rengel Z. (2006) Canola cultivars differ in nitrogen utilization efficiency at vegetative stage. *Field Crops Research* 97: 221-226.
- Schulte auf'm Erley, G., Wijaya, K.A., Ulas, A., Becker, H., Wiesler, F. and Horst, W.J. (2007) Leaf senescence and N uptake parameters as selection traits for nitrogen efficiency of oilseed rape cultivars. *Physiol Plantarum* 130: 519-531.

Genotypic variability of N use efficiency in winter oilseed rape reveals the mechanisms involved in leaf N remobilization associated to sequential senescence in response to nitrate limitation.

Girondé Alexandra¹, Poret Marine¹, Etienne Philippe¹, Trouverie Jacques¹, Bouchereau Alain², Le Cahérec Françoise², Leport Laurent², Nési Nathalie², Avice Jean-Christophe¹.

¹INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritons NCS, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France; ²INRA UMR 1349 Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes F-35653 Le Rheu Cedex, France

alexandra.gironde@gmail.com marine.poret@live.fr

This work was funded by ANR (ANR-07-GPLA-016) GENERGY.



Introduction

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the third worldwide oleaginous crop. It requires high level of nitrogen (N) fertilizer which only 50% is found in seeds (1) revealing a low N Use Efficiency (NUE) mainly related to a low leaf N Remobilization Efficiency (NRE). This is strongly linked to senescence mechanisms involving proteolysis processes due to proteases (2). In order to improve NRE, our goals were to (i) explore the genotypic variability of NRE and (ii) identify mechanisms leading to a better N remobilization during senescence processes.

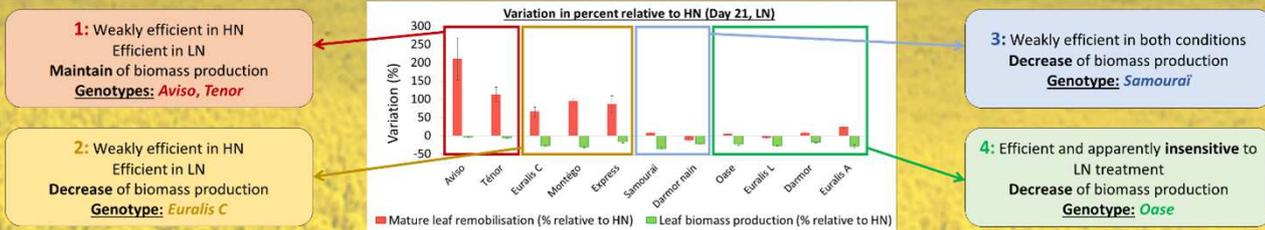
Material and Methods

A screening on 11 genotypes was performed at vegetative stage using a long term pulse-chase ¹⁵N-labeling to determine the N remobilization at whole plant level and in a leaf rank becoming senescent. Plants were supplied with high (HN: 3.75 mM) or low (LN: 0.375 mM) nitrate during 21 d. The theoretical last senescing leaf rank was determined by the SAG12/Cab method (3) and the proteases were identified by: 2-D electrophoresis, immunodetection and tests of RubisCO degradation in gel with specific inhibitors of proteases classes.

Results

1. Genotypic variability of NRE

→ Four responses profiles depending of N remobilization in the mature leaf and the maintain or not of biomass production in LN condition were identified.



1: Weakly efficient in HN
Efficient in LN
Maintain of biomass production
Genotypes: *Aviso*, *Tenor*

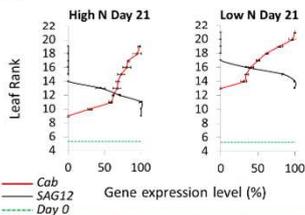
2: Weakly efficient in HN
Efficient in LN
Decrease of biomass production
Genotype: *Euralis C*

3: Weakly efficient in both conditions
Decrease of biomass production
Genotype: *Samourai*

4: Efficient and apparently insensitive to LN treatment
Decrease of biomass production
Genotype: *Oase*

2. Link between senescence and N remobilization *Aviso* vs *Oase*

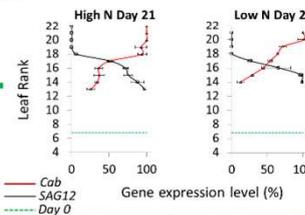
2.A Theoretical last senescing leaf rank: *Aviso*



Aviso vs *Oase*

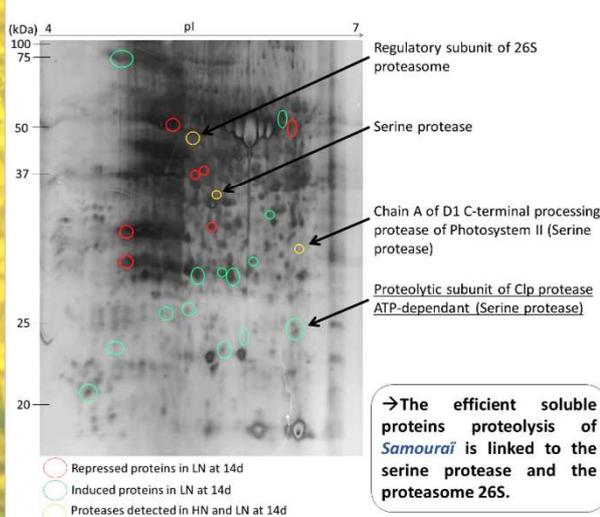
- Increase of N remobilization
 - Increase of senescence speed
 - Similar N remobilization
 - Similar senescence speed
- An increase of N remobilization contribute to the maintain of biomass production for *Aviso* and is related to an increase of number of senescing leaves.

2.B Theoretical last senescing leaf rank: *Oase*

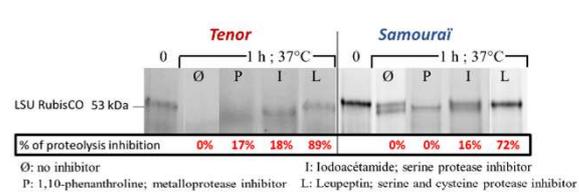


3. During senescence, what are the leaf proteases involved in a good proteolysis in LN for *Tenor* vs *Samourai* ?

3.A 2D electrophoresis (Day 14, LN): *Samourai*

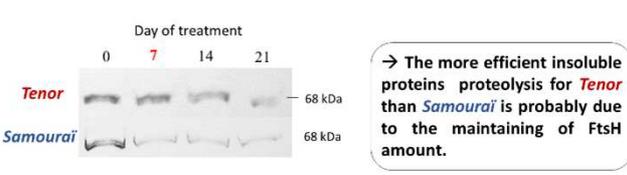


3.B Tests of RubisCO degradation in gel (Day 21, LN): *Tenor* and *Samourai*



→ Serine and cysteine proteases are involved in the efficient soluble proteins degradation of both genotypes, in addition of the metalloproteases in the case of *Tenor*.

3.C Immunodetection of the metalloproteases FtsH (LN): *Tenor* and *Samourai*



Conclusion

These results highlight the strong link between N remobilization and (i) senescence, (ii) soluble and insoluble proteolysis and (iii) the involvement of serine, cysteine and metalloproteases (as the FtsH) in an efficient proteolysis. Further studies are in progress to precise these results.

ANNEXE 2 : ACTE DE CONGRES rédigé pour le « 6th European Workshop on Leaf Senescence » du 14 au 18 octobre 2014 à Versailles, France (présentation d'un poster)

Genotypic variability of N use efficiency in winter oilseed rape reveal the proteolysis mechanisms involved in leaf N remobilization associated to sequential senescence in response to nitrate limitation.

Girondé Alexandra¹, Poret Marine¹, Etienne Philippe¹, Trouverie Jacques¹, Bouchereau Alain², Le Cahérec Françoise², Leport Laurent², Nési Nathalie², Avice Jean-Christophe¹.

¹INRA, UMR INRA-UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France

² INRA UMR 1349 Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes F-35653 Le Rheu Cedex, France

alexandra.gironde@gmail.com

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the third worldwide oleaginous crop and requires high level of nitrogen (N) fertilizer which only 50% is found in seeds (Schjoerring et al. 1995) revealing a low N Use Efficiency (NUE). This weak NUE is mainly related to a low leaf N Remobilization Efficiency (NRE). In order to improve NRE, our goals were to (i) explore the genotypic variability of NRE and (ii) identify mechanisms leading to a better N remobilization during senescence process ⁽¹⁾.

To achieve these objectives, a screening on 11 genotypes was performed at vegetative stage using a long term pulse-chase ¹⁵N-labeling, to determine the N remobilization at whole plant level and in a leaf rank becoming senescent. Plants were supplied with high (HN: 3.75 mM) or low (LN: 0.375 mM) nitrate during 21 d.

Results indicated that there was 4 profiles of responses to LN conditions depending on N remobilization and biomass production: (1) high NRE in both N conditions without maintaining of growth, (2) low NRE in both N conditions without a maintain of growth, (3) high NRE in LN nutrition without a maintain of leaf growth, or (4) with a maintain of growth. Based on these data, the N remobilization during the senescence of a leaf becoming senescent was specifically investigated in 2 contrasted genotypes: Samouraï (profile 2) and Ténor (profile 4). Both genotypes had the same rate of soluble proteins degradation after 21 d but Ténor presented a higher decrease of total proteins amount. This indicates that the higher NRE of Ténor in response to LN is mainly due to an efficient proteolysis of soluble and insoluble proteins, while Samouraï does not degrade so much the insoluble ones. Moreover, western blotting suggests an important role of the FtsH in the proteolysis mechanisms involved in the efficient NRE of Ténor, and studies of proteases activities highlighted the importance of serine and cysteine proteases in both genotypes. The characterization of proteases especially involved in high NRE is in progress.

Schjoerring JK, Bock JGH, Gammelvind L, Jensen CR and Mogensen VO (1995) Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant Soil* **177**: 255-264

Résumés

Le colza d'hiver est une oléagineuse exigeante en azote (N) minéral et qui présente une efficacité d'usage du N (EUA) médiocre, notamment du fait d'une faible efficacité de remobilisation du N (ERA) au stade végétatif. Dans un contexte de réduction des intrants azotés et d'une amélioration du bilan agro-environnemental du colza, les objectifs visaient à explorer la variabilité génotypique afin (i) de déterminer un idéotype de colza adapté à une limitation en nitrate et (ii) d'identifier les mécanismes cellulaires associés à une forte ERA foliaire aux stades végétatif et reproducteur.

L'analyse des composantes de l'EUA et des flux de N *via* l'utilisation du traceur isotopique ^{15}N chez 10 géotypes au stade rosette et 2 géotypes au stade reproducteur a permis de proposer un idéotype de colza adapté à une limitation en nitrate caractérisé par : (i) une forte remobilisation du N foliaire tout au long du cycle permettant de réduire les pertes de N par la chute des feuilles, (ii) une forte utilisation de ce N dans les feuilles en croissance au stade rosette afin d'obtenir une production de biomasse foliaire élevée avant la montaison et (iii) une capacité accrue à stocker le N des feuilles dans la tige, permettant ainsi de conserver le N provenant de la remobilisation foliaire, avant de le redistribuer en fin de cycle pour couvrir les besoins en N liés à la formation et au remplissage des graines. Au niveau cellulaire, une forte remobilisation du N foliaire au stade rosette est associée à une forte protéolyse des protéines solubles et insolubles chloroplastidiales. Une protéolyse efficace est associée à une forte activité des protéases à cystéine, à sérine et à aspartate au pH acide, suggérant un rôle prépondérant des protéases vacuolaires en lien avec un important trafic cellulaire (autophagie, « senescence-associated vacuole » et/ou « CV-containing vesicles »). *A contrario*, entre la montaison et la formation des siliques, la remobilisation du N n'est pas limitée par la protéolyse mais par un défaut de dégradation/exportation des peptides et des protéines membranaires et/ou par des processus déficients de détoxification/exportation de l'ammonium. De plus, nos travaux ont démontré que le taux de dégradation de la protéine D1 (protéine membranaire associée au photosystème II) pourrait être un indicateur pertinent de l'efficacité de remobilisation du N foliaire.

Winter oilseed rape is an oleaginous crop highly demanding in mineral nitrogen (N) that is characterized by a low nitrogen (N) use efficiency (NUE), consequently to a weak N remobilization efficiency (NRE) at vegetative stages. In a context of reduction in N fertilizers inputs and an improvement of agro-environmental balance of oilseed rape, the objectives aimed to explore the genotypic variability (i) to determine an ideotype adapted to low nitrate supply and (ii) to identify the cellular mechanisms associated with a high leaf NRE at vegetative stages and after bolting.

The analysis of NUE components and N fluxes *via* the utilization of ^{15}N isotopic tracer in 10 genotypes at the vegetative stages and 2 genotypes at the reproductive stages allow to define an ideotype adapted to a low nitrate supply characterized by (i) a high N remobilization from leaf during all the developmental stages, leading to lower N loss by leaf fall, (ii) a high N utilization of the N from remobilization in growing leaves during vegetative stages in order to obtain a high leaf biomass production before bolting and, (iii) an increased capacity to store the N from leaves in the stem, leading to a conservation of N coming from the leaf remobilization before its redistribution at the end of the cycle to meet the needs of N for the seed formation and filling. At cellular level, a high N remobilization in leaf is associated with a high proteolysis of soluble and thylakoid-bound proteins of chloroplasts. A high proteolysis is associated with a strong activity of cysteine, serine and aspartic proteases at acidic pH, suggesting a crucial role of vacuolar proteases in relation with an important cellular trafficking (autophagy, senescence-associated vacuoles and/or CV-containing vesicles). *A contrario*, between bolting stage and the formation of siliques, N remobilisation is not limited by proteolysis, but by a defect in the degradation/export of peptides and thylakoid-bound proteins and/or by deficient processes related to detoxication/export of ammonium. In addition, our results highlight that the degradation rate of the D1 protein (a thylakoid-bound protein of the photosystem II) at abscission could be a relevant indicator of leaf N remobilization efficiency.
