

**Université de Caen Normandie**

Ecole doctorale Normande, Biologie Intégrative, Santé et Environnement

**Thèse de doctorat**

présentée et soutenue le : 15/03/2016

par

**Anne Maillard**

pour obtenir le

**Doctorat de l'Université de Caen Normandie**

**Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions**

**Adaptations des végétaux à un environnement minéral fluctuant :  
mécanismes impliqués et interactions entre nutriments**

Directeur de thèse : Alain Ourry  
Co-encadrant : Sylvain Diquélou

**Jury**

Philippe Hinsinger, Directeur de recherche, INRA, Montpellier (rapporteur)  
Sébastien Thomine, Directeur de recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette (rapporteur)  
José María García-Mina, Professeur, Université de Navarre, Espagne  
Jean-Claude Yvin, Directeur de recherche R&D, Centre Mondial d'Innovation, Saint-Malo

.....  
Alain Ourry, Professeur, Université de Caen Normandie, Caen (directeur de thèse)  
Sylvain Diquélou, MCU, Université de Caen Normandie, Caen (Co-encadrant)



**Université de Caen Normandie**

Ecole doctorale Normande, Biologie Intégrative, Santé et Environnement

**Thèse de doctorat**

présentée et soutenue le : 15/03/2016

par

**Anne Maillard**

pour obtenir le

**Doctorat de l'Université de Caen Normandie**

**Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions**

**Adaptations des végétaux à un environnement minéral fluctuant :  
mécanismes impliqués et interactions entre nutriments**

Directeur de thèse : Alain Ourry  
Co-encadrant : Sylvain Diquélou

**Jury**

Philippe Hinsinger, Directeur de recherche, INRA, Montpellier (rapporteur)  
Sébastien Thomine, Directeur de recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette (rapporteur)  
José María García-Mina, Professeur, Université de Navarre, Espagne  
Jean-Claude Yvin, Directeur de recherche R&D, Centre Mondial d'Innovation, Saint-Malo

.....  
Alain Ourry, Professeur, Université de Caen Normandie, Caen (directeur de thèse)  
Sylvain Diquélou, MCU, Université de Caen Normandie, Caen (Co-encadrant)



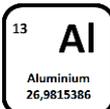
# Remerciements

---

*Cette thèse est l'aboutissement de nombreuses contributions et j'espère réussir à remercier dans ces quelques pages chaque personne ayant participé à son élaboration. A l'image du manuscrit, la liste des éléments essentiels, ayant contribué de près ou de loin, est longue et sans doute non exhaustive...*



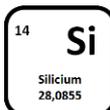
**P**our commencer, je tiens à remercier Alain Ourry, mon directeur de thèse et Sylvain Diquélou, mon co-encadrant sans qui cette thèse ne serait pas.



**Al**ain, merci de m'avoir fait confiance lors du recrutement, de m'avoir encouragé à entreprendre une thèse puis de m'avoir soutenue et aiguillée tout au long de cette expérience. J'ai apprécié chacun de tes conseils et de tes encouragements, me transmettant ton optimisme et ton envie d'avancer, d'agir, d'écrire. Merci également pour ton implication de tout instant et ta disponibilité.



**S**ylvain, merci pour ton soutien indéfectible et tes précieux conseils tout au long de cette thèse qui m'ont aidé à surmonter bien des difficultés, ta disponibilité pour tous les points-questions improvisés. Merci aussi pour ton aide sur l'ICP-MS lorsque celle-ci refusait de coopérer. Alain, Sylvain, ce fut un véritable plaisir de travailler avec vous.



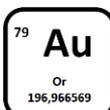
**Si**ncères remerciements à tous les membres du jury pour leur évaluation de ce manuscrit. Je suis très honorée que Philippe Hinsinger et Sébastien Thomine aient accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse et les en remercie. Je souhaite également exprimer ma gratitude à Jean-Claude Yvin et José María García-Mina pour avoir accepté de prendre part au jury.



**C**es remerciements s'adressent également à tous les partenaires du projet Sérapis pour leur écoute attentive et leur intérêt lors des réunions de pilotage ainsi que pour leurs conseils toujours pertinents. Merci également de nous avoir permis de vérifier la génécité de l'indicateur [Mo]:[S] chez de nombreuses espèces cultivées en nous fournissant directement les échantillons demandés. Je remercie en particulier le CMI, coordinateur du projet Serapis sans qui aucun de ces travaux n'aurait pu voir le jour. Merci à Jean-Claude Yvin et Mustapha Arkoun pour tous vos conseils. Merci également à Marion Randu et Frank Jamois pour les minéralisations de nombreux échantillons et à José María García-Mina pour l'analyse des éléments minéraux par ICP-OES.



**C**ette thèse a été réalisé au sein de l'UMR INRA-UCBN Écophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions NCS. Je souhaite donc remercier Marie-Pascale Prud'homme et Philippe Lainé pour leur accueil au laboratoire où ils ont su créer un cadre de travail favorable.



**Au** cours de ces trois années, j'ai pu bénéficier des formations proposées par l'école doctorale EdNBISE et l'en remercie. Je la remercie également pour les aides financières accordées qui m'ont permis de participer à une école jeunes chercheurs en métallomique à l'Université de Copenhague. J'en profite pour remercier Soren Husted pour m'avoir



accueilli au sein de son laboratoire, afin de me familiariser avec les multiples techniques cousines de l'ICP-MS-HR telles que l'ICP-MS Quadripôle, l'ablation laser, etc... Merci également au fond Jean & Marie-Louise Dufrenoy pour m'avoir permis de présenter mes travaux à un congrès international.

**85 At** Astatine 209,9871  
 Tous les chercheurs du labo, merci pour leur disponibilité envers tous les doctorants (qu'ils les encadrent ou non). Pour commencer, merci Jacques pour toutes les discussions scientifiques que nous avons partagées, ainsi que pour tes compétences de biologiste moléculaire qui m'ont souvent aidées. Merci également pour ta patience lorsque j'envahissais le bureau de Sylvain (et le tien !) avec mes multiples interrogations. Je souhaite également te remercier Philippe E. pour tes conseils avisés tout au long de cette thèse et d'avoir si souvent participé à mes réunions d'avancement. Merci également de m'avoir confié une première évaluation d'article.

**92 U** Uranium 238,02891  
 Un grand merci à tous les autres chercheurs : Philippe L., Sophie B-M., Jean-Christophe, Frédéric, Emmanuelle, Marie-Pascale, Jean-Bernard, Annette et Servane d'avoir enrichi cette thèse au cours de nombreuses discussions.

**79 Au** Or 196,966569  
 Au cours de cette thèse, j'ai également bénéficié de nombreuses aides techniques qui ont participé à l'aboutissement de ces travaux. Merci Anne-Françoise d'avoir veillé sur des bacs entiers de colza Bohème et d'avoir jonglé entre les 14 solutions nutritives requises. Merci également aux collègues toujours nombreux lors des récoltes (notamment lors de l'une d'elle qui ne s'est achevée qu'à 2 heures du matin, ou une autre un 27 décembre...) : Alain, Sylvain, Vincent, Elise, Thaïs, Philippe, Anne-Françoise, Magali, Josiane, Josette, Bénédicte, Frédérine, Julie, Jacques, Caroline, Marine, Alexandra, Julie E. et la famille Ourry (Valérie, Morgane et Valentin). Merci également à M. Chédeville, d'avoir mis à disposition l'une de ses parcelles pour la mise en place de l'essai au champ et d'avoir accepté les contraintes liées à cette expérimentation, y compris celle consistant à la laisser sans fertilisation.

**92 U** Uranium 238,02891  
 Un grand merci également à Magali, Josiane et Bénédicte pour les quelques centaines d'échantillons broyés avant analyse. Merci à Magali et Josiane, véritables points de repères dans le labo, pour leur aide de chaque instant. Merci Dominique pour ton ingéniosité, de l'ouverture des bouteilles de gaz à la construction des quelques 12 portoirs à partir de simples planches en passant par le portique pour l'eau Milli-Q ; toutes tes petites astuces m'ont grandement facilité le travail. Je tiens également à remercier Julie pour ton apprentissage de quelques techniques de biologie moléculaire, mains et doigts gelés. Merci Sophie d'avoir démêlé les problèmes administratifs et à Patrick pour les relevés en serre ainsi que pour la résolution des bugs informatiques.

**5 B** Bore 10,811  
 Bien sûr, je remercie également l'ensemble du plateau Platin' qui forme une belle équipe : Marie-Paule et Frédérine pour toutes les analyses IR-MS, ainsi que pour les discussions partagées autour de nos machines, jouant souvent les Sherlock Holmes pour identifier la nature du problème. Je tiens également à remercier Josette, la reine des micropesées, pour tous les échantillons pesés et toutes les pauses café partagées.

**9 F** Fluor 18,9984032  
 Fanny, Frédérine, je vous laisse les clés de l'ICP-MS : puisque celle-ci démarre à la clé ! Les sursauts à l'ouverture des portes ne s'arrêteront pas à mon départ !

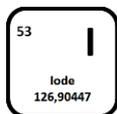




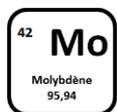
our finir, je n'oublie pas de remercier l'ensemble des doctorants avec lesquels j'ai partagé cette thèse au quotidien sans qui cette belle aventure n'aurait pas été la même, entre travail, pauses cafés et soirées inoubliables. Merci aux anciens, à commencer par Philippe qui a su nous montrer la voie tête baissée, toujours de bon conseil. Vincent avec qui j'ai partagé de nombreuses cultures, données et prises de tête mais aussi (et surtout !) pleins de bons moments au cours de la thèse et lors de tes petites visites sur Hubert-Folie ! Alex, merci pour tous tes délires et ton grain de folie. Merci Caroline, pour toutes tes visites dans le bureau n°2 et les papotages en tout genre, tous les moments partagés que nous aurons plaisir à prolonger ! Bien sûr, merci à mes coloc's de bureau, les Sérapiettes, Elise et Thaïs, avec qui j'ai partagé tant de bons moments au labo et en dehors : entre sushis et autres restos, rédaction, piscine, terrain, cultures, Canada, manips, RU, soirées, Grèce, shopping et tant d'autres... La liste de souvenir est longue de jolis moments d'amitié et n'est pas encore terminée ! A tous les docs du bureau n°1, bonne continuation pour la suite de vos thèses ! Marine, merci pour toutes tes petites attentions qui ont su me toucher. Bon courage Elise, pour la lutte contre Max, merci également aux nouveaux : Maxence, Emilie et Cylia qui ne le sont plus vraiment ! Sans oublier Aurélia, qui fait bien entendu partie de la bande des docs ! Au final, merci à vous tous, ces trois ans sont à l'origine de belles amitiés ! Bonne continuation à tous et bonne route à ceux qui s'envolent vers de nouvelles aventures !



ne pensée également pour Flora, Audrey, Cédric, Jocelin, Ioanna, David, Fabien, Cécile, Elodie, Christine, Flamme et tous les autres avec qui j'ai partagé des moments entre parenthèses comme la semaine au ski ou en Espagne !



Il me reste à remercier ma famille à qui je dois beaucoup. Papa, Maman, merci de m'avoir accompagné dans mes choix, de m'avoir toujours soutenu et encouragée tout au long de mes études, d'avoir cru en mes capacités. Merci également d'avoir relu quelques chapitres, pas forcément des plus faciles. Hélène, merci de m'avoir changé les idées, d'avoir toujours été là pour moi, toujours protectrice envers la p'tite dernière ! Le rôle de maman te va comme un gant ! Merci également aux Méheut, à Yvonne et à Mathilde pour votre bienveillance et pour toujours avoir été attentifs à l'avancée de ma thèse.



Un dernier mot est pour toi, Manuel. Merci de m'avoir rejoint sur Caen après seulement quelques semaines loin de moi en laissant derrière toi travail, famille et amis. Merci d'avoir été à mes côtés tout au long cette aventure forte en émotion ! Merci pour tout !



# Table des matières

---

Remerciements.....	i
Table des matières.....	iv
Table des figures.....	viii
Table des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations.....	xvi

## CHAPITRE I Introduction générale ..... 1

## CHAPITRE II Synthèse bibliographique ..... 5

### I. Le ionome ..... 5

#### I.1. La ionomique ou l'étude du ionome ..... 5

#### I.2. Les éléments essentiels et bénéfiques pour la croissance des végétaux..... 6

#### I.3. Fonctions et mécanismes physiologiques concernés (Figure II.1) ..... 7

##### I.3.1. Structure de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique..... 7

##### I.3.2. Synthèse des protéines ..... 8

##### I.3.3. Structure de l'ADN ..... 9

##### I.3.4. Photosynthèse..... 9

##### I.3.5. Respiration ..... 10

##### I.3.1. Régulation de la turgescence cellulaire..... 10

### II. Stratégies d'acquisition et de gestion des ressources minérales chez les végétaux..... 11

#### II.1. Stratégie d'acquisition des ressources minérales ..... 12

##### II.1.1. Par augmentation de la prospection racinaire..... 12

###### II.1.1.a. Multiplication des poils racinaires..... 12

###### II.1.1.b. Développement de la racine primaire et des racines latérales ..... 13

##### II.1.2. Par modification de la rhizosphère par les racines..... 15

##### II.1.3. Par régulation de l'absorption racinaire des éléments minéraux..... 16

###### II.1.3.a. L'absorption des anions monovalents (Figure II.12)..... 17

###### II.1.3.b. L'absorption des anions bivalents (Figure II.13)..... 19

###### II.1.3.c. L'absorption des cations monovalents (Figure II.14) ..... 20

###### II.1.3.d. L'absorption des cations bivalents (Figure II.15)..... 21

###### II.1.3.e. L'absorption du B sous forme de molécule neutre ..... 23

#### II.2. Mise en réserve et remobilisation des ressources ..... 24

##### II.2.1. Mise en réserve ..... 25

##### II.2.2. Remobilisation selon la mobilité dans le phloème..... 25

###### II.2.2.a. Eléments hautement mobiles dans le phloème..... 26

###### II.2.2.b. Eléments à mobilité modérée dans le phloème ..... 26

###### II.2.2.c. Eléments non mobile dans le phloème ..... 27

##### II.2.3. Remobilisation selon les stades de développement ..... 28

###### II.2.3.a. Remobilisation au stade végétatif..... 28

###### II.2.3.b. Remobilisation associée à la sénescence durant le stade reproducteur..... 29



<b>III. Interactions entre nutriments et impact sur l'homéostasie minérale .....</b>	<b>30</b>
III.1. Au niveau du sol .....	30
III.2. Au niveau de l'absorption.....	31
III.3. Au niveau du métabolisme .....	32
<b>IV. Objectifs de la thèse et stratégies expérimentales.....</b>	<b>34</b>

## **CHAPITRE III Développement d'une méthode d'analyse du ionome par ICP-MS-HR37**

<b>I. Objectif de l'étude .....</b>	<b>37</b>
<b>II. Principe de l'ICP-MS-HR .....</b>	<b>38</b>
II.1. Système d'introduction de l'échantillon et de nébulisation .....	38
II.2. Formation des ions dans le plasma .....	38
II.3. Extraction et focalisation des ions.....	39
II.4. Séparation des ions et analyses .....	40
II.4.1. Secteur magnétique.....	40
II.4.2. Secteur électrostatique .....	41
II.4.3. Détection des ions .....	41
<b>III. Etalonnage de l'ICP-MS-HR.....</b>	<b>42</b>
III.1. Etalonnage et standards de référence.....	42
III.1.1. Standards externes .....	42
III.1.2. Standards internes.....	42
III.1.3. Standard de référence utilisé dans cette étude .....	43
III.2. Limite de détection et de quantification .....	43
<b>IV. Tests de fidélité et justesse .....</b>	<b>44</b>
IV.1. Fidélité .....	44
IV.2. Justesse .....	45
<b>V. Mise en œuvre de l'analyse .....</b>	<b>45</b>
V.1. Correction des interférences .....	45
V.2. Temps de lavage .....	47
V.3. Séquence analytique type.....	47
<b>VI. Préparation des échantillons .....</b>	<b>49</b>
VI.1. Minéralisation à blanc .....	50
VI.2. Détermination de la prise d'essai .....	50
VI.3. Choix des réactifs .....	52
VI.4. Durée de la minéralisation.....	53
VI.5. Impact de la filtration du minéralisât.....	53
VI.6. Protocole de minéralisation retenu .....	54



<b>CHAPITRE IV Remobilisation des nutriments durant la sénescence foliaire et modulation par une carence en nutriments .....</b>	<b>55</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>56</b>
<b>II. Materials and methods.....</b>	<b>58</b>
II.1. Harvesting leaves during senescence .....	58
II.2. Deficiencies under hydroponic conditions and plant harvests .....	58
II.3. Element analysis by mass spectrometry .....	59
II.4. Calculations and statistical analysis .....	59
<b>III. Results .....</b>	<b>60</b>
III.1. Changes in leaf dry weight and chlorophyll content in plants grown under field conditions .....	60
III.2. Changes in nutrient contents during leaf life span in plants grown under field conditions and estimated net remobilization .....	60
III.3. Alteration of <i>B. napus</i> growth during mineral deprivation or deficiency .....	63
III.4. Apparent nutrient remobilization in <i>B. napus</i> during mineral deprivation or deficiency .....	64
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>64</b>
IV.1. General patterns of nutrient accumulation and remobilization during leaf development .....	64
IV.2. Species dependence of nutrient remobilization efficiency .....	67
<b>CHAPITRE V Modification du ionome lors de carences nutritionnelles chez <i>Brassica napus</i> : une focalisation sur les interactions entre le molybdène et d'autres éléments</b>	<b>82</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>85</b>
<b>II. Materials and Methods .....</b>	<b>87</b>
II.1. Growth conditions of plants .....	87
II.2. Element analysis by mass spectrometry .....	88
II.3. RNA extraction .....	89
II.4. Reverse transcriptase (RT) and Q-PCR analysis .....	89
II.5. Replications and statistical analysis.....	90
<b>III. Results .....</b>	<b>90</b>
III.1. Some mineral nutrient deprivations in <i>B. napus</i> reduced growth but increased the uptake of other mineral nutrients .....	90
III.2. Effects of mineral nutrient deprivation on selected molybdate and sulfate transporters .....	91
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>92</b>
IV.1. Crosstalks identified in response to individual mineral nutrient deficiencies .....	92
IV.2. Increased Mo uptake in Cu and Zn-deficient plants: a consequence of disturbances in MoCo synthesis? .....	93
IV.3. Increased Mo uptake in S-, Fe-, Mn- and B-deficient plants: an indirect consequence of up-regulation of root sulfate transporters .....	94
<b>V. Conclusion.....</b>	<b>96</b>



<b>CHAPITRE VI Le transport racinaire aspécifique de nutriments permet de développer des indicateurs précoces de la nutrition minérale : le cas du molybdate et du sulfate .....</b>	<b>97</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>100</b>
<b>II. Materials and Methods .....</b>	<b>102</b>
II.1. Hydroponic experiments and tissue sampling .....	102
II.2. Field experiments and plant sampling.....	103
II.2.1.Study of different fertilization rates on an S deficient field .....	103
II.2.2.Study of 45 commercial crops before fertilization and flowering .....	104
II.3. Multispecies experiment under controlled conditions .....	104
II.4. Element analysis by mass spectrometry .....	105
II.5. Reverse transcription (RT) and q-PCR analysis .....	105
II.6. Statistical analysis .....	106
<b>III. Results .....</b>	<b>107</b>
III.1. S deprivation reduced S, N, K, Ca, B and Na uptake but strongly increased Mo uptake .....	107
III.2. S deprivation strongly and immediately increased uptake of Mo without induction of molybdate transporter genes. ....	107
III.3. In leaves of S-deprived plants, Mo and S contents changed in opposite ways .....	108
III.4. Under field conditions, lower S availability increased leaf Mo content and hence the [Mo]:[S] ratio .....	108
III.5. Test of genericity of the [Mo]:[S] ratio as S-deficiency indicator .....	110
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>110</b>
IV.1. Perturbations of Mo homeostasis by non-specific transport of molybdate and sulfate .....	110
IV.2. A potential indicator derived from early molecular events .....	112
 <b>CHAPITRE VII Discussion générale et perspectives.....</b>	 <b>117</b>
<b>I. Discussion générale .....</b>	<b>117</b>
<b>II. Perspectives de recherche et de développement .....</b>	<b>130</b>
II.1. Perspectives de recherches au niveau fondamental .....	130
II.2. Perspectives de développement .....	133
 <b>Références bibliographiques.....</b>	 <b>135</b>
 <b>Annexe I Procédure de Mise en route journalière de l'ICP-MS-HR.....</b>	 <b>152</b>
<b>Annexe II Méthode d'analyse de 18 isotopes d'intérêt .....</b>	<b>161</b>
<b>Annexe III Préparation des solutions étalons .....</b>	<b>162</b>
<b>Annexe IV Procédure de minéralisation .....</b>	<b>163</b>



## Table des figures

---

### CHAPITRE II. Synthèse bibliographique

---

Figure II.1. Implication des éléments minéraux dans les grandes fonctions de la cellule végétale.

Figure II.2. Liaisons chimiques entre pectines au sein de la paroi cellulaire végétale : (A) interaction avec le calcium et (B) liaison borate-diol ester entre deux molécules de Rhamnogalacturonane-II (RG-II).

Figure II.3. Implication dans la phase claire de la photosynthèse des éléments essentiels. N (en rose), S (en vert clair), Ca (en jaune), Mg (en rouge), Fe (en vert foncé), Cu (en bleu), Zn (en bleu ciel) et Cl (en violet).

Figure II.4. Implication des éléments essentiels dans les principales étapes de la respiration : (A) glycolyse dans le cytosol et les plastes et cycle de Krebs, (B) transport d'électron dans la membrane interne de la mitochondrie.

Figure II.5. Evolution des caractéristiques de la production de blé depuis 1945 à l'IACR de Rothamsted. (A) Rendement en  $\text{tonne}\cdot\text{ha}^{-1}$ , (B) indice de récolte, (C) teneurs des grains (D) en Zn, (E) en Fe, (F) en Cu et (G) en Mg en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Figure II.6. Gradients d'éléments nutritifs et formation de microsites enrichis en nutriments dans les sols. (A) Spatialisation des gradients, (B) zone rhizosphérique appauvrie, et (C) microsites enrichis en Fer.

Figure II.7. La disponibilité en P joue sur la densité des poils racinaires chez *Arabidopsis*.

Figure II.8. Synthèse des principaux effets de différentes carences minérales sur l'architecture du système racinaire chez *Arabidopsis thaliana*.

Figure II.9. Réponses du système racinaire d'*Arabidopsis* à différents apports nutritifs.

Figure II.10. Modulation du développement racinaire du lupin en réponse à une faible disponibilité en phosphate.

Figure II.11. Changement de pH induit par les racines de *Nicotiana tabacum* L. soumis à une limitation en Fe.

Figure II.12. Principaux transporteurs de P (en bleu), de N (en rose) et de Cl (en jaune) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale.

Figure II.13. Principaux transporteurs de S (en orange), de Se (en jaune) et de Mo (en bleu) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale.

Figure II.14. Principaux transporteurs de K (en bleu), de Na (en vert) et de Ca (en jaune) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale.



Figure II.15. Principaux transporteurs de Fe (en vert), de Zn (en bleu foncé), de Cu (en bleu ciel), de Mn (en orange), de Mg (en rouge), de Ca (en jaune) et de Ni (en violet) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale.

Figure II.16. Transition puit/source au niveau cellulaire durant la sénescence.

Figure II.17. Interactions génétiques, physiologiques et chimiques entre éléments.

### CHAPITRE III. Développement d'une méthode d'analyse du ionome par ICP-MS-HR

---

Figure III.1. Schéma du trajet des ions dans l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Figure III.2. (A) Photographie du système d'introduction de l'échantillon liquide de l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) composé d'un nébuliseur pneumatique de type flux croisés entre l'argon et l'introduction de l'échantillon liquide et d'une chambre de nébulisation cyclonique. (B) Distribution du diamètre des gouttelettes en sortie de chambre de nébulisation.

Figure III.3. Schéma de l'assemblage : injecteur, torche, bobine d'induction et interface composée de l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Figure III.4. Schéma du système de lentilles de transfert de l'ICP-MS-HR permettant l'accélération et la focalisation des ions depuis la sortie de l'interface jusqu'à la fente d'entrée du secteur magnétique (Element 2, Thermo Fisher).

Figure III.5. Double focalisation des ions en ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) obtenue par la combinaison d'un champ magnétique exercé par l'aimant et d'un champ électrique exercé par le secteur électrostatique constitué de deux électrodes parallèles.

Figure III.6. Schéma du principe du multiplicateur d'électrons secondaires (SEM) de l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher), en bleu le trajet des électrons.

Figure III.7. Exemples de droite d'étalonnage du  $^{24}\text{Mg}$  et du  $^{111}\text{Cd}$  analysés en moyenne et basse résolution respectivement en utilisant le  $^{71}\text{Ga}$  et le  $^{103}\text{Rh}$  respectivement comme standard interne obtenues par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Figure III.8. Effet du choix du standard interne :  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{103}\text{Rh}$  ou  $^{209}\text{Bi}$  sur l'intensité relative en % du signal du  $^{98}\text{Mo}$  par la correction de l'effet de matrice analysé par ICP-MS (Thermo Electron X Series II, Thermo Elemental, Winsford, England) (Masson *et al.*, 2010).

Figure III.9. Représentation symbolique des paramètres généraux d'évaluation de la qualité : la fidélité, la justesse et l'exactitude.

Figure III.10. Séparation des signaux de l'isotope du  $^{56}\text{Fe}$  (en vert) et des interférences polyatomiques (en noir) de masse 56 à différentes résolutions : (A) basse résolution (LR, 300), (B) moyenne résolution (MR, 4 000), (C) et haute résolution (HR, 10 000).



Figure III.11. Détermination du temps de lavage nécessaire à la décroissance de l'intensité cumulée en coups par seconde pour le  $^{95}\text{Mo}$ ,  $^{98}\text{Mo}$ ,  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{68}\text{Zn}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{44}\text{Ca}$  et  $^{56}\text{Fe}$  après analyse d'un standard de feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves – Sylab).

Figure III.12. Diagramme de mise en œuvre d'une analyse en ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) et outils logiciels utilisés (cadres bleus).

Figure III.13. Concentrations en  $\mu\text{g.l}^{-1}$  des macro-éléments (A) et des micro-éléments (B) dans les blancs minéralisés en réacteurs en téflon préalablement minéralisés à blanc (barre blanche) ou en réacteurs juste lavés à l'eau (barre grise) mesurés par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Figure III.14. Teneurs obtenues 20 et 40 mg de prise d'essai exprimées en % des teneurs certifiées (Justesse) des feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab) mesurés par ICP-MS HR (Element 2, Thermo Fisher).

Figure III.15. Détermination du pouvoir oxydant de quatre combinaisons d'acides pour la minéralisation de feuilles de citronnier (CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves – Sylab):  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HNO}_3 : \text{HCl}$  85 : 15,  $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$  8 : 2,  $\text{H}_2\text{O} : \text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$  5 : 4 : 1.

Figure III.16. Teneurs mesurées par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) d'échantillons digérés avec un cycle de minéralisation de 23 min et de 43 min exprimées en % des teneurs certifiées des feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab).

Figure III.17. Teneurs mesurées par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) dans des minéralisats filtrés par filtres Whatman n°4, filtres en téflon ou non filtrés exprimées en % des teneurs certifiées des feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab).

#### *CHAPITRE IV. Remobilisation des nutriments durant la sénescence foliaire et modulation par une carence en nutriments*

---

Figure 1. Changes in whole leaf-blade biomass (A,B) and chlorophyll content(C,D) during the leaf life span (days after leaf emergence) of *Q. robur* (A,C) and *Z. mays* (B,D).

Figure 2. Changes in nitrogen and potassium (A,B), sulfur and phosphorus (C,D) and calcium and manganese (E,F) contents in leaves during their leaf life span in *Q. robur* (A,C,E) and *Z. mays* (B,D,F).

Figure 3. Apparent nutrient remobilization (ANR) of macronutrients (A,B): N, K, P, S, Ca, Mg, and micronutrients (C,D): Zn, Fe, Mn, B, Ni, Cu, and Mo, expressed as % of maximum



nutrient content during leaf senescence in three tree species; *Q. robur*, *P. nigra*, *A. glutinosa* and five crop species: *Z. mays*, *T. aestivum*, *H. vulgare*, *P. sativum* and *B. napus*.

Figure 4. Dry weight of young petioles, young leaves, mature petioles, mature leaves, and roots of *Brassica napus* L. at  $t = 0$  and after 30 days of culture in control plants and in N, P, S, K, Mg, Ca, Zn, Mo, Cu, Ni, Fe, B, or Mn deficient plants.

Figure 5. Sulfur (A), calcium (B), copper (C), and zinc (D) contents per plant in hydroponically grown *Brassica napus* subjected to S, Ca, Cu, and Zn deficiency, respectively.

Figure 6. Apparent nutrient remobilization (ANR), expressed as % of maximum nutrient content in leaves of *B. napus* grown under field condition (calculated from Equation (3) given in material and methods,  $n=12$  or  $15$  depending on the nutrient) or in mature leaves of hydroponically grown plants (calculated from Equation (4) given in Material and Methods,  $n=16$ ) subjected to individual nutrient deficiency.

#### *CHAPITRE V. Modification du ionome lors de carences nutritionnelles chez Brassica napus : une focalisation sur les interactions entre le molybdène et d'autres éléments*

---

Figure 1. Crosstalks between deprivation of one nutrient (N-, K-, P-, Ca-, S-, Mg-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn-, Mo- or B-deprivation) through stimulation of relative uptake (as % of uptake by control plants) of other nutrients (N, K, P, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B and Na).

Figure 2. Relative Mo uptake (A, as % of control plants, for which Mo uptake was  $940 \pm 32 \mu\text{g Mo plant}^{-1}$ ) and leaf Mo content (B,  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW) in *B. napus* in response to Mo-, S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- or B-deprivation.

Figure 3. Effect of Mo-, S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- and B-deprivation on relative expression of genes encoding the molybdate transporters *BnaMot1* (A) and *BnaAsy* (B) expressed in roots and on relative expression of a key gene involved in the MoCo synthesis pathway, *BnaCnx1* (C) expressed in old leaves (data given as % of control plant expression).

Figure 4. Effect of Mo-, S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- or B-deprivation on relative expression of genes encoding sulfate transporters *BnaSultr1.1* (A) and *BnaSultr1.2* (B) expressed in roots of *B. napus* as % of control plants.

Figure 5. Relative sulfur uptake in *B. napus* expressed as % of control plant values in response to S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- or B-deprivation.

Figure 6. Crosstalk between S, Fe, B, Mn, Cu, Zn and Mo during MoCo synthesis.



## CHAPITRE VI. Le transport racinaire aspécifique de nutriments permet de développer des indicateurs précoces de la nutrition minérale : le cas du molybdate et du sulfate

---

Figure 1: Change in whole plant biomass (g DW plant<sup>-1</sup>) of *B. napus* L. in control (+S, black line), and S-deprived (-S, dashed line) plants during the 28 days of the experiment.

Figure 2: Changes in uptake of macro (N, P, K, S, Ca and Mg) and micronutrients (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B and Na) in *B. napus* after 21 days of S deprivation.

Figure 3: (A) Cumulated S and (B) Mo contents (mg plant<sup>-1</sup>) in *B. napus* control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants. (C) Kinetic of the [Mo]:[S] ratio in *B. napus* from control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants. (D) Effect of S deprivation on relative expression of root transporters: *BnaSultr1.1*, *BnaSult2.1*, *BnaAsy* and *BnaMot1* genes expressed in % of control plants. The insert provides the correlation between Mo uptake and the relative expression of *BnaSultr1.1*.

Figure 4: Kinetic of (A-B) S and (C-D) Mo contents (mg g<sup>-1</sup> DW) and (E-F) the [Mo]:[S] ratio in emerged (on the left) and new emerging (on the right) leaves of *B. napus* from control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants.

Figure 5: (A, B, C) S content (mg g<sup>-1</sup> DW), (D, E, F) Mo content (µg g<sup>-1</sup> DW) and (G, H, I) the [Mo]:[S] 10<sup>4</sup> ratio (to simplify reading the [Mo]:[S] ratio is presented with a multiplier factor of 10<sup>4</sup>) in mature leaves of *B. napus* grown under field conditions after (A, D, G) 15 and (B, C, E, F, H, I) 47 days of fertilization.

Figure 6: Classification of 45 commercial oilseed rape crops from different locations in France (see Supplemental data SD1) according to their [Mo]:[S] 10<sup>4</sup> ratio in mature leaves quantified before flowering and S fertilization.

## CHAPITRE VII. Discussion générale et perspectives

---

Figure VII.1. Schéma conceptuel des principales stratégies utilisées par les plantes supérieures en réponse à une carence minérale comprenant la stimulation de l'activité des transporteurs racinaires, la modulation de l'architecture racinaire, la modification de la rhizosphère par l'exsudation racinaire et enfin la remobilisation entre organes des ressources stockées.

Figure VII.2. Bilan de masse élémentaire d'une feuille au cours de son développement traduisant trois types possible de remobilisation des éléments minéraux.

Figure VII.3. Interactions entre éléments induites par une carence nutritionnelle en un élément (N, K, P, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo ou B) à travers la stimulation ou la diminution de



l'absorption relative des autres nutriments (N, K, P, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B et Na).

Figure VII.4. Le ratio [Mo]:[S] présente plusieurs avantages et inconvénients.

### *Annexes*

---

Figure A-I.1. Schéma de mise en route de l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Figure A-I.2. Courbe de calibration en masse (A) non optimisée (certaines masses ont été mal assignées, assignation à une interférence voisine ou à un isotope voisin) puis (B) optimisée, chaque pic est correctement identifié, en moyenne résolution sur l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Figure A-IV.1. Cycle de minéralisation micro-onde (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) choisi.



## Table des tableaux

---

### CHAPITRE II. Synthèse bibliographique

---

Tableau II.1. Découverte de l'essentialité des éléments minéraux (Barker and Pilbeam, 2006).

Tableau II.2. Dénombrement par approches bioinformatique des protéines contenant des éléments métalliques ou se liant à des éléments métalliques chez *Arabidopsis thaliana* (Gladyshev *et al.*, 2004).

Tableau II.3. Principales modalités utilisées par les végétaux pour modifier la rhizosphère et augmenter la phytodisponibilité des nutriments (Marschner, 2011).

### CHAPITRE III. Développement d'une méthode d'analyse du ionome par ICP-MS-HR

---

Tableau III.1. Droite de calibration utilisées pour la quantification de 20 des isotopes analysés par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) et taux de résolution choisi (LR, MR, HR, faible, moyenne et haute résolution, respectivement).

Tableau III.2. Potentiel d'ionisation (eV) et limites de détection et de quantification des isotopes d'intérêt par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Tableau III.3. Evaluation de la répétabilité de la mesure pour les éléments traces : Co, Ni, Cu, Mo, Se, Cd et Pb et pour les éléments majeurs : B, Na, Mg, P, S, K, Ca, Mn et Fe par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Tableau III.4. Méthodes de minéralisation d'échantillons végétaux utilisées dans la littérature.

Tableau III.5. Teneurs en S, K et Ca en ppm des feuilles de citronnier certifiées des feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves – Sytab) minéralisées en réacteur en téflon préalablement minéralisés à blanc ou en réacteurs lavés à l'eau mesurées par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Tableau III.6. Composition du verre des réacteurs en % de la masse donnée sous la forme d'oxydes des éléments présents.

Tableau III.7. Coefficient de variation des analyses obtenues avec 4 répétitions pour 20 mg de prise d'essai ou 40 mg par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).



*CHAPITRE V. Modification du ionome lors de carences nutritionnelles chez Brassica napus : une focalisation sur les interactions entre le molybdène et d'autres éléments*

---

Table I. Accession number and Q-PCR primer sets. *EF1-α* and *18S rRNA* were housekeeping genes used for relative gene expression by Q-PCR analysis.

Table II. Effects of N-, K-, Ca-, P-, S-, Mg-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn-, Mo- or B-deprivation on relative biomass production (as % of control plants) and relative uptake (as % of control plants) of the respective nutrients.

*CHAPITRE VI. Le transport racinaire spécifique de nutriments permet de développer des indicateurs précoces de la nutrition minérale : le cas du molybdate et du sulfate*

---

Table I: Accession number and Q-PCR primer sets. *EF1-α* and *18S rRNA* were housekeeping genes used for relative gene expression by Q-PCR analysis.

Table II: Sulfur content (mg g<sup>-1</sup> DW) and Mo content (μg g<sup>-1</sup> DW) and the [Mo]:[S] ratio in leaves of *B. napus*, *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *P. sativum* and *S. lycopersicum* following different S treatments (+S: control treatment, -S: S deficiency treatment) to plants grown under controlled conditions (given in Supplemental Data SD3).

Table III (provisional): Data extracted from the Purdue ionomics information management system related to S and Mo contents in lines (Line median in μg g<sup>-1</sup>) of the *Arabidopsis* single mutant KO, *Atsultr1.1* or *Atsultr1.2*, and of the *Arabidopsis* double mutant KO, *Atsultr1.1-1.2*, and in wild type (Background median in μg g<sup>-1</sup>).

*Annexes*

---

Tableau A-II.1. Paramètres de la méthode d'analyse de 18 isotopes par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Tableau A-III.1. Composition et fabrication des solutions étalons pour le dosage de 18 isotopes par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).



## Liste des abréviations

---

### --- A ---

ABA : acide abscissique  
ABC : ATP-Binding Cassette  
ACF : Analogic Conversion Factor  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADP : adénosine diphosphate  
AMT : ammonium transporter  
AN : analogique  
ARN : acide ribonucléique  
ASY : abnormal shoot in youth  
ATM : ABC Transporters of the  
Mitochondria  
ATP : adénosine triphosphate

### --- B ---

B : champ magnétique  
BOR : boron transporter

### --- C ---

CAX : calcium / cations exchanger  
CCC : Ca<sup>2+</sup>-sensitive cross complementer  
CDF : Cation Diffusion Facilitator  
CLC : chloride channel  
CLIC : chloride intracellular channel  
CMI : Centre Mondial d'Innovation  
CNRS : Centre National de la Recherche  
Scientifique  
CNX : cofactors of nitrate reductase and  
xanthine dehydrogenase  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
COPT : Copper transporter  
cPMP : cyclic pyranopterin monophosphate  
cps : coups par secondes  
CRM : certified reference material

Ct : cycle threshold  
CV : coefficient de variation  
cv : cultivar  
Cyt : cytochrome

### --- D ---

DACC : depolarization-activated cation  
channels  
DKO : double knockout  
DW : dry weight

### --- E ---

E : différence de potentiel  
Ec : énergie cinétique  
EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetic acid  
Ei : potentiel d'ionisation  
ESA : Ecole Supérieure d'Agricultures  
eV : Électron-volt  
EVA : Ecophysiologie Végétale, Agronomie  
& nutritions N.C.S.

### --- F ---

F<sub>B</sub> : force magnétique  
F<sub>c</sub> : force centrifuge  
F<sub>e</sub> : force électrostatique  
FEDER : Fonds européen de développement  
régional  
FRO : Ferric reductase oxidase  
FUI : Fonds unique interministériel

### --- G ---

GTP : guanosine triphosphate

### --- H ---

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène  
HACC : hyperpolarization-activated cation  
channels



HAK : high affinity K<sup>+</sup> transporters

--- M ---

HCl : acide chlorhydrique

m : masse de l'ion

HG : homogalacturonane

MAR : Multiple Antibiotic Resistance

HKT : high-affinity K<sup>+</sup> transporters

mARC : mitochondrial amidoxime reducing  
component

HMA : Heavy Metal transporting P1B-type  
ATPases

MGT : magnesium transporter

HNO<sub>3</sub> : acide nitrique

MIP : major intrinsic protein

HR : haute résolution

MoCo : molybdenum cofactor

--- I ---

MOT : molybdenum transporter

ICln : nucleotide-sensitive chloride  
conductance regulator protein

MPT : molybdopterin

ICP-MS : inductively coupled plasma mass  
spectrometry

MR : medium resolution

ICP-OES : Inductively coupled plasma  
optical emission spectrometry

MRP : Multidrug Resistance-associated  
Proteins

INRA : Institut National de Recherche  
Agronomique

MTP : Metal Tolerance Protein

IREG : Iron Regulated Protein

MYB : myeloblastosis

IRT : Iron Regulated Protein

--- N ---

IUPAC : Union internationale de chimie pure  
et appliquée

NA : nicotianamine

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide  
hydrogen

--- K ---

K : Kelvin

NIP : nodulin-like intrinsic protein channel

KO : knockout

NPD : nitrate peptide

--- L ---

LCT : low-affinity cation transporter

NRAMP : Natural Resistance Associated  
Macrophage Protein

LEVA : Légumineuses, Ecophysiologie  
Végétale, Agroécologie

NRT : nitrate transporter

LIBS : Laser-induced breakdown  
spectroscopy ou spectroscopie sur  
plasma induit par laser

NSC : non-selective cation channels

--- O ---

LOD : limites de détection

OPT : oligopeptide transporter

LOQ : limites de quantification

--- P ---

LR : Low resolution

PAR : photosynthetically active radiation

LR : lateral roots ou racines latérales

PC : pulse counting

PDR : Pleiotropic Drug Resistance

PEP : polyéthylène téréphtalate

pH : Potentiel hydrogène

Pheo : phéophytine

PHR : phosphate starvation response



PHT : phosphate transporter  
 Pi : phosphate inorganique  
 PIC : permease in chloroplasts  
 PLATIN' : Plateau Isotopique de Normandie  
 PP : pyrophosphate  
 ppb : part per billion ( $10^{-9}$ )  
 ppm : partie par million ( $10^{-6}$ )  
 ppt : part per trillion ( $10^{-12}$ )  
 PR : primary root ou racine primaire  
 PS : phytosidérophores  
 PSI : photosystème I  
 PSII : photosystème II  
 --- Q ---  
 Q : quinone  
 Q-PCR : Quantitative Polymerase Chain  
 Reaction  
 --- R ---  
 RCB : Rubisco-containing body  
 RF : radiofréquence  
 RG-II : Rhamnogalacturonane-II  
 $r_m$  : rayon  
 ROS : espèces réactives de l'oxygène  
 rpm : rotation par minute  
 RSD : relative standard deviation  
 RT : Reverse Transcription  
 RuBisCO : ribulose-1,5-bisphosphate  
 carboxylase  
 --- S ---  
 SAG : senescence-associated genes  
 SAV : senescence-associated vacuoles  
 SEM : multiplicateur d'électrons secondaires  
 SHST : *Stylosanthes hamata* sulfate  
 transporter  
 SLAC/SLAH : slow anion channel associated  
 homologs  
 SM : Solution Mère  
 SOD : SuperOxyde Dismutase  
 STAS : sulfate transporter anti-sigma  
 SULTR : sulfate transporter  
 --- T ---  
 TOM : transporter of mugineic acid  
 --- U ---  
 U : tension  
 UCP : uncoupling protein  
 UQ : ubiquinone  
 --- V ---  
 v : vitesse  
 V : volts  
 VICC : voltage-independant cation channels  
 VIT : Vacuolar Iron Transporter  
 --- X ---  
 XRF : analyseurs de fluorescence à rayons X  
 --- Y ---  
 YS- YSL : Yellow Strip – YS like  
 --- Z ---  
 z : charge de l'ion  
 ZAT : zinc transporter  
 ZIP : zinc-regulated transporter



---

# **CHAPITRE I**

## **Introduction générale**

---





# CHAPITRE I

## Introduction générale

---

Pour assurer leur croissance et leur développement, les plantes doivent acquérir en quantité suffisante 14 éléments minéraux de la solution du sol : l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca), le soufre (S), le magnésium (Mg), le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B) et le chlore (Cl), tout en s'adaptant aux disponibilités fluctuantes des ressources minérales du sol (Williams et Salt, 2009). En cas de carence en l'un de ces éléments, non seulement le rendement mais aussi la qualité des produits récoltés peuvent être réduits (McGrath et Zhao, 1996). Une culture de colza (*Brassica napus* L.), l'une des principales espèces oléagineuses et par ailleurs l'espèce modèle de l'UMR EVA, requiert, comparativement aux céréales, de forts apports de fertilisants contenant de l'N, du K, du P, du S, du Mn ou encore du B pour atteindre de hauts rendements (Grant et Bailey, 1993). Par exemple, en cas de limitation en S, la composition protéique des graines est affectée. La faible disponibilité en acides aminés soufrés conduit à une accumulation de protéines de stockage pauvres en S (D'Hooghe *et al.*, 2014). La teneur en lipides des graines est également réduite en raison d'une plus faible accumulation des acides linoléiques et oléiques. Les carences en micro-nutriments, moins souvent considérées, peuvent présenter un impact également négatif sur le rendement du colza comme démontré pour le B (Mei *et al.*, 2009). Un apport de B, Zn et Mo augmente le contenu et la qualité de l'huile et diminue les teneurs en glucosinolates des grains. L'équilibre entre les différents éléments minéraux est également essentiel puisque le rendement est limité par le premier nutriment qui devient limitant (Grant et Bailey, 1993). L'apport d'un nutriment lorsqu'un autre est limitant va au mieux être inefficace, et au pire entraîner une réduction du rendement.

La qualité des productions végétales utilisées pour l'alimentation présente également des conséquences sur la consommation animale et humaine et potentiellement sur leur santé. Ainsi, il a été estimé que les carences en micronutriments, en particulier, Fe, Mg, Cu et Zn affectent plus de deux milliards de personnes tant dans les pays développés que dans les pays en voie de développement et elles résulteraient directement des faibles teneurs des tissus récoltés au sein des génotypes à haut rendement sélectionnés depuis les années 70 (Fan *et al.*, 2008).

Un prérequis pour améliorer les rendements et la qualité des produits récoltés repose sur la compréhension de l'ensemble des mécanismes contrôlant l'absorption des nutriments, leur transport, leur accumulation et leur remobilisation au sein de la plante.



La quantité d'un élément dans une plante peut être affectée par un grand nombre de facteurs tels que :

- (1) l'architecture racinaire de la plante,
- (2) son stade de développement (stade végétatif ou reproducteur),
- (3) les conditions régnant au sein de la rhizosphère, sous influence de la plante (acidification, exsudation de composés organiques) et des facteurs environnementaux (lessivage par la pluie, sécheresse...),
- (4) les capacités d'absorption de la plante *via* la régulation des transporteurs plus ou moins spécifiques impliqués,
- (5) les processus de remobilisation des nutriments au sein de la cellule ou entre organes, eux-mêmes affectés par le stade de développement de la plante et son environnement.

Un mécanisme particulier inhérent à l'un de ces facteurs peut affecter exclusivement un nutriment, comme par exemple la régulation d'un transporteur hautement spécifique. Cependant, les plantes sont le plus souvent sujettes à une modification globale de la composition minérale de leurs tissus (ou ionome) sous l'influence de multiples interactions à l'échelle d'un ou de plusieurs des facteurs précédemment cités.

Dans ce cadre, la compréhension des mécanismes et des réseaux de régulation impliqués dans la composition du ionome, ne peut être envisagée qu'au travers l'analyse combinée de plusieurs ou de l'ensemble des éléments minéraux requis par la plante. L'acquisition en 2012 au sein de la plateforme Platin' (Plateau d'Isotopie de Normandie) d'un spectromètre de masse haute résolution couplé à une torche plasma (ICP-MS-HR Element 2, Thermo Fisher) permet cette quantification simultanée de plusieurs éléments. Une part importante de mon travail d'ingénieur d'étude pour lequel j'ai été initialement recrutée visait à développer une méthode d'analyse encore indisponible au sein de l'UMR avec pour objectif de quantifier l'ensemble des éléments essentiels au sein des tissus végétaux.

Rapidement, la possibilité d'associer une thèse à ce travail d'ingénieur a émergé. Ce projet de recherche avait tout d'abord pour ambition de contribuer à la compréhension des stratégies de mise en réserve et de remobilisation potentiellement différentes selon les éléments. Dans un second temps, les interactions entre éléments au cours de l'absorption ont été étudiées en rejoignant progressivement les objectifs du projet Sérapis au sein duquel cette thèse s'insère, projet qui vise plus particulièrement à identifier un indicateur de la nutrition soufrée chez le colza.

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique faisant un bilan non exhaustif des connaissances actuelles portant sur les stratégies de gestion et d'acquisition des éléments minéraux par les plantes confrontées à une carence (Chapitre II). Cette analyse présente donc successivement



(i) le caractère essentiel des éléments minéraux pour les végétaux (ii) les stratégies d'acquisition des ressources minérales reposant soit sur une modification de l'architecture racinaire soit sur une modification de la rhizosphère par les racines ou encore sur une stimulation du réseau de transporteurs racinaires ; (iii) les mécanismes de remobilisation des ressources minérales préalablement stockées dans les tissus végétaux ainsi que (iv) les interactions entre éléments minéraux au cours de ces différents processus.

La méthode d'analyse par ICP-MS-HR de 12 éléments minéraux mise au point pour répondre aux objectifs de ce travail doctoral est ensuite présentée (Chapitre III). Cette méthode ayant nécessité de nombreuses mises au point, il paraissait pertinent de la décrire pour préciser les protocoles et démarches utilisés et constituer un recueil utile pour les utilisateurs à venir. Enfin, le volet recherche de mon travail doctoral dépendant étroitement de ce développement méthodologique, une bonne appréciation des possibilités et limites de cette technique constituait un préalable indispensable. Dans ce chapitre, les protocoles utilisés ainsi que les méthodes statistiques et techniques associées (conduites de culture, analyses moléculaires...) ne sont pas présentés, car décrits de façon détaillée dans les trois publications constituant la partie résultats de ce manuscrit.

Les résultats issus de ce travail sont ensuite présentés sous la forme de trois articles scientifiques (Chapitre IV - VI) :

**Maillard A, Diquélou S, Billard V, Laîné P, Garnica M, Prudent M, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A** (2015) Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Front Plant Sci* **6**: 317

**Maillard A., Etienne E., Diquélou S., Trouverie J., Yvin J.-C., Ourry A.** (2016) Nutrient deficiencies in *Brassica napus* modify the ionic composition of plant tissues: a focus on crosstalks between molybdenum and others nutrients. La soumission de ce manuscrit est actuellement conditionnée par les règles de confidentialité requises par un dépôt de brevet en cours.

**Maillard A. - Sorin E., Etienne E., Diquélou S., Trouverie J., Yvin J.-C., Ourry A.** (2016) Root unspecific transport of nutrient gives access to early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate. De façon identique, la soumission de ce manuscrit reste pour l'instant conditionnée par la confidentialité requise par un dépôt de brevet en cours.

Enfin, les principaux résultats repris de manière synthétique font l'objet d'une discussion générale afin de dégager de nouvelles perspectives de recherche (Chapitre VII).

Le projet SERAPIS, au sein duquel s'insère cette thèse de doctorat, regroupe trois unités de recherches : l'UMR INRA 950 EVA (Caen), l'UMR INRA 1347 Agroécologie (Dijon) et l'Unité



de Recherche LEVA du groupe ESA (Angers), ainsi que trois partenaires du secteur privé dont le Centre Mondial d'Innovation (CMI) du groupe Roullier (Dinard), les sociétés Anaximandre (Landerneau) et Végénov (Saint-Pol-de-Léon). Il est labellisé par deux pôles de compétitivité, VEGEPOLYS et VALORIAL, financé par le FUI, les FEDER et les régions Pays de Loire, Bretagne et Basse-Normandie. Il vise à optimiser les nutriments soufrée et azotée des végétaux selon différentes stratégies. L'une de celle-ci repose sur le développement d'un outil d'aide à la décision pour piloter la fertilisation S reposant sur des indicateurs de fonctionnement de la plante.

Mon activité d'ingénieur consistait également à favoriser au travers de différents partenariats, l'utilisation de l'ICP-MS-HR dans le cadre de plusieurs projets. Mon implication s'est traduite par ma participation à l'acquisition des résultats et/ou aux expérimentations ayant donné lieu aux articles suivants qui ne sont pas présentés dans ce manuscrit de thèse :

- Billard V, Ourry A, Maillard A, Garnica M, Coquet L, Jouenne T, Cruz F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Etienne P** (2014) Copper-Deficiency in *Brassica napus* Induces Copper Remobilization, Molybdenum Accumulation and Modification of the Expression of Chloroplastic Proteins. PLoS ONE **9**: e109889
- Billard V, Maillard A, Garnica M, Cruz F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A, Etienne P** (2015) Zn deficiency in *Brassica napus* induces Mo and Mn accumulation associated with chloroplast proteins variation without Zn remobilization. Plant Physiol Biochem **86**: 66–71
- Sorin E, Etienne P, Maillard A, Zamarreño A-M, Garcia-Mina J-M, Arkoun M, Jamois F, Cruz F, Yvin J-C, Ourry A** (2015) Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. J Exp Bot **erv321**
- Sorin E., Etienne P., Maillard A., Gallardo K., Arkoun M., Cruz F., Yvin J.-C., Ourry A.** (2015) Assessment of sulfur deficiency under field conditions by single measurements of sulfur, chloride and phosphorus in mature leaves. La soumission de cet article est aussi conditionnée par un dépôt de brevet en cours d'étude (cabinet de propriété intellectuelle Beau de Loménie).



---

## **CHAPITRE II**

### **Synthèse bibliographique**

---





# CHAPITRE II

## Synthèse bibliographique

---

### I. Le ionome

#### I.1. La ionomique ou l'étude du ionome

L'analyse simultanée de l'ensemble des éléments minéraux contenus dans les tissus végétaux est une démarche récente, permise grâce à l'émergence de nouvelles techniques d'analyse élémentaire telles que l'utilisation de torche plasma associée à des détecteurs optiques ou de masse. Des techniques telles que l'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) ou l'ICP-OES (Inductively coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) permettent la mesure simultanée d'une multitude d'éléments. A l'heure actuelle, la plupart des études utilisant ces techniques repose sur la quantification de 12 à 20 éléments (Baxter, 2009). La notion de ionome a été proposée par Lahner *et al.*, en 2003 étendant le terme de métallome pour inclure tous les éléments contenus par un organisme : métaux, métalloïdes et non métaux. Cette définition recouvre aussi une vision dynamique des teneurs en éléments qui sont contrôlées par de nombreux mécanismes tels que l'absorption par les racines, le transport et la redistribution dans la plante, mécanismes qui sont eux-mêmes dépendants de facteurs génétiques et environnementaux (Williams et Salt, 2009). La notion de ionome peut être également associée aux termes de signatures nutritionnelles ou de profils nutritionnels (Parent *et al.*, 2013). L'étude du ionome ou ionomique constitue une discipline relativement récente comme en atteste le fait que la majorité des gènes et réseaux de gènes impliqués dans sa régulation reste encore largement inconnue (Salt, 2004). Des approches conduites à différentes échelles combinant étude protéomique, profilage ionique, mesure de l'activité enzymatique ou utilisation de mutants ont déjà permis de comprendre la relation entre apport nutritionnel et ajustement métabolique.

Le réseau de transporteurs a été particulièrement étudié en raison de son importance dans le maintien de l'homéostasie ionique (Williams et Salt, 2009). En effet, celui-ci va déterminer la composition ionomique de la plante entière d'une part *via* l'absorption racinaire, et d'autre part *via* le transport des ions entre tissus entraînant une redistribution. L'identification et la caractérisation de l'ensemble de ces transporteurs reste à l'heure actuelle partielle. En effet, une analyse du génome d'*Arabidopsis thaliana* révèle l'existence d'approximativement 1 000 transporteurs qui n'ont pas encore été caractérisés d'un point de vue fonctionnel (Lahner *et al.*, 2003). Les auteurs de l'étude estiment par ailleurs que 2 à 4% du génome d'*A. thaliana* contribuerait à la composition



ionomique des feuilles chez des plantes non stressées. Les transporteurs déjà identifiés peuvent être spécifiques d'un seul ion, ou au contraire, être capables de transporter plusieurs ions présentant des configurations structurales proches. La régulation de l'expression des gènes codant ces transporteurs est complexe, pouvant intervenir tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel. Les multiples régulations possibles ne seront pas systématiquement décrites dans cette analyse.

La ionomique a été largement utilisée comme outil pour des études fonctionnelles de génomique. En effet, le profilage élémentaire de mutants permet l'identification de gènes contrôlant l'accumulation et la distribution de chaque élément. Une étude reposant sur la quantification de 18 éléments chez 6 000 mutants d'*A. thaliana*, a permis d'identifier 51 mutants présentant une composition ionomique altérée (Lahner *et al.*, 2003). Ce premier screening a permis l'identification progressive de nouveaux gènes impliqués dans la régulation de l'absorption et de l'accumulation des nutriments. Par exemple, un nouveau gène clé pour l'assimilation de sulfate (APR2), a ainsi été identifié par cette méthode chez *A. thaliana* (Loudet *et al.*, 2007). Il a ensuite été démontré que la variabilité allélique du gène APR2 au sein de 411 lignées recombinantes d'*A. thaliana* permet d'expliquer la variabilité naturelle des teneurs en sulfate.

Plus récemment, il a été suggéré que l'étude du ionome pourrait également permettre de diagnostiquer le statut physiologique des végétaux (Baxter *et al.*, 2008b), puisque sa composition est affectée potentiellement par de nombreux processus physiologiques allant de l'absorption des éléments dans la rhizosphère jusqu'à la remobilisation des éléments *via* le phloème. Des contraintes environnementales telles que l'altération de la disponibilité des ions dans l'environnement ou génétiques comme l'altération d'un des mécanismes impliqués dans le transport des ions à partir de la solution du sol pourrait affecter la composition du ionome de façon assez spécifique. A titre d'exemple, il a été montré qu'une carence en Fe ou en P conduit à une modification du ionome foliaire (Baxter *et al.*, 2008b), étude sur laquelle nous reviendrons lorsque seront considérées les interactions entre éléments minéraux.

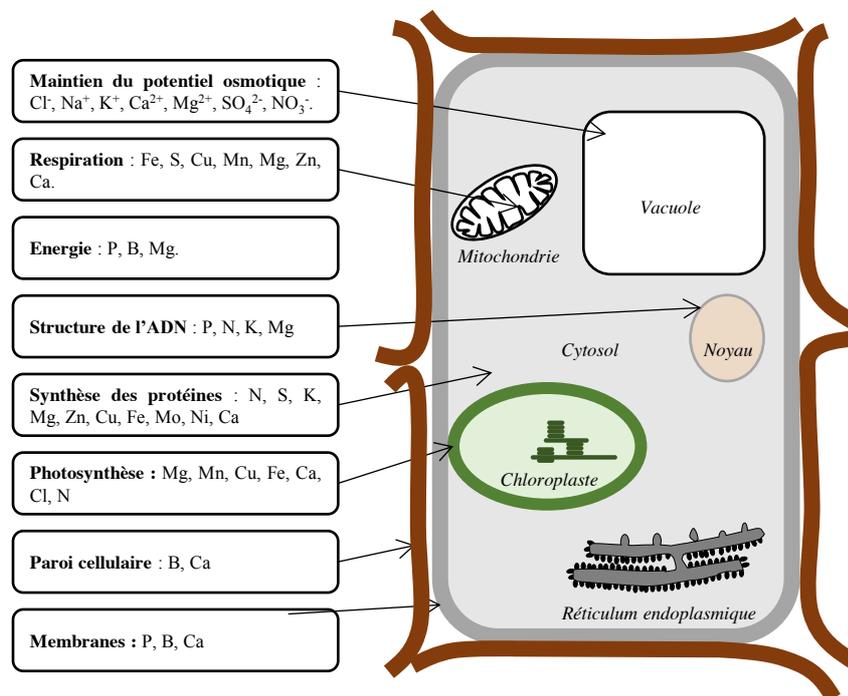
## I.2. Les éléments essentiels et bénéfiques pour la croissance des végétaux

Parmi les 118 éléments découverts à ce jour, constituant le tableau périodique, seuls 17 sont considérés comme essentiels pour les végétaux. La notion d'**élément essentiel ou nutriment** a été proposée par Arnon et Stout en 1939 (Arnon et Stout, 1939 ; Kirkby, 2012). Pour qu'un élément soit considéré comme essentiel, trois critères doivent être respectés :

1. une plante doit être incapable de terminer son cycle de vie en l'absence de cet élément,
2. cet élément ne doit pas pouvoir être remplacé par un autre,

**Tableau II.1. Découverte de l'essentialité des éléments minéraux (Barker et Pilbeam, 2006).**

Élément essentiel	Date	Découvert par
	1804	De Saussure
N	1851-1855	Boussingault
	1839	Liebig
P	1861	Ville
K	1866	Birner et Lucanus
Ca	1862	Stohmann
Mg	1875	Boehm
S	1866	Birn et Lucanus
Fe	1843	Gris
Mn	1922	Mc Hargue
Cu	1925	Mc Hargue
B	1926	Sommer et Lipman
Zn	1926	Sommer et Lipman
Mo	1939	Arnon et Stout
Cl	1954	Broyer, Carlton, Johnson et Stout
Ni	1987	Brown, Welch et Cary



**Figure II.1. Implication des éléments minéraux dans les grandes fonctions de la cellule végétale.**

Les éléments essentiels présentent de nombreuses fonctions dans la plante : ils interviennent dans la structure de la paroi, la composition des membranes, le potentiel osmotique, la photosynthèse, la respiration. Schéma établi d'après (Broadley *et al.*, 2012a; Hawkesford *et al.*, 2012a).

3. cet élément doit directement intervenir dans le métabolisme de la plante.

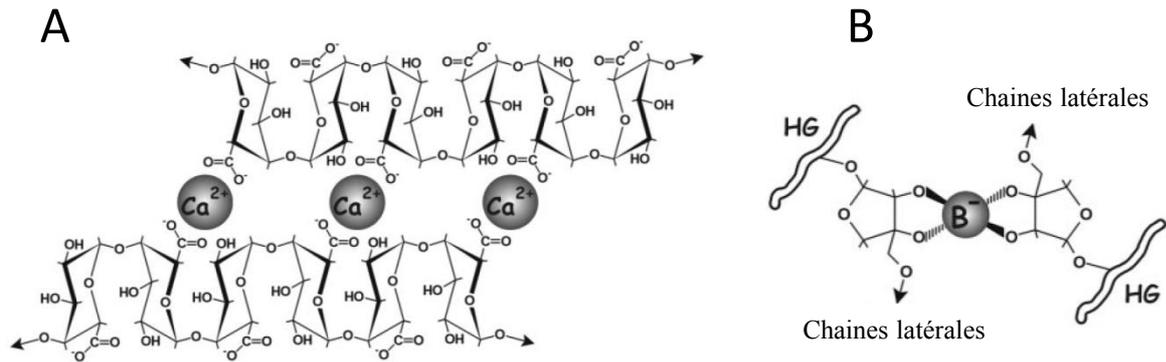
Dix-sept éléments remplissent ces critères d'essentialité. Les éléments essentiels qui sont requis en relativement grande quantité (>0,1 % de la masse sèche) considérés comme **macronutriments** sont le carbone (C), l'hydrogène (H), l'oxygène (O), l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca), le soufre (S) et le magnésium (Mg). Alors que les **micronutriments** incluant le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B), le chlore (Cl) et le nickel (Ni) sont requis en plus petites quantités (<0,01 % de la masse sèche). Ainsi, selon cette définition stricte, un élément qui atténue les effets toxiques d'un autre élément (par exemple, le silicium (Si) palliant les effets de la toxicité du Mn) ou qui en remplace un autre (par exemple, le sodium (Na) à la place du K), ou encore qui est essentiel à seulement certaines espèces (par exemple le cobalt (Co) requis pour la fixation symbiotique de N<sub>2</sub>) ne peut pas être décrit comme un élément essentiel pour les végétaux (Kirkby, 2012). Ces éléments non essentiels tels que le Si, le Na ou le Co qui stimulent la croissance ou qui sont essentiels pour seulement certaines espèces ou sous certaines conditions particulières, sont définies comme **éléments bénéfiques**. Néanmoins, cette classification reste évolutive et dépend étroitement des connaissances disponibles. Le Ni, par exemple, anciennement classé parmi les éléments bénéfiques est considéré dorénavant comme un élément essentiel depuis 1987 (Brown *et al.*, 1987) compte tenu de son implication dans la constitution d'uréase active (Tableau II.1). Le Vanadium (V) à ce jour non listé parmi les éléments essentiels, est également candidat (Arnon et Wessel, 1953) bien que des preuves manquent encore, le V étant seulement requis pour les algues d'eau douce et les champignons.

### I.3. Fonctions et mécanismes physiologiques concernés (Figure II.1)

Les éléments essentiels présentent de nombreuses fonctions dans la plante : de façon non exhaustive, ils peuvent intervenir dans la composition structurale, le potentiel osmotique, la photosynthèse ou encore la respiration (Figure II.1). Il ne sera pas tenu compte ici, des trois principaux éléments indispensables à la nutrition des plantes qui ne sont pas prélevés par voie racinaire : C, H, O.

#### I.3.1. Structure de la paroi cellulaire et de la membrane plasmique

Plus de 90 % du B est localisé dans la paroi cellulaire des cellules (Figure II.2) (Blevins et Lukaszewski, 1998) dont il stabiliserait la structure par dimérisation d'une molécule pariétale complexe, le Rhamnogalacturonane-II (RGII) (O'Neill *et al.*, 2004). Le Ca confère également une certaine rigidité à la paroi cellulaire en formant des ponts calciques entre les groupes carboxyles



**Figure II.2. Liaisons chimiques entre pectines au sein de la paroi cellulaire végétale : (A) interaction avec le calcium et (B) liaison borate-diol ester entre deux molécules de Rhamnogalacturonane-II (RG-II).**

(A) La liaison de deux chaînes d'acide galacturonique (HG : homogalacturonane) *via* des ions calcium implique neuf atomes d'oxygène, elle s'organise selon une structure en 'boîte à œufs'. (B) Deux molécules de RG-II peuvent également être liées par une liaison borate-diol ester (Vincken *et al.*, 2003).

**Tableau II.2. Dénombrement par approches bioinformatique des protéines contenant des éléments métalliques ou se liant à des éléments métalliques chez *Arabidopsis thaliana* (Gladyshev *et al.*, 2004).**

Organisme	Nombre de protéines	Zn	Cu	Mg	Fe	Ca	Ni	Co	Mo
<i>Arabidopsis thaliana</i>	27 243	536	19	51	81	14	1	4	6

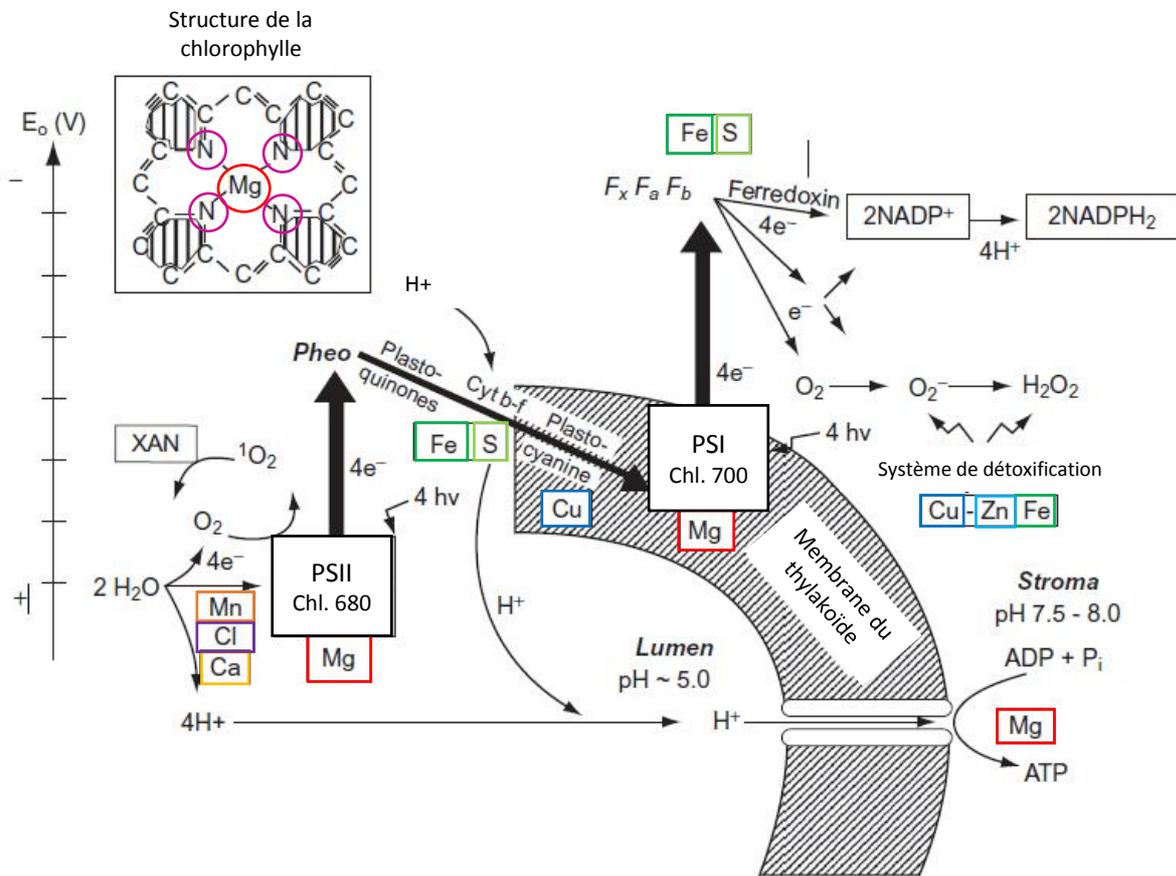
des acides galacturoniques de deux portions de chaînes de pectines (Maathuis, 2009) (Figure II.2). D'autres cations divalents tels que le  $\text{Sr}^{2+}$ , le  $\text{Ba}^{2+}$  ou le  $\text{Pb}^{2+}$  pourraient jouer le même rôle que le  $\text{Ca}^{2+}$  comme démontré *in vitro* par Kobayashi *et al.* (1999).

Le P est essentiel à la composition des membranes, puisque celles-ci sont constituées d'une bicouche de phospholipides. Le B et le Ca participent également à l'intégrité de la membrane cellulaire. Le Ca lie les groupements phosphate des phospholipides et protéines, contribuant au maintien de la structure membranaire (Maathuis, 2009). Le B serait impliqué dans l'induction de certaines ATPases membranaires, enzymes hydrolysant les molécules d'adénosine-triphosphate (ATP) tout en permettant le transfert des ions de part et d'autre de la membrane. D'autres investigations ont montré que le B peut stimuler la pompe à protons qui provoque une hyperpolarisation du potentiel membranaire (reviewé par Blevins et Lukaszewski, 1998).

### I.3.2. Synthèse des protéines

L'N joue un rôle primordial dans le métabolisme des plantes comme constituant des protéines. Il permet la formation du groupement amine des acides aminés. Le S est également un composant majeur des protéines, puisque près de 50 % du S total est incorporé dans des protéines chez le colza ayant un apport suffisant en S, alors que 42 % du S total est accumulé sous la forme de  $\text{SO}_4^{2-}$  (Blake-Kalff *et al.*, 1998). Le  $\text{SO}_4^{2-}$  est réduit dans les plastes où il est assimilé en cystéine qui peut être directement intégrée dans les protéines ou convertie en méthionine (Droux, 2004). La structure tertiaire des protéines est stabilisée par l'établissement de liaisons disulfures *via* l'oxydation des groupements thiols de la cystéine. De fortes concentrations en K sont nécessaires à la synthèse des protéines (Hawkesford *et al.*, 2012). La vitesse de synthèse des protéines par les ribosomes isolés de germes de blé est optimale avec 130 mM de K et environ 2 mM de  $\text{Mg}^{2+}$  (Hawkesford *et al.*, 2012).

Les micro-éléments participent également à la structure et à la fonctionnalité des protéines. Ainsi, de nombreuses protéines sont Zn dépendantes. Sur les 27 243 protéines identifiés chez *A. thaliana*, de nombreuses protéines se lient ou contiennent des métaux comme le Zn, le Cu, le Mg, le Fe, le Ca, le Ni, le Co et le Mo (Gladyshev *et al.*, 2004) (Tableau II.2). Par exemple, 536 protéines contiennent ou se lient à un ou plusieurs atomes de Zn. Six de ces protéines utilisent 10 % du Zn cellulaire. La plus abondante est une ARN polymérase exprimée à environ 5 000 copies par cellule et liant un atome de Zn alors que les cinq autres sont des ARNt synthèses exprimées chacune à 2 000 - 3 000 copies par cellule et nécessitant deux atomes de Zn par copie (Broadley *et al.*, 2007). Le Mo est également indispensable à la synthèse de six enzymes chez les plantes : la sulfite oxydase, la nitrate réductase, la xanthine oxydase, l'aldéhyde oxydase, la nitrogénase et



**Figure II.3. Implication dans la phase claire de la photosynthèse des éléments essentiels. N (en rose), S (en vert clair), Ca (en jaune), Mg (en rouge), Fe (en vert foncé), Cu (en bleu), Zn (en bleu ciel) et Cl (en violet).**

Un atome de Mg se situe au centre du noyau porphyrine de la chlorophylle, quatre atomes de N sont également requis. Dans le centre réactionnel du photosystème II, les électrons sont transférés de la phéophytine (Pheo) vers la plastoquinone. La chlorophylle récupère alors un électron provenant de l'oxydation de l'eau par le système Z dépendant de quatre atomes de Mn reliés à un atome de Ca. Le Cl participe également à cette réaction. Le cytochrome  $b_6/f$  (Cyt) intervenant dans le transfert des électrons entre la plastoquinone et la plastocyanine (une métalloprotéine à Cu) intègre un centre  $2\text{Fe}-2\text{S}$ . Dans le photosystème I, les électrons sont transférés *via* trois clusters Fe-S ( $\text{F}_x$ ,  $\text{F}_a$  and  $\text{F}_b$ ) jusqu'à l'accepteur final du PSI : la ferredoxine. Le Mg participe également à la photosynthèse en contrebalançant la forte différence de charge induite par l'export de protons hors des thylakoïdes. De plus, le Fe comme le Cu et le Zn sont des cofacteurs de la SuperOxyde Dismutase (SOD) qui détoxifie les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Engels *et al.*, 2012).

mARC (mitochondrial amidoxime reducing component) dont le rôle reste encore inconnu (Mendel, 2005; Schwarz et Mendel, 2006; Schwarz *et al.*, 2009; Bittner, 2014). Le Ni a été identifié chez une seule enzyme, l'uréase, qui requière deux atomes de nickel pour son activation (Dixon *et al.*, 1975; Witte, 2011) et assure ainsi l'hydrolyse de l'urée.

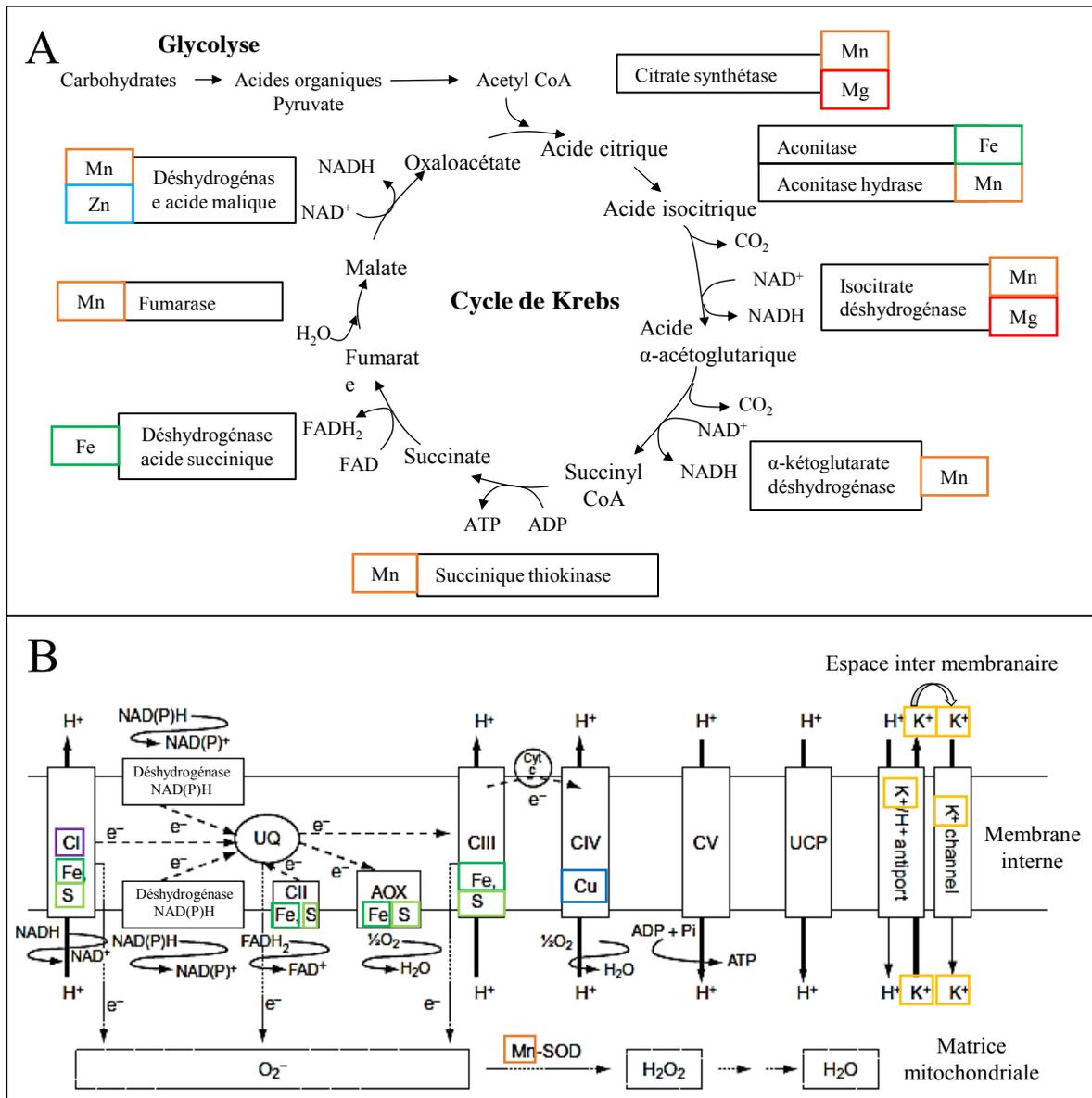
### I.3.3. Structure de l'ADN

Le P et l'N sont les deux constituants principaux d'origine tellurique de l'ADN et de l'ARN. Le  $\text{PO}_4^{2-}$  forme un pont entre les ribonucléoside. Les propriétés du  $\text{K}^+$  permettent d'équilibrer les charges négatives des acides nucléiques (Maathuis, 2009). Le  $\text{Mg}^{2+}$  se lie également aux groupes carboxyle négatifs des acides nucléiques afin de stabiliser la structure de l'ADN (Maathuis, 2009). Le  $\text{Mg}^{2+}$  a un rôle similaire dans le maintien de la structure secondaire de l'ARN.

### I.3.4. Photosynthèse

Plusieurs ions sont impliqués à la fois dans la phase claire et la phase sombre de la fixation du  $\text{CO}_2$  dans les chloroplastes (Figure II.3). Le  $\text{Mg}^{2+}$ , le  $\text{Mn}^{2+}$ , le  $\text{Cu}^{2+}$ , le  $\text{Fe}^{3+}$  et le  $\text{Ca}^{2+}$  jouent un rôle structural autant que fonctionnel dans la photosynthèse. Plus de 80 % du Fe est localisé dans les chloroplastes (Nouet *et al.*, 2011). Le Fe est présent au sein des clusters Fe-S de protéines de type Rieske et dans des ferrédoxines impliquées dans le transfert d'électrons (Lill, 2009) ou comme noyau hème intégré à des cytochromes (Ponka, 1999).

Un atome de Mg est au centre du noyau porphyrine de la chlorophylle. Cette seule fonction requiert 20 % du Mg des feuilles (White et Broadley, 2009). L'N est également essentiel à la formation des pigments photosynthétiques. Pendant la phase claire, dans le centre réactionnel du photosystème II, les électrons sont transférés de la phéophytine jusqu'aux quinones  $\text{Q}_A$  et  $\text{Q}_B$  séparées par un noyau fer non-hémique ; celles-ci stockent les électrons et les transfèrent sur l'accepteur suivant présent dans la membrane à l'extérieur du PSII : la plastoquinone (Diner *et al.*, 1991). La chlorophylle récupère alors un électron provenant de l'oxydation de l'eau par le système Z du photosystème II qui est constitué par un centre de quatre atomes de Mn reliés à un atome de Ca (Dau et Haumann, 2008). Le fonctionnement du complexe repose sur le changement de valence des atomes de Mn qui acceptent les électrons. Le cytochrome b6f intervenant dans le transfert des électrons entre le photosystème II et le photosystème I intègre un centre 2Fe-2S (Yruela, 2013). Un des accepteurs d'électrons est la plastocyanine : une métalloprotéine à Cu qui représente environ 50 % du Cu cellulaire (Yruela, 2013). Dans le photosystème I, les électrons sont transférés *via* trois cluster Fe-S ( $\text{F}_x$ ,  $\text{F}_a$  et  $\text{F}_b$ ) jusqu'à l'accepteur final du PSI : la ferrédoxine (Díaz-Quintana *et al.*, 1998). Le Mg participe également à la photosynthèse en contrebalançant la forte différence de



**Figure II.4. Implication des éléments essentiels dans les principales étapes de la respiration : (A) glycolyse dans le cytosol et les plastes et cycle de Krebs, (B) transport d'électron dans la membrane interne de la mitochondrie.**

S (en vert clair), K (en jaune), Mg (en rouge), Fe (en vert foncé), Cu (en bleu), Zn (en bleu ciel) et Cl (en violet). (NADH dehydrogenase), CII complexe II (succinate dehydrogenase), CIII complex III (cytochrome bc1 complex), CIV complexe IV (cytochrome c oxidase), CV complexe V (ATP synthase); UQ: ubiquinone; cyt c: cytochrome c; UCP: uncoupling protein; Mn-SOD: Mn superoxidodismutase. Adapté de Malvi, 2011; Engels *et al.*, 2012.

charge induite par l'export de protons hors des thylakoïdes (Maathuis, 2009). De plus, le Fe est un cofacteur de la Fe-SuperOxyde Dismutase (SOD) qui détoxifie les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Abreu et Cabelli, 2010). Il existe également une seconde SOD chloroplastique, la Cu/Zn-SOD.

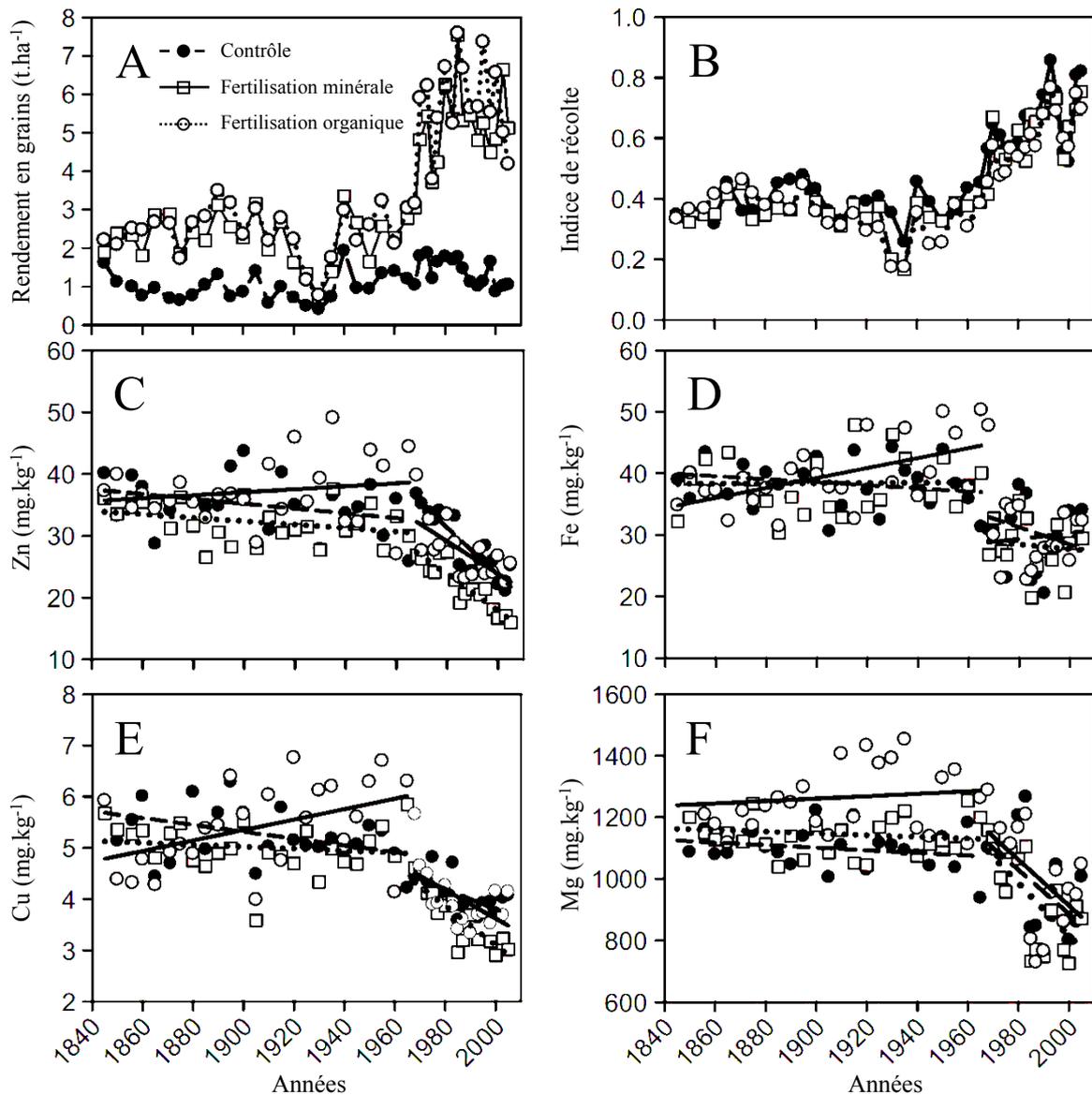
Lors de la phase sombre de la photosynthèse, dans le cycle de Calvin, le Mg participe à l'activation de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase ou RuBisCO (Andersson, 2008).

### I.3.5. Respiration

La respiration cellulaire produit de l'adénosine triphosphate (ATP), source d'énergie directement utilisable par la cellule dans la membrane interne des mitochondries (Figure II.4). Le dernier phosphate de l'ATP est ajouté à l'ADP par réaction de phosphorylation, en présence de Mg (Gout *et al.*, 2014). Comme les chloroplastes, les mitochondries nécessitent du Fe hémique (cytochromes) et des clusters Fe-S (sous unités des complexes I, II et III) pour assurer le transfert d'électrons. Par exemple, l'aconitase est une enzyme qui comprend quatre centres Fe-S (Lill et Kispal, 2000). Comme le Fe, le Cu est impliqué dans les réactions redox dans la mitochondrie : le complexe IV ou cytochrome c oxydase, enzyme terminale de la chaîne respiratoire, en plus d'un hème comprend 2 atomes de Cu (Garcia *et al.*, 2014). Le Mn et le Mg activent plusieurs enzymes telles que les décarboxylases et déshydrogénases impliquées dans le cycle de Krebs (Broadley *et al.*, 2012). Par exemple, l'isocitrate-déshydrogénase et la malate déshydrogénase sont activées en présence de Mg et de Mn. Le cycle de Krebs est régulé par le Ca (Wan *et al.*, 1989). De plus, le Zn est un élément essentiel au fonctionnement de certaines enzymes du cycle de Krebs telle que la succinate déshydrogénase, la sérine acétyl-transférase ou la citrate synthase (Broadley *et al.*, 2007).

### I.3.1. Régulation de la turgescence cellulaire

Des ions comme le  $\text{Cl}^-$ , le  $\text{Na}^+$ , le  $\text{K}^+$ , le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ , largement localisés dans la vacuole (Figure II.1), contribuent au maintien de l'équilibre osmotique. Le  $\text{Mg}^{2+}$  libre peut ainsi représenter de 60 à 90 % du Mg total (Hawkesford *et al.*, 2012b). La conductance de ces ions joue un rôle critique dans la régulation de la turgescence cellulaire et l'ouverture des stomates. Le  $\text{SO}_4^{2-}$  et le  $\text{NO}_3^-$  peuvent également participer au maintien de la turgescence cellulaire lorsque leur apport est important. Le sulfate peut ainsi représenter de 10 à plus de 71 % du S total dans les feuilles de colza (Sarda *et al.*, 2014) alors que le nitrate ne représente qu'une faible fraction de l'N total.



**Figure II.5. Evolution des caractéristiques de la production de blé depuis 1845 à l'IACR de Rothamsted. (A) Rendement en tonne.ha<sup>-1</sup>, (B) indice de récolte, (C) teneurs des grains (D) en Zn, (E) en Fe, (F) en Cu et (G) en Mg en mg.kg<sup>-1</sup>.**

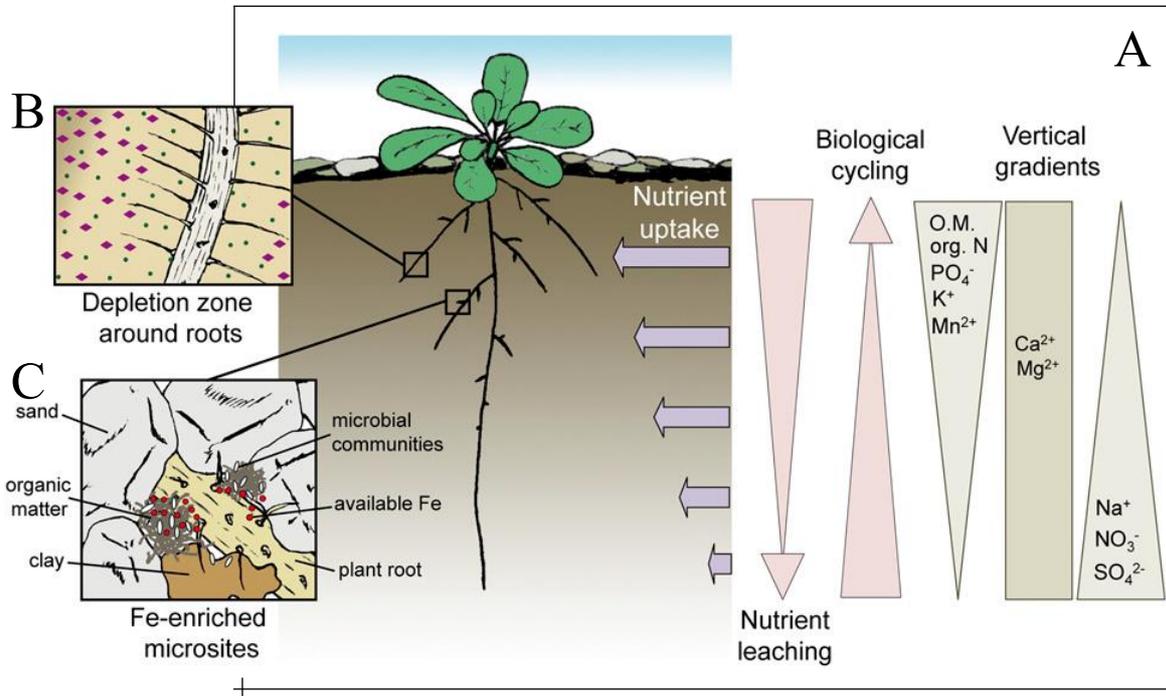
Trois types de fertilisations ont été testés, sans fertilisation (contrôle), fertilisation minérale en N, P, K, Na, Mg, S, fertilisation organique. (A) L'augmentation du rendement et de (B) l'indice de récolte à partir des années 70 s'accompagne d'une diminution des teneurs en (C) Zn, (D) Fe, (E) Cu et (F) Mg du grain (Fan *et al.*, 2008).

## II. Stratégies d'acquisition et de gestion des ressources minérales chez les végétaux.

Les éléments minéraux intervenant dans tous les processus fondamentaux, leurs carences affectent donc des structures et des fonctions très diverses chez la plante. Une disponibilité limitée en nutriments peut résulter de la faible teneur du sol, de conditions abiotiques sous-optimales telles que des températures extrêmes, des variations de pH, une faible disponibilité en eau ou des conditions anaérobiques qui vont altérer la minéralisation et ainsi la phytodisponibilité. Les pratiques agricoles telles que le chaulage des sols pratiqué pour augmenter le pH peut ainsi modifier la solubilité des micronutriments (Verma et Minhas, 1987). Dans le même temps, les besoins en nutriments des plantes peuvent être affectés par des facteurs abiotiques, physiologiques et génétiques. Par exemple, Fan *et al.* en 2008 ont examiné les teneurs en nutriments de grains de blé entre 1843 et 2008 en fonction des génotypes utilisés, du rendement et de l'indice de récolte (Fan *et al.*, 2008). Les teneurs en Zn, en Fe, en Cu et en Mg des grains sont restées stables entre 1843 et le milieu des années 1960, puis ont diminué de façon significative, alors que dans le même temps, les concentrations dans le sol de ces nutriments ont augmenté ou sont restées stables (Figure II.5). La même tendance est observée pour les teneurs en P, Mn, S et Ca qui ont également diminué dans les grains de blé. Cette diminution des teneurs coïncide avec l'introduction de cultivars à haut rendement de type demi-nain. Les auteurs en déduisent que la sélection génotypique conduite chez le blé, visant à augmenter le rendement et donc l'acquisition du C, s'est faite au détriment de l'acquisition de certains éléments minéraux. Il en résulte que face à une baisse des teneurs des grains en Zn, en Fe, en Cu et en Mg, éléments essentiels pour la nutrition humaine ou animale, de nombreuses stratégies sont développées pour pallier à d'éventuelles carences, *via* des méthodes de bio-fortification.

Lorsque la disponibilité d'un nutriment est insuffisante pour couvrir les besoins de la plante, des réponses morphologiques et/ou physiologiques sont mises en place pour améliorer l'acquisition des nutriments et optimiser leur utilisation interne. *A minima*, il peut être considéré quatre stratégies essentielles qui peuvent être décrites comme suit :

- une modification de l'architecture racinaire permettant d'augmenter le volume de sol exploré par les racines (López-Bucio *et al.*, 2003; Giehl *et al.*, 2013)
- une modification de l'environnement rhizosphérique *via* des processus physico-chimiques et biologiques, permettant d'accroître la mobilisation des nutriments dans la rhizosphère et donc leur phyto-disponibilité (Hinsinger *et al.*, 2009; Marschner, 2011).



**Figure II.6. Gradients d'éléments nutritifs et formation de microsites enrichis en nutriments dans les sols. (A) Spatialisation des gradients, (B) zone rhizosphérique appauvrie, et (C) microsites enrichis en fer.**

Beaucoup de processus sont impliqués dans la formation de gradients verticaux dans le sol, comme l'absorption des nutriments, leur lixiviation ou lessivage, le cycle biologique. Une utilisation accrue des nutriments dans les couches superficielles du sol diminue les concentrations de nutriments dans cette couche de sol. Les phénomènes de lixiviation et lessivage accroissent les concentrations en nutriments mobiles dans le bas du profil de sol. Le cycle des éléments nutritifs biologique agit de manière opposée, les nutriments absorbés au sein des horizons profonds étant restitués à la surface sous la forme de dépôts de litière. Certains éléments nutritifs, tels que le Ca et le Mg, ne présentent généralement pas de forts gradients verticaux dans la plupart des sols. **(B)** À une plus petite échelle, l'absorption intense d'éléments immobiles (en violet) et mobiles (en vert) peut entraîner la formation de zones à l'interface racine-sol où les nutriments immobiles sont limitants. **(C)** Par ailleurs, les dépôts localisés de matières organiques associés à une activité microbienne intense peuvent entraîner une augmentation de la disponibilité en nutriments immobiles dans le sol comme le Fe dans des microsites (Giehl et von Wirén, 2014).

- une surexpression de gènes codant des transporteurs spécifiques ou aspécifiques (Puig *et al.*, 2007; Gojon *et al.*, 2009; Pilon *et al.*, 2009).
- un stockage à court et moyen termes des macro et micronutriments dans la plante suivi d'une remobilisation de ceux-ci. Cette stratégie alternative, qui permet de maintenir au moins durant un certain temps la croissance du végétal est fréquemment mais pas toujours associée à la sénescence des feuilles (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Avice et Etienne, 2014).

Ces réponses sont souvent couplées afin d'augmenter la zone d'interaction racine-sol, améliorer la capacité de la plante à intercepter les nutriments peu mobiles, et augmenter leur utilisation pour maximiser la croissance ou permettre son maintien.

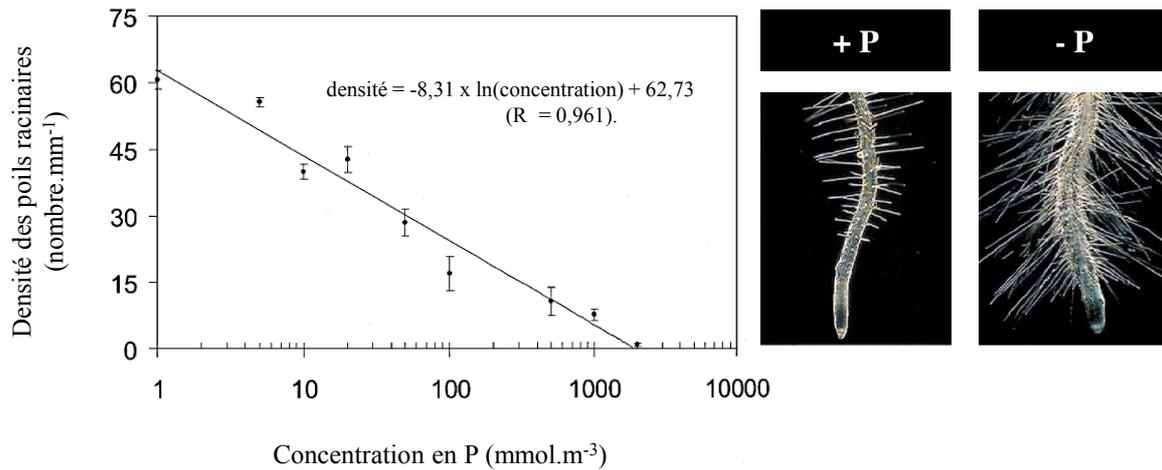
## II.1. Stratégie d'acquisition des ressources minérales

### II.1.1. Par augmentation de la prospection racinaire

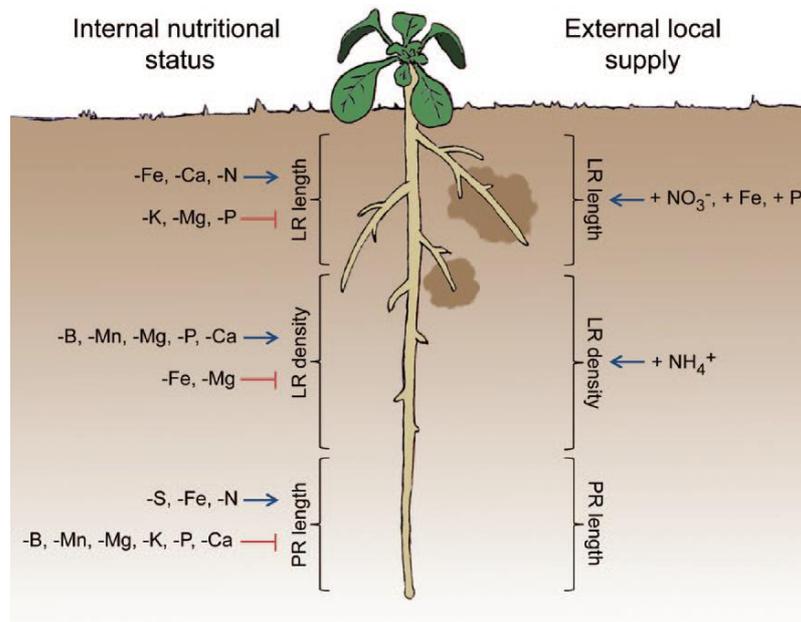
Pendant le cycle de vie d'une plante, la disponibilité des nutriments dans le sol est hétérogène tant dans l'espace que dans le temps. La composante spatiale de la biodisponibilité : l'accessibilité, est donc cruciale (Hinsinger *et al.*, 2009). La répartition des nutriments dans le sol suit un gradient qui dépend d'une part de la décomposition de la matière organique et d'autre part du lessivage (Figure II.6) (Giehl et von Wirén, 2014). Les végétaux peuvent améliorer l'acquisition des nutriments en développant et en modulant l'architecture de leur système racinaire (synthèse de (López-Bucio *et al.*, 2003; Giehl *et al.*, 2013; Giehl et von Wirén, 2014). Le développement du système racinaire est habituellement fortement asymétrique et reflète la capacité des racines à ajuster leur croissance et leur développement aux facteurs environnementaux (López-Bucio *et al.*, 2003). Ainsi, une augmentation de la prospection racinaire peut pallier à la faible disponibilité en nutriments dans le sol en augmentant la surface totale d'absorption du système racinaire et en optimisant l'exploitation des micropools de ressources. Outre la disponibilité des nutriments dans le sol, l'architecture racinaire reflète également le statut nutritionnel de la plante. Les carences en nutriments induisent des altérations de l'architecture racinaire spécifiques selon les nutriments. Cette plasticité a été montrée notamment en réponse à 12 carences minérales chez *A. thaliana* (Gruber *et al.*, 2013).

#### II.1.1.a. Multiplication des poils racinaires

Les carences en éléments nutritifs conduisent à une augmentation de la différenciation des cellules épidermiques en poils racinaires (López-Bucio *et al.*, 2003; Giehl et von Wirén, 2014).



**Figure II.7. La disponibilité en P joue sur la densité des poils racinaires chez *Arabidopsis*.**  
 La densité des poils racinaires diminue de façon linéaire en fonction de l'augmentation logarithmique de la disponibilité en phosphore dans le milieu de croissance. Les données sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  s.e (n = 6) (Ma *et al.*, 2001). Photographies : López-Bucio *et al.*, (2003).



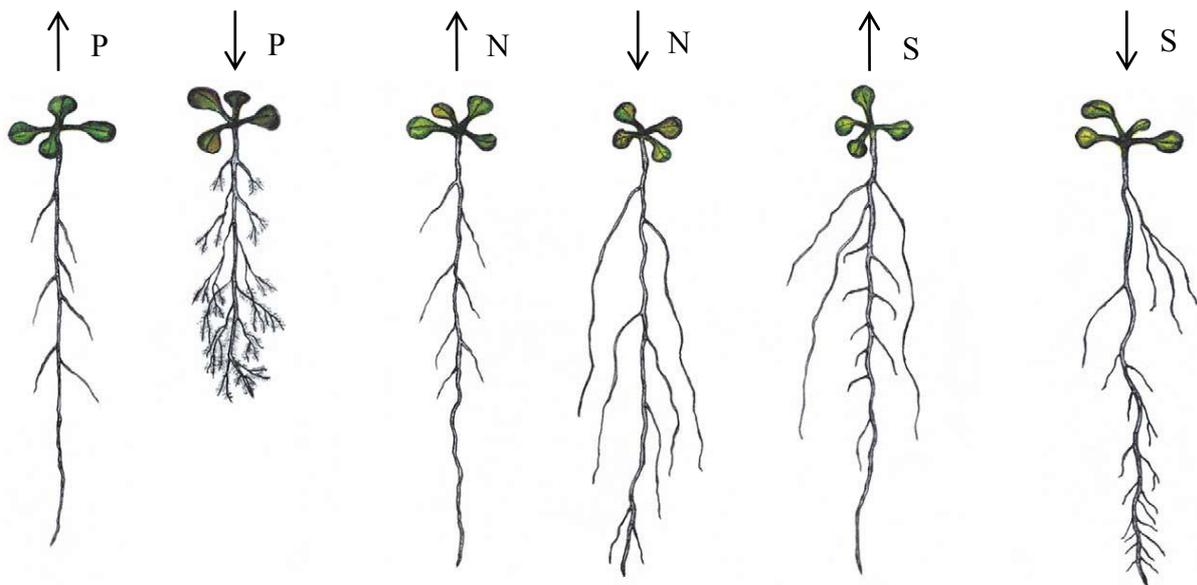
**Figure II.8. Synthèse des principaux effets de différentes carences minérales sur l'architecture du système racinaire chez *Arabidopsis thaliana*.**

L'architecture racinaire est appréhendée par la quantification de la longueur et la densité de racines latérales (LR Length and density) ainsi que par la longueur de la racine primaire (PR length). A gauche du schéma, l'effet d'une carence en un élément est indiqué par une flèche bleue lorsqu'il est positif et par une flèche rouge lorsqu'il est négatif. A droite, est indiqué selon le même principe l'effet d'un apport localisé dans le sol de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, de Fe, de P ou de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Giehl *et al.*, 2014).

C'est l'un des changements de l'architecture racinaire les plus remarquables qui s'opère en cas de carence. En effet, les poils racinaires sont les principaux sites d'absorption d'eau et de nutriments, grâce à leur paroi fine et hydrophile et à leur grande surface d'échange avec le sol. La surface des poils racinaires peut représenter jusqu'à 70 % de la superficie totale des racines, d'où leur importance en terme d'absorption (López-Bucio *et al.*, 2003). L'importance des poils racinaires dans l'acquisition des éléments nutritifs a récemment été étudiée sur la lignée transgénique NR23 d'*A. thaliana* déficiente en poils racinaires (Tanaka *et al.*, 2014). La biomasse aérienne de la lignée NR23 est affectée négativement par les carences nutritionnelles et cette lignée accumule moins de Ca, K, P, S, B, Cu et Zn que la lignée sauvage. Selon Giehl et von Wirén (2014), la différenciation des cellules épidermiques en poils racinaires est induite en réponse à des carences en P, K, Mg, Fe et Mn. Par exemple, dans des conditions de faible disponibilité en P, les poils racinaires deviennent plus longs et jusqu'à cinq fois plus dense chez *A. thaliana* (Ma *et al.*, 2001). Cette plus grande densité résulte de l'inhibition de l'allongement des cellules épidermiques et de la différenciation ectopique des cellules épidermiques profondes en trichoblastes (Giehl et von Wirén, 2014). Elle augmente de façon linéaire lorsque la disponibilité en P dans le milieu diminue (Figure II.7) (Ma *et al.*, 2001). La différenciation des cellules épidermiques en poils racinaires est donc modulée par la disponibilité en P de façon dose-dépendante car le P modifie la vitesse et la durée de l'allongement. Une faible disponibilité en Fe induit également des modifications morphologiques racinaires similaires à celles induites par une carence en P (López-Bucio *et al.*, 2003). D'une façon générale, l'adaptation des plantes à une faible disponibilité en nutriments comporte donc un développement accru des poils racinaires.

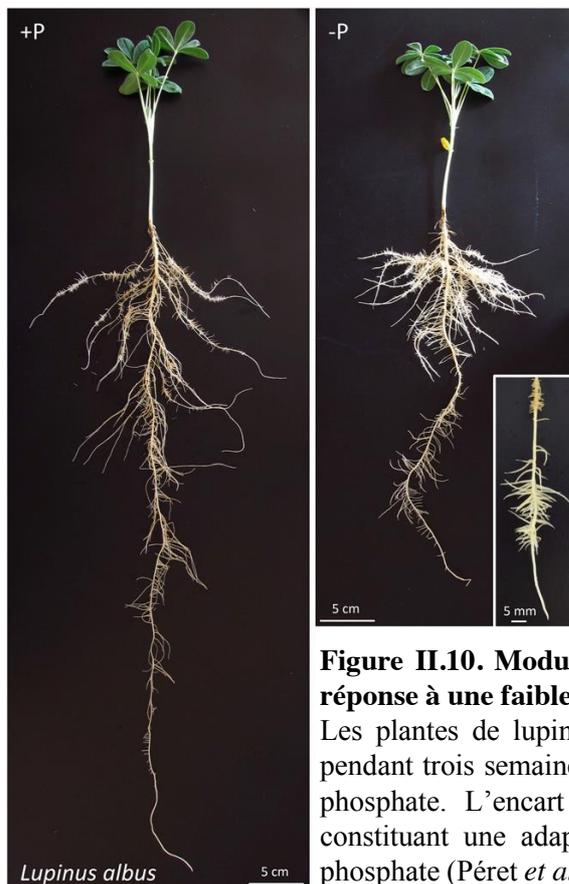
#### II.1.1.b. Développement de la racine primaire et des racines latérales

Outre cette différenciation des cellules épidermiques en trichoblastes, en cas de carence, un changement plus global de l'architecture racinaire s'effectue au niveau de la racine primaire et des racines latérales. La racine primaire constitue l'axe principal du système racinaire. Son développement est dépendant de la gravité, qui détermine donc la profondeur du sol atteint, et de la disponibilité en nutriment. Giehl *et al.*, (2013) ont étudié les effets de différentes déficiences nutritionnelles sur le développement racinaire appréhendé *via* la longueur et la densité des racines latérales ainsi que par la longueur de la racine primaire (Figure II.8). Ils montrent que la longueur de la racine primaire (Figure II.8, PR length) est affectée négativement par des carences en B, Mn, Mg, K, P ou Ca mais positivement si ces carences concernent le S, le Fe ou l'N. La densité de racines latérales (Figure II.8, LR density) est quant à elle augmentée lors de carences en B, Mn, Mg, P, ou Ca mais réduite par des carences en Fe ou Mg. Enfin la longueur des racines latérales (Figure II.8 LR length) est augmentée par une insuffisance de Fe, Ca ou N mais réduites lors d'une



**Figure II.9. Réponses du système racinaire d'*Arabidopsis* à différents apports nutritifs.**

Les plantules ont été cultivées avec une concentration élevée (↑) ou non (↓) en P, en N ou en S dans la solution nutritive. La carence en P induit une modification de la croissance de la racine principale et des racines latérales, provoquant une modification de l'architecture globale de la racine. La disponibilité en N et en S modifie l'allongement des racines latérales (López-Bucio *et al.*, 2003).



**Figure II.10. Modulation du développement racinaire du lupin en réponse à une faible disponibilité en phosphate.**

Les plantes de lupin blanc ont été cultivées en culture hydroponique pendant trois semaines sur du milieu Hoagland avec (100 mM) ou sans phosphate. L'encart montre une racine protéoïde ou racine cluster constituant une adaptation de la plante à une faible disponibilité en phosphate (Péret *et al.*, 2014).

faible disponibilité en K, Mg ou P. De façon additionnelle, ces mêmes auteurs montrent qu'un apport racinaire localisé, dans un contexte de faible disponibilité, en  $\text{NO}_3^-$ , Fe ou P stimule l'allongement des racines latérales (Figure II.8), processus qui pour l'N et le P a déjà été décrit par López-Bucio *et al.* (2003, Figure II.9) et pour le P par Péret *et al.* (2014, Figure II.10).

La modification de la morphologie du système racinaire en réponse à des carences minérales est donc assez complexe et pourrait en partie s'expliquer selon certains auteurs (Liu *et al.*, 2013) par le caractère plus ou moins mobile des ions minéraux dans le sol. Ainsi, les racines latérales auraient un rôle majeur dans l'acquisition des nutriments peu mobiles comme le P, le Mn, le Cu ou le Zn, alors qu'elles contribueraient moins à l'acquisition d'éléments mobiles comme le  $\text{NO}_3^-$ , le S ou le K (Liu *et al.*, 2013). Une autre adaptation du système racinaire repose sur le développement de racines qualifiées de protéoïdes ou de racines clusters (Watt et Evans, 1999) lorsque certaines espèces végétales (Proteacées, Betulacées, Casuarinacées, Elaeagnacées, Fabacées, Moracées ou Myricacées) sont confrontées à une faible disponibilité en P. Le lupin blanc (*Lupinus albus*) et l'*Hakea prostrata* sont d'ailleurs devenus des espèces modèles pour l'analyse du développement de ces racines protéoïdes (Figure II.10). Ces racines protéoïdes qui forment des groupes denses de courtes radicules latérales très rapprochées sont retrouvées chez des espèces adaptées à des sols pauvres en nutriments. Leur développement a, jusqu'ici, été largement étudié dans des conditions de limitation en phosphore mais le développement de ces racines est également induit par des carences en N et en Fe. Ces racines permettent la capture des nutriments (principalement le P) par une augmentation de la surface racinaire et par l'exsudation de composés tels que des anions organiques, des phosphatases, des composés phénoliques afin de faciliter la mobilisation des éléments nutritifs du sol (Watt et Evans, 1999). Les anions organiques, en particulier le citrate, mobilisent le P par chélation du Fe, de l'Al et du Ca, qui sont complexés au P.

Les hormones contrôlent la mise en place de l'architecture du système racinaire : croissance de la racine primaire et formation des racines latérales et des poils racinaires (López-Bucio *et al.*, 2003). Beaucoup d'espèces répondent à l'application d'auxines en produisant un grand nombre de racines latérales, et à l'application d'auxine et d'éthylène en augmentant la densité et la longueur des poils racinaires. Chez le lupin blanc et *Arabidopsis*, un rôle important de l'auxine dans la formation des racines latérales a été démontré (Gilbert *et al.*, 2000 ; López-Bucio *et al.*, 2002). En cas de carence en P, l'auxine est requise pour la formation des racines protéoïdes ou latérales chez le lupin et *Arabidopsis* respectivement. A l'inverse, les cytokinines inhibent l'initiation des racines latérales chez les plantes limitées en P. Mais, les nutriments pourraient agir directement comme molécule signal, contrôlant la modulation de l'architecture racinaire. En effet, chez des mutants

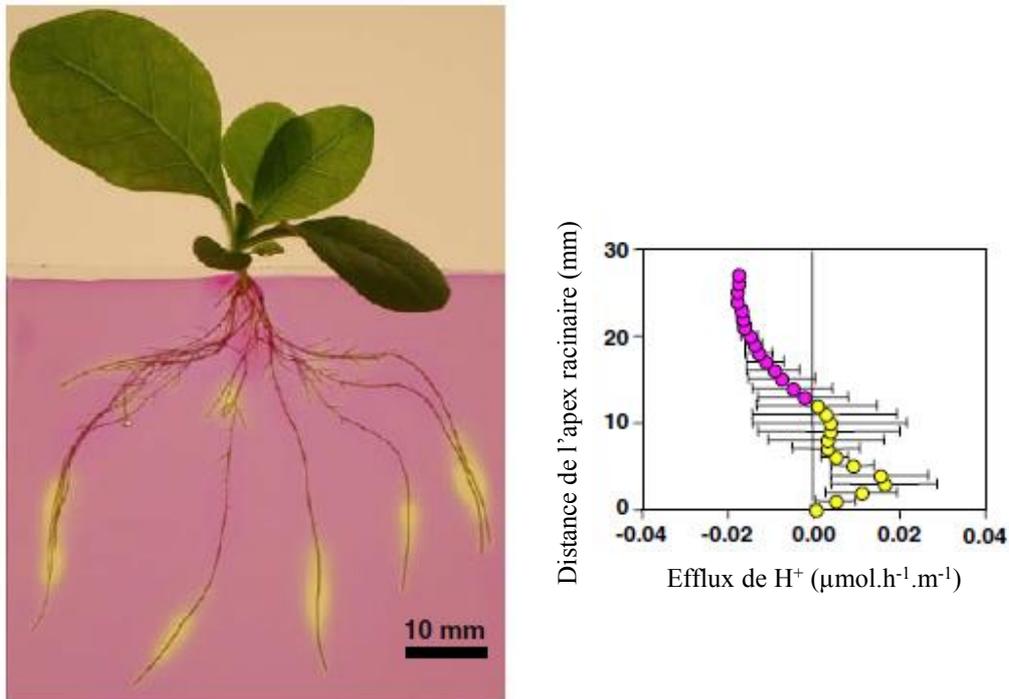


d'*Arabidopsis* déficients en nitrate réductase et donc incapables d'utiliser le nitrate comme source d'N, un apport localisé de nitrate dans le milieu induit une stimulation locale de l'élongation racinaire (Zhang *et al.*, 1999). Les auteurs suggèrent que le nitrate pourrait agir directement comme molécule signal. Cependant, un apport localisé de nitrate induit l'expression des transporteurs de nitrate de la famille NRT1 dont certains membres sont également capables de transporter l'auxine (Léran *et al.*, 2014). L'élongation des racines latérales lors d'un apport localisé de nitrate pourrait donc être le résultat d'un transport accru de l'auxine.

### II.1.2. Par modification de la rhizosphère par les racines

Ces changements morphologiques (modulation du système racinaire et formation de poils racinaires) en réponse à une faible disponibilité en nutriments s'accompagnent également de changements physiologiques qui vont permettre aux végétaux d'augmenter leur capacité à prélever les nutriments peu mobiles dans le sol. Les végétaux sont capables de mettre en œuvre divers processus physico-chimique et biochimique de mobilisation des nutriments au travers de modifications de leur disponibilité environnementale dans une zone bio-influencée appelée rhizosphère (Hinsinger *et al.*, 2009), constituant l'interface entre le sol et les racines.

Dans le sol, moins de 2 % des nutriments sont directement accessibles pour la plante (Marschner, 2011). Pour accéder aux nutriments, les racines vont donc induire un mouvement d'eau qui va entraîner un important flux de masse (Barber, 1995). Plus de 80 % des besoins en N du maïs peut ainsi être pourvu. Mais ce mécanisme ne permet pas l'absorption d'éléments peu mobiles dans le sol tels que le P, le K, le Ca ou le Fe. La diffusion permet également le déplacement des nutriments dans la rhizosphère mais dans une moindre mesure. Dans les régions arides ou semi-arides où le flux de masse ne permet pas d'augmenter la disponibilité des nutriments, les végétaux se sont adaptés en mettant en place un mécanisme d'ascenseur hydraulique. L'eau est prélevée en profondeur par les racines puis libérée par les racines près de la surface. La faible quantité d'eau larguée dans la rhizosphère permet alors une diffusion des nutriments jusqu'aux racines. Une modification du potentiel redox permet également d'augmenter la disponibilité des nutriments. En effet, l'oxygène consommé par les racines n'étant pas totalement réapprovisionné entraîne une diminution du potentiel redox. Celle-ci va accentuer la réduction du Fe et du Mn ce qui augmente leurs solubilités. Cependant, chez certaines espèces adaptées à des milieux anaérobies, un tissu aërifère, l'aérenchyme permet l'échange d'oxygène avec la rhizosphère, entraînant la diminution de l'absorption de Fe ou de Mn. C'est par exemple le cas chez le riz cultivé en sol submergé, les racines fournissent de l'O<sub>2</sub> ce qui conduit à une augmentation du potentiel redox dans la rhizosphère, avec pour conséquence une précipitation d'oxydes de Fe et une diminution de la



**Figure II.11. Changement de pH induit par les racines de *Nicotiana tabacum* L. soumis à une limitation en Fe.**

Les racines sont immergées dans un gel d'agarose contenant du pourpre de bromocrésol, un colorant révélateur de pH. L'efflux de protons (en  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ ) est calculé en fonction de l'évolution du pH indiquant une alcalinisation significative (couleur rouge et valeurs négatives de l'efflux de protons) ayant lieu le long des parties basales des racines, ou une acidification apicale (couleur jaune) (Vansuyt *et al.*, 2003; Hinsinger *et al.*, 2009).

**Tableau II.3. Principales modalités utilisées par les végétaux pour modifier la rhizosphère et augmenter la phytodisponibilité des nutriments (Marschner, 2011).**

Modification de la rhizosphère par la plante	Effet sur la disponibilité des éléments nutritifs
Croissance des poils racinaires	Augmentation de zone rhizosphérique appauvrie en phosphore et en potassium.
Libération d'eau (ascenseur hydraulique)	Mouvement accru de nutriments aux racines <i>via</i> l'induction d'un mouvement d'eau qui va entraîner un important flux de masse, augmentation de la minéralisation microbienne, de la solubilisation.
Libération de polysaccharides	Augmentation de la stabilité du sol.
Modification du pH	Augmentation de la disponibilité du phosphore et des métaux.
Libération d'acides organiques	Augmentation de la disponibilité du phosphore et des métaux.
Libération de phytosidérophores	Augmentation de la disponibilité du fer.
Libération de sucres	Modification de la communauté microbienne du sol : augmentation de la minéralisation, de la solubilisation.
Libération de molécules signals	Attraction des microorganismes bénéfiques (champignons mycorhiziens, microorganismes fixateurs de $\text{N}_2$ ), répulsion des pathogènes et microorganismes délétères.

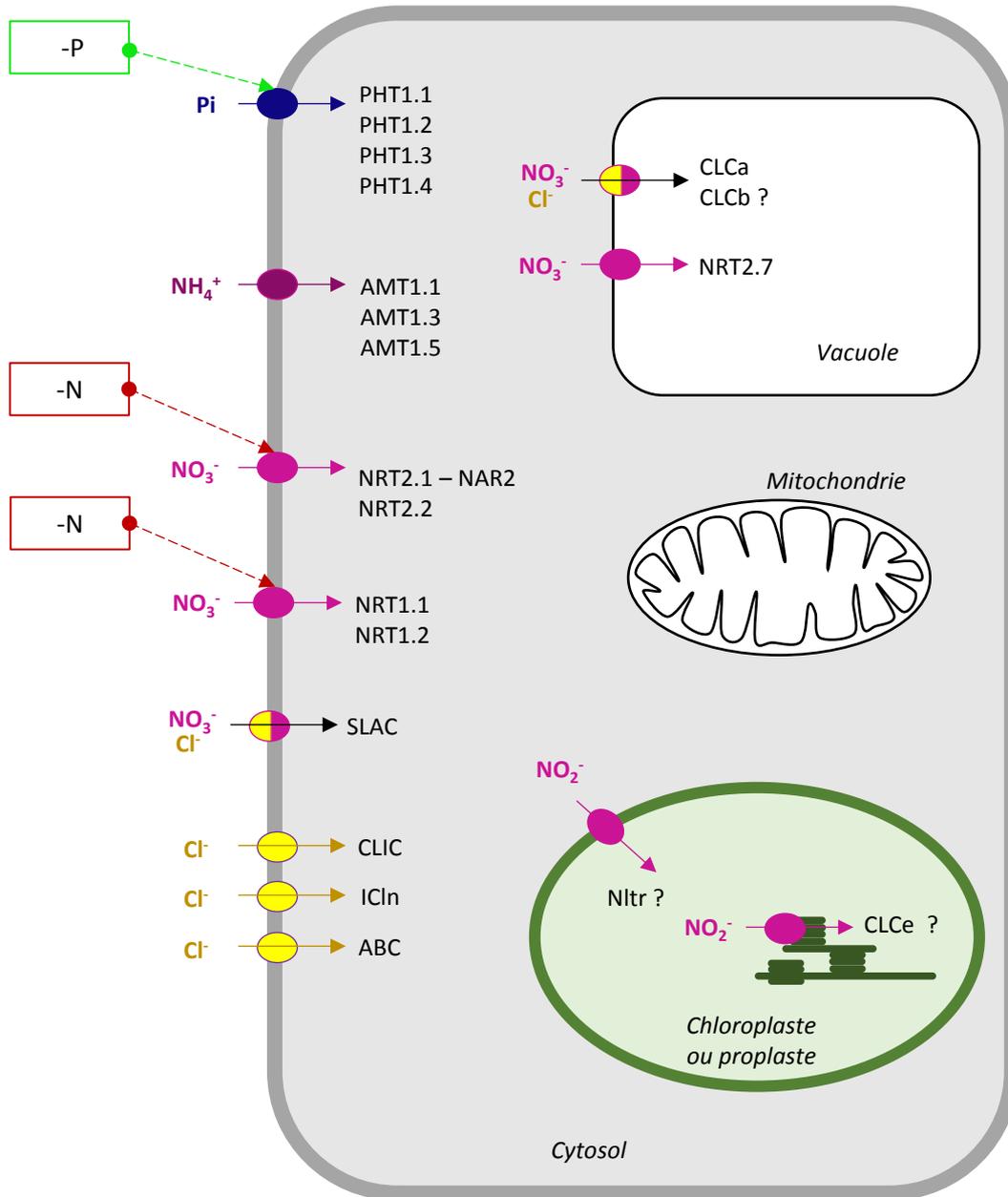
biodisponibilité en Fe, Zn et P. Tout comme le potentiel redox, le pH affecte fortement la disponibilité des nutriments. La respiration entraîne une acidification de la rhizosphère par le dégagement de CO<sub>2</sub> qui se transforme rapidement en H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. De la même façon, une absorption de cations entraîne également une acidification de la rhizosphère résultant d'un efflux de protons racinaires. Cette acidification entraîne l'augmentation de la disponibilité du P, du Fe et d'autres métaux (Figure II.11). A l'inverse, l'alcalisation a lieu lorsque l'absorption d'anion prédomine sur l'absorption de cations du fait d'un symport anion/protons.

Les végétaux peuvent également modifier directement la disponibilité de certains nutriments en relarguant des composés dans la rhizosphère (Tableau II.3) tels que des acides organiques, des composés phénoliques, des sucres, des phytosidérophores, des enzymes, etc... (Marschner, 2011). Ainsi, la libération d'acides organiques, de composés phénoliques ou de phosphatase augmente la disponibilité de P dans la rhizosphère. Les acides organiques en se complexant au Fe diffusent jusqu'à la surface racinaire permettant d'augmenter son adsorption. Chez les Poacées, l'exsudation de phytosidérophores qui complexent préférentiellement le Fe, mais également le Cu et le Zn augmentent l'absorption de ces éléments. Ils sont ensuite absorbés sous leurs formes chélatées.

Les végétaux pourraient également affecter indirectement la disponibilité des nutriments en modifiant la communauté microbienne du sol (Marschner, 2011). Les micro-organismes présents dans la rhizosphère peuvent diminuer la disponibilité des nutriments en décomposant certains composés relargués dans la rhizosphère par les végétaux ou en immobilisant les nutriments au sein de la communauté microbienne, ou au contraire augmenter leur disponibilité par la libération de nutriments, la modification du pH ou encore la libération de sidérophores ou d'acides organiques tout comme les végétaux.

### II.1.3. Par régulation de l'absorption racinaire des éléments minéraux

Les plantes doivent constamment acquérir des nutriments de la solution du sol pour assurer leur croissance et leur développement. Par conséquent, une absorption racinaire efficace, surtout dans des conditions défavorables, est nécessaire pour maintenir l'homéostasie des teneurs des tissus en nutriments. Les différents transporteurs racinaires et leurs régulations potentielles ont fait l'objet de différentes revues, par exemple, pour l'N, le P et le S (Gojon *et al.*, 2009), le Cu, le Zn, le Mn et le Fe (Pilon *et al.*, 2009), et le Ni, le Mo, le B et le Cl (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009). La régulation de ces systèmes d'absorption est complexe, elle implique de multiples transporteurs et de multiples voies de régulation suggérant que les végétaux absorbent les nutriments dont ils ont besoins en réponse à la demande interne et à l'offre du milieu extérieur mais aussi afin de maintenir des concentrations cellulaires en dessous des risques de toxicité.



**Figure II.12. Principaux transporteurs de P (en bleu), de N (en rose) et de Cl (en jaune) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale.**

Certains transporteurs capables de transporter à la fois le  $\text{NO}_3^-$  et le  $\text{Cl}^-$ , apparaissent en deux couleurs. Pour chaque transporteur, les flèches indiquent le sens de transport de l'élément (influx ou efflux). A gauche du schéma, l'effet positif d'une carence en un élément sur l'expression d'un transporteur est indiqué par une flèche verte, alors qu'un effet négatif est indiqué par une flèche rouge. Adapté de Shin *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2007; Tejada-Jiménez *et al.*, 2009; Dechorgnat *et al.*, 2010; Krapp *et al.*, 2014.

Les nutriments sont absorbés au niveau racinaire sous la forme d'anions ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ...) ou de cations ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ...) ou encore de molécule neutre ( $\text{B}(\text{OH})_3$ ) par différents mécanismes. De par les similarités physicochimiques de certains éléments, une part importante de l'absorption est assurée par des canaux à cations ou canaux à anions aspécifiques qui peuvent transporter plusieurs nutriments selon leurs valences. Une autre partie de l'absorption est assurée par des transporteurs spécifiques ne transportant qu'un ion ou que quelques-uns.

La synthèse qui sera donnée ensuite pour l'absorption racinaire des anions et des cations est probablement non exhaustive et sera sans aucun doute, amenée à être complétée en fonctions des découvertes qui restent à venir.

### II.1.3.a. L'absorption des anions monovalents (Figure II.12)

L'N est prélevé par les racines sous la forme de **nitrate** ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) mais également et de façon plus minoritaire sous la forme d'urée, d'acides aminés voire de peptides. L'absorption de ces différentes molécules est assurée par un réseau complexe de transporteurs. Quatre familles de transporteurs de nitrate ont été décrites chez *A. thaliana* : NRT1/NPD (nitrate transporter 1/peptide) ou NPF, NRT2 (nitrate transporter 2), CLC (chloride channel) et SLAC/SLAH (slow anion channel associated homologs) (Figure II. 12) (Krapp *et al.*, 2014). NPF pour NRT1/PTR family est une nomenclature récemment proposée par Lérant *et al.* en 2014 puisque les transporteurs NRT1 de nitrate sont également capable de transporter d'autres molécules telles que l'auxine, l'ABA, et des glucosinolates (Lérant *et al.*, 2014).

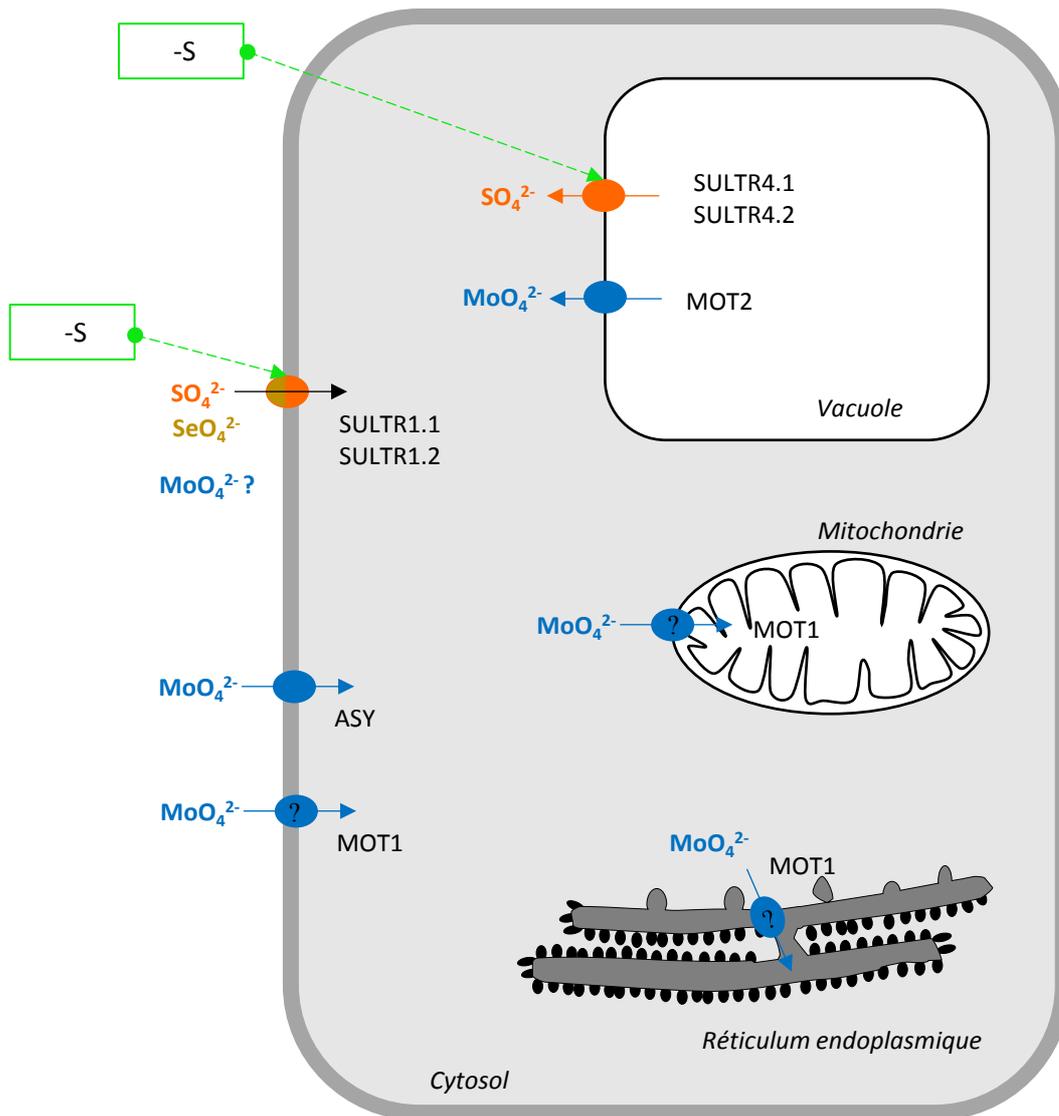
L'expression des gènes codant des transporteurs de  $\text{NO}_3^-$  est dépendante du statut azoté de la plante et de la disponibilité de l'azote dans la solution du sol. Les protéines NRT2 sont des transporteurs à haute affinité capable de transporter les ions  $\text{NO}_3^-$  lorsqu'ils sont présents dans le milieu à des concentrations inférieures à  $500\mu\text{M}$ . En fonction de leur réponse à un apport de 1 mM de  $\text{NO}_3^-$ , les sept gènes actuellement décrits chez *A. thaliana* appartenant à la famille NRT2 (AtNRT2.1 à AtNRT2.7) (Orsel *et al.*, 2002) ont été regroupés en trois catégories. La première catégorie comprend les gènes AtNRT2.1 et AtNRT2.2, dont l'expression augmente jusqu'à 5 fois après 3h d'exposition, puis sont réprimés à partir de 72h. La protéine AtNRT2.1 n'agit pas seule pour transporter le  $\text{NO}_3^-$ , mais requière une deuxième protéine NAR2 qui lui est physiquement associée (Dechornat *et al.*, 2010). La deuxième catégorie comprend les gènes exprimés de façon constitutive (AtNRT2.5 et AtNRT2.6), ne présentant aucun phénomène d'induction par le  $\text{NO}_3^-$ . Enfin, la troisième catégorie comprend les gènes dont l'expression est réprimée après un apport de  $\text{NO}_3^-$ , (AtNRT2.4 et AtNRT2.7). Le gène AtNRT1.1 code un système de transport qui intervient aux faibles et aux fortes concentrations en nitrate (Krapp *et al.*, 2014) selon son état de



phosphorylation. Comme pour AtNRT2.1, le gène AtNRT1.1 est inductible par le nitrate, et il est réprimé lors d'une période de carence en nitrate (Lejay *et al.*, 1999). Les transporteurs de nitrate sont finement régulés en fonction de la source d'azote disponible et du statut nutritionnel de la plante. Une régulation serait exercée négativement par les produits de l'assimilation du nitrate tels que l'ammonium et les acides aminés (Vidmar *et al.*, 2000), et positivement par les produits issus de la photosynthèse, comme le saccharose (Lejay *et al.*, 1999).

La famille SLAC/SLAH et la famille CLC sont des canaux à anions monovalents capables de transporter à la fois du  $\text{NO}_3^-$  et du  $\text{Cl}^-$ . Les protéines SLAC présentent une forte affinité pour le  $\text{NO}_3^-$ , avec un rapport de perméabilité  $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$  de  $\sim 10$  et  $20$  pour SLAC1 et SLAH3, respectivement (Krapp *et al.*, 2014). À l'inverse, les protéines de transport anionique CLC présente une plus grande affinité pour les ions  $\text{Cl}^-$ . Mais la protéine CLCa peut également fonctionner comme un antiport  $2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  contrôlant l'accumulation de nitrate dans les vacuoles (De Angeli *et al.*, 2009). Une perte de fonction du gène *clca* entraîne une diminution de l'accumulation de  $\text{NO}_3^-$  de 50 % chez les mutants d'*A. thaliana* en comparaison du type sauvage. AtCLC est sur-régulé par le nitrate. Le chlore est également transporté par trois autres familles de transporteurs spécifiques : CLIC (chloride intracellular channel), ICln (nucleotide-sensitive chloride conductance regulator protein) et ABC (ATP-Binding Cassette) (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009).

Le **phosphore** est également majoritairement prélevé comme un anion monovalent sous la forme de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ; il peut également être prélevé sous la forme de  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Schachtman *et al.*, 1998). En effet, la forme selon laquelle le phosphate est disponible dans le sol varie en fonction du pH. À pH 5-6, où le taux d'absorption est le plus élevé, la forme monovalente prédomine. Comme les concentrations de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  dans le sol sont de l'ordre du micromolaire, des transporteurs actifs à haute affinité sont requis pour son absorption (Shen *et al.*, 2011). Elle est assurée par des symports  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}^+$  appartenant à la famille de transporteurs PHT1 (Gojon *et al.*, 2009). Chez *A. thaliana*, les gènes *AtPht1* sont fortement exprimés dans les racines, PHT1,1, PHT1,2 et PHT1,4 étant localisés dans l'épiderme et les cellules corticales de la racine et PHT1,3 localisé dans les cellules du péricycle. Les transporteurs PHT1,1 et PHT1,4 ont un rôle majeur dans l'absorption du phosphate puisque la mutation des deux gènes codant ces transporteurs entraîne une diminution de l'absorption du phosphate de 20 % et de 40 % respectivement et leur double mutation conduit à une chute de l'absorption du phosphate de 75 % en comparaison du type sauvage (Shin *et al.*, 2004). Le schéma de régulation de l'expression des gènes *AtPht1* est complexe. Ces gènes sont induits par une limitation de l'apport en P (Gojon *et al.*, 2009). Leur induction est contrôlée par un mécanisme de régulation transcriptionnelle commun impliquant le facteur de transcription MYB : PHR1.



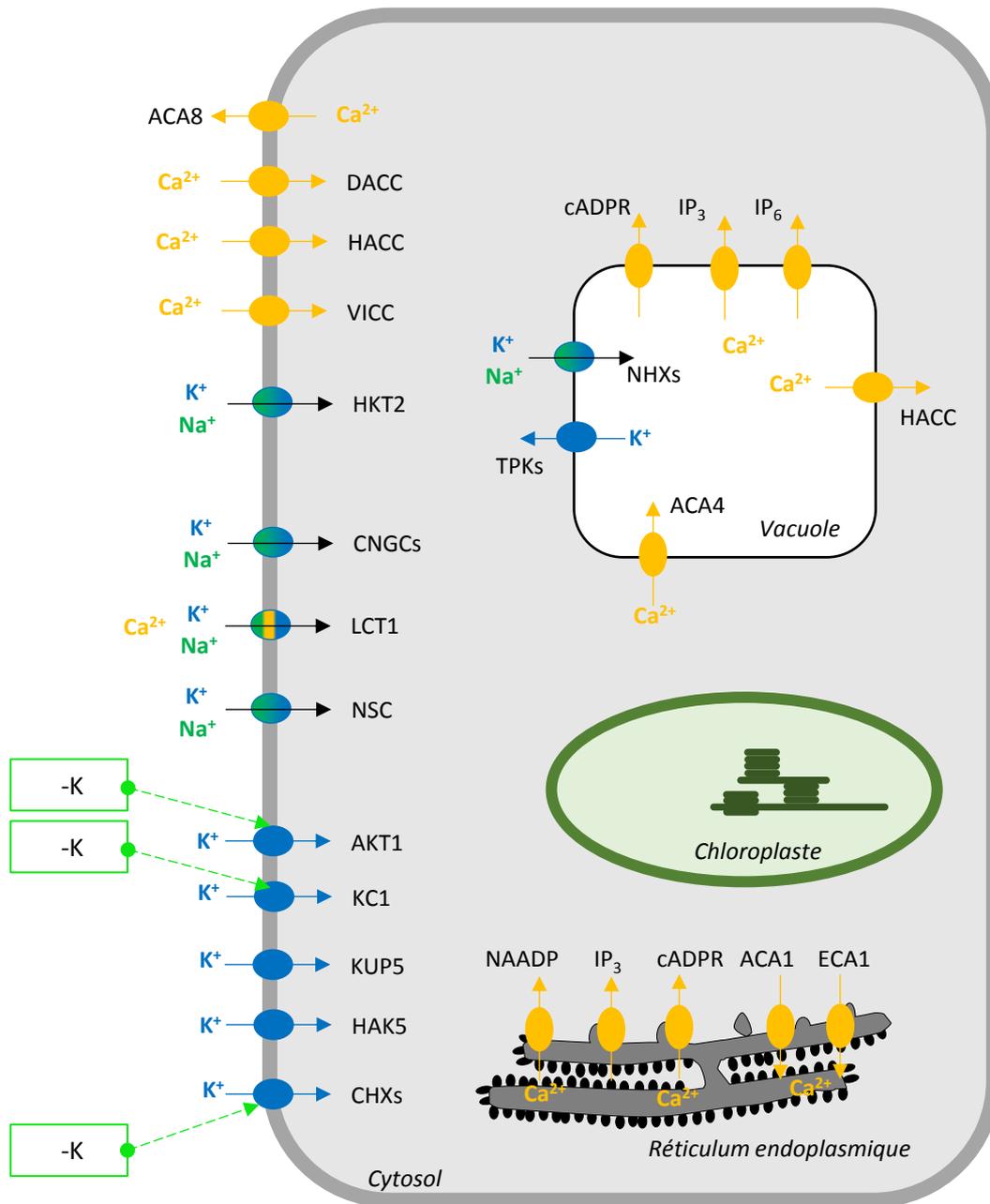
**Figure II.13. Principaux transporteurs de S (en orange), de Se (en jaune) et de Mo (en bleu) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale.**

Certains transporteurs sont capables de transporter à la fois le  $\text{SO}_4^{2-}$  et le  $\text{SeO}_4^{2-}$ , ils apparaissent en plusieurs couleurs correspondant aux éléments transportés. Pour chaque transporteur, les flèches indiquent le sens de transport de l'élément (influx ou efflux). Le point d'interrogation indique que la localisation de MOT1 est hypothétique, Tomatsu *et al.* (2007) localisent MOT1 au sein de la membrane plasmique et dans le système endomembranaire, alors que Baxter *et al.* (2008a) établissent sa localisation dans les mitochondries. A gauche du schéma, l'effet positif d'une carence en un élément sur l'expression d'un transporteur est indiqué par une flèche verte. Adapté de Kopriva *et al.*, 2009; Hibara *et al.*, 2013; Bittner, 2014.

### II.1.3.b. L'absorption des anions bivalents (Figure II.13)

Le soufre, le molybdène et le sélénium sont prélevés de la solution du sol sous la forme d'anions bivalents sous forme de **sulfate** ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), **de molybdate** ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) **et de sélénate** ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), respectivement (Figure II.13). Ces trois anions de même taille et de même charge pourraient être prélevés par les transporteurs de sulfate (Figure II.13) (Shinmachi *et al.*, 2010).

La famille des transporteurs de sulfate comprend chez *A. thaliana* 14 gènes qui peuvent être subdivisés en cinq groupes selon leurs similarités de séquence (synthèses de Hawkesford, 2003; Kopriva *et al.*, 2009). Les membres du premier groupe sont les mieux caractérisés, ce sont des transporteurs à haute affinité qui jouent un rôle dans l'absorption du sulfate du sol. Les transporteurs du second groupe sont responsables du transport longue distance au cours de la translocation du sulfate des organes source aux organes puits. Ils sont localisés dans les cellules des vaisseaux conducteurs xylémiques et phloémiques. Les transporteurs du troisième groupe sont localisés dans les tissus foliaires. A ce jour, le rôle spécifique de ces transporteurs reste à élucider. Les membres du quatrième groupe sont localisés au niveau vacuolaire et sont responsables de l'efflux de sulfate des vacuoles vers le cytoplasme (Kopriva *et al.*, 2009). Un cinquième groupe comprenant deux isoformes (*Sultr5.1* et *Sultr5.2*) a été proposé, les séquences de ces deux gènes sont considérablement plus courtes : environ 450 acides aminés de longueur contre 650 pour les autres groupes (Hawkesford, 2003), et ne comportent pas le domaine STAS (sulfate transporter anti-sigma), domaine critique pour le transport de sulfate et la stabilité des transporteurs (Llamas *et al.*, 2011). Ce dernier groupe ayant moins de 13 % d'identité avec les autres groupes de transporteurs de sulfate pourrait être considéré comme une famille indépendante (Llamas *et al.*, 2011). En effet, leur rôle effectif dans l'absorption de sulfate n'a toujours pas été démontré. Au contraire, *SULTR5.2* a été renommé *MOT1* puisqu'il a été identifié comme le premier transporteur de molybdate chez *Clamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jiménez *et al.*, 2007) et *A. thaliana* (Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008a; Bittner, 2014). La localisation et l'implication de *MOT1* dans l'absorption de Molybdate reste à confirmer. En effet, Tomatsu *et al.* (2007) localisent *MOT1* au sein de la membrane plasmique et dans le système endomembranaire, alors que Baxter *et al.* (2008a) établissent sa localisation dans les mitochondries. *SULTR5.1* a également été identifié comme un transporteur de molybdate et renommé *MOT2* (Tejada-Jiménez *et al.*, 2011). Cette isoforme est responsable de l'export vacuolaire du molybdate vers les organes puits (Gasber *et al.*, 2011 ; Bittner, 2014). Récemment, le transporteur membranaire *ASY* jouant un rôle dans l'absorption du molybdate a été identifié (Hibara *et al.*, 2013). L'absorption du molybdate à partir de la solution du sol est également assurée par *SHST1*, un transporteur de sulfate du groupe 1. L'absorption de molybdate par ce transporteur n'est pas affectée par la présence de sulfate, alors



**Figure II.14. Principaux transporteurs de K (en bleu), de Na (en vert) et de Ca (en jaune) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale.**

Certains transporteurs sont capables de transporter à la fois le K<sup>+</sup>, le Na<sup>+</sup> ou le Ca<sup>2+</sup>, ils apparaissent en plusieurs couleurs correspondant aux éléments transportés. Pour chaque transporteur, les flèches indiquent le sens de transport de l'élément (influx ou efflux). A gauche du schéma, l'effet positif d'une carence en un élément sur l'expression d'un transporteur est indiqué par une flèche verte. Adapté de White et Broadley, 2003; Adams et Shin, 2014.

que celle de sulfate est réduite en présence de molybdate chez *Stylosanthes hamata* (Fitzpatrick *et al.*, 2008)

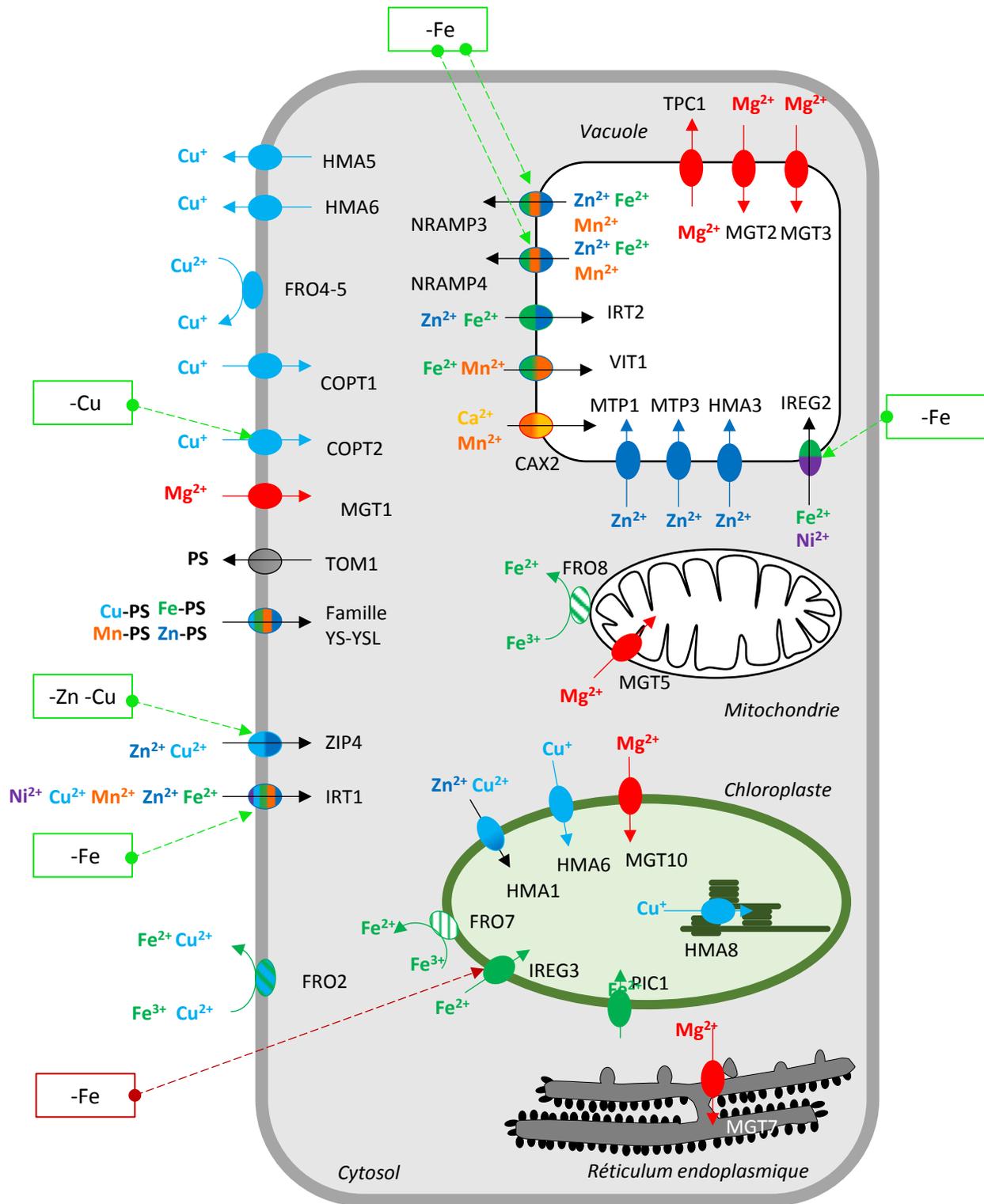
L'absorption du sulfate est régulée en fonction de la disponibilité en S et du statut nutritionnel de la plante. Une diminution de la disponibilité en sulfate entraîne une sur-régulation de l'expression des gènes codant les transporteurs de sulfate, augmentant ainsi les capacités d'absorption (Davidian et Kopriva, 2010). L'application de Se augmente l'expression de *BjSultr1.1* chez *B. juncea* correctement alimenté en S, alors qu'il n'a pas d'effet sur son niveau d'expression en cas de carence en S (Schiavon *et al.*, 2015). L'expression du transporteur de molybdate : MOT1 est activée en présence de  $\text{MoO}_4^{2-}$  (Tomatsu *et al.*, 2007).

### II.1.3.c. L'absorption des cations monovalents (Figure II.14)

La famille des gènes AMT1 responsables du transport à haute affinité de l'**ammonium**, comporte cinq membres, parmi lesquels *AtAmt1.1*, *AtAmt1.2* et *AtAmt1.3* ont été les plus étudiés (Gazzarrini *et al.*, 1999). Leur expression est principalement régulée par la concentration en N dans la rhizosphère (Gansel *et al.*, 2001). Le niveau de transcrits de *AtAmt1.1* augmente de sept fois durant les 24 premières heures lors d'une carence azotée (Rawat *et al.*, 1999). De la même façon, *AtAmt1.3* est fortement induit par une déficience en azote dans le milieu alors qu'aucun changement n'est observé pour *AtAmt1.2* (Gazzarrini *et al.*, 1999). La glutamine exercerait un rétrocontrôle négatif sur la transcription du gène *AtAmt1.1* (Rawat *et al.*, 1999).

Le **potassium** et le **sodium** sont des éléments structurellement et chimiquement très similaires (Benito *et al.*, 2014). Ils sont absorbés sous la forme de cations monovalents :  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$ . Plusieurs types de transporteurs sont à la fois impliqués dans l'absorption de Na et de K, tels que HKT (high-affinity  $\text{K}^+$  transporters), HAK (high affinity  $\text{K}^+$  transporters), LCT (low-affinity cation transporter) ou NSC (non-selective cation channels) qui transportent les cations par diffusion passive (Figure II.14) (Schachtman et Liu, 1999). La famille HKT a été particulièrement étudiée. Elle a été initialement caractérisée chez le blé comme un symport  $\text{H}^+-\text{K}^+$ . Mais, le nom de cette famille (high-affinity  $\text{K}^+$  transporters) n'apparaît plus aujourd'hui approprié. En effet, les transporteurs HKT peuvent contribuer au maintien du potentiel osmotique en transportant du Na. Les transporteurs HKT interviennent dans l'absorption à haute affinité de K et l'absorption à basse ou haute affinité de Na, selon le transporteur et les concentrations en Na et K dans la solution du sol. LCT1, un transporteur de K et de Na pourrait également faciliter l'absorption du Ca (White et Broadley, 2003).

Le **cuiivre** est majoritairement absorbé sous la forme de  $\text{Cu}^+$ . Au niveau racinaire, son transport est assuré par les transporteurs COPT1 et COPT2 membres de la famille COPT (Copper



**Figure II.15. Principaux transporteurs de Fe (en vert), de Zn (en bleu foncé), de Cu (en bleu ciel), de Mn (en orange), de Mg (en rouge), de Ca (en jaune) et de Ni (en violet) identifiés et localisés à ce jour dans une cellule végétale.**

Certains transporteurs sont capables de transporter plusieurs cations, ils apparaissent en plusieurs couleurs correspondant aux éléments transportés. Pour chaque transporteur, les flèches indiquent le sens de transport de l'élément (influx ou efflux). Pour être pris en charge par leurs transporteurs, le Cu et le Fe doivent être préalablement oxydés par des oxydases indiquées en hachure. L'effet positif d'une carence en un élément sur l'expression d'un transporteur est indiqué par une flèche verte, alors qu'un effet négatif est indiqué par une flèche rouge. PS : phytochelatins. Adapté de Pittman, 2005; Puig et Penarrubia, 2009; Waters, 2011; Yruela, 2013.

transporter) présentant la plus haute affinité pour le Cu (Figure II.15) (Yruela, 2013). L'absorption de Cu est également en partie assurée par les transporteurs de la famille HMA (Heavy Metal transporting P1B-type ATPases) au nombre de 8 chez *A. thaliana*. Les HMA 1 et 5 à 8 sont impliqués dans le transport de cations monovalents tel que le  $\text{Cu}^+$  ; alors que les HMA 2 à 4 sont impliqués dans le transport des cations bivalents ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) (Williams et Mills, 2005).

#### II.1.3.d. L'absorption des cations bivalents (Figure II.15)

Le Fe, le Zn, le Mn, le Ni, le Mg et le Ca sont prélevés de la solution du sol sous la forme de cations bivalents. Le Fe présent dans la solution du sol comme  $\text{Fe}^{3+}$  peut être réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  par FRO2 avant qu'il ne soit pris en charge par différentes familles de transporteurs de cations bivalents. Il peut également être chélaté dans la solution du sol par des phytosydérophores (PS) sécrétées par la plante *via* le transporteur TOM1. Le complexe Fe-Phytosidérophore est alors absorbé par la famille YS- YSL (Yellow Strip - YS like) (Thomine et Vert, 2013). Cette famille peut également transporter le Zn, le Mn et le Cu complexés aux phytosidérophores.

Le transport des métaux bivalents à travers les membranes plasmiques est assuré par un grand nombre de protéines qui ne présentent que peu ou très peu de spécificité (Figure II.15). Les principales familles sont les suivantes (Krämer *et al.*, 2007) : la famille ZIP (zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter protein), les CDF (Cation Diffusion Facilitator), les NRAMP (Natural Resistant Associated Macrophage Proteins), la sous-famille YSL (yellow-stripe 1-like) de la superfamille OPT (oligopeptide transporter), la famille CCC1 ( $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive cross complement 1), la famille IREG (iron-regulated protein) ou Ferroportine, les CAX (cations exchangers), la famille VIT et les HMA2 à 4 comme mentionné précédemment. Trois sous-familles des transporteurs ABC pour ATP-binding Cassette : MRP (Multidrug Resistance-associated Proteins), ATM (ABC Transporters of the Mitochondria) et PDR (Pleiotropic Drug Resistance) sont également impliqués dans le transport actif des métaux bivalents en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP.

Les protéines de la **famille ZIP** (ZRT-IRT-like Proteins) (Guerinot, 2000) sont des transporteurs non spécifiques d'un grand nombre de métaux ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$ ). Un membre de la famille ZIP, IRT1 (Iron-Responsive Transporter 1) représente la principale voie d'absorption des ions  $\text{Fe}^{2+}$  par *A. thaliana* (Vert *et al.*, 2002). Les premiers travaux sur la surexpression de IRT1 chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ont montré une contribution de cette protéine dans l'absorption d'autres ions :  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  (Korshunova *et al.*, 1999). IRT2, comme IRT1 est exprimé dans les cellules de l'épiderme racinaire, il est capable de



transporter le Fe et le Zn à travers la membrane tonoplastique. ZIP4 qui partage plus de 50 % d'homologie avec AtIRT1 est impliqué dans le transport de Zn et du Cu, sous la forme de cations bivalents. Un autre transporteur ZIP2 pourrait être impliqué dans l'acquisition racinaire du Cu (Puig *et al.*, 2007). L'expression de ZIP2 et ZIP4 est augmentée en cas de carence en Zn et en Cu.

**La famille NRAMP** (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) correspond également à une famille de protéines impliquées dans le transport des ions métalliques bivalents. Chez *S. cerevisiae*, les deux protéines de la famille NRAMP, SMF1 et SMF2, sont responsables du transport de plusieurs ions tels que le  $Mn^{2+}$ , le  $Cu^{2+}$ , le  $Co^{2+}$  et le  $Cd^{2+}$  (Liu *et al.*, 1997). Concernant les NRAMP présentes chez les plantes, de premiers travaux ont montrés que les protéines AtNRAMP1, 3 et 4 assurent l'absorption de  $Cd^{2+}$  (Thomine *et al.*, 2000). La surexpression d'AtNRAMP3 chez *A. thaliana* confère une sensibilité des plantes au  $Cd^{2+}$  en raison d'un transport accru du Cd vacuolaire vers le cytosol (Thomine *et al.*, 2003). AtNRAMP3 et AtNRAMP4 sont localisés sur la membrane tonoplastique et sont impliqués dans la remobilisation des métaux essentiels (Fe, Mn et Zn) stockés dans la vacuole au cours de la germination des graines (Lanquar *et al.*, 2005). Ils sont induits en cas de carence en Fe.

Les gènes de la **famille CCC** ( $Ca^{2+}$ -sensitive cross completer) encodent des transporteurs dont le rôle est opposé à celui des NRAMP. Ils vont transporter le Fe dans la vacuole alors que les NRAMP vont mobiliser les métaux de la vacuole. Chez la levure, le transporteur CCC1 est capable de transporter le  $Fe^{2+}$  et le  $Mn^{2+}$  dans la vacuole. Chez *Arabidopsis*, l'homologue VIT1 de CCC1 a été identifié (58 % de similarité de séquence) (Grotz et Guerinot, 2006).

Les gènes de la **famille CDF** (cations diffusion facilitator) également appelée **MTP (Metal Tolerance Protein)** encodent des antiports proton/cation bivalent dont les membres peuvent contrôler le transport des métaux dans la vacuole ou dans d'autres compartiments intracellulaires. Cette famille est la famille des **CDF (Cation Diffusion Facilitator)** (Colangelo et Guerinot, 2006). Le premier transporteur de la famille CDF identifié était le transporteur de zinc ZAT1, dernièrement renommé MTP1. MTP1 et MTP3 sont localisés dans la membrane tonoplastique où ils permettent la séquestration du Zn dans la vacuole.

Trois protéines de la **famille IREG** ou **ferroportines** ont également été décrites chez *A. thaliana*. AtIREG1/FPN est localisé dans la membrane plasmique des cellules de la stèle et pourrait être impliqué dans la distribution longue distance des métaux (Morrissey *et al.*, 2009). Un second membre de la famille, IREG2 est localisé dans le tonoplaste et permet l'influx vacuolaire du Fe, du Ni et du Co (Schaaf *et al.*, 2006; Morrissey *et al.*, 2009). IREG3 ou MAR1 est impliqué dans l'influx chloroplastique de Fe (Conte *et al.*, 2009; Yruela, 2013). MAR1 est sous-exprimé en cas de carence en Fe au contraire de IREG2 qui est surexprimé (Schaaf *et al.*, 2006; Conte *et al.*, 2009).



La protéine membranaire PIC1 (pour permease in chloroplasts1) permet également le transport de Fe dans les chloroplastes.

Les transporteurs de la **famille CAX** (calcium exchanger) sont des antiports cation/H<sup>+</sup> ou cation/Na<sup>+</sup> qui échangent H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup> contre des cations tels que Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ou Cd<sup>2+</sup>. Onze gènes ont été identifiés à ce jour chez *A. thaliana*. Ils ont un rôle important dans la séquestration vacuolaire des métaux qui existent en excès dans le cytoplasme (Clemens, 2006; Krämer *et al.*, 2007).

Le Ca peut également être transporté par d'autres familles de transporteurs (Figure II.14) (White et Broadley, 2003). Deux familles de pompes ioniques à Ca<sup>2+</sup> ont été décrites. Quatre membres de la première famille (ECA1 à ECA4) ont été identifiés chez *Arabidopsis*, présents dans la membrane plasmique, le tonoplaste et le système endomembranaire. Dix membres de la deuxième famille ont été identifiés (ACA1, 2 et 4 et ACA7 à ACA13) dans la membrane plasmique, le tonoplaste, le système endomembranaire et les plastes. Des canaux perméables au Ca ont également été décrits. Ils sont classés en trois familles : DACC (depolarization-activated cation channels), HACC (hyperpolarization-activated cation channels) et VICC (voltage-independant cation channels). Tous les membres de la famille VICC sont perméables à la fois aux cations monovalents et divalents. Plusieurs canaux à Ca hautement sélectifs localisés dans le tonoplaste contrôlent l'influx du Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme : IP<sub>3</sub>, IP<sub>6</sub> ou cADPR).

Le Mg est également absorbé par des canaux à cations aspécifiques et par des membres de la famille MGT (Figure II.15) (Waters, 2011). Cette famille pourrait également transporter d'autres cations bivalents. MGT1, un transporteur à haute affinité du Mg identifié au niveau de la membrane plasmique chez *A. thaliana* serait responsable de la plus grande part de l'absorption (Li *et al.*, 2001). MGT2 et MGT3 sont impliqués dans le stockage vacuolaire de Mg<sup>2+</sup> (Conn *et al.*, 2011) et MGT5 dans l'influx de Mg<sup>2+</sup> dans la mitochondrie (Li *et al.*, 2008). MGT10 (également appelé MRS2-11) est exprimé dans la membrane plastidiale (Drummond *et al.*, 2006). Enfin, MGT7 serait localisé au niveau du système endomembranaire des cellules racinaires (Mao *et al.*, 2008).

### II.1.3.e. L'absorption du B sous forme de molécule neutre

Le **B** est majoritairement prélevé de la solution du sol sous la forme d'acide borique B(OH)<sub>3</sub> (Miwa et Fujiwara, 2010). Parmi tous les éléments requis par les plantes, le B est le seul élément qui est absorbé comme une molécule de charge neutre et non sous forme ionique. L'absorption du B a longtemps été considérée comme un mécanisme passif, non facilité par des transporteurs (Hu et Brown, 1997). Cette hypothèse était fondée sur la perméabilité élevée des bicouches lipidiques à l'acide borique. Cependant, de récentes études moléculaires chez *A. thaliana* ont identifié deux transporteurs racinaires de B : NIP5,1 (Takano *et al.*, 2006) et BOR1 (Takano *et al.*, 2007). NIP5,1,



appartenant à la famille MIP est un canal permettant l'influx d'acide borique aux cellules racinaires. L'implication d'autres membres de la famille MIP dans le transport de B a également été suggérée. Le second transporteur de B, BOR1, joue un rôle dans le chargement du xylème. Il est localisé dans les cellules du péricycle. Dans des conditions de faible disponibilité en B, l'association de NIP5,1 pour l'absorption et de BOR1 pour l'efflux vers le xylème permet le transport de B de la solution du sol au xylème. BOR1 permet de générer un gradient de concentration entre les cellules racinaires et le milieu, gradient qui est probablement essentiel pour l'absorption de B par NIP5,1.

L'expression des transporteurs de B est également dépendante de l'apport en B. L'expression racinaire de *AtNip5,1* est surexprimée lors d'un faible apport de B chez *A. thaliana*. Le niveau de transcrits dans les racines augmente de 15 fois, 24h après l'application de la carence en B (Takano *et al.*, 2006). Au contraire, en réponse à de fortes concentrations en B dans le milieu, l'expression de *AtNip5,1* et *AtBor1* est réprimée (Miwa et Fujiwara, 2010).

## II.2. Mise en réserve et remobilisation des ressources

L'absorption racinaire des nutriments et leur exportation vers d'autres tissus se fait de façon quasi simultanée. En règle générale, les feuilles sénescentes se caractérisent par un fort export et un faible import pour assurer le développement de nouveaux organes végétatifs ou reproductifs (White, 2012). Ce mécanisme conduisant à une diminution nette du contenu élémentaire est souvent décrit dans la littérature par les termes : redistribution, retranslocation ou remobilisation.

Durant le stade végétatif, cette stratégie de gestion des nutriments permet de maintenir la croissance végétative lorsque la disponibilité en nutriments est limitante. La remobilisation des macro- et micro-nutriments stockés à court ou moyen terme permet ainsi de pallier le manque transitoire d'absorption minérale. Par exemple, en cas de carence en N (Malagoli *et al.*, 2005a) ou en S (Abdallah *et al.*, 2010), les feuilles matures deviennent sources pour assurer la croissance des organes en développement, notamment des jeunes feuilles. La remobilisation est également un mécanisme important durant le stade reproducteur où l'activité racinaire et l'absorption diminuent alors que de nouveaux puits émergent (Malagoli *et al.*, 2005a). Les feuilles sénescentes vont alors assurer une part importante du remplissage des graines (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Enfin, la remobilisation intervient également chez les ligneux avant la chute des feuilles pour assurer un stockage au sein du tronc puis une nouvelle remobilisation printanière au profit des bourgeons (Millard et Grelet, 2010).



### II.2.1. Mise en réserve

Les nutriments sont remobilisés à partir de pool d'éléments mis en réserve. Dans le cas où la disponibilité en nutriments est supérieure aux besoins de la plante, certains nutriments tels que le S, le K, le P, le Mg, le Cl peuvent être stockés dans les feuilles sous la forme d'ions inorganiques ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  (ou pyrophosphate noté PP) et  $\text{HPO}_4^{2-}$  (ou phosphate inorganique noté Pi),  $\text{Mg}^{2+}$ , Cl). Ainsi, le S serait stocké comme  $\text{SO}_4^{2-}$  dans la vacuole puis remobilisé par l'action de transporteurs de sulfate tonoplastiques (AtSULTR4;1 et AtSULTR4;2) responsables de l'efflux de sulfate de la vacuole (Kataoka *et al.*, 2004; Dubousset *et al.*, 2009). MGT2 et MGT3 seraient impliqués dans le stockage vacuolaire de  $\text{Mg}^{2+}$  (Conn *et al.*, 2011) alors que TPC1 serait impliqué dans l'efflux de  $\text{Mg}^{2+}$  de la vacuole.

D'autres éléments ne peuvent pas être stockés sous forme libre en raison de leur toxicité mais sont complexés dans la vacuole. Par exemple, lors de situations non limitantes en Fe, celui-ci peut être stocké dans les vacuoles où il sera complexé à d'autres molécules telles que le malate (Fe-Malate), le citrate (Fe-Citrate) ou encore la nicotianamine (Fe-NA) pour éviter toute toxicité. Comme le Fe, le Zn et le Mn peuvent également être chélatés par la NA. NRAMP3 et NRAMP4, sur-régulés en cas de carence, sont impliqués dans l'efflux vacuolaire de ces métaux (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005).

Les nutriments peuvent également être mis en réserve sous la forme de protéines solubles bien que ce type de stockage soit coûteux en énergie. Par exemple, l'N peut être mis en réserve sous forme d'acides aminés mais aussi de protéines solubles comme certaines enzymes de l'appareil photosynthétique et plus particulièrement la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) qui constitue quantitativement la plus grosse réserve d'N dans les plantes (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008).

### II.2.2. Remobilisation selon la mobilité dans le phloème

Les nutriments sont remobilisés vers les puits en développement *via* le phloème, en conséquence leur capacité à être remobilisés va dépendre de leur mobilité dans le phloème (White, 2012). Les macronutriments à l'exception du Ca (*i.e.*, N, P, S, K, et Mg) sont considérés comme hautement mobiles dans le phloème, alors que les micronutriments à l'exception du Mn (*i.e.*, Fe, Zn, Cu, Ni, Mo, B, et Cl) ont une mobilité modérée dans le phloème. Le Ca et le Mn sont considérés comme immobiles dans le phloème et donc comme non remobilisables durant la vie de la plante.



### II.2.2.a. *Éléments hautement mobiles dans le phloème*

L’N est hautement mobile dans le phloème. Lors de la sénescence foliaire, quelle que soit l’espèce, l’N stocké au niveau des feuilles sous forme de protéines, mais également d’acides aminés et d’acides nucléiques, est exporté essentiellement sous forme d’acides aminés vers les tissus en croissance (grains et nouvelles feuilles) *via* les tissus conducteurs du phloème. Chez le colza, la quantité de N foliaire remobilisé est hautement variable selon le rang foliaire (Malagoli *et al.*, 2005b), la remobilisation étant plus efficace à partir des feuilles situées en haut de la canopée (rangs foliaires 22 à 36) par rapport aux feuilles du bas de la canopée (rangs 1 à 21). La remobilisation en N est également plus importante en cas de carence en N qui provoque une sénescence foliaire et une protéolyse plus intenses (Desclos *et al.*, 2009).

Le **K**, **P**, **S** et **Mg** sont également hautement mobiles dans le phloème mais un stockage restreint de ces éléments pourrait limiter leur remobilisation chez certaines espèces (*cf.* Abdallah *et al.*, 2011 pour le S). La remobilisation de ces éléments pourrait être indépendante de la sénescence puisque leur stockage est essentiellement sous forme inorganique. Le K et le P sont efficacement remobilisés à partir des feuilles d’*A. thaliana* (Himmelblau et Amasino, 2001; Waters et Grusak, 2008) et des feuilles sénescents des arbres à feuilles caduques (Hagen-Thorn *et al.*, 2006). En revanche, le K n’est pas remobilisé des feuilles sénescents de *Betula pendula* (Tejia Ruuhola, 2011). Le S est également remobilisé des feuilles sénescents d’*A. thaliana* (Himmelblau et Amasino, 2001) mais aussi de *Brassica napus* en particulier lors d’une carence en S (Abdallah *et al.*, 2010). La remobilisation du Mg dépendrait de l’espèce considérée, il a été constaté qu’il est remobilisé des feuilles de *Triticum aestivum* (Hocking, 1994) et de *Fraxinus excelsior* (Hagen-Thorn *et al.*, 2006) mais pas des feuilles de *Quercus robur*, *Tilia cordata*, *B. pendula* (Hagen-Thorn *et al.*, 2006), *Pisum* sp (White, 2012), ou d’*A. thaliana* (Himmelblau et Amasino, 2001).

### II.2.2.b. *Éléments à mobilité modérée dans le phloème*

La remobilisation des micronutriments a été moins étudiée que celle des macronutriments en raison de leurs faibles teneurs dans les tissus et de l’utilisation limitée d’isotopes stables. Le **B**, **le Ni**, **le Mo**, **le Fe**, **le Cu**, et **le Zn** sont considérés comme ayant une mobilité modérée. L’efficacité de remobilisation de ces nutriments va dépendre de l’espèce considérée et pourrait être affecté par l’environnement. Par exemple, la remobilisation du **B** est dépendante de l’espèce. Ce nutriment est complexé avec des composés diols ou polyols pour être transporté dans le phloème (Blevins et Lukaszewski, 1998), il est donc mobile chez les espèces riches en sorbitol, transportant le C comme polyols telles que *Prunus amygdalus*, *P. dulcis*, *P. persica* et *Malus domestica* mais est immobile chez les espèces pauvres en sorbitol telles que *Ficus carica*, *Pistacia vera*, et *Juglans regia* (Brown et Hu, 1996).



La mobilité du **Ni** est également variable selon les espèces. Il est remobilisé de feuilles sénescents de *Glycine max* (Cataldo *et al.*, 1978) mais pas des feuilles sénescents de *A. thaliana* (Himmelblau et Amasino, 2001). Neumann et Chamel (1986) rapportent également une mobilité contrastée du  $^{63}\text{Ni}$  dans le phloème : elle est plus importante chez *Pisum sativum* que chez *Pelargonium zonale* (Neumann et Chamel, 1986).

Des symptômes de carence en **Fe, Cu et Zn** apparaissent chez les jeunes feuilles, bien que la translocation de ces nutriments dans le phloème soit possible (White, 2012). Le Zn est remobilisé chez *H. vulgare* (Hegelund *et al.*, 2012) alors qu'il n'est pas remobilisé chez *P. sativum* (Sankaran et Grusak, 2014). Chez le blé, les résultats sont divergents, Garnett et Graham, (2005) n'observent pas de remobilisation du Zn, alors que d'autres auteurs constatent sa remobilisation (Hocking, 1994; Kutman *et al.*, 2012). Le Zn et le Cu apparaissent remobilisés chez de nombreuses espèces durant la sénescence foliaire : chez *Q. subpyrenaica* (Abadia *et al.*, 1996), *Pinus sylvestris* (Nieminen et Helmisaari, 1996), *A. thaliana* (Himmelblau et Amasino, 2001; Waters et Grusak, 2008), *G. max* (Mauk et Noodén, 1992), et chez *T. aestivum* (Hocking, 1994; Guttieri *et al.*, 2013). Par contre, chez différentes espèces d'arbres à feuilles caduques et à feuilles persistantes, Shi *et al.*, (2011) n'ont constaté aucune remobilisation du Fe et du Cu durant la sénescence.

En cas de carences en **Mo**, des symptômes apparaissent sur les plus jeunes feuilles, suggérant une faible efficacité de remobilisation (White, 2012). En effet, la quantité de Mo dans les feuilles sénescents de *A. thaliana* ne diminue pas, indiquant que ce métal n'est pas une cible de la remobilisation associée à la sénescence (Himmelblau et Amasino, 2001). Pourtant, une remobilisation importante du Mo (93 %) a lieu chez des explants de *G. max* lorsque ceux-ci sont uniquement alimentés avec de l'eau (Mauk et Noodén, 1992).

### II.2.2.c. *Éléments non mobile dans le phloème*

Le **Ca** et le **Mn** sont deux nutriments ayant une très faible mobilité dans le phloème. En utilisant le Mn marqué, son transport dans le phloème a été démontré, bien que sa mobilité reste généralement basse (Nable et Loneragan, 1984). Des résultats similaires sont retrouvés pour le Ca. La mobilité du Ca a été mesurée dans la sève phloémique avec des concentrations très faibles (ratio Ca/K de 1/100 dans la sève phloémique). En effet, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, la formation d'un bouchon de callose est induite, stoppant le transport longue distance des ions (Kauss, 1987). Sous certaines conditions, la remobilisation du Ca a été reportée chez *G. max* (Mauk et Noodén, 1992) et *Phaseolus vulgaris* (Biddulph *et al.*, 1959) après l'application de diéthyl éther, de NaCl ou d'acide triiodobenzoïque et chez *Lycopersicon esculentum* dont la couche épidermique est localement endommagée (Malone *et al.*, 2002). Ces perturbations induisent le mouvement du Ca *via* le xylème



en augmentant les flux transpiratoires (Dayod *et al.*, 2010). Comme le Ca, le Mn pourrait également être mobilisé *via* le xylème (Nable et Loneragan, 1984).

Outre la mobilité dans le phloème, l'efficacité de remobilisation d'un nutriment pourrait également dépendre de la force de puits (nouveaux organes, remplissage des graines, etc...), de leur stockage (plus ou moins limité) et de la forme de stockage qui va être plus ou moins facilement remobilisable. En effet, les nutriments stockés dans les vacuoles pourraient être plus facilement remobilisés que ceux nécessitant la dégradation de structures cellulaires telles que les chloroplastes, et encore la dégradation de protéines.

La remobilisation des nutriments va donc être fortement dépendante du stade de développement. Durant le stade reproducteur, le degré de remobilisation d'un élément, est généralement considérée comme pouvant être plus important que durant le stade végétatif (White, 2012).

### II.2.3. Remobilisation selon les stades de développement

Les études disponibles sur la remobilisation des éléments minéraux au cours du développement végétatif ou reproducteur des végétaux, concernent essentiellement les macro-éléments d'origine tellurique, le N en particulier, secondairement le P et le S. Les travaux portant sur d'autres éléments sont en général beaucoup moins nombreux alors que les approches multi-élémentaires sont quant-à-elles plus rares, comme l'illustrent les données bibliographiques suivantes. A ce jour, seules quelques approches multi-élémentaires ont été réalisées décrivant la remobilisation des éléments essentiels durant la sénescence foliaire (Hocking et Pate, 1977; Himelblau et Amasino, 2001; Waters et Grusak, 2008; Moreira, 2009).

#### II.2.3.a. Remobilisation au stade végétatif

La remobilisation des éléments mis en réserve est initiée lorsque l'absorption ne suffit pas à satisfaire les besoins requis pour la croissance de la plante. Durant le stade végétatif, l'apport des nutriments aux racines peut être limitant de façon permanente (faible disponibilité dans le sol, bas pH, etc...) ou de façon temporaire (manque d'eau limitant le flux de masse, excès d'eau augmentant le lessivage des nutriments, basses températures, etc...) La remobilisation des nutriments stockés dans les feuilles matures va donc être de prime importance pour leur permettre de maintenir leur croissance dans de telles conditions. Ce mécanisme constitue une adaptation typique des végétaux ayant une croissance rapide, d'autres espèces vont simplement cesser de croître lorsque la disponibilité en nutriments est limitante (White, 2012). Ainsi, le maintien de la croissance du colza en dépit de longues périodes de restriction en  $\text{SO}_4^{2-}$  atteste d'une remobilisation du S endogène



préalablement stocké dans les organes végétatifs (principalement au sein des feuilles) particulièrement efficace (Abdallah *et al.*, 2010). De la même façon, en cas de carence en P, le Pi stocké est largement remobilisé afin de maintenir les mêmes concentrations en P dans le cytosol permettant ainsi un maintien des activités métaboliques. Le maintien ou la réduction de croissance de différents cultivars de soja (Martinez *et al.*, 2005), ou différents cultivars de *Brassica* (Akhtar *et al.*, 2008) est directement corrélée à leur capacité de stockage et à leur vitesse de libération du P stocké.

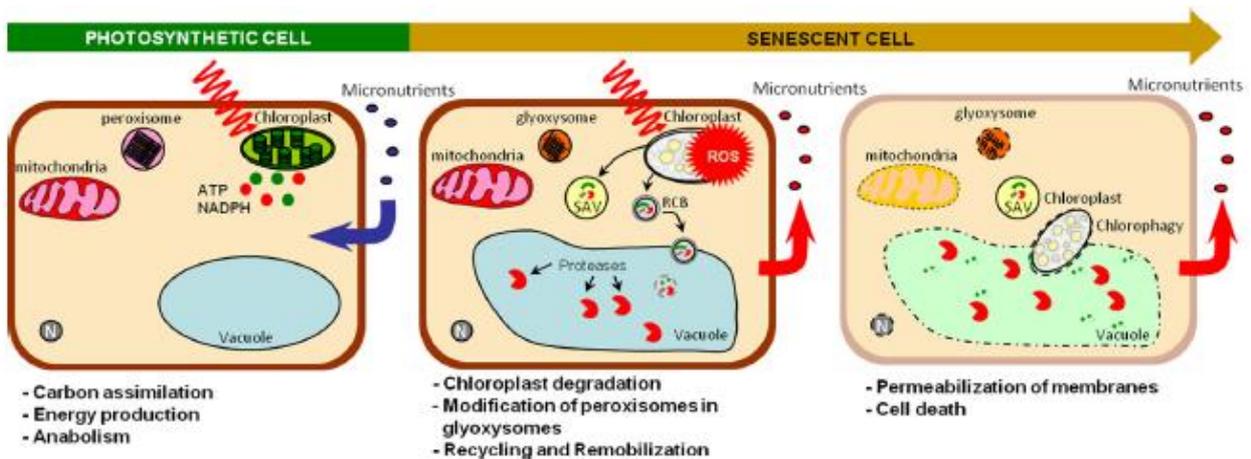
En cas de carence, les nutriments stockés à court terme tels que les ions inorganiques peuvent être remobilisés. Ceux-ci sont exportés depuis la vacuole vers le phloème. Ainsi, en cas de carence en S, le principal composé soufré mobilisé est le sulfate. Cet ion inorganique stocké préalablement au niveau vacuolaire est remobilisé *via* l'induction des transporteurs tonoplastiques : SULTR4.1 et SULTR4.2 (Kataoka *et al.*, 2004; Dubousset *et al.*, 2009). Le P s'accumule également dans la vacuole lorsque la disponibilité en P est importante, puis celui-ci est largement remobilisé. Au cours de la carence en P, les concentrations en Pi dans le cytosol sont maintenues au détriment du Pi vacuolaire. Aucune protéine n'a encore été identifiée comme contrôlant le transport de P à travers la membrane tonoplastique.

A contrario, lorsque des plantes de colza avec de bas niveaux de réserves soufrées sont exposées à une limitation en S, la remobilisation du sulfate par l'induction de transporteurs tonoplastiques n'est pas suffisante pour maintenir la croissance (Abdallah *et al.*, 2011). Dans ce cas, la sénescence foliaire est induite, permettant la dégradation de composés organiques soufrés telles que des protéines solubles dans le but d'augmenter le S remobilisé pour les organes en développement (Avice et Etienne, 2014).

### *II.2.3.b. Remobilisation associée à la sénescence durant le stade reproducteur*

La remobilisation est particulièrement importante durant la phase reproductrice pendant laquelle l'activité racinaire et l'absorption diminue alors que de nouveaux puits émergent. En effet, à ce stade, l'assimilation de N diminue chez les légumineuses, le colza, le blé, le maïs ou le riz (Salon *et al.*, 2011).

Durant ce stade, les feuilles entrent en sénescence devenant des organes sources alors que de nouveaux puits comme les graines se développent. Le remplissage de ces dernières est assuré par l'absorption de nouveaux nutriments du sol et par la remobilisation des nutriments stockés. Par conséquent, la sénescence n'est pas seulement un processus dégénératif mais une étape importante pour la remobilisation des nutriments. Elle peut être déclenchée naturellement peu de temps après que la feuille ait atteint sa maturité, lorsque sa surface est maximale (Crafts-Brandner *et al.*, 1998) ou induite par un stress externe. Une limitation en N peut ainsi initier la sénescence ou l'accélérer



**Figure II.16. Transition puit/source au niveau cellulaire durant la sénescence.**

Les cellules photosynthétiques actives permettent la fixation de carbone, la production d'énergie et l'anabolisme, fonctions qui requièrent un apport de nutriments. La sénescence transforme ces cellules puits en cellules sources, par un intense processus de remobilisation des nutriments à partir des chloroplastes, du cytosol et de la vacuole. Les chloroplastes sont les premiers affectés. Les pigments photosynthétiques sont directement dégradés dans les chloroplastes, alors que les protéines stromales sont dégradées dans la vacuole centrale ou dans des vacuoles associées à la sénescence (SAV) après leur exportation via les RCB pour « Rubisco-containing Body » ou autophagosome. Ces mécanismes de démantèlement diminuent la taille et l'intégrité des chloroplastes permettant sa dégradation par chlorophagie. Les peroxyosomes sont modifiés en glyoxyosomes, qui produisent de l'énergie et des sucres solubles à partir du catabolisme lipidique. Les mitochondries qui restent intactes jusqu'à la fin de la sénescence, sont à leur tour dégradées lorsque la demande en énergie diminue. Enfin, la perméabilisation de la membrane plasmique entraîne une perte du cytoplasme qui conduit finalement à la mort cellulaire.

ROS : espèces réactives de l'oxygène ; SAV : vacuoles associées à la sénescence ; RCB : « Rubisco-containing body » ; N : noyau. (Pottier *et al.*, 2014)

(Diaz *et al.*, 2008; Agüera *et al.*, 2010). Lors de la sénescence, différents mécanismes physiologiques et biochimiques permettent la remobilisation : les constituants cellulaires sont catabolisés (rupture d'organites comme les chloroplastes, des protéines de réserve et d'enzymes) alors que les solutés mobiles sont exportés vers les nouveaux puits *via* le phloème (Figure II.16). Les chloroplastes sont parmi les premiers organites affectés par la sénescence (Biswal *et al.*, 2012). Les protéines chloroplastiques telle que la Rubisco sont transportées dans de petites vésicules, les RCB pour «Rubisco-containing Bodies» (Chiba *et al.*, 2003) afin d'être dégradées dans des vacuoles associées à la sénescence (SAV) (Martínez *et al.*, 2008) ou par autophagie dans la vacuole lytique centrale (pour review, voir Ishida *et al.*, 2014; Pottier *et al.*, 2014). Cette étape est cruciale pour la remobilisation de l'N, principalement d'origine protéique et pour les métaux fortement concentrés dans les chloroplastes. A la suite de ces bouleversements, la dégradation des chlorophylles est observée, puis celle des protéines membranaires des thylakoïdes (Hörtensteiner et Feller, 2002). 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 de la cellule ou apoptose.

La remobilisation intense des nutriments liée à la sénescence permet le remplissage du grain. L'N remobilisé à partir des feuilles contribue de 50 à 90 % au remplissage des grains de blé ou de maïs (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Cependant, quelques espèces comme le colza ont une faible efficacité de remobilisation de l'N (Avice et Etienne, 2014). A la récolte, seul 50 % de l'N absorbé est retrouvé dans les graines (Schjoerring *et al.*, 1995). Chez le blé, le P remobilisé représente de 21 à 63 % du contenu en P des graines (Batten *et al.*, 1986; Masoni *et al.*, 2007). En cas de carence, la contribution de la remobilisation au remplissage des graines augmente encore, pouvant représenter de 58 à 90 % du P des grains de blé (Batten *et al.*, 1986). Kutman *et al.*, 2012 rapporte que 80 % du Fe et 50 % du Zn des grains de blé sont issues de la remobilisation foliaire. La concentration foliaire de Fe et de Cu chute également durant la sénescence foliaire chez le blé (77 et 40-62 % respectivement) en raison de leur remobilisation vers les grains (Garnett et Graham, 2005).

### **III. Interactions entre nutriments et impact sur l'homéostasie minérale**

#### **III.1. Au niveau du sol**

L'accessibilité d'un élément, l'une des composantes principales de la disponibilité (Hinsinger *et al.*, 2009) est directement déterminée par la concentration d'éléments pouvant interagir avec lui en formant des complexes ioniques. Par exemple, le Se précipite avec certains métaux lourds tels que le Hg réduisant sa disponibilité dans les sols pollués (Wang *et al.*, 2014).



Le P va également coprécipiter dans la solution du sol en se complexant avec le Ca en milieu neutre ou alcalin, ou avec l'Al et le Fe en milieu acide (Hinsinger, 2001). Dans ces derniers, des complexes humique-Fe-Al-phosphates peuvent se former dans la solution du sol et représenter plus de 50 % du P organique total (Dolfing *et al.*, 1999).

Comme vu précédemment, la disponibilité des éléments dans le sol est également dépendante du pH (Marschner, 2011). Dans des sols neutres ou alcalins, l'acidification de la rhizosphère va augmenter la disponibilité du P, de Fe et d'autres métaux. Ainsi, l'acidification de la rhizosphère est une réponse adaptative de plusieurs espèces à la carence en Fe et P pour maintenir leur homéostasie. Une faible disponibilité en Fe va induire l'émission de protons au niveau racinaire. Cet efflux de protons va modifier localement le pH, changeant la biodisponibilité du Fe mais également des autres éléments de la rhizosphère. Ainsi, en cas de carence en Fe, l'absorption de Mn, de Co, de Zn, de Cd et de Mo est affectée (Baxter *et al.*, 2008b). L'acidification de la rhizosphère va augmenter la solubilité de Mn, Co, Zn et Cd mais diminuer celle du Mo. Une carence en Fe va donc interagir directement sur ces éléments et induire une carence secondaire en Mo. De la même façon, l'acidification du sol peut également augmenter la disponibilité du P en augmentant la solubilité du Fe et de l'Al, mais cette modification pourrait également induire une toxicité en Al (He *et al.*, 2010).

### III.2. Au niveau de l'absorption

Les transporteurs jouent aussi un rôle primordial dans les interactions entre les éléments minéraux. À cause des similarités physicochimiques de certains éléments, les transporteurs sont le plus souvent aspécifiques et peuvent transporter plusieurs éléments, comme précisé dans la partie 'Absorption racinaire des éléments minéraux et régulations'. Les ions de même valence vont donc entrer en compétition pour un même site d'absorption. Ainsi, l'absorption des ions  $\text{Cl}^-$  interagit avec l'absorption des ions  $\text{NO}_3^-$ . En milieu salin, l'absorption de  $\text{NO}_3^-$  est réduite chez un grand nombre de plantes (Rubinigg *et al.*, 2003). Chez *Lycopersicon esculentum*, un apport élevé de  $\text{Cl}^-$  dans le milieu va induire une diminution linéaire de l'absorption nette du  $\text{NO}_3^-$  et *vice-versa* (Kafkafi *et al.*, 1982). Cette diminution semble due à une réduction de l'influx alors que l'efflux reste inchangé (Rubinigg *et al.*, 2003). Le  $\text{Cl}^-$  et le  $\text{NO}_3^-$  pourraient rivaliser pour différentes familles de canaux à anions monovalents : les SLAC/SLAH et la famille CLC, capables de transporter du  $\text{NO}_3^-$  comme du  $\text{Cl}^-$  (De Angeli *et al.*, 2009; Krapp *et al.*, 2014).

Des interactions antagonistes ont également été reportées entre les anions divalents :  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$  et  $\text{SeO}_4^{2-}$ . En effet, le  $\text{SO}_4^{2-}$  et le  $\text{MoO}_4^{2-}$  ont la même charge nette, une géométrie et des propriétés de liaisons identiques (Dudev et Lim, 2004). En raison de sa similarité avec le  $\text{SO}_4^{2-}$ , le



$\text{SeO}_4^{2-}$  est transporté *via* les transporteurs de  $\text{SO}_4^{2-}$  (El Kassis *et al.*, 2007). Ces transporteurs sont également de bons candidats pour transporter le  $\text{MoO}_4^{2-}$ . En effet, chez un mutant de *S. cerevisiae* déficient dans le transport de  $\text{SO}_4^{2-}$  une part de l'absorption du Mo est assurée par SHST1, un transporteur de sulfate du groupe 1 de *Stylosanthes hamata* (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Lors d'une carence en S, *Brassica juncea* accumule plus de Se et de Mo que le témoin, probablement en raison de l'absence de compétition entre  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{MoO}_4^{2-}$  et entre  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{SeO}_4^{2-}$  (Schiavon *et al.*, 2012). Stroud *et al.*, (2010) et Shinmachi *et al.*, (2010) rapportent également une diminution des teneurs en Se et Mo des grains de blé lorsqu'une fertilisation soufrée est appliquée au cours de la culture.

L'absorption des cations par la plante est également extrêmement dépendante de la présence d'autres cations en compétition dans la rhizosphère, en particulier pour l'accumulation des métaux alcalins comme le K, le Na et le Rb qui sont des éléments structurellement et chimiquement très similaires (Benito *et al.*, 2014). Dans les sols salins, le Na rivalise avec le K pour les sites de transports à travers la membrane plasmique (Schachtman et Liu, 1999). Avec de forts apports en Na, les plantes vont préférentiellement prélever du Na, au détriment du K (Malvi, 2011). En effet, de nombreuses familles de transporteurs sont à la fois impliqués dans l'absorption de Na et de K : HKT (high-affinity  $\text{K}^+$  transporter), HAK (high-affinity  $\text{K}^+$  transporters), LCT (low-affinity cation transporter) et NSC (non-selective cation channels). HKT1, tout d'abord identifié comme un transporteur à haute affinité pour le K est un symport  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  (Gassmann *et al.*, 1996). L'absorption de  $\text{Rb}^+$  *via* HKT1 dans la levure est fortement inhibée par la présence de  $\text{K}^+$  dans le milieu suggérant une compétition entre  $\text{Rb}^+$  et  $\text{K}^+$  pour le site de transport.

De telles interactions sont également reportées entre métaux divalents. Ainsi, les transporteurs ayant une forte affinité pour le  $\text{Fe}^{2+}$  tels que IRT1 transportent également d'autres ions divalents tels que  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou encore  $\text{Cd}^{2+}$  (Pilon *et al.*, 2009). En conséquence, un faible apport de Fe affecte l'absorption des autres cations divalents et *vice-versa*. Une carence en Fe pourrait donc être à l'origine d'une toxicité secondaire en Zn. De plus, le Fe et le Cu ont besoin d'être réduit avant l'import par FRO2 ou FRO3 (Puig *et al.*, 2007). L'expression de FRO2 est sur-régulée lors d'une carence en Fe. La concentration de Fe dans le milieu affecte donc l'absorption du Cu (Pilon *et al.*, 2009).

### III.3. Au niveau du métabolisme

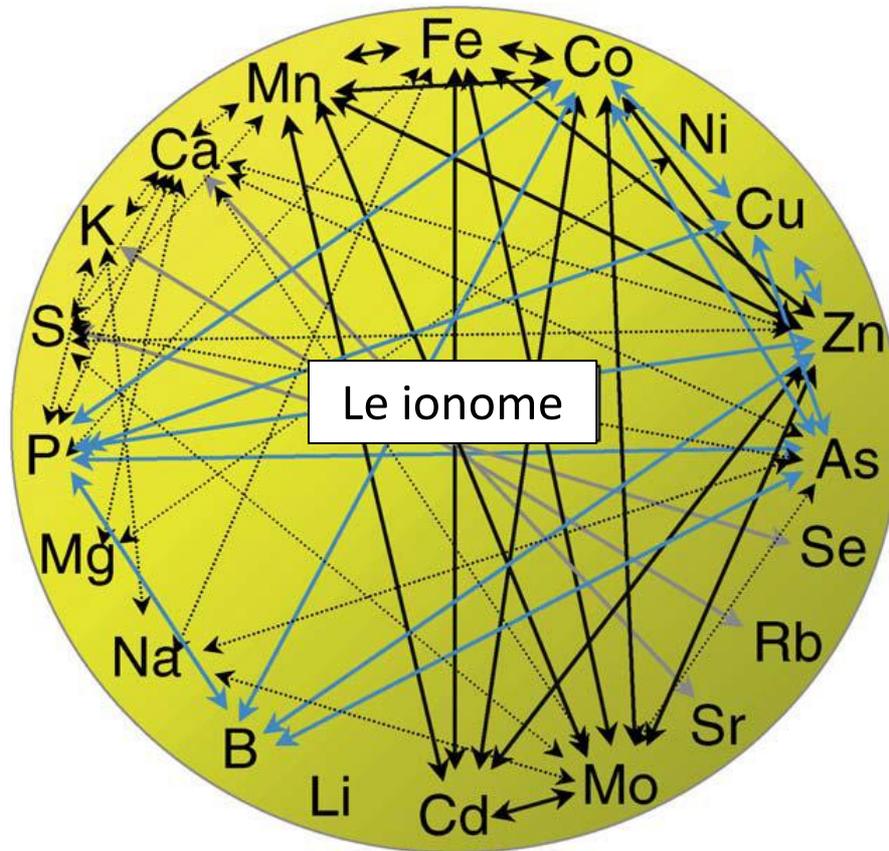
Une disponibilité limitée en un nutriment entraîne également la perturbation de processus métaboliques qui vont déclencher des réactions en cascade à travers de multiples voies de signalisation afin de rétablir un certain équilibre. En effet, une dérégulation de l'absorption d'un



élément peut avoir une incidence sur les voies métaboliques impliquant des enzymes dépendantes de cet élément, mais également sur les autres cations et anions, dont la teneur évoluera pour contrebalancer son absence. Chez les végétaux, certains anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) ou cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) sont importants pour le maintien de la pression osmotique et de l'équilibre acido-basique de la cellule. En cas de carence en un élément important pour l'équilibre osmotique, le potentiel osmotique des cellules va être maintenu dans un état stable par l'accumulation d'autres osmotocums et par l'ajustement de sa teneur en eau (Burns *et al.*, 2012). Par exemple, chez le colza, lors d'une carence en S, durant laquelle le  $\text{SO}_4^{2-}$  stocké est remobilisé pour maintenir la croissance, la réduction de sa contribution dans le maintien du potentiel osmotique est compensée par l'accumulation de plusieurs osmotocums : le  $\text{NO}_3^-$ , le  $\text{PO}_4^{2-}$  et le  $\text{Cl}^-$  (Sorin *et al.*, 2015). De la même façon, une modification de la biodisponibilité en un élément peut créer un déséquilibre acido-basique par un influx d'anions plus important que l'influx de cations ou *vice-versa*. Ainsi, un important apport de  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu de culture de plants de tomate a été reporté comme stimulant l'absorption de cation ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$ ) pour maintenir l'équilibre de charges (Kirkby et Knight, 1977).

Chaque élément a également un rôle métabolique, certains ions tels que le  $\text{Mg}^{2+}$  sont indispensables comme cofacteurs de certaines activités enzymatiques. Son absence peut donc potentiellement perturber de nombreuses voies métaboliques. Cependant, le noyau  $\text{Mg}^{2+}$  requis pour l'activité de nombreuses enzymes pourrait être remplacé dans une grande majorité des cas par un noyau  $\text{Mn}^{2+}$  puisque ces deux cations sont analogues chimiquement (Broadley *et al.*, 2012b). Par exemple, dans le cycle de Krebs l'isocitrate se lie avec un  $\text{Mg}^{2+}$ . Cette réaction enzymatique accepte également le  $\text{Mn}^{2+}$  comme cofacteur au lieu de  $\text{Mg}^{2+}$ . En cas de limitation en Mg, une accumulation de Mn dans des graines en développement d'orge a donc été reportée (Ahluwalia et Duffus, 1982). Cet effet pourrait également être dû à une compétition pour les sites de fixation des transporteurs (cf. partie Interactions transporteurs) ou/et au maintien de l'équilibre de charge.

Le Cu ou encore le Zn interagissent également avec le Mo au niveau métabolique. En effet, ces deux nutriments sont indispensables à la voie de biosynthèse du cofacteur MoCo, principale voie d'assimilation du Mo chez les végétaux (Kuper *et al.*, 2004; Schwarz et Mendel, 2006; Llamas *et al.*, 2011). Le Zn serait essentiel à la stabilisation de l'enzyme CNX5 impliquée dans cette voie de biosynthèse (Llamas *et al.*, 2011), alors que le Cu agirait comme un agent protecteur de MPT avant l'insertion du molybdène pour former le MoCo (Kuper *et al.*, 2004). Lors d'une disponibilité limitée en Cu et en Zn, la voie de biosynthèse du MoCo pourrait donc être affectée entraînant une augmentation de l'absorption de Mo. De précédent travaux ont en effet rapportés de plus fortes



**Figure II.17.** Interactions génétiques, physiologiques et chimiques entre éléments. Les flèches ne représentent qu'une partie des interactions élémentaires connues. En noir : Interactions entre éléments selon le modèle Fe de Baxter *et al.* (2008). En bleu : interactions entre éléments selon le modèle P de Baxter *et al.* (2008). Ces modèles ont été réalisés en mesurant le contenu élémentaire de plantes d'*Arabidopsis thaliana* soumises à différents niveaux d'apports de Fe ou P. En gris : analogues chimiques. (Baxter *et al.*, 2009)

teneurs foliaire en Mo chez le colza dans des conditions limitantes en Cu (Billard *et al.*, 2014) ou en Zn (Billard *et al.*, 2015).

Le B augmente également le transport de Cl et de P par l'induction des ATPases membranaires qui hydrolysent ou synthétisent l'ATP en permettant le passage des ions de l'autre côté de la membrane (Hänsch et Mendel, 2009).

De plus, la voie de régulation de certains transporteurs fait intervenir des éléments non transportés par ceux-ci. C'est par exemple, le cas du Zn qui va réguler l'activité des transporteurs à haute affinité de phosphate HvPT1 et HvPT2 (Huang *et al.*, 2000). Un apport sub-optimal de Zn induit donc une surexpression des transporteurs HvPT1 et HvPT2 chez *Hordeum vulgare* conduisant à une augmentation de l'absorption de P.

Ainsi, les interactions entre éléments sont hautement complexes et sensibles aux variations de teneurs de chacun d'entre eux comme l'illustre les propos précédents et au moins partiellement la Figure II.17 (Baxter, 2009). Les nutriments ne se comportent pas de façon indépendante mais comme une combinaison de nutriments (Baxter, 2015) pour lesquelles les analogies chimiques, et donc l'absence de spécificité de certains transporteurs, de même que les implications métaboliques et les régulations associées conduisent à un réseau multiple d'interactions (Figure II.17). Il est donc nécessaire de considérer l'ensemble de la composition d'un organisme : le ionome. De nouvelles techniques en spectrométrie de masse permettent de mesurer simultanément les teneurs de dizaines d'éléments. Ces interactions entre éléments sont encore mal connues mais sont de plus en plus étudiées dans le cadre d'approche de ionomique.

#### **IV. Objectifs de la thèse et stratégies expérimentales**

L'analyse bibliographique que nous avons réalisée ainsi que l'émergence encore relativement récente de la ionomique, soulignent largement la complexité des interactions entre éléments minéraux requis pour la nutrition des végétaux, pour lesquels il paraît nécessaire d'envisager des démarches plus globales. Cette nécessité est accrue par le fait que la production agricole requise par la croissance de la population humaine nécessitera d'optimiser la fertilisation et l'utilisation de ces ressources minérales dont certaines sont limitantes. Dans ce contexte, il paraît important de mieux caractériser les réponses du végétal à l'ensemble des carences minérales potentielles. L'objectif général de cette thèse consiste donc à étudier l'incidence de carences minérales individuelles sur (i) la remobilisation des nutriments, (ii) la composition du ionome et (iii) les applications pouvant en être dérivées. Les résultats obtenus sont décrits en trois chapitres, ayant chacun des objectifs distincts :



- le premier vise à identifier des stratégies potentiellement différentes, selon les éléments, en termes de mise en réserve et de remobilisation, conditionnées par leur rôle et leur utilisation métabolique. Ces mécanismes de stockage/remobilisation ont déjà été largement décrits pour l'azote et de façon plus récente pour le soufre que ce soit chez *Arabidopsis* ou *B. napus* (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Abdallah *et al.*, 2010). Les données pour les autres éléments sont plus rares et fragmentaires ; quelques études ont démontré la remobilisation du cuivre, du fer et du zinc au cours de la croissance (Himmelblau et Amasino, 2001 ; Waters *et al.*, 2009). Dans ce cadre, l'objectif de ce chapitre est de comparer le potentiel de remobilisation des éléments nutritifs (1) au cours de la sénescence foliaire chez plusieurs espèces végétales contrastées cultivées en conditions de plein champ ou (2) lors de 13 carences individuelles chez le colza.

- Les résultats obtenus dans ce premier chapitre laissent clairement présager de fortes interactions entre nutriments qu'il était nécessaire d'explicitier. Lors d'une carence en un nutriment, l'absorption des autres nutriments était soit non affectée, soit diminuée, soit augmentée. Un certain nombre de ces interactions ont déjà été bien explicités. C'est par exemple, le cas du Na qui est largement accumulé en cas de carence en K en raison de leur compétition pour les mêmes sites de transports tels que HKT (high-affinity  $K^+$  transporter), HAK (high-affinity  $K^+$  transporters), LCT (low-affinity cation transporter) ou NSC (non-selective cation channels) (Schachtman et Liu, 1999; Malvi, 2011). Au contraire, d'autres interactions n'ont pas encore explorées. Pour ce faire, la même procédure expérimentale a été mise en place afin de caractériser les modifications de la composition ionomique du colza en réponse à 13 carences individuelles afin d'identifier les interactions les plus significatives. Les résultats obtenus nous ont conduits dans un deuxième temps à nous focaliser sur l'absorption du molybdène et à tenter d'explicitier les mécanismes mis en jeu lors des carences conduisant à son augmentation.

- Le dernier chapitre de résultats a pour objectif d'identifier en conditions contrôlées puis de valider en conditions de plein champ, un indicateur nutritionnel précoce de la carence en S en s'appuyant sur les modifications du ionome mises en évidence lors de cette carence. Véritable signature nutritionnelle, la composition ionomique est considérée comme spécifique d'un statut physiologique selon Baxter *et al.*, (2008b). Les variations des teneurs en S seules dans les tissus ne sont pas révélatrices d'une carence en S, elles sont étroitement liées au stade de développement, à la vitesse de développement de la plante. L'utilisation de ratios entre composés a souvent été suggérée afin de pallier aux variations de teneurs ayant lieu durant la croissance et le développement des plantes (Blake-Kalff *et al.*, 2001). La démarche expérimentale que nous utilisons repose dans un premier temps sur une cinétique précise des variations des teneurs en S et en Mo des tissus lors d'une carence en S parallèlement à l'étude de l'expression des gènes supposés



coder des transporteurs de sulfate et/ou de molybdate. La validation du ratio [Mo]:[S] en condition de plein champ a ensuite été recherchée en utilisant une parcelle de colza oligotrophe en S, soumise à différents niveaux de fertilisation N et S. En utilisant un réseau de parcelles agricoles, nous avons ensuite cherché à déterminer des valeurs seuils permettant de classer ces cultures de colza comme ayant un statut carencé en S, présentant un risque de carence, ou suffisant.



---

## CHAPITRE III

### Développement d'une méthode d'analyse du ionome par ICP-MS-HR

---





# CHAPITRE III

## Développement d'une méthode d'analyse du ionome par ICP-MS-HR

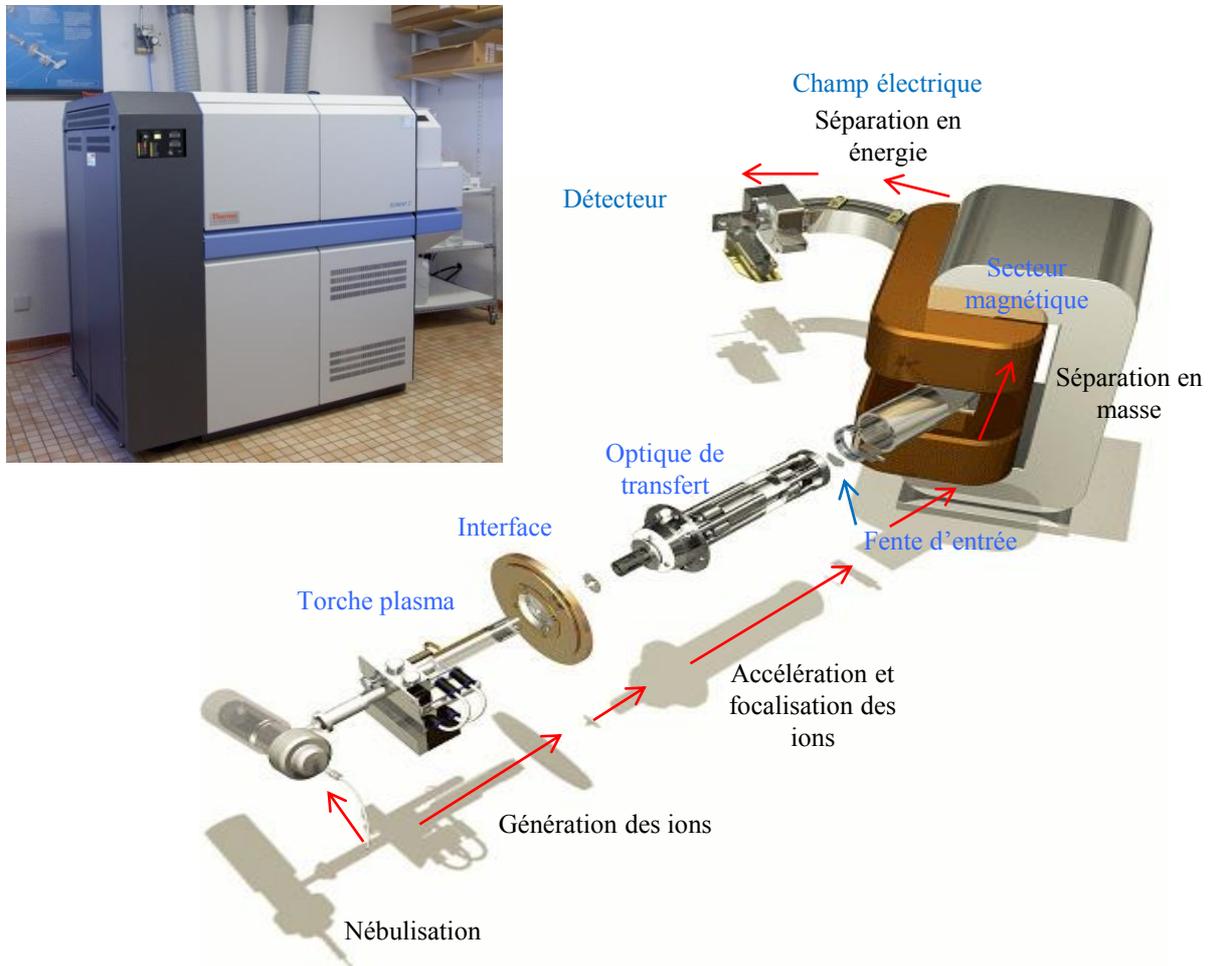
---

### I. Objectif de l'étude

L'analyse bibliographique a souligné la nécessité de considérer l'ensemble des nutriments essentiels et bénéfiques pour la croissance des végétaux à travers l'étude du ionome. Parmi les méthodes d'analyse multiélémentaire, l'ICP-MS-HR ou spectromètre de masse haute résolution à plasma à couplage inductif permet, en théorie, la détermination de 109 des éléments du tableau périodique à de très basses limites de détection (du ppq au ppm, soit de  $10^{-15}$  à  $10^{-6}$ ). C'est un bon outil d'analyse du ionome végétal puisqu'il permet l'analyse simultanée des éléments traces et majeurs. Inhérentes aux technologies plasma, des interférences dues à la présence de composés ou d'éléments ionisés ayant le même rapport masse/charge ( $m/z$ ) que l'isotope mesuré peuvent induire des erreurs dans les dosages. Dans quelques cas, elles peuvent être évitées en choisissant un isotope plus adéquat, en cassant les liaisons, ou uniquement pour les ICP-MS-HR, en ajustant la résolution. Néanmoins, les performances analytiques de l'ICP-MS-HR sont hautement dépendantes de la préparation des échantillons avant analyse. Une digestion totale de la matière organique doit être assurée dans des conditions optimales, d'une part, afin d'éviter que des résidus organiques interfèrent lors de la quantification et d'autre part, afin de limiter les risques de contamination, en particulier pour les éléments traces.

L'objectif principal de ce développement méthodologique est donc d'optimiser les conditions opératoires de l'ICP-MS-HR disponible au sein du Plateau Isotopique de Normandie (PLATIN'), ainsi que les conditions de préparation des échantillons permettant une digestion totale, l'ensemble visant à proposer une procédure de préparation des échantillons et une séquence analytique type pour une utilisation en routine de l'ICP-MS-HR pour des échantillons végétaux (protocoles opératoire fournis en annexes I, II, III et IV).

La description de ce développement se décompose en cinq parties principales : la première présente le principe de l'ICP-MS-HR suivie de l'étalonnage de celui-ci. L'étude des performances analytiques est ensuite décrite au travers de l'évaluation de paramètres globaux (limites de détection, de quantification, fidélité, justesse des résultats) par l'analyse d'un matériel de référence. Une séquence analytique type est ensuite établie intégrant les corrections d'interférence et les temps de mesure. Enfin, l'optimisation des conditions de minéralisation des échantillons a été réalisée.



**Figure III.1. Schéma du trajet des ions dans l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

Le trajet suivi par l'échantillon est figuré par des flèches rouges. Les principaux éléments composant l'ICP-MS-HR sont légendés en bleu, leurs rôles en noir. L'échantillon liquide est dispersé en un fin aérosol par collision avec un flux d'argon dans la chambre de nébulisation. L'échantillon est ensuite introduit dans le plasma qui va le ioniser. Puis, les ions sont transférés depuis le plasma par l'intermédiaire de l'interface qui va permettre le passage des ions de la pression atmosphérique à un vide compatible avec le spectromètre de masse. A la sortie de cette interface, les ions sont focalisés et accélérés par différentes lentilles constituant l'optique de transfert ionique afin de passer la fente d'entrée du secteur magnétique qui permet de régler la résolution. La focalisation des ions et leurs séparations sont obtenues par la combinaison d'un champ magnétique et électrique qui fournit les propriétés d'une double focalisation en fonction de leurs masses et de leurs énergies. Après la fente de sortie, le détecteur mesure l'impulsion électrique générée par les ions.

## II. Principe de l'ICP-MS-HR

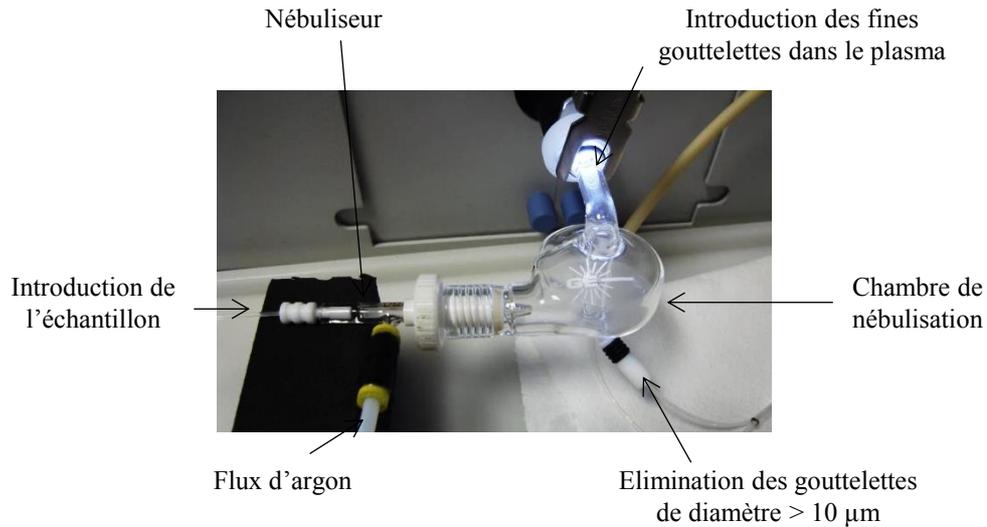
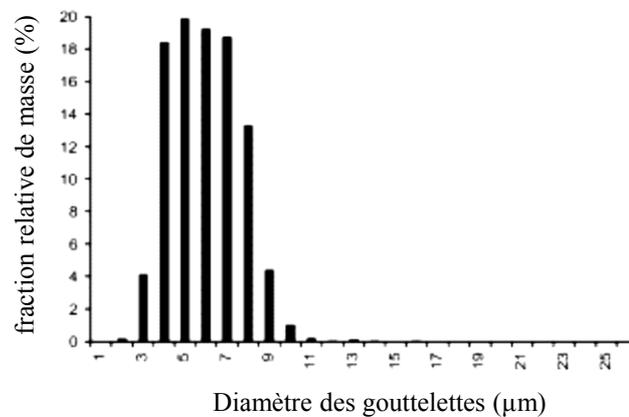
L'Elément 2 - ICP-MS-HR (Thermo-Fisher) est un spectromètre de masse haute résolution qui comporte une source d'ionisation ICP pour plasma à couplage inductif suivie de deux analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport  $m/z$  et d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal (Figure III.1).

### II.1. Système d'introduction de l'échantillon et de nébulisation

L'échantillon liquide est prélevé par une aiguille et entraîné à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit constant (9 rpm soit  $200 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Il est ensuite dispersé en un fin aérosol par collision avec un flux d'argon (gaz vecteur) par un nébuliseur pneumatique de type flux croisés : l'arrivée de l'argon et de l'échantillon sont perpendiculaires (Figure III.2A). L'aérosol formé est guidé à l'intérieur de la chambre de nébulisation qui va éliminer les plus grosses particules. Seules les gouttes suffisamment petites ( $<10 \mu\text{m}$ ) sont introduites dans la torche à plasma ce qui représente moins de 1 % de la solution initiale (Figure III.2B). Cette sélection permet de maintenir une température de plasma constante. La chambre utilisée dans cette étude est une chambre cyclonique Twinnabar qui possède un faible volume permettant un rinçage rapide (3 min). La forme de ces chambres permet de séparer les fines gouttelettes et le gaz vecteur qui sont dirigés vers la torche par le haut, tandis que les grosses gouttelettes vont se condenser vers le bas de la chambre. Ces dernières vont être éliminées de façon constante pour éviter les variations de pression dans la chambre qui entraînerait une variation du signal. Quelques difficultés d'analyse inhérentes au système d'introduction de l'échantillon peuvent être observées. En effet, un débit non constant peut entraîner des variations du signal. Des pertes de sensibilité dues à une mauvaise nébulisation (sensibilité inférieure à 100 000 cps pour 100 ppt de  $^{115}\text{In}$ ) peuvent également résulter d'une trop grande viscosité de l'échantillon, de la saleté des parois de la chambre de nébulisation ou/et de la vitesse du gaz de nébulisation. Une procédure de nettoyage de la chambre de nébulisation peut être requise. Elle nécessite l'immersion de la chambre de nébulisation dans un bain d'eau régale (mélange d'acides chlorhydrique et nitrique 2 : 1) pendant quelques minutes puis son passage au bain à ultrasons.

### II.2. Formation des ions dans le plasma

L'échantillon sous la forme d'aérosol est ensuite introduit dans le plasma qui va ioniser l'échantillon permettant son analyse en masse. Le plasma, considéré comme le quatrième état de la matière est un gaz ionisé caractérisé par la présence d'électrons libres. La source plasma à courant induit est obtenue par l'application d'un champ magnétique sur l'argon. Elle est constituée de trois

**A****B**

**Figure III.2. (A) Photographie du système d'introduction de l'échantillon liquide de l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) composé d'un nébuliseur pneumatique de type flux croisés entre l'argon et l'introduction de l'échantillon liquide et d'une chambre de nébulisation cyclonique.**

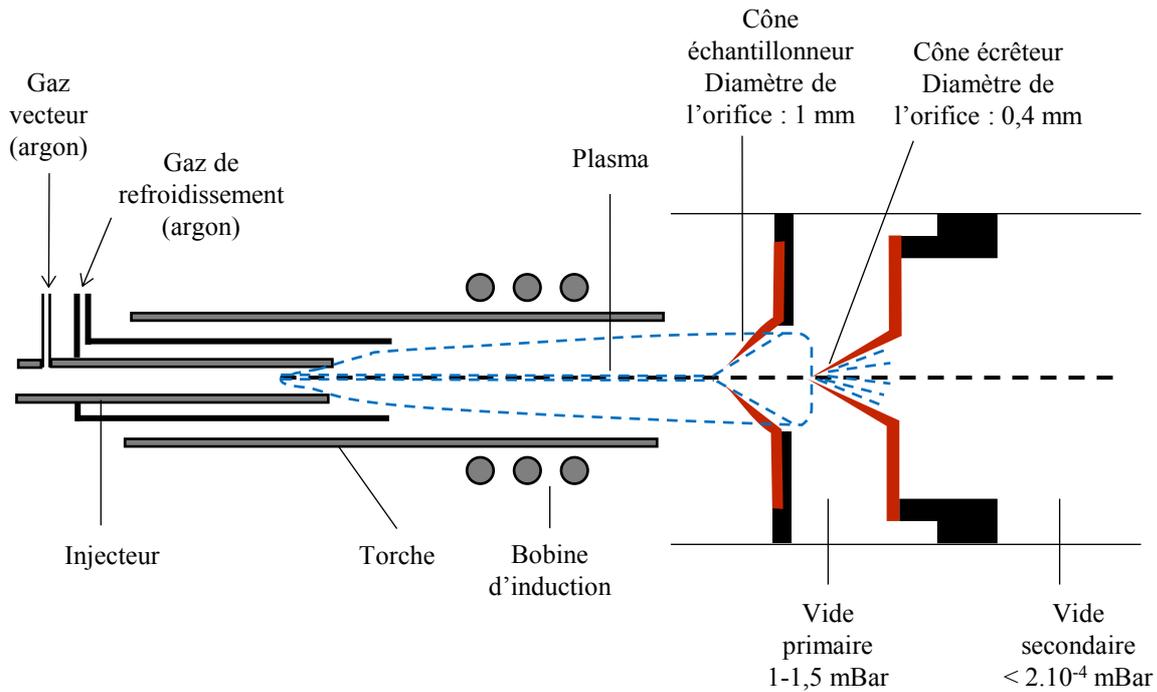
Cette dernière permet la sélection des gouttelettes inférieures à 10  $\mu\text{m}$  représentant moins de 1 % de l'échantillon. (B) Distribution du diamètre des gouttelettes en sortie de chambre de nébulisation.

tubes concentriques. L'introduction de l'échantillon se fait par le tube central en quartz appelé Injecteur par un flux d'argon ( $0,997 \text{ l.min}^{-1}$ ) jusqu'à la torche (Figure III.3). Cette dernière constituant le tube intermédiaire permet de générer le plasma. Elle est entourée par une spire d'induction reliée à un générateur de radiofréquence (RF). Elle permet la formation d'un champ magnétique induisant un courant RF dans le flux d'argon. Une étincelle générée par une alimentation haute tension provoque l'arrachage d'électrons des atomes d'argon. Ces électrons accélérés par le champ magnétique rentrent en collision à leur tour avec d'autres atomes d'argon arrachant d'autres électrons. Cette réaction en chaîne permet l'ionisation de l'argon et ainsi la transformation du milieu gazeux en plasma. Sa température varie entre environ 4 000 et 10 000 K permettant la désolvation, la vaporisation, l'atomisation et l'ionisation d'une grande partie de l'échantillon. Le pourcentage d'ionisation des éléments peut être calculé à partir de l'équation de Saha (Crain *et al.*, 1989). Le plasma en raison de sa température très élevée est isolé par un flux d'argon qui circule le long des parois de la torche à un débit d'environ  $10 \text{ l.min}^{-1}$  permettant leurs refroidissements.

### II.3. Extraction et focalisation des ions

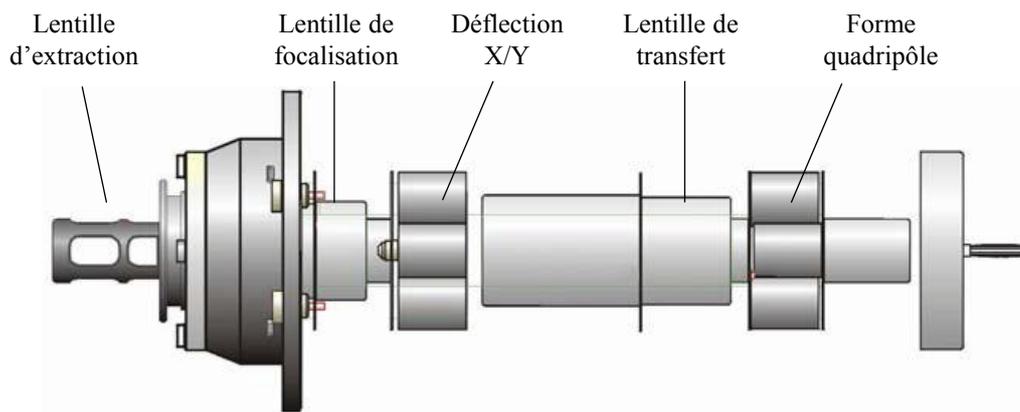
Les ions sont ensuite transférés depuis le plasma vers l'analyseur par l'intermédiaire de l'interface et de l'optique de transfert ionique. L'interface permet le passage des ions de la pression atmosphérique à un vide compatible avec le spectromètre de masse et de décroître la température de 6000 K à la température ambiante en évitant un changement de la composition du plasma et la formation d'espèces moléculaires (Figure III.3). Elle est constituée de deux cônes : le cône échantillonneur (ou sampler cone) et le cône écrêteur (ou skimmer cone) (Figure III.3). Le premier cône est au contact direct du plasma et doit donc être refroidi en permanence, il est percé en son centre d'un trou de 1 mm de diamètre. Le cône écrêteur est percé d'un trou de 0,7 mm. Entre les deux cônes une dépression est assurée par un premier étage de vide. Derrière le deuxième cône, les ions accèdent à un second étage de vide.

A la sortie de cette interface, les ions sont focalisés et accélérés par différentes lentilles constituant l'optique de transfert ionique (Figure III.4). La première lentille appelée lentille d'extraction attire les ions à la sortie de l'interface par électricité statique. Elle permet d'améliorer la transmission des éléments de faible masse ayant tendance à être éjectés du faisceau d'ion par les ions de masses plus lourdes. Une lentille de focalisation va ensuite permettre de focaliser le faisceau d'ion en direction de la fente d'entrée, cette trajectoire va être corrigée par la lentille de déflexion. Puis ceux-ci sont accélérés par la lentille de transfert. Une dernière lentille, la lentille quadripôle de mise en forme va donner une forme plate au faisceau d'ion afin de passer la fente



**Figure III.3. Schéma de l'assemblage : injecteur, torche, bobine d'induction et interface composée de l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

L'injecteur permet l'introduction de l'échantillon par un flux d'argon jusqu'à la torche. Dans la torche, une étincelle générée par une alimentation haute tension provoque l'arrachage d'électrons des atomes d'argon. Ces électrons sont accélérés par le champ magnétique créé par une spire d'induction. Les ions sont ensuite transférés depuis le plasma vers l'interface composée du sampler cone et du skimmer cone permettant le passage des ions de la pression atmosphérique à un vide compatible avec le spectromètre de masse et de décroître la température de 6 000 K à la température ambiante.



**Figure III.4. Schéma du système de lentilles de transfert de l'ICP-MS-HR permettant l'accélération et la focalisation des ions depuis la sortie de l'interface jusqu'à la fente d'entrée du secteur magnétique (Element 2, Thermo Fisher).**

d'entrée du secteur magnétique. L'optimisation du fonctionnement de l'optique de transfert ionique (X et Y-deflection (V), Shape (V), etc...) constitue une part importante des réglages à effectuer avant l'utilisation de l'ICP-MS-HR.

#### II.4. Séparation des ions et analyses

La focalisation des ions et leur séparation sont obtenues par la combinaison d'un champ magnétique et électrique qui fournit les propriétés d'une double focalisation sur l'Element 2 (Figure III.5). Le secteur électrostatique, originalité de l'ICP-MS-HR permet une seconde focalisation des ions permettant d'augmenter la résolution et de séparer physiquement les ions. La résolution peut être modifiée en ajustant la largeur des fentes d'entrée et de sortie du spectromètre. Trois niveaux de résolution sont prédéfinis : basse, moyenne et haute résolution soit 300, 4 000 et 10 000, respectivement. La résolution nécessaire à la séparation de deux pics est calculée comme :  $M/\Delta M$ . Elle permet donc de séparer des isotopes ayant une différence de masse de 0,0001 u. Les ICP-MS de type quadripôle majoritairement utilisée en ICP ont des résolutions bien plus faibles puisqu'elle permette une séparation entre 0,7 et 10 u. Ces derniers ne permettent donc pas toujours de séparer l'isotope d'intérêt des interférences isobariques ou polyatomiques.

##### II.4.1. Secteur magnétique

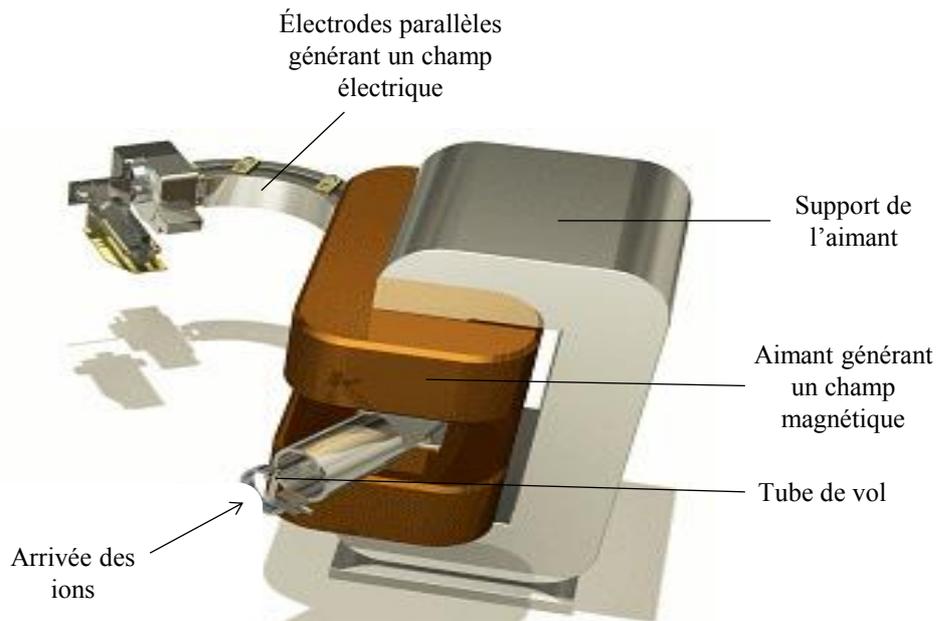
Les ions accélérés et focalisés depuis le plasma par une tension U ont acquis une énergie cinétique :  $E_c = \frac{1}{2} mv^2 = zU$  (Equation 1) tel que m, z et v sont respectivement la masse, la charge et la vitesse de l'ion.

Ils vont entrer dans un champ magnétique B exercé par l'aimant perpendiculaire à la trajectoire des ions. Sous l'effet de cette force centrifuge ( $F_c$ ), chaque ion acquiert une trajectoire de rayon  $r_m$ . Pour qu'un ion puisse traverser le secteur magnétique, la force centrifuge ( $F_c$ ) et la force magnétique ( $F_B$ ) doivent se compenser.

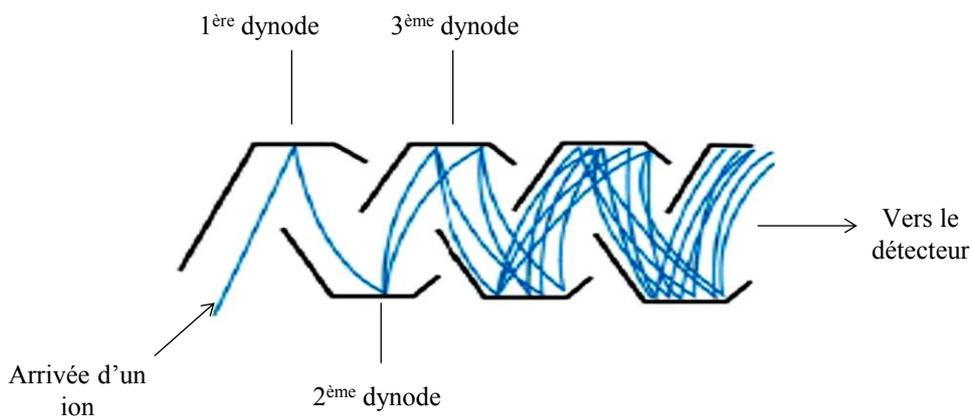
$$F_c = F_B \text{ soit } \frac{mv^2}{r_m} = zvB \text{ soit } r_m = \frac{mv}{zB} \text{ (Equation 2)}$$

En portant les membres de l'équation 2 au carré puis en remplaçant  $v^2$  par  $\frac{2zU}{m}$  d'après l'équation (1), il vient :  $r_m = \frac{1}{B} \times \sqrt{\frac{2 \times m \times U}{z}}$

Pour des valeurs de B et de U données, les ions vont donc être séparés selon leurs masses et selon leurs charges. Les ions avec un rapport masse sur charge élevé décriront un cercle plus grand que les ions de faible rapport masse sur charge qui vont décrire une trajectoire plus petite. Cependant, la focalisation des ions de même rapport masse sur charge n'est pas parfaite puisqu'ils vont être dispersés selon leur énergie cinétique qui varie à la suite de collisions ou de phénomène



**Figure III.5. Double focalisation des ions en ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) obtenue par la combinaison d'un champ magnétique exercé par l'aimant et d'un champ électrique exercé par le secteur électrostatique constitué de deux électrodes parallèles.**



**Figure III.6. Schéma du principe du multiplicateur d'électrons secondaires (SEM) de l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher), en bleu le trajet des électrons.**  
 Chaque dynode focalise les électrons secondaires sur la dynode suivante qui à son tour émet des électrons secondaires.

de répulsion. Cette focalisation imparfaite des ions de même rapport  $m/z$  se traduit par une faible résolution. Dans l'Element 2, ICP-MS-HR, la haute résolution est atteinte par une seconde focalisation des ions grâce au secteur électrostatique.

#### II.4.2. Secteur électrostatique

Après être passé dans le champ magnétique, les ions entrent dans le secteur électrostatique (par passage dans la fente intermédiaire) pour être focalisés en énergie. Le secteur électrostatique est constitué de deux électrodes parallèles entre lesquelles une différence de potentiel ( $E$ ) va être appliquée (Figure III.5). De la même façon que dans le secteur magnétique, une force centrifuge  $F_c$  s'exerce sur les ions. Pour qu'un ion puisse franchir le secteur électrostatique, cette force centrifuge et la force électrostatique ( $F_e$ ) doivent se compenser :  $F_c = F_e$  soit encore  $\frac{mv^2}{r_m} = zE$ . En substituant  $mv^2$  par  $2zU$  selon l'équation liant l'énergie cinétique à la tension d'accélération, on obtient :  $r_m = \frac{2U}{E}$ .

Il en résulte que dans le secteur électrostatique, la trajectoire des ions est donc indépendante de leur masse et de leur charge. Le Secteur électrostatique focalise les ions ayant une faible différence d'énergie vers la fente de sortie. La focalisation des ions se fait donc à la sortie de ces deux secteurs selon leur masse, leur charge et leur énergie cinétique permettant une focalisation parfaite nécessaire à l'obtention d'une haute résolution.

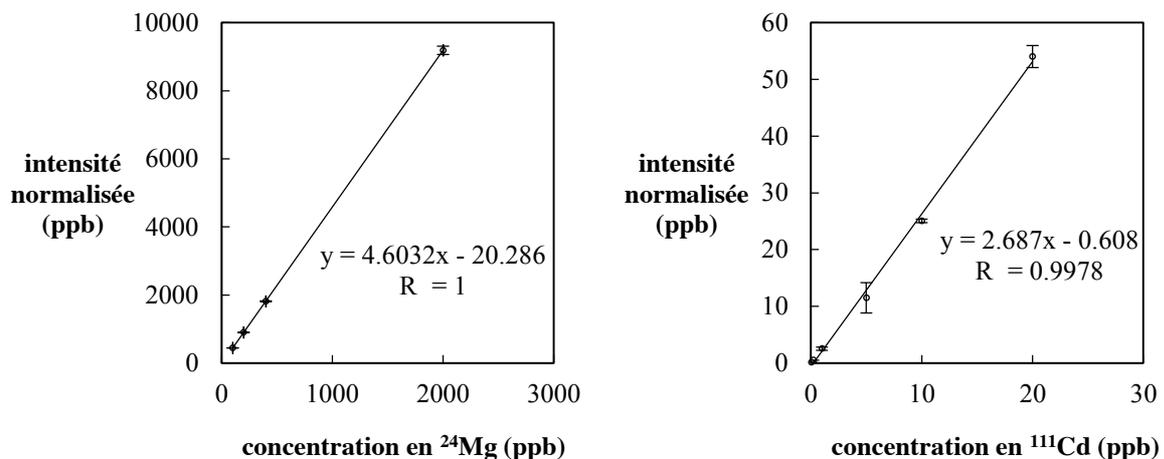
#### II.4.3. Détection des ions

Après la fente de sortie, une plaque de déflexion dirige le faisceau d'ions sur la dynode de conversion. Suite à l'impact, les électrons émis de la surface de la dynode sont attirés dans le multiplicateur d'électrons secondaires (SEM) (Figure III.6) qui permettra une amplification du signal. Au sein du SEM, les électrons vont venir heurter tour à tour 19 dynodes où des électrons secondaires vont être émis. Chaque dynode focalise les électrons secondaires sur la dynode suivante qui à son tour émet des électrons secondaires. A la dynode de sortie, l'impulsion électrique générée par la cascade d'électron est mesurée, elle est appelée taux de comptage en coups par secondes (cps). La SEM permet la quantification des éléments traces et majeurs de façon simultanée selon deux modes de détection des ions. Pour la détection de faibles taux de comptage inférieur à 50 000 cps, le mode comptage est utilisé. Pour la détection des forts taux de comptage compris entre 5 000 000 cps et 5 000 000 000 cps, le mode analogique est utilisé. Entre 50 000 cps et 5 000 000 cps, les deux modes peuvent être utilisés.

**Tableau III.1. Droite de calibration utilisées pour la quantification de 20 des isotopes analysés par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) et taux de résolution choisi (LR, MR, HR, faible, moyenne et haute résolution, respectivement).**

y correspond à la concentration mesurée alors que x correspond à l'intensité normalisée, i.e. l'intensité du signal de chaque isotope divisé par l'intensité du signal mesuré pour le standard interne ( $^{71}\text{Ga}$  ou  $^{103}\text{Rh}$ ).

Isotope analysé / Standard interne	Valeurs des étalons (ppb)	Equations des droites de calibration	Corr. Coeff.
$^{111}\text{Cd} / ^{103}\text{Rh}$ (LR)	0,0 5 - 0,2 - 1 - 5 - 10 - 20	$y = 2,69 x - 0,61$	0,9989
$^{208}\text{Pb} / ^{103}\text{Rh}$ (LR)	0,0 5 - 0,2 - 1 - 5	$y = 21,2 x + 0,05$	0,99999
$^{59}\text{Co} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	0,05 - 0,2 - 1 - 5	$y = 10,3 x - 0,20$	0,99995
$^{77}\text{Se} / ^{71}\text{Ga}$ (HR)	0,05 - 0,2 - 1	$y = 5,54 \cdot 10^{-1} x - 0,02$	0,99998
$^{60}\text{Ni} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	0,2 - 1 - 5 - 10 - 20	$y = 2,39 x - 0,06$	0,99998
$^{95}\text{Mo} / ^{103}\text{Rh}$ (LR)	0,2 - 1 - 5 - 10 - 20 - 100	$y = 5,54 \cdot 10^{-1} x - 0,02$	0,99998
$^{98}\text{Mo} / ^{103}\text{Rh}$ (LR)	0,2 - 1 - 5 - 10 - 20 - 100	$y = 8,65 \cdot 10^{-1} x - 0,08$	0,99998
$^{63}\text{Cu} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	0,05 - 0,2 - 1 - 5 - 10 - 20 - 100	$y = 4,92 x + 1,43$	0,99994
$^{66}\text{Zn} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	0,2 - 1 - 5 - 10 - 20 - 100	$y = 9,99 \cdot 10^{-1} x + 0,07$	0,99998
$^{55}\text{Mn} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	5 - 10 - 20 - 100	$y = 9,89 x - 6,84$	0,99989
$^{11}\text{B} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	5 - 10 - 20 - 100	$y = 1,37 x - 2,52$	0,99989
$^{23}\text{Na} / ^{71}\text{Ga}$ (LR)	25 - 50 - 100 - 500	$y = 7,11 x - 42,00$	0,99982
$^{56}\text{Fe} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	25 - 50 - 100 - 500	$y = 8,82 x - 15,50$	0,99999
$^{27}\text{Al} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	25 - 50 - 100 - 500	$y = 6,86 x - 18,30$	0,99999
$^{28}\text{Si} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	50 - 100 - 200 - 1000	$y = 3,14 x - 33,00$	0,99998
$^{24}\text{Mg} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	100 - 200 - 400 - 2000	$y = 4,60 x - 20,30$	1
$^{31}\text{P} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	250 - 500 - 1000 - 5000	$y = 4,33 \cdot 10^{-1} x - 24,90$	0,99992
$^{32}\text{S} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	500 - 1000 - 2000 - 10000	$y = 8,41 \cdot 10^{-1} x - 77,20$	0,99996
$^{44}\text{Ca} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	1000 - 2000 - 4000 - 20000	$y = 3,01 \cdot 10^{-1} x - 48,50$	0,99998
$^{39}\text{K} / ^{71}\text{Ga}$ (HR)	1500 - 3000 - 6000 - 30000	$y = 9,12 x - 36,10$	0,99988



**Figure III.7. Exemples de droite d'étalonnage du  $^{24}\text{Mg}$  et du  $^{111}\text{Cd}$  analysés en moyenne et basse résolution respectivement en utilisant le  $^{71}\text{Ga}$  et le  $^{103}\text{Rh}$  respectivement comme standard interne obtenues par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

L'intensité normalisée correspond au signal de chaque isotope divisé par l'intensité du signal mesuré pour le standard interne ( $^{71}\text{Ga}$  ou  $^{103}\text{Rh}$ ).

### III. Etalonnage de l'ICP-MS-HR

#### III.1. Etalonnage et standards de référence

##### III.1.1. Standards externes

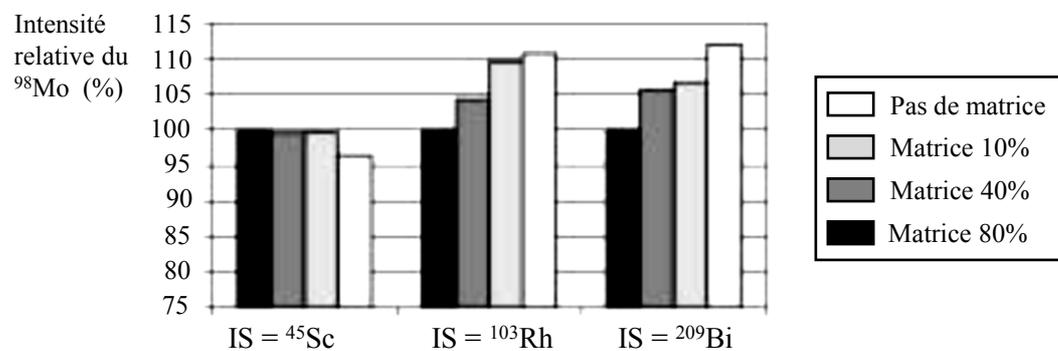
L'étalonnage est effectué à l'aide de solutions "étalons" préparées à partir de solutions mères multiélémentaires et monoélémentaires, aux concentrations certifiées (étalons ICP, 1 000 µg.ml<sup>-1</sup> dans 4 % HNO<sub>3</sub> et étalon contrôle de qualité 4, SCP Sciences, Courtabœuf, France).

Une gamme spécifique pour chaque élément a ainsi été établie de façon à couvrir la gamme des concentrations attendues pour les échantillons végétaux à analyser (Tableau III.1, de 0.05 ppb pour le <sup>111</sup>Cd, <sup>208</sup>Pb, <sup>59</sup>Co, et <sup>77</sup>Se, éléments traces à 30 000 ppb pour le <sup>39</sup>K, élément majeur) (Cf Protocole de préparation des solutions étalons utilisées permettant l'analyse simultanée des éléments traces et majeurs et concentrations de chaque isotope en annexe III). La concentration en un élément (en ppb) est alors calculée en fonction de l'intensité normalisée (en ppb), correspondant à l'intensité de l'isotope analysé divisée par celle mesurée pour le standard interne utilisé (<sup>71</sup>Ga ou <sup>103</sup>Rh). La Figure III.7 présente à titre d'exemple les droites d'étalonnage obtenues pour le <sup>24</sup>Mg et le <sup>111</sup>Cd. Une bonne linéarité du système de détection est obtenue avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,998 (Tableau III.1) pour tous les isotopes quantifiés (<sup>111</sup>Cd, <sup>208</sup>Pb, <sup>59</sup>Co, <sup>77</sup>Se, <sup>60</sup>Ni, <sup>95</sup>Mo, <sup>98</sup>Mo, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>55</sup>Mn, <sup>11</sup>B, <sup>23</sup>Na, <sup>56</sup>Fe, <sup>27</sup>Al, <sup>28</sup>Si, <sup>24</sup>Mg, <sup>31</sup>P, <sup>32</sup>S, <sup>44</sup>Ca, <sup>39</sup>K), et utilisant de trois (<sup>77</sup>Se) à sept (<sup>63</sup>Cu) points d'étalonnage.

##### III.1.2. Standards internes

Le standard interne ajouté en quantité connue à tous les blancs, étalons et échantillons sert de référence lors de l'analyse. Le dosage d'un élément se fait de façon relative au standard interne permettant ainsi de s'affranchir des pertes lors de la préparation, des erreurs de dilution et des variations d'intensité instrumentale. L'utilisation d'un standard interne permet surtout de corriger l'effet de la matrice en particulier pour les échantillons ayant de fortes teneurs en C organique. Les différents standards internes vont appliquer un plus ou moins gros facteur de correction, qui peut sous-estimer ou surestimer l'effet de matrice, le potentiel d'ionisation, etc... (Masson *et al.*, 2010).

Selon Thompson et Houk, (1987), le choix du standard interne doit être basé sur la similarité des potentiels d'ionisation, une masse proche entre l'isotope à analyser et le standard interne. Cependant, beaucoup d'auteurs ont démontré que les standards internes sélectionnés en suivant ces critères n'étaient pas toujours idéaux. Par exemple, le <sup>9</sup>Be est souvent utilisé comme standard interne pour l'analyse du <sup>10</sup>B ou <sup>11</sup>B dans des échantillons biologiques, mais le C<sup>+</sup> induit des mécanismes différents de transfert de charge sur <sup>10</sup>B et sur <sup>9</sup>Be. Ainsi, Probst *et al.*, (1997) ont



**Figure III.8. Effet du choix du standard interne :  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{103}\text{Rh}$  ou  $^{209}\text{Bi}$  sur l'intensité relative en % du signal du  $^{98}\text{Mo}$  par la correction de l'effet de matrice analysé par ICP-MS (Thermo Electron X Series II, Thermo Elemental, Winsford, England) (Masson *et al.*, 2010).**

constaté que le  $^{107}\text{Rh}$  était un étalon interne plus approprié que le  $^9\text{Be}$  pour quantifier le B malgré leurs masses distantes. Une autre contrainte relative au choix des standards internes repose sur leur absence dans les échantillons à analyser.

L'étalon interne approprié pour un isotope a été choisi en fonction de leurs potentiels d'ionisation (Tableau III.2.), de leurs masses et selon les recommandations de Thermo Fisher. Deux standards internes ont été utilisés pour le dosage des isotopes d'intérêt : le  $^{71}\text{Ga}$  et le  $^{103}\text{Rh}$ . D'autres isotopes comme standard interne pourraient cependant être plus appropriés que le  $^{71}\text{Ga}$  et le  $^{103}\text{Rh}$  pour analyser certains isotopes. En effet, Le  $^{103}\text{Rh}$  est actuellement utilisé pour doser le  $^{98}\text{Mo}$ . Pourtant, Masson *et al.*, (2010) ont montré que le  $^{45}\text{Sc}$  était plus approprié que le  $^{103}\text{Rh}$ , pour supprimer l'effet de matrice lors de l'analyse du  $^{98}\text{Mo}$  (Figure III.8). Ainsi, il est nécessaire d'optimiser le choix du standard interne.

### III.1.3. Standard de référence utilisé dans cette étude

Pour évaluer la justesse des résultats, un matériel de référence certifié, correspondant à une poudre végétale de feuilles de citronnier (CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab) a été utilisé. La valeur fournie pour chaque élément correspond à la moyenne des analyses assurées par au moins six laboratoires indépendants. Ce matériel de référence permet de prendre en compte l'ensemble du processus d'analyse (de la minéralisation à la quantification par ICP-MS-HR).

## III.2. Limite de détection et de quantification

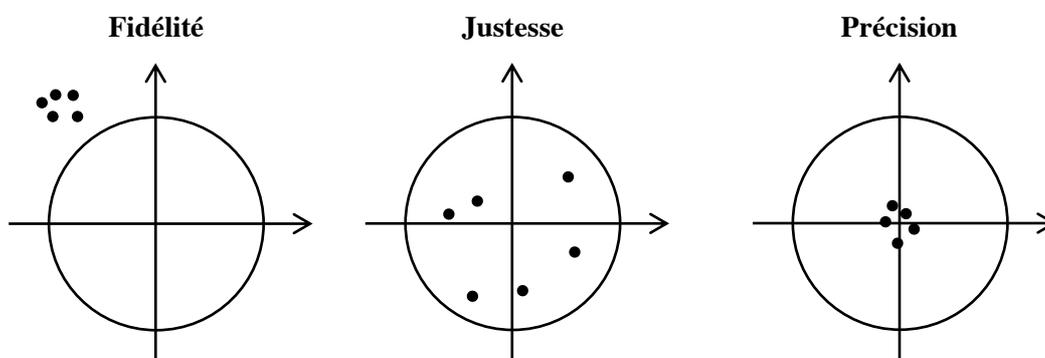
La limite de détection (ou LOD) représente la concentration minimale d'un élément produisant un signal détectable (en coups par seconde) statistiquement différent du bruit de fond produit par un « blanc machine » (Solution d'acide nitrique à 2 % dans de l'eau ultra-pure Milli-Q) dans les mêmes conditions. Le calcul des limites de détection est basé sur les équations de Longerich *et al.* (1996). Il fait intervenir l'écart-type de l'intensité (en cps) de dix blancs indépendants (eau à 2 % d'acide nitrique). L'équation utilisée pour le calcul des limites de détection en ICP-MS-HR est la suivante :

$$LOD = \bar{X}_{BLC} + \sigma_{BLC} \times k$$

Avec  $\bar{X}_{BLC}$  comme étant la moyenne du signal des blancs,  $\sigma_{BLC}$  l'écart-type et  $k=3$  comme recommandé par l'IUPAC (Union internationale de chimie pure et appliquée) en 1976 et par le "Analytical Methods Committee", en 1987.

**Tableau III.2. Potentiel d'ionisation (eV) et limites de détection et de quantification des isotopes d'intérêt par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

Isotope analysé	Potentiel d'ionisation (eV)	Limite de détection ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ou ppb)	Limite de quantification ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ou ppb)
<b>Eléments traces</b>			
$^{59}\text{Co} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	7,881	0,018	0,023
$^{60}\text{Ni} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	7,640	0,385	0,443
$^{63}\text{Cu} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	7,726	1,729	2,094
$^{95}\text{Mo} / ^{103}\text{Rh}$ (LR)	7,092	0,426	1,185
$^{98}\text{Mo} / ^{103}\text{Rh}$ (LR)	7,092	0,400	1,121
$^{77}\text{Se} / ^{71}\text{Ga}$ (HR)	9,752	0,027	0,060
$^{111}\text{Cd} / ^{103}\text{Rh}$ (LR)	8,994	0,007	0,010
$^{208}\text{Pb} / ^{103}\text{Rh}$ (LR)	7,417	0,010	0,015
<b>Eléments majeurs</b>			
$^{11}\text{B} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	8,298	1,153	1,700
$^{23}\text{Na} / ^{71}\text{Ga}$ (LR)	5,139	0,807	1,050
$^{24}\text{Mg} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	7,646	0,339	0,397
$^{27}\text{Al} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	5,986	0,258	0,329
$^{28}\text{Si} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	8,152	1,858	2,078
$^{31}\text{P} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	10,487	0,688	0,887
$^{32}\text{S} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	10,360	17,918	20,597
$^{39}\text{K} / ^{71}\text{Ga}$ (HR)	4,341	8,192	18,876
$^{44}\text{Ca} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	6,113	13,704	16,969
$^{55}\text{Mn} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	7,434	0,012	0,016
$^{56}\text{Fe} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	7,902	0,137	0,185
$^{66}\text{Zn} / ^{71}\text{Ga}$ (MR)	9,394	2,536	2,942
<b>Standards internes</b>			
$^{71}\text{Ga}$	5,999		
$^{103}\text{Rh}$	7,459		



**Figure III.9. Représentation symbolique des paramètres généraux d'évaluation de la qualité : la fidélité, la justesse et l'exactitude.**

La limite de quantification d'un élément est la concentration minimale d'un élément pouvant être dosée avec une justesse et une reproductibilité définies. Les limites de quantification (ou LOQ) ont été déterminées comme étant dix fois la valeur du bruit de fond de l'ICP-MS-HR.

$$LOQ = \bar{X}_{Blc} + \sigma_{Blc} \times 10$$

Un traitement de données faisant intervenir le calibrage par standard interne et externe est nécessaire pour transformer les unités mesurées en coups par seconde en concentrations. Les limites de détection sont donc fonction de la stabilité du bruit de fond, mais aussi de l'intensité relative des standards utilisés, notamment l'intensité du signal du standard interne pendant l'analyse. Les résultats obtenus pour la LOD ou LOQ pour l'ICP-MS-HR Element 2 en opération sont présentés dans le Tableau III.2. Les LOD des micro-éléments sont toutes de l'ordre de 0,007 à 0,1  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , sauf celle du Cu, qui est de 1,729  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Cette LOD plus élevée traduit de plus importantes concentrations en Cu dans l'eau à 2 % d'acide nitrique. Les macro-éléments ont des LOD plus hautes, ce qui traduit une sensibilité moins importante pour ces éléments. Ces LOD et LOQ dépendent directement de la qualité de l'eau et de l'acide nitrique.

## IV. Tests de fidélité et justesse

### IV.1. Fidélité

La fidélité est la capacité d'une méthode analytique à donner des résultats proches lors de l'analyse répétée d'un échantillon (Figure III.9). Elle se divise en deux composantes : la reproductibilité représentant la variabilité maximale de la fidélité et la répétabilité représentant la variabilité minimale de la fidélité.

La reproductibilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sur des essais indépendants entre eux pour une même méthode d'analyse, dans des conditions fortement variables à des jours différents, dans différents laboratoires, par différents opérateurs utilisant un équipement différent.

La répétabilité est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus sur des essais indépendants entre eux à de courts intervalles de temps, effectués dans un même laboratoire, par un même opérateur utilisant le même équipement et la même méthode. Seule celle-ci a été évaluée étant la composante la plus importante de la fidélité. La répétabilité peut s'exprimer comme la dispersion des résultats par le coefficient de variation (CV) ou la déviation standard relative (RSD) exprimée en % :

$$RSD (\%) = CV (\%) = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$$

**Tableau III.3. Evaluation de la répétabilité de la mesure pour les éléments traces : Co, Ni, Cu, Mo, Se, Cd et Pb et pour les éléments majeurs : B, Na, Mg, P, S, K, Ca, Mn et Fe par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

<b>Isotope analysé</b>	<b>Répétabilité</b>
Eléments traces	
<sup>59</sup> Co (MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	7,05 %
<sup>60</sup> Ni (MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	4,67 %
<sup>63</sup> Cu (MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	9,10 %
<sup>95</sup> Mo (LR) / <sup>103</sup> Rh (LR)	4,69 %
<sup>98</sup> Mo (LR) / <sup>103</sup> Rh(LR)	3,49 %
<sup>77</sup> Se (HR) / <sup>71</sup> Ga(HR)	8,52 %
<sup>111</sup> Cd (LR) / <sup>103</sup> Rh(LR)	1,83 %
<sup>208</sup> Pb (LR) / <sup>103</sup> Rh(LR)	5,03 %
Eléments majeurs	
<sup>11</sup> B(MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	2,79 %
<sup>23</sup> Na (LR) / <sup>71</sup> Ga (LR)	15,50 %
<sup>24</sup> Mg(MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	2,50 %
<sup>31</sup> P(MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	2,37 %
<sup>32</sup> S(MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	2,65 %
<sup>39</sup> K(HR) / <sup>71</sup> Ga(HR)	2,19 %
<sup>44</sup> Ca(MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	2,82 %
<sup>55</sup> Mn(MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	2,84 %
<sup>56</sup> Fe(MR) / <sup>71</sup> Ga(MR)	1,86 %

Avec  $\bar{X}$ , moyenne et  $\sigma$ , l'écart-type des différentes mesures. Dans l'ensemble, la répétabilité que nous avons obtenue est meilleure (RSD usuellement inférieur à 5 %) pour les éléments majeurs que pour les éléments traces (Tableau III.3). Trois éléments en particulier présentent une moins bonne répétabilité, le  $^{59}\text{Co}$  (RSD de 7 %), le  $^{63}\text{Cu}$  (RSD de 9 %) et le  $^{23}\text{Na}$  (RSD de 15 %).

#### IV.2. Justesse

La justesse (Figure III.9) est définie comme l'écart entre la valeur mesurée et la valeur certifiée :

$$\Delta (\%) = \frac{C_{\text{mesurée}} - C_{\text{certifiée}}}{C_{\text{certifiée}}} \times 100$$

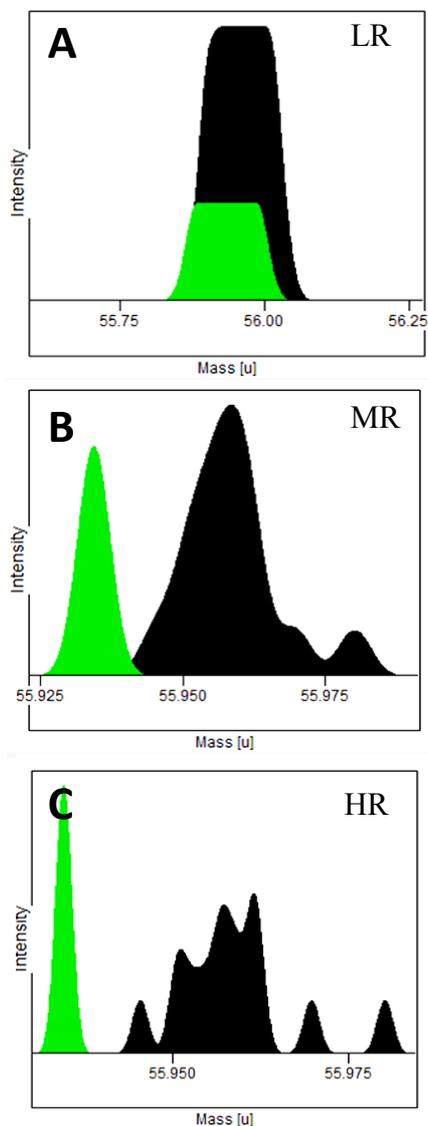
La justesse des résultats obtenus après différentes procédures de minéralisation pour le matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves est l'un des principaux critères d'évaluation utilisés pour la préparation des échantillons (cf. VI. Préparation des échantillons).

### V. Mise en œuvre de l'analyse

#### V.1. Correction des interférences

Les interférences peuvent induire des erreurs dans les dosages par ICP-MS-HR. Elles sont dues à la présence de composés ou éléments ionisés ayant le même rapport masse/charge ( $m/z$ ) que l'isotope mesuré. Différentes interférences existent, dues aux ions isobariques (deux éléments présentent chacun un isotope de masses très proches, par exemple le  $^{204}\text{Pb}$  et le  $^{204}\text{Hg}$ ) ou encore aux ions polyatomiques ou doublement chargés dont la masse peut être voisine d'un isotope que l'on cherche à quantifier.

Les interférences isobariques sont dues à la présence d'un isotope d'un autre élément ayant la même masse que l'isotope analysé, entraînant une superposition de leurs deux spectres de masse. Pour les éléments monoisotopiques tels que le  $^{23}\text{Na}$ , le  $^{31}\text{P}$ , le  $^{55}\text{Mn}$  ou le  $^{59}\text{Co}$ , aucune interférence isobarique n'existe. Pour tous les éléments sauf l'Indium, il existe un ou plusieurs isotopes qui ne possèdent pas d'isobares. L'indium possède deux isotopes le  $^{113}\text{In}$  et le  $^{115}\text{In}$  qui sont soumis à des interférences avec le  $^{113}\text{Cd}$  et le  $^{115}\text{Sn}$  respectivement. Pour séparer les signaux d'isotopes isobariques, un analyseur de masse avec un pouvoir de résolution très important est nécessaire. Par exemple, pour séparer le  $^{204}\text{Pb}$  (203,97304) du  $^{204}\text{Hg}$  (203,97348) une résolution supérieure à 450 000 ( $M/\Delta M = 204/0,00044$ ) est requise. A titre de comparaison, l'Element 2 HR présente une résolution maximale de 10 000. Néanmoins, le problème des interférences isobariques peut être résolu en choisissant d'analyser un isotope de l'élément d'intérêt libre de tout chevauchement isobarique. Par exemple, le signal de l' $^{40}\text{Ar}$  (gaz plasmagène) se superpose à celui de l'isotope le



Isotope analysé	Masse
$^{56}\text{Fe}$	55,934399
Interférences	Masse
$^{55}\text{Mn}^1\text{H}$	55,945332
$^{112}\text{Cd}^{++}$	55,950292
$^{112}\text{Sn}^{++}$	55,951323
$^{54}\text{Fe}^2\text{H}$	55,953174
$^{44}\text{Ca}^{12}\text{C}$	55,954945
$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$	55,956758
$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$	55,956966
$^{40}\text{K}^{16}\text{O}$	55,958374
$^{20}\text{Ne}^{36}\text{Ar}$	55,959445
$^{18}\text{O}^{38}\text{Ar}$	55,961352
$^{43}\text{Ca}^{13}\text{C}$	55,961585
$^{39}\text{K}^{17}\text{O}$	55,962299
$^{15}\text{N}^1\text{H}^{40}\text{Ar}$	55,969777

**Figure III.10. Séparation des signaux de l'isotope du  $^{56}\text{Fe}$  (en vert) et des interférences polyatomiques (en noir) de masse 56 à différentes résolutions : (A) basse résolution (LR, 300), (B) moyenne résolution (MR, 4 000), (C) et haute résolution (HR, 10 000).**

Modélisation des séparations entre isotopes et interférences par l'application «Tour & Interferences» de Thermo Fisher.

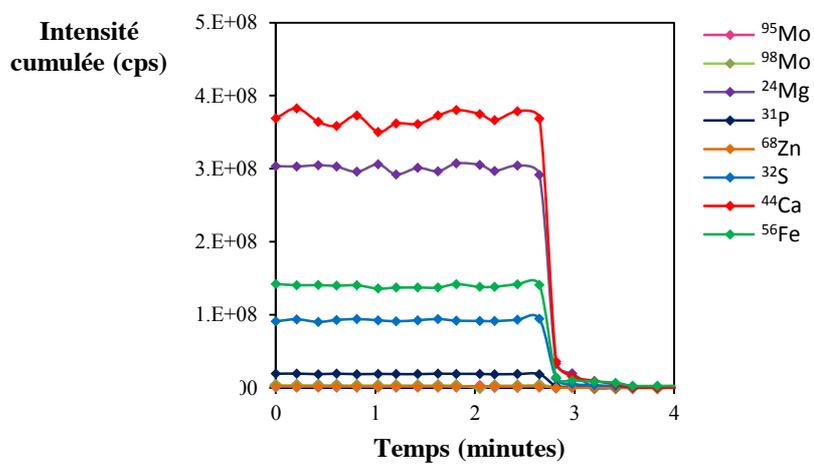
plus abondant du calcium, le  $^{40}\text{Ca}$  (96,94 % du calcium total). Un autre isotope, le  $^{44}\text{Ca}$  (2,09 % du Ca total) va donc être analysé pour quantifier le Ca total puisque celui-ci ne possède pas d'isotopes isobariques. Cette démarche reste opérante tant que l'objectif n'est pas de déterminer des ratios isotopiques.

Les interférences polyatomiques sont dues à la formation de complexes entre plusieurs ions présents dans le gaz plasmagène, les gaz atmosphériques, les réactifs ou la matrice de l'échantillon. De telles interférences peuvent souvent être résolues en améliorant la résolution, c'est-à-dire la séparation des signaux. Par exemple, pour séparer le signal du  $^{56}\text{Fe}$  du signal de l' $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ , une résolution minimale de 4 000 (résolution moyenne, MR) est nécessaire (Figure III.10) (résolution théorique > 2 500). Des interférences sont rencontrées pour tous les isotopes à partir du  $^{11}\text{B}$  (May et Wiedmeyer, 1998). Les interférences les plus importantes sont celles du  $^{56}\text{Fe}$  et du  $^{39}\text{K}$  qui vont interférer avec des complexes formés avec l'argon  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$  et  $^{38}\text{Ar}^1\text{H}$  respectivement (Figure III.10), complexes quantitativement importants, compte tenu de l'utilisation de l'argon comme gaz vecteur.

Nous avons donc défini le mode de résolution optimale pour chaque isotope afin d'obtenir un compromis entre la suppression d'interférences et l'optimisation de la sensibilité (la sensibilité est réduite avec des résolutions plus élevées). Dès lors, ont été analysés en basse résolution (LR), le  $^{111}\text{Cd}$ , le  $^{208}\text{Pb}$ , le  $^{95}\text{Mo}$ , le  $^{98}\text{Mo}$  et le  $^{23}\text{Na}$ , en moyenne résolution (MR), le  $^{59}\text{Co}$ , le  $^{60}\text{Ni}$ , le  $^{63}\text{Cu}$ , le  $^{66}\text{Zn}$ , le  $^{55}\text{Mn}$ , le  $^{11}\text{B}$ , le  $^{56}\text{Fe}$ , le  $^{27}\text{Al}$ , le  $^{28}\text{Si}$ , le  $^{24}\text{Mg}$  le  $^{31}\text{P}$ , le  $^{32}\text{S}$  et le  $^{44}\text{Ca}$ , alors que le  $^{77}\text{Se}$  et le  $^{39}\text{K}$  ont été analysés en haute résolution (HR). Enfin, le molybdène ayant pris une place croissante dans nos travaux, nous avons choisi une double quantification sur deux isotopes de cet élément ( $^{95}\text{Mo}$  et  $^{98}\text{Mo}$ ).

Les ions doublement chargés  $\text{M}^{2+}$  se forment dans le plasma, en plus de l'espèce mono-chargée majoritaire  $\text{M}^+$ , pour les éléments dont le potentiel de deuxième ionisation est inférieur au potentiel d'ionisation de l'argon ( $E_i = 15,76 \text{ eV}$ ). A titre d'exemple, la présence des ions doublement chargés  $^{112}\text{Cd}^{++}$  ou de  $^{112}\text{Sn}^{12++}$  peut induire des erreurs lors de la mesure du  $^{56}\text{Fe}$  (Figure III.10).

La proportion d'ions doublement chargés et la formation d'oxydes dépendent principalement du temps de séjour des ions dans le plasma et de sa température. Ces deux paramètres dépendent du débit de nébulisation, du diamètre du cône échantillonneur et de la puissance du générateur haute fréquence. Le taux d'oxyde et la proportion d'ions doublement chargé sont vérifiés et optimisés chaque jour par le réglage des paramètres de l'Element 2 en scannant une solution dite de « tune » (Tune-Up Solution Element à 5 % d' $\text{HNO}_3$ , 1099601, Thermo Scientific) recommandée par le



**Figure III.11. Détermination du temps de lavage nécessaire à la décroissance de l'intensité cumulée en coups par seconde pour le <sup>95</sup>Mo, <sup>98</sup>Mo, <sup>24</sup>Mg, <sup>31</sup>P, <sup>68</sup>Zn, <sup>32</sup>S, <sup>44</sup>Ca et <sup>56</sup>Fe après analyse d'un standard de feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves – Sytab).**

Les mesures ont été effectuées toutes les 12 secondes par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

constructeur (Thermo-Fisher) en se focalisant sur l'uranium et la formation d'oxyde d'uranium ainsi que sur le baryum pour les ions doublement chargés qui doivent rester inférieurs à 10 % et 4 %, respectivement.

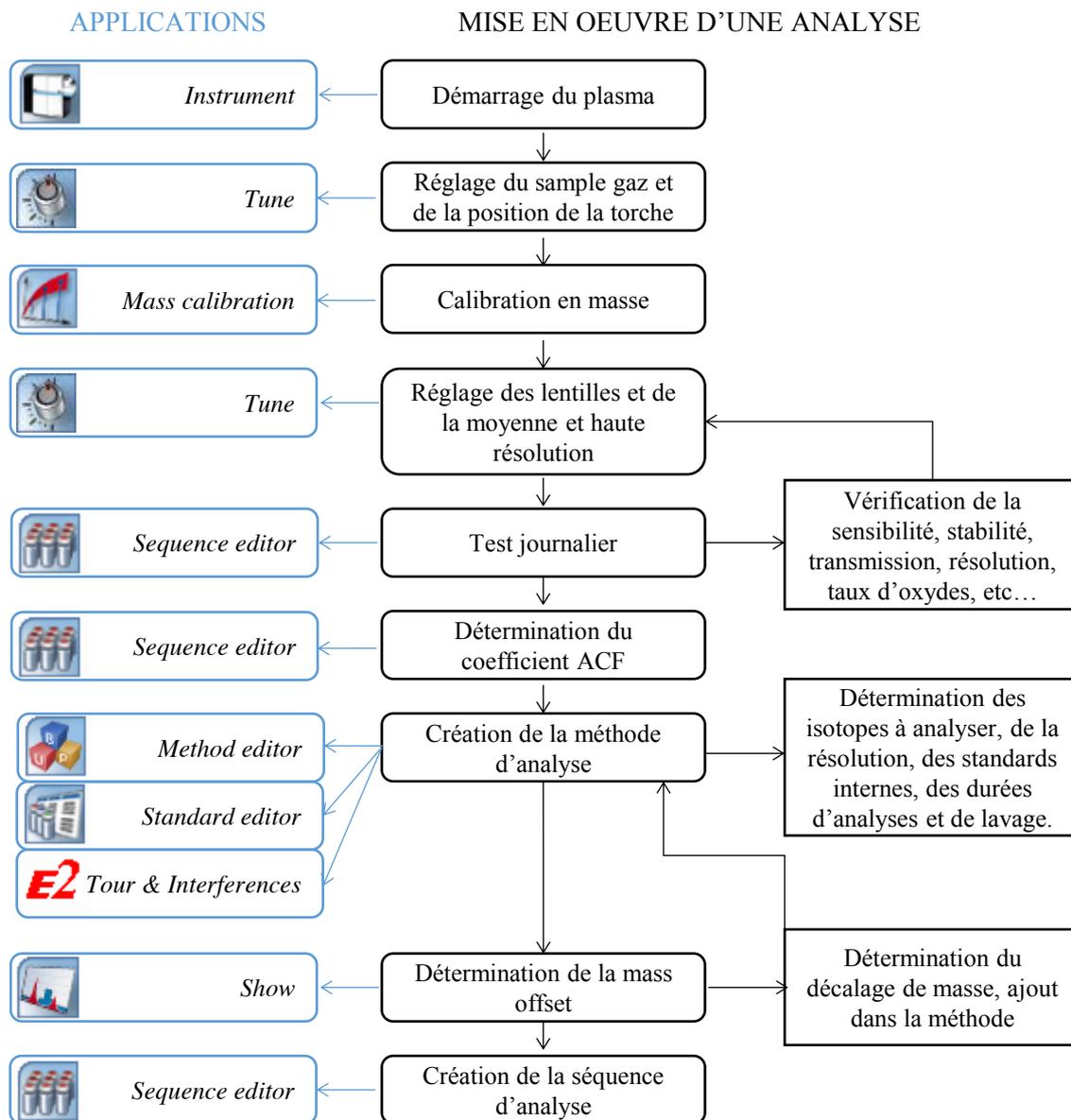
## V.2. Temps de lavage

Afin de nettoyer de façon optimale le système d'injection et de nébulisation entre deux échantillons, le temps de lavage par une solution d'acide nitrique à 2 % (dans de l'eau Milli-Q) entre deux échantillons a par ailleurs été optimisé afin de limiter au maximum les risques de contamination. La décroissance du signal en cps pour chaque isotope a donc été enregistrée après le passage d'un échantillon végétal, de manière à retrouver les valeurs du blanc. Les mesures ont été effectuées toutes les 12 secondes, (Figure III.11), un temps de lavage de 3,2 min permet d'éliminer tous les effets de mémoire après analyse d'un standard de feuilles de citronnier.

## V.3. Séquence analytique type

L'analyse d'une série d'échantillons nécessite un réglage de l'appareil quotidien, la construction de la méthode d'analyse et de la séquence analytique (Figure III.12). Après le démarrage du plasma, un scan d'une solution de réglage (Tune-Up Solution Element à 5 % HNO<sub>3</sub>, 1099601, Thermo Scientific) contenant 100 ppt de Ba, de B, de Co, de Fe, de Ga, d'In, de K, de Li, de Lu, de Na, de Rh, de Sc, de Tl, de U et de Y est acquis pour ajuster les performances de l'instrument par le réglage de la position de la torche et du débit de gaz échantillonneur (cf. Annexe I : Procédure de Mise en route journalière de l'ICP-MS-HR). La calibration en masse est ensuite effectuée pour permettre une bonne attribution des unités de masse sur les pics acquis (précision à 0,002 u nécessaire pour la haute résolution). Lorsque la masse moyenne d'un isotope n'est pas attribuée au pic correspondant, un recalibrage manuel est réalisé. Une fois, ces opérations effectuées le spectromètre de masse est alors stabilisé, un réglage approfondi peut être effectué par l'optimisation de la position des lentilles du transfert optique, de la moyenne et de la haute résolution. Un test journalier est ensuite effectué pour évaluer la performance de l'Element 2, la sensibilité et la stabilité de la mesure, la résolution, la transmission, le taux d'oxyde d'Uranium et le taux d'ions doublement chargé du Baryum. Enfin, le coefficient de conversion entre le mode analogique et le mode counting (ACF, Analogic Conversion Factor) est ensuite calculé.

La méthode d'analyse doit ensuite être créée (cf. Annexe II : Méthode d'analyse de 18 isotopes d'intérêt). Les éléments analysés incluent les cinq éléments majeurs (K, Ca, P, S, Mg), les micro-éléments essentiels (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B, Ni) ainsi que plusieurs éléments bénéfiques (*e.g.* Na, Se, Co, Si et Al) et métaux lourds (Cd). Les isotopes analysés sont choisis en fonction des



**Figure III.12. Diagramme de mise en œuvre d'une analyse en ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) et outils logiciels utilisés (cadres bleus).**

ACF (Analogic Conversion Factor) : coefficient de conversion entre mode analogique et mode counting - Mass offset : décalage entre la masse de référence et la masse déterminée par l'analyse.

interférences isobariques existantes. Parallèlement, la résolution optimale pour chacun est choisie en fonction des interférences dont il est l'objet et de son abondance. Le standard interne ( $^{71}\text{Ga}$  ou  $^{103}\text{Rh}$ ) le plus approprié est ensuite déterminé pour chaque isotope analysé. Vingt canaux d'acquisition sont acquis par pic, le temps par canal d'acquisition dépendant de la résolution et de la sensibilité. La méthode d'intégration est ensuite définie (largeur de la fenêtre d'intégration, largeur de la fenêtre de recherche...). Enfin, les différentes caractéristiques de l'aimant sont déterminées (temps de repos de l'aimant...).

Avant l'analyse des échantillons, le décalage de masse (ou mass offset) doit encore être contrôlé par l'acquisition d'un étalon comprenant tous les isotopes qui devront être quantifiés. Ce décalage est corrigé en appliquant un coefficient calculé comme la différence entre la masse de référence et la masse du pic de l'isotope analysé.

Une fois, ce dernier réglage effectué, une séquence analytique peut être lancée. Elle comprend, quatre 'blancs machine' (solution d'acide nitrique à 2 % dans de l'eau ultra-pure MilliQ) permettant le nettoyage de celle-ci, les sept solutions d'étalonnage (Annexe III), de nouveau un 'blanc machine', les blancs de minéralisation (voir chapitre suivant pour la composition) et enfin les échantillons. Une séquence se termine avec de nouveau deux 'blancs machine' avant l'arrêt de l'ICP-MS-HR.

L'ensemble de ces opérations est réalisé grâce à l'utilisation séquentielle de huit logiciels ayant des tâches spécifiques (Figure III.12).

**Tableau III.4. Méthodes de minéralisation d'échantillons végétaux utilisées dans la littérature.**

Matrices végétales	Prise d'essai	Agents oxydants	Rampe et température	Réacteurs	Détermination	Références
Oignon ( <i>Allium cepa</i> Hysam)	2 g	10.0 mL d'acide nitrique (HNO <sub>3</sub> )	The microwave oven (power level) 504 W) was programmed to run at increasing pressure of 40, 85, and 175 psi in three steps. The pressure was held constant for 3, 3, and 5 min during the three steps, respectively.	Réacteurs fermés en Téflon PFA (perfluoroalkoxy)	63 éléments (Ag, Al, Au, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Ge, Hf, Hg, Ho, In, Ir, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nb, Nd, P, Pb, Pt, Rb, Re, Ru, S, Sb, Se, Si, Sm, Sn, Sr, Tl, Th, Ti, Tl, U)	Bibak et al., 1998
Feuilles de tabac et feuilles de tomates	200 mg	3 mL d'acide nitrique (65%) and de peroxyde d'hydrogène (30%). Après la digestion, addition de 100 µL d'acide tetrafluoroborique (HBF <sub>4</sub> )	Une pression de départ de 50 bar était appliquée à la chambre de réaction, puis augmentation de la température jusqu'à 60°C en 9 min, de 60 à 125°C en 25 min, de 125 à 160°C en 10 min de 160 à 240°C en 12 minutes et un plateau à 240°C pendant 20 min.	Réacteurs de 20 mL en PTFE	As	Frank et al., 2005
farine de blé dur et riz	250 mg	5 mL 70% d'acide nitrique ultrapure (HNO <sub>3</sub> ) et 5 mL de peroxyde d'hydrogène à 15% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	?	Réacteurs de 100 mL	21 éléments (Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Sr, Mo, Cd, Ba et Pb)	Laursen et al., 2009
Foins	1 g	5 mL d'acide nitrique (65%), après la digestion à température ambiante, addition de 10 mL de peroxyde d'hydrogène (30%)	Après 10h de digestion à température ambiante, chauffé pendant 2h et demi.	Tube en pyrex de 250 mL Pyrex	8 éléments (As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb et Se)	Masson et al., 1999
Feuilles de tomate, aiguille de pin, farine de riz et feuilles de pêcher.	A - 1g B - 500 mg	Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%), acide nitrique (HNO <sub>3</sub> , 69%) et acide hydrofluorique (HF, 48%)	A - Incinération dans une capsule en silice à 480 °C pendant 5h dans un four à moufle. Après incinération, transfert de l'échantillon dans une capsule en Téflon, 5 mL de HF était ajouté. Après évaporation en chauffant, le résidu était repris dans 5 mL d'HNO <sub>3</sub> . B - Minéralisation en microonde avec 2mL d'HNO <sub>3</sub> .	A - Capsule en silice B - Réacteur en Téflon	8 éléments (As, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni et Pb)	Masson et al., 2010
Graines de céréales (blé, seigle, orge) et bois, écorce et aiguilles de pin et d'épinette	A - 2 g B - 500 mg	A - 10 mL d'acide nitrique B - 5 mL d'acide nitrique et 0,5 mL de peroxyde d'hydrogène.	A. Digestion en réacteurs ouverts avec 10 mL d'HNO <sub>3</sub> . Digestion à température ambiante pendant 30 minutes puis augmentation progressive de la température jusqu'à 1208°C pendant 2h. B. Digestion microonde. Puissance de 600 W pendant 1 h.	A - Tube en pyrex B - Réacteur PFA	16 éléments (Al, Fe, Ti, Zn, Mn, Cu, Co, Ni, Cr, Ba, Sr, Cd, As, V, Mo et Pb)	Rodushkin et al., 1999
Racines, feuilles et graines de blé et de riz	500 mg	10mL d'acide nitrique (HNO <sub>3</sub> , 50%)	Digestion pendant 12 min à 240 °C	réacteurs en quartz de 30 mL	30 macro- and trace elements	Shrangeeva et al., 2011
le grain entier de l'amidonnier, l'engrain et l'épeautre et de deux cultivars de blé de printemps	500 mg	2 mL d'acide nitrique (HNO <sub>3</sub> )	Procédure décrite par Wivart et al. 2009	réacteurs en quartz de 30 mL	20 éléments (K, P, S, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Na, Cu, Al, Ba, Sr, B, Rb, Mo, Ni, Cr, Cd et Pb)	Suchowilska et al. 2012
Plante émergée ( <i>Typha latifolia</i> ) et immergées ( <i>Elatine triandra</i> and <i>Ceratophyllum demersum</i> ).	50 mg	0,5 mL d'acide nitrique concentré (HNO <sub>3</sub> )	Après 10 min à température ambiante, les réacteurs étaient chauffés à 70°C pendant toute une nuit.	réacteurs en Téflon conique de 5 mL avec bouchon à vis.	As	Zheng et al., 2003
Feuilles de pommier, grain de blé dur et grain de riz	< 5 mg	125 µL 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and 250 µL 65% HNO <sub>3</sub>	Rampe de 10 minutes pour atteindre 140°C puis digestion à 140°C pendant 80 min.	Des flacons en verre jetables fermés par des bouchons à vis en polyéthylène téréphtalate (PETE) et joints en polytétrafluoroéthylène (PTFE)	11 éléments (K, P, S, Mg, Ca, Zn, Fe, Cu, Mo, Se, Cd)	Hansen et al., 2009

## VI. Préparation des échantillons

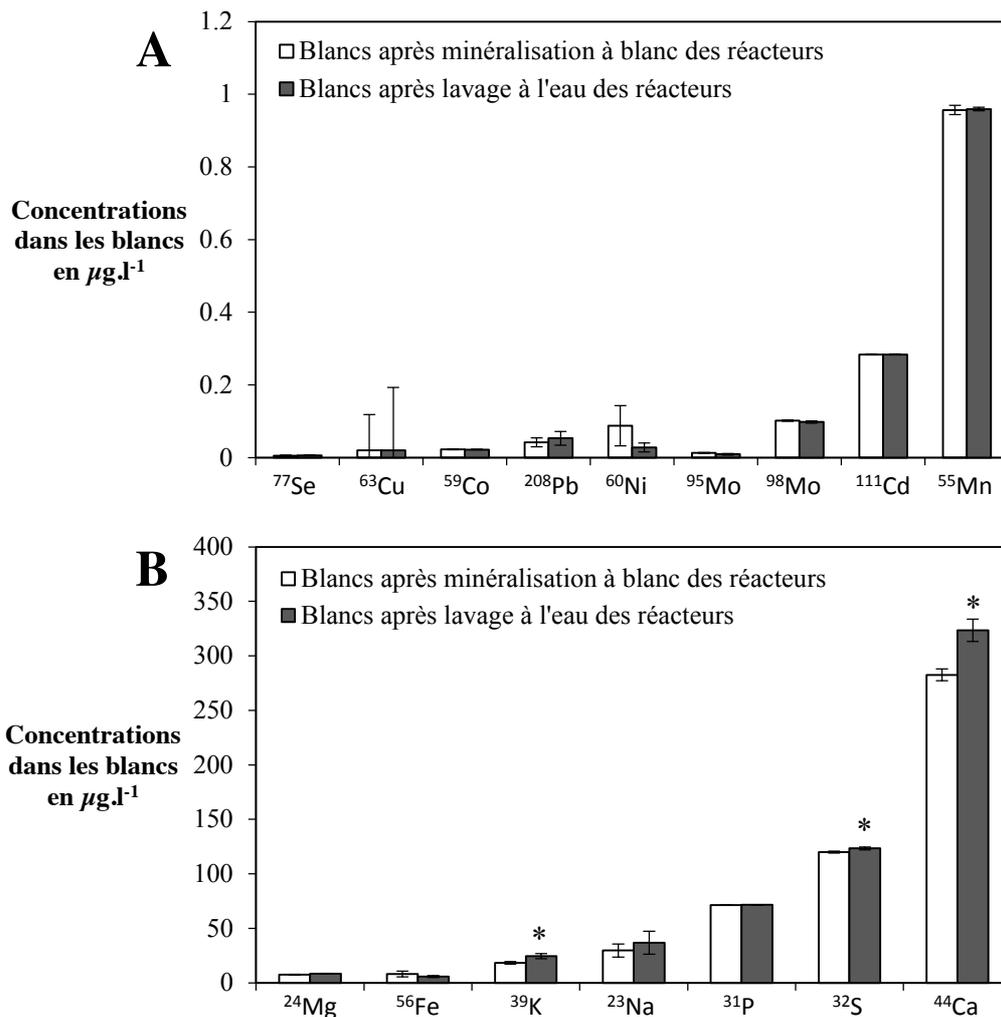
Les performances analytiques de l'ICP-MS-HR sont hautement dépendantes de la qualité de la préparation des échantillons avant analyse. Une digestion efficace de toutes matières organiques doit être réalisée puisque des résidus organiques pourraient causer des biais analytiques (effet matrice). Ces résidus peuvent entraîner une nébulisation instable, une instabilité du plasma et des interférences polyatomiques avec le C ( $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$  sur  $^{52}\text{Cr}$  et  $^{12}\text{C}^{15}\text{N}$  sur  $^{27}\text{Al}$ ).

Différentes méthodes de minéralisations des échantillons ont été décrites dans la littérature dépendant du type, de la quantité d'échantillon, et de l'isotope d'intérêt (Tableau III.4.). Ces méthodes diffèrent par la prise d'essai, le type d'agent oxydant utilisé, les températures sélectionnées selon la méthodologie utilisée (four micro-onde ou bloc de minéralisation) ainsi que par les réacteurs employés (Téflon, pyrex, quartz...). Les feuilles sont généralement facilement minéralisées au contraire des graines ou des fruits (Husted *et al.*, 2011). Deux méthodes de minéralisation de matières organiques sont utilisées : la minéralisation par voie sèche ou « dry ashing » assurée par une calcination à haute température et la minéralisation par voie humide ou « oxydative acid digestion » sous l'action d'agents oxydants.

Lors de la minéralisation par voie sèche, l'échantillon est déposé dans un creuset en silice, porcelaine ou platine avant d'être réduit en cendre dans un four à moufle par un long chauffage à 450°C. Les cendres sont ensuite mises en solution dans de l'acide nitrique ou chlorhydrique. Cette méthode présente de nombreux inconvénients et n'a donc pas été utilisée dans cette étude. En effet, les températures élevées mises en jeu lors de la calcination provoquent inévitablement des pertes par volatilisation plus ou moins importantes de certains éléments (essentiellement Hg, As, Se et S) (Husted *et al.*, 2011). Lors de la reprise des cendres, des pertes peuvent également être observées, en raison de l'adsorption des cendres à la surface des creusets entraînant alors une sous-estimation de tous les éléments. La reprise des cendres ne permet pas non plus la dissolution de la silice et de tous les éléments qui y seraient associés tels que l'Al.

La minéralisation par voie humide se fait par voie chimique sous l'action d'acides forts tels que l' $\text{HNO}_3$ , l' $\text{HCl}$ , l' $\text{H}_2\text{SO}_4$ , l' $\text{HClO}_3$  ou l' $\text{HF}$  complétée par l'action d'agents oxydants tels que l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cette réaction peut être accélérée par une haute température. Elle peut être effectuée dans des systèmes ouverts à pression atmosphérique ou en réacteurs fermés sous pression.

Les réacteurs ouverts sont chauffés par bec bunsen, plaques chauffantes ou autres. Cependant, en système ouvert la dégradation est limitée par le point d'ébullition des agents oxydants. De plus, l'utilisation de systèmes ouverts peut entraîner des pertes d'éléments volatils tout comme lors la digestion par voie sèche.



**Figure III.13.** Concentrations en  $\mu\text{g.l}^{-1}$  des macroéléments (A) et des microéléments (B) dans les blancs minéralisés en réacteurs en téflon préalablement minéralisés à blanc (barres blanches) ou en réacteurs juste lavés à l'eau (barres grises) mesurés par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Les concentrations sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  erreur standard ( $n = 4$ ).

**Tableau III.5.** Teneurs en S, K et Ca en ppm des feuilles de citronnier certifiées des feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves – Sylab) minéralisées en réacteur en téflon préalablement minéralisés à blanc ou en réacteurs lavés à l'eau mesurées par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

Les concentrations sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  erreur standard ( $n = 4$ ).

	Teneurs en ppm obtenues avec minéralisation à blanc des réacteurs	Teneurs en ppm obtenues avec un simple lavage des réacteurs	Valeur de <i>P</i> (test de student)
$^{32}\text{S}$ (ppm)	4227,7 $\pm$ 39,64	4148,1 $\pm$ 55,00	0,14
$^{39}\text{K}$ (ppm)	8038,8 $\pm$ 246,13	7928,7 $\pm$ 86,97	0,34
$^{44}\text{Ca}$ (ppm)	43335,0 $\pm$ 667,89	42523,6 $\pm$ 600,45	0,20

La minéralisation en système fermé s'effectue dans des réacteurs en Téflon ou en verre. Elle a l'avantage de combiner les effets oxydants des acides forts à une haute température et à une haute pression tout en limitant les risques de pertes d'éléments volatils et d'apports de contaminants. Dans cette étude, c'est donc une minéralisation par voie humide en réacteur en Téflon sous pression, qui a été choisie. Des essais préliminaires nous ont conduit à éviter tout au long de la préparation des échantillons tout équipement en pyrex (réacteurs, fiole, Bécher, pipette) conduisant à une forte et constante pollution par relargage de Si, B, Na et Al, mais aussi à n'utiliser que de l'eau ultra-pure de type Milli-Q présentant par ailleurs une résistivité d'au moins 18,2 MΩ.cm à 20°C.

### VI.1. Minéralisation à blanc

Afin de limiter tout apport de contaminants, les réacteurs en Téflon doivent être lavés entre deux séries d'analyses. Afin de vérifier si un simple lavage des réacteurs précédemment utilisés pour minéraliser un échantillon végétal par de l'eau de type Milli-Q était suffisant, nous avons comparé les traces élémentaires d'un minéralisât blanc (1 ml d'eau Milli-Q, 0,8 ml d'HNO<sub>3</sub> et 0,2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) au sein d'un réacteur ayant préalablement été utilisé puis lavé soit à l'eau Milli-Q soit ayant été lavé par une minéralisation à blanc et un rinçage à l'eau Milli-Q. Aucune différence significative n'a été observée entre les concentrations obtenues dans les blancs dont les réacteurs ont été minéralisés à blanc et dans les blancs dont les réacteurs ont été simplement rincés à l'eau Milli-Q (Figure III.13) pour la majorité des éléments. Une amélioration de la propreté des blancs a été obtenue uniquement pour trois macro-éléments : le Ca, le S et le K. Cependant, cette contamination (faible au regard des quantités mesurées au sein des tissus végétaux) n'a pas d'effet significatif sur la quantification des teneurs en Ca, S et K des feuilles de citronnier (matériel de référence certifié) (Tableau III.5). En effet, cette contamination ne représente qu'une très faible part de la teneur d'un échantillon : 0,12, 0,10 et 0,10 % respectivement pour le Ca, le S et le K.

### VI.2. Détermination de la prise d'essai

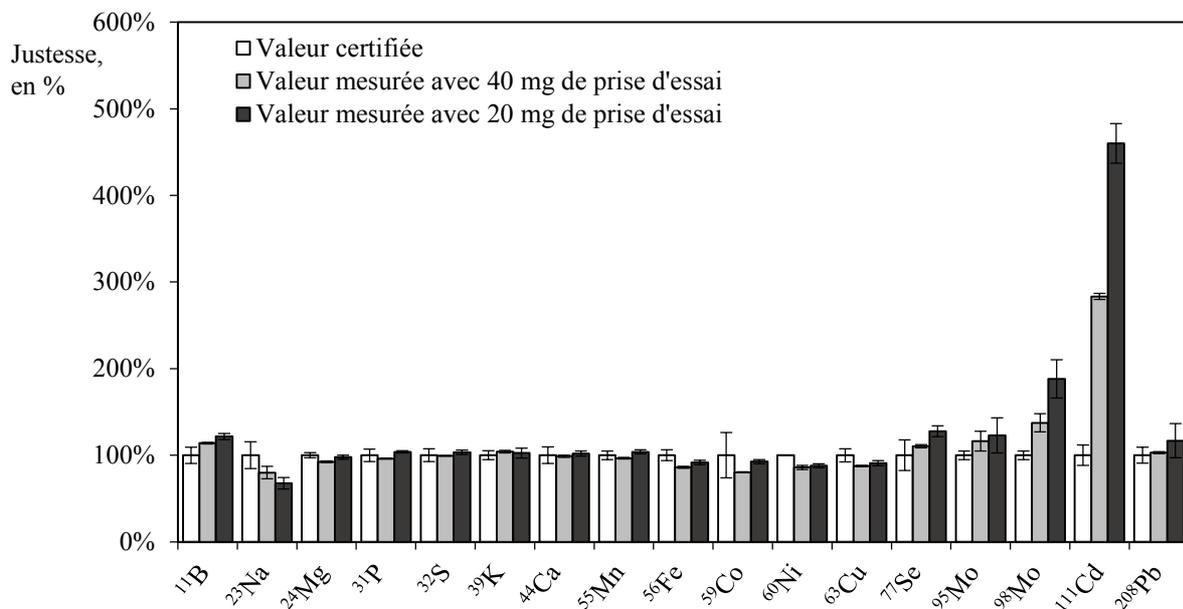
Dans la littérature, la prise d'essai varie de 1 mg à 2 000 mg (Tableau III.4). Elle est souvent limitée par la quantité de matériel végétal disponible. Une grande quantité de prise d'essai nécessite un plus grand volume de réactif voire une étape de dilution supplémentaire pouvant engendrer des contaminations. En 2009, Hansen *et al.*, ont donc développé une procédure de minéralisation micro-onde pour des échantillons compris entre 1 et 20 mg de MS en utilisant des réacteurs de 5 ml. Le profil élémentaire obtenu correspondait à celui obtenu avec une minéralisation de 250 mg de MS par un mélange de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et HNO<sub>3</sub> (2 : 1) en réacteur de 50 ml. Cette méthode de

**Tableau III.6. Composition du verre des réacteurs en % de la masse donnée sous la forme d'oxydes des éléments présents.**

Oxydes	SiO <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> O	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO
Pyrex	80,6	12,6	4,2	2,2	0,1	0,05

**Tableau III.7. Coefficient de variation des analyses obtenues avec quatre répétitions pour 20 mg de prise d'essai ou 40 mg par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

Isotopes analysés	20 mg de prise d'essai CV(%)	40 mg de prise d'essai CV(%)
<sup>11</sup> B	6 %	1 %
<sup>23</sup> Na	20 %	18 %
<sup>24</sup> Mg	5 %	2 %
<sup>31</sup> P	3 %	1 %
<sup>32</sup> S	5 %	1 %
<sup>39</sup> K	11 %	3 %
<sup>44</sup> Ca	6 %	2 %
<sup>55</sup> Mn	5 %	2 %
<sup>56</sup> Fe	6 %	2 %
<sup>59</sup> Co	5 %	2 %
<sup>60</sup> Ni	5 %	6 %
<sup>63</sup> Cu	6 %	2 %
<sup>77</sup> Se	10 %	3 %
<sup>95</sup> Mo	33 %	20 %
<sup>98</sup> Mo	23 %	15 %
<sup>111</sup> Cd	10 %	2 %
<sup>208</sup> Pb	34 %	2 %



**Figure III.14. Teneurs obtenues 20 et 40 mg de prise d'essai exprimées en % des teneurs certifiées (Justesse) des feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab) mesurés par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

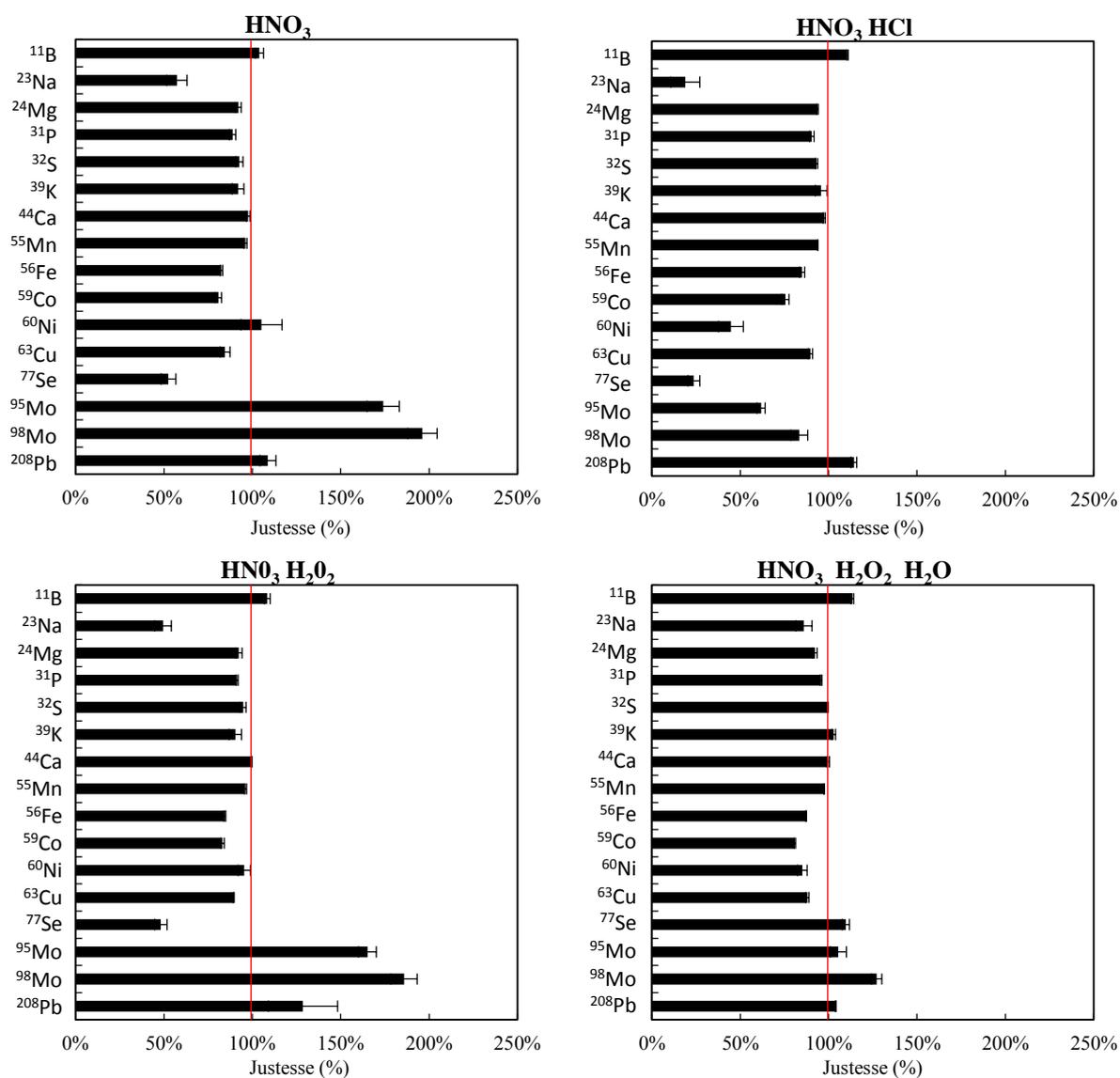
Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  erreur standard (n = 4).

miniaturisation de la prise d'essai présente cependant des inconvénients puisque la digestion s'effectue dans des réacteurs en verre qui pourraient être altérés au cours des utilisations et relarguer des éléments entrant dans sa composition tels que le B, le Si, le Na, l'Al, le Ca et le Mg rendant l'analyse de ceux-ci impossible (Tableau III.6). Ces éléments ne sont pas pris en compte dans l'étude de Hansen *et al.*, 2009. Nous avons initialement cherché à mettre au point une méthode de micro-minéralisation en utilisant des réacteurs en pyrex de 5 ml, mais cette démarche a dû être abandonnée compte tenu des contaminations importantes tant des blancs que des échantillons végétaux en ces éléments.

Une procédure de minéralisation par un mélange de H<sub>2</sub>O, HNO<sub>3</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 :4 :1) de faibles quantités de matériel végétal sec de 20 et de 40 mg a donc été testée en utilisant des réacteurs classiques en Téflon de 50 ml, n'ayant pu trouver de fournisseurs proposant de plus petits réacteurs. L'utilisation de ceux-ci pour de faibles prises d'essai peut engendrer une diminution du rendement de minéralisation puisqu'une plus faible pression est générée au cours de la réaction (faible dégagement de CO<sub>2</sub>). Il faut également garder en mémoire qu'une petite prise d'essai peut augmenter la variabilité si l'échantillon est hétérogène. Nous avons limité ce risque en utilisant des poudres très finement broyées (vibro broyeur Retsch MM400 utilisés à 30 oscillations s<sup>-1</sup>, pendant 2 minutes pour des limbes foliaires).

Les teneurs mesurées en éléments minéraux dans les feuilles de citronnier étaient en accord avec les valeurs certifiées pour la majorité des éléments (Figure III.14). La teneur en Na était celle que soit la prise d'essai sous-estimée par rapport à la valeur certifiée. Avec une quantité de matériel sec de 40 mg et de 20 mg, le Na était sous-estimé de 20 % et de 32 % respectivement. La teneur en <sup>98</sup>Mo était surestimée de 37 % avec une prise d'essai de 40 mg. Une surestimation plus importante était observée avec une plus petite prise d'essai (88 %). Une considérable surestimation de l'élément trace Cd de 360 % et de 183 % était observées pour une prise d'essai de 20 et 40 mg respectivement. Ces valeurs pourraient englober des contaminants issus des procédés de préparation tels que le Na. La répétabilité des résultats avec la prise d'essai de 40 mg étaient nettement supérieure, avec des RSD usuellement inférieures à 5 % sauf pour le Na et le Mo (Tableau III.7). De plus, les teneurs en Pb et Se étaient déterminés avec moins de 3 % de variabilité en dépit des très faibles teneurs de ces éléments dans le matériel de référence certifié. *A contrario*, la variabilité des teneurs mesurées augmente en diminuant la prise d'essai de 40 à 20 mg (Tableau III.7). Une partie de la variation mesurée pourrait être dû à une hétérogénéité de l'échantillon indiquant qu'une telle prise d'essai serait insuffisante.

Néanmoins, si on regarde l'ensemble des résultats, la procédure de minéralisation développée avec 40 mg de matériel végétal est en mesure de fournir des résultats fiables et



**Figure III.15. Détermination du pouvoir oxydant de quatre combinaisons d'acides pour la minéralisation de feuilles de citronnier (CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves – Sylab): HNO<sub>3</sub>, HNO<sub>3</sub> : HCl 85 : 15, HNO<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8 : 2, H<sub>2</sub>O : HNO<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 : 4 : 1.**

Les teneurs obtenues après analyse par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) sont exprimées de façon relative aux teneurs certifiées. Les valeurs sont exprimées comme la moyenne ± erreur standard (n = 4).

reproductibles pour la plupart des éléments mesurés : B, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Se, Mo et Pb.

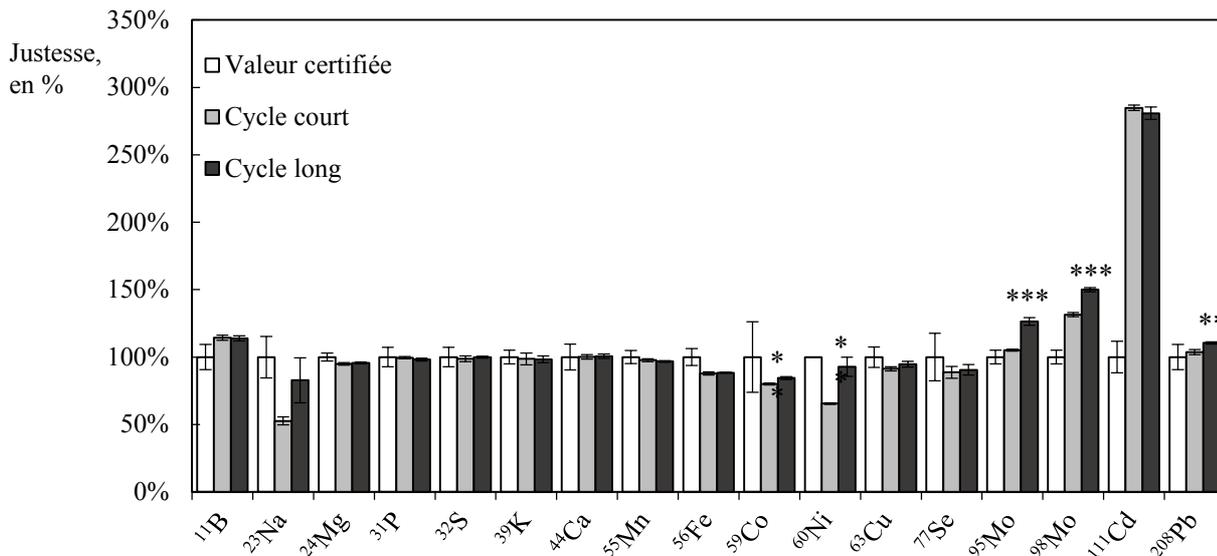
### VI.3. Choix des réactifs

Les agents oxydants les plus utilisés sont les acides forts tels que l' $\text{HNO}_3$ , l' $\text{H}_2\text{SO}_4$ , l' $\text{HClO}_3$ , et l' $\text{HCl}$ . L' $\text{H}_2\text{O}_2$  est également utilisé. Son pouvoir oxydant n'est pas suffisant pour digérer entièrement la matière organique à température ambiante. En conséquence, il doit être utilisé à haute température, à haute pression et/ou combiné avec des acides. L' $\text{H}_2\text{SO}_4$  peut permettre de digérer certaines matrices difficilement minéralisables puisque son pouvoir de digestion et son point d'ébullition est plus élevé que celui des autres acides. Cependant, celui-ci doit être évité lorsque l'on souhaite analyser des traces puisque celui-ci n'est pas disponible en haute pureté et qu'il interdit par ailleurs de quantifier le S. En revanche, l' $\text{HNO}_3$ , l' $\text{HCl}$ , et l' $\text{HClO}_3$  sont disponibles en très hautes puretés, l'N et le Cl ne pouvant de toute façon être analysés par cette technique. Le dernier, en raison de son instabilité n'est pas utilisé en système fermé.

L' $\text{HNO}_3$  est particulièrement bien adapté à la minéralisation de tissus végétaux car il permet l'oxydation à température ambiante ainsi qu'à haute température et à haute pression. C'est l'acide le plus utilisé dans la littérature pour minéraliser les matrices végétales, seul ou combinaison avec l' $\text{HCl}$  ou l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tableau III.4). Afin de déterminer une méthode de minéralisation optimale, le pouvoir oxydant de quatre combinaisons d'acides a été analysé sur un matériel de référence certifié (CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Syllab) à raison de 40 mg de MS et d'acides dans les proportions suivantes :

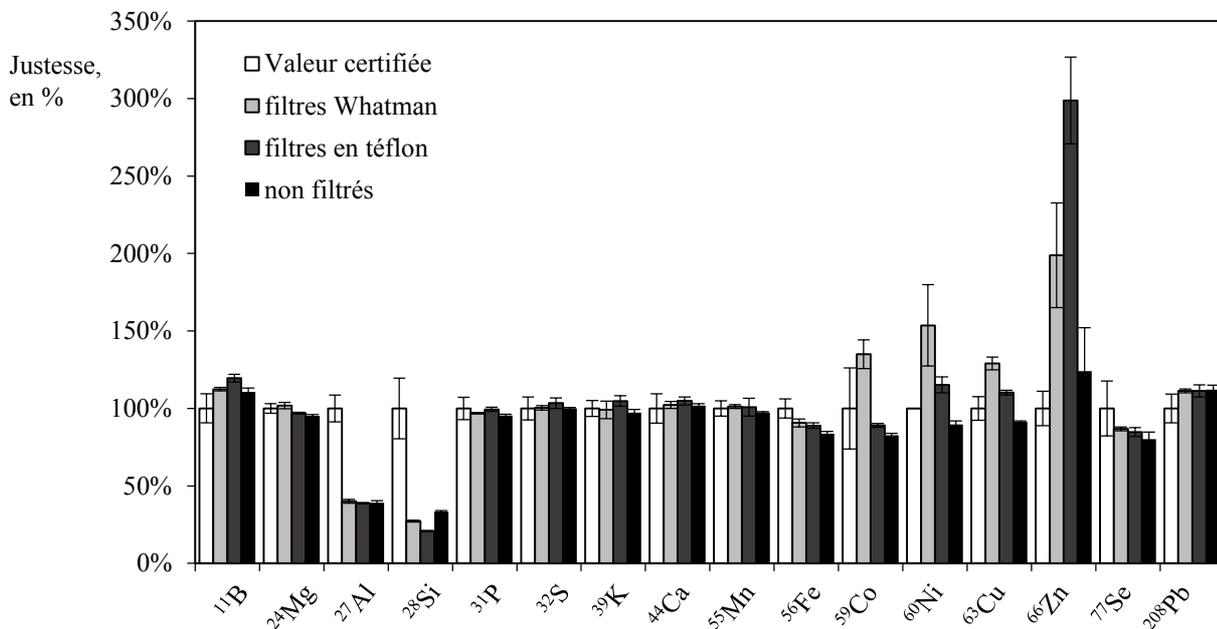
- $\text{HNO}_3$  : 2 ml,
- $\text{HNO}_3$  et  $\text{HCl}$  à raison de 1,7 et 0,3 ml, respectivement,
- $\text{HNO}_3$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  à raison de 1,6 et 0,4 ml, respectivement,
- $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HNO}_3$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  : à raison de 1, 0,8 et 0,2 ml, respectivement.

La justesse des quatre méthodes de digestion a été évaluée en comparant les données obtenues aux concentrations certifiées. Les méthodes utilisant comme réactif 100 % d' $\text{HNO}_3$  ou combiné avec l' $\text{HCl}$  ou l' $\text{H}_2\text{O}_2$  avait tendance à sous-évaluer la teneur de plusieurs éléments tels que le Na, ou le Se (Figure III.15). La plus grande erreur par rapport à la valeur certifiée était observée pour le Mo qui était largement surestimé par la digestion avec l' $\text{HNO}_3$  à 100 % (de 74 % pour  $^{95}\text{Mo}$  et de 96 % pour  $^{98}\text{Mo}$ ) ainsi que par la digestion avec un mélange  $\text{HNO}_3$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  (de 65 % pour  $^{95}\text{Mo}$  et de 86 % pour  $^{98}\text{Mo}$ ). En revanche, la méthode de minéralisation par la combinaison  $\text{H}_2\text{O} : \text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O}_2$  5 : 4 : 1, permettait de retrouver les valeurs certifiées pour neuf des éléments considérés avec moins de 10 % d'erreur sur la justesse des analyses. Les analyses des teneurs en



**Figure III.16. Teneurs mesurées par ICP-MS HR (Element 2, Thermo Fisher) d'échantillons digérés avec un cycle de minéralisation de 23 min et de 43 min exprimées en % des teneurs certifiées des feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab).**

Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  erreur standard (n = 4).



**Figure III.17. Teneurs mesurées par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher) dans des minéralisats filtrés par filtres Whatman n°4, filtres en téflon ou non filtrés exprimées en % des teneurs certifiées des feuilles de citronnier (Matériel de référence certifié CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab).**

Les valeurs sont exprimées comme la moyenne  $\pm$  erreur standard (n = 4).

macro-éléments Ca, K, P et S étaient précises avec moins de 5 % d'erreur. Les teneurs en Mg, Fe, Cu et Ni étaient légèrement sous-estimées (~10 %) alors que le Mn et le Pb étaient déterminés précisément. Par cette méthode, le Na était également sous-estimé (-14 %) et le Mo surestimé (de 6 % pour  $^{95}\text{Mo}$  et de 27 % pour  $^{98}\text{Mo}$ ).

#### VI.4. Durée de la minéralisation

Avec toujours l'objectif d'obtenir une digestion efficace de toute la matière organique contenue dans notre matrice végétale, la durée de la minéralisation a été optimisée. Deux cycles de minéralisation ont été testés, l'un de 23 min et l'autre de 43 min afin de déterminer si le cycle court était suffisant pour éliminer tout résidu organique qui pourrait entraîner une nébulisation instable, une instabilité du plasma et des interférences polyatomiques avec le C. Pour la majorité des éléments, le cycle court était suffisant pour permettre une minéralisation complète de la matière organique, c'était notamment le cas pour le Mg, le P, le S ou encore le Mn (Figure III.16). Cependant, la teneur en certains éléments tels que le Co, le Ni, le Mo ou le Pb augmentait significativement dans les minéralisats avec la durée de la minéralisation suggérant que la minéralisation était légèrement incomplète.

#### VI.5. Impact de la filtration du minéralisat

Afin de limiter les interférences physico-chimiques qui pourraient survenir à la suite du colmatage des cônes composant l'interface, une filtration des minéralisats à 0,45  $\mu\text{m}$  est fortement recommandée par le constructeur Thermo-Fisher. Cette filtration pourrait avoir un impact sur la composition des échantillons dans le cas d'une minéralisation incomplète. En effet, des résidus organiques non minéralisés passant dans le plasma, pourrait entraîner une instabilité de celui-ci et être à l'origine d'interférences polyatomiques avec le C. L'impact de la filtration sur la composition des minéralisats a donc été évalué.

La filtration n'avait pas d'impact sur la plupart des éléments considérés, la justesse étant proche de 100 % pour le Pb, le B, le Mg, le P, le S, le Ca ou encore le Mn (Figure III.17). La filtration était cependant source de contamination pour plusieurs éléments métalliques tels que le Co, le Ni, le Cu et surtout le Zn. En effet, la concentration en Zn dans les minéralisats dilués doublait par l'utilisation de filtre Whatman en cellulose (Whatman® qualitative filter paper, Grade 4, Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France) et triplait par l'utilisation de filtre en téflon (Digifilter, Courtage Analyses Services, Mont-Saint-Aignan, France). Pour le Co, Ni et Cu, la filtration par des filtres Whatman contaminait les échantillons de façon plus importante que la filtration par les filtres téflon. Les concentrations plus faibles de Si et Al quantifiées dans les minéralisats étaient



probablement dues à leur co-précipitation en silicate d'alumine, à l'origine d'une faible ionisation dans la torche.

#### VI.6. Protocole de minéralisation retenu

L'ensemble des essais préliminaires effectués permet de proposer quelques recommandations préalables, un protocole constituant un compromis entre les différentes contraintes rencontrées (Annexe III) mais aussi quelques perspectives d'amélioration qui n'ont pu être totalement menées à bien.

Les principales recommandations concernent les risques de contamination. Ainsi, l'eau et les acides utilisés doivent être de qualité ultra-pure. Tout le matériel utilisé doit être soigneusement lavé à l'eau Milli-Q. Le verre doit être complètement exclu, tout comme les gants talqués pouvant apporter différents éléments traces dans les minéralisats.

Le protocole de minéralisation suivant peut être proposé : minéralisation de 40 mg de masse sèche avec 2 ml d'un mélange  $H_2O : HNO_3 : H_2O_2$  à 180°C pendant un cycle de 43 minutes correspondant à 10 minutes de rampe pour monter à 130°C suivi d'un plateau de 5 minutes puis 5 minutes de rampe pour atteindre 190°C, température maintenue pendant 10 minutes. La filtration malgré sa recommandation par les fournisseurs est à reconsidérer en raison d'une contamination en Zn par la méthode actuellement retenue (filtre en téflon).

Quelques améliorations ne constituant pas un obstacle majeur pour ce travail seront à prévoir, comme le dosage du Si et de l'Al. De plus, cette méthode de minéralisation devra être adaptée à d'autres matrices pour permettre de nouvelles perspectives de recherche, comme l'analyse de sol, graines, etc... Enfin, une procédure de démarche qualité doit être mise en place.



---

## CHAPITRE IV

### Remobilisation des nutriments durant la sénescence foliaire et modulation par une carence en nutriments

---





## CHAPITRE IV

### Remobilisation des nutriments durant la sénescence foliaire et modulation par une carence en nutriments

---

Il est généralement admis que la remobilisation des éléments essentiels est associée à la sénescence foliaire. Afin d'évaluer le potentiel de remobilisation des éléments minéraux requis par les végétaux, nous avons donc suivi en condition de plein champ l'évolution de la quantité de chaque élément essentiel dans les feuilles sénescentes de huit espèces : *Zea mays*, *Brassica napus*, *Pisum sativum*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Quercus robur*, *Populus nigra* et *Alnus glutinosa*. Dans un second temps, leur remobilisation a été quantifiée à l'échelle de la plante entière, chez *B. napus* cultivé en conditions hydroponiques, dans le cas d'une privation en l'un ou l'autre des 13 éléments étudiés.

**Résultats majeurs :** Trois classes d'éléments peuvent être décrites selon leur potentiel de remobilisation foliaire. L'N est remobilisé chez toutes les espèces durant la sénescence foliaire avec une efficacité de remobilisation variable allant de 40 % chez le maïs à 90 % chez le blé et l'orge. Les autres macronutriments (le K, le P, le S et le Mg) sont remobilisés chez quelques espèces, tout comme les micronutriments (le Cu, le Mo, le Ni, le B, le Fe, le Zn). Enfin, le Ca comme le Mn ne sont remobilisés que chez le maïs et le blé. *A contrario*, en condition d'hydroponie et de privation totale, ces éléments, Ca et Mn, sont largement remobilisés des racines vers les parties aériennes (-97 et -86 % de la quantité initiale présente dans les racines, respectivement). Le potentiel de remobilisation d'un élément apparaît donc fortement dépendant de l'espèce considérée. Chez certaines espèces telles que le maïs ou le peuplier, une faible proportion de nutriments est remobilisée depuis les feuilles au cours de la sénescence au contraire du blé, de l'orge ou encore du chêne. Cette différence d'efficacité de remobilisation peut être expliquée par des durées de sénescence, des ratios organes reproducteurs : organes végétatifs différents ou des disponibilités en éléments minéraux variables selon les sols.

Ces résultats ont été publiés sous la forme d'un article dans *Frontiers in Plant Science*, intitulé «Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency».



# Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency

Anne Maillard<sup>1,2,3</sup>, Sylvain Diquélou<sup>1,2,3</sup>, Vincent Billard<sup>1,2,3</sup>, Philippe Lainé<sup>1,2,3</sup>, Maria Garnica<sup>4</sup>, Marion Prudent<sup>5</sup>, José-Maria Garcia-Mina<sup>4</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>6</sup> and Alain Ourry<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS, Normandie Université, Caen, France, <sup>2</sup> UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS, UNICAEN, Caen, France, <sup>3</sup> UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS, INRA, Caen, France, <sup>4</sup> Timac Agro Spain, Orcoyen, Spain, <sup>5</sup> UMR1347 Agroécologie, INRA, Dijon, France, <sup>6</sup> Groupe Roullier, Centre de Recherche International en Agrosceience, CRIAS-TAI, Dinard, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Raul Antonio Sperotto,  
Centro Universitário Univates, Brazil

### Reviewed by:

Sebastien Thomine,  
Centre National de la Recherche  
Scientifique, France  
Brian M. Waters,  
University of Nebraska, USA

### \*Correspondence:

Alain Ourry,  
UMR 950 Ecophysiologie Végétale,  
Agronomie et Nutritions NCS,  
Normandie Université – INRA,  
Esplanade de la Paix, CS14032,  
14032 Caen Cedex 5, France  
alain.ourry@unicaen.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Plant Nutrition,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

Received: 12 February 2015

Accepted: 21 April 2015

Published: 13 May 2015

### Citation:

Maillard A, Diquélou S, Billard V, Lainé P, Garnica M, Prudent M, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C and Ourry A (2015) Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Front. Plant Sci.* 6:317. doi: 10.3389/fpls.2015.00317

Higher plants have to cope with fluctuating mineral resource availability. However, strategies such as stimulation of root growth, increased transporter activities, and nutrient storage and remobilization have been mostly studied for only a few macronutrients. Leaves of cultivated crops (*Zea mays*, *Brassica napus*, *Pisum sativum*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*) and tree species (*Quercus robur*, *Populus nigra*, *Alnus glutinosa*) grown under field conditions were harvested regularly during their life span and analyzed to evaluate the net mobilization of 13 nutrients during leaf senescence. While N was remobilized in all plant species with different efficiencies ranging from 40% (maize) to 90% (wheat), other macronutrients (K–P–S–Mg) were mobilized in most species. Ca and Mn, usually considered as having low phloem mobility were remobilized from leaves in wheat and barley. Leaf content of Cu–Mo–Ni–B–Fe–Zn decreased in some species, as a result of remobilization. Overall, wheat, barley and oak appeared to be the most efficient at remobilization while poplar and maize were the least efficient. Further experiments were performed with rapeseed plants subjected to individual nutrient deficiencies. Compared to field conditions, remobilization from leaves was similar (N–S–Cu) or increased by nutrient deficiency (K–P–Mg) while nutrient deficiency had no effect on Mo–Zn–B–Ca–Mn, which seemed to be non-mobile during leaf senescence under field conditions. However, Ca and Mn were largely mobilized from roots (-97 and -86% of their initial root contents, respectively) to shoots. Differences in remobilization between species and between nutrients are then discussed in relation to a range of putative mechanisms.

**Keywords:** remobilization, ionic, nutrient deficiencies, senescence, crop species, *Brassica napus*, trees

## Introduction

As sessile organisms, higher plants have to cope with a permanently fluctuating availability of soil nutrients, both in space and time. When facing mineral nutrient deficiency, different plant strategies have evolved to optimize acquisition and use of most macro- and some micronutrients. The first strategy relies on an increase in the expression of genes encoding more or less nutrient-specific root transporters (Amtmann and Armengaud, 2009; Gojon et al., 2009) coupled with the second longer term strategy of increased and oriented



exploration of the soil by roots resulting from their growth and increased branching (Gruber et al., 2013; Giehl and von Wirén, 2014; Giehl et al., 2014). Root exudation of organic compounds is the third process by which nutrient mobility and phytoavailability of some nutrients can be increased either directly or indirectly through stimulation of rhizobiont activity (Dakora and Phillips, 2002). However, these three first strategies may not be sufficient to buffer any reduction in soil mineral nutrient availability and hence maintain the plant growth rate under varying conditions. The fourth identified strategy has been less described and relies on the remobilization of short or mid-term storage of macro- and micronutrients within the plant, which may be used to buffer a transient lack of mineral uptake by roots. This strategy occurs during vegetative growth when the availability of nutrients in soil is insufficient, mature leaves become sources to support the growth of new organs for example for N (Malagoli et al., 2005) or S (Abdallah et al., 2010).

However, remobilization processes may also occur during reproductive growth when root activity and nutrient uptake generally decrease while new sinks are emerging (Malagoli et al., 2005). In the latter case, remobilization of nutrients is frequently associated with foliar senescence, which makes nutrients available for younger plant organs and contributes to nutrient use efficiency (Himelblau and Amasino, 2001; Fischer, 2007; Avicé and Etienne, 2014). Remobilization requires mostly phloem transport. Macronutrients with the exception of Ca (i.e., N, P, S, K, and Mg) are known to be highly mobile in the phloem, while micronutrients (i.e., Fe, Zn, Cu, Ni, Mo, B, and Cl) with the exception of Mn show at least moderate mobility as reported by White (2012).

Seasonal patterns of macronutrient remobilization have also been reported in woody species. Deciduous trees store nutrients during winter, which are remobilized from the trunk each spring to sustain leaf growth as previously shown for N (Millard and Grelet, 2010). Mature trees rely more on the remobilization of N stores for their growth each spring than do small, juvenile trees (Millard et al., 2006). In evergreen trees, it has been shown that macronutrients such as nitrogen and phosphorus are remobilized from leaves (Cherbuy et al., 2001). This remobilization occurs in summer, after vegetative growth and synchronously with leaf shedding. K remobilization occurs in mid-summer, similar to N and P, and could be attributed to K resorption before leaf shedding or the fulfillment of nutrient demands when soil availability is low (Milla et al., 2005).

General appraisals of the remobilization of most nutrients during plant growth are relatively scarce, being only well-documented for the most abundant nutrients such as N, S, and P; and most of the time they have been studied individually. The simplest estimation of nutrient remobilization can be calculated through the “apparent remobilization” method, which relies on the determination of the amount of total nutrient present in the different plant organs at different times of development as previously used by Hocking and Pate (1977). Isotopic labeling, which allows the determination of nutrient fluxes derived from root uptake and by subtraction the remobilization of unlabeled nutrient between tissues is a more precise method, but it is limited by the availability of suitable isotopes. Using stable isotope

labeling, it has been shown that N is remobilized from senescing leaves to expanding leaves at the vegetative stage as well as to seeds during the reproductive stage in *Arabidopsis thaliana* and in *Brassica napus* (Malagoli et al., 2005; Diaz et al., 2008; Masclaux-Daubresse et al., 2010). Contrary to this, sulfur remobilization from leaves to the seeds is considered as a process independent of senescence (Abdallah et al., 2011) mostly because most S storage is under a mineral form ( $\text{SO}_4^{2-}$  may account for up to 70% of total S in *B. napus* leaves) (Abdallah et al., 2011). On the other hand, phosphorus remobilization has been less well-described in the literature. In wheat, remobilization of P accounted for 56–63% of the grain P content (Masoni et al., 2007). In P-deficient wheat, around 58–90% of P in the grain could be attributed to retranslocated P (Batten et al., 1986), whereas the proportion was substantially lower (up to 21% P) when the roots were continuously well-supplied with P.

Remobilization of micronutrients from leaves has received much less attention than for macronutrients in crops and in woody species because of low concentrations in tissues and probably the limited use of stable isotope [see Waters et al. (2009) or Hegelund et al. (2012) using stable isotopes of Zn]. Yet crops as basic sources of essential micronutrients do not always contain sufficient amounts of these essential nutrients to meet animal or human dietary requirements (Gupta et al., 2001; Alloway, 2008). Over the past 60 years, micronutrient contents (mostly Fe, Zn, Mg, and Cu) have been reduced in edible products, despite concentrations in soil that have either increased or remained stable (Fan et al., 2008). This has been attributed to varietal selection that aimed to achieve higher yields (Fan et al., 2008; Murphy et al., 2008). Consequently, improving the transfer of such micronutrients into edible parts via remobilization from vegetative tissues could be a way to satisfy micronutrient needs. Remobilization of Fe, Cu, and Zn has been specifically investigated. In wheat, the concentration of Fe and Cu in all plant vegetative organs has been shown to drop over time during grain filling (77 and 40–62%, respectively) due to their remobilization (Garnett and Graham, 2005). Remobilization of Zn from leaves to the grain is substantial in wheat (Kutman et al., 2012) and barley (Hegelund et al., 2012) but affected by Zn availability during post anthesis. Kutman et al. (2011) reported that more Fe (80%) than Zn (50%) in wheat grains was derived from leaf remobilization. Iron and Zn remobilization from wheat leaves has been shown to be impaired in *TaNAM* (NAC-type transcription factor) RNAi line compare to WT plants and that the extent of net Fe and Zn remobilization was dependent on availability of mineral input in both lines (Waters et al., 2009). This *TaNAM* RNAi wheat line was then characterized as having a delayed leaf senescence which provided a yield advantage under optimal conditions but with lower grain nutritional quality, resulting from a reduced remobilization of most minerals to the grains (Guttieri et al., 2013). Shi et al. (2012) demonstrated that leaf Fe remobilization with barley senescing leaves was stimulated by N deficiency, that increased phytosiderophore synthesis and hence Fe solubility. However, using dark induced leaf senescence, they suggested that Fe remobilization from mature leaves was independent of N remobilization.



To date, only a few studies have attempted to describe remobilization of all essential nutrients during plant senescence (Hocking and Pate, 1977; Himelblau and Amasino, 2001; Waters and Grusak, 2008; Moreira, 2009). Hocking and Pate (1977) using three legume species (*Pisum sativum*, *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*) grown under controlled conditions, described three classes of nutrients with diverging leaf remobilization efficiencies: N, P, and K (60–90% of remobilization from leaves); Mg, Zn, Mn, Fe, and Cu (20–60%); and Na and Ca (<20%). In *Musa spp.*, N, P, K, Mg, and Cu had a high remobilization rate compared to other nutrients investigated. B, Zn, and S had an intermediate rate whereas Ca, Fe, and Mn had low remobilization to the fruits (Moreira, 2009). In *A. thaliana*, the levels of Cu, Fe, K, Mo, N, P, S, and Zn in leaves drop by <40% during senescence suggesting that these nutrients are mobilized from senescing leaves (Himelblau and Amasino, 2001). Waters and Grusak (2008) using the same species but with different ecotypes showed that remobilization of some nutrients was genetically influenced (Cu, Zn, or S) or kept under the same magnitude whatever the ecotype (K for example). On average, they considered that remobilization of K accounted for about 48% of seed contents, only for 6–30% of Fe, P, S, Zn, and Cu, while Ca, Mg, or Mn were not remobilized at all. Moreover, it was shown that the *ysl1ysl3* mutant impaired in two metal-chelate transporter genes had impaired movement of Cu and Zn from the senescing rosette leaves.

Therefore, the aims of the current study were firstly to determine whether the different plant species remobilize minerals differently. In order to do so, the apparent remobilization was quantified during the leaf senescence in eight plant species. They included five crop species (*Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Brassica napus*, *Pisum sativum*, *Zea mays*) and three woody species (*Quercus robur*, *Alnus glutinosa*, *Populus nigra*) grown in field conditions. This choice of plant species was dependent on their economic importance, their ability to fix atmospheric N (*Pisum sativum* and *Alnus glutinosa*), their photosynthetic system (*Zea mays* as a C4) and their different patterns of growth and senescence (*Quercus robur* vs. *Populus nigra*). Secondly, the putative remobilization of each nutrient was quantified from mature leaves (i.e., before senescence) and from roots using *B. napus* grown in hydroponic culture and subjected to 13 individual nutrient deficiencies in order to determine if remobilization is induced or not by nutrient deficiency independently of senescence.

## Materials and Methods

### Harvesting Leaves during Senescence

Eight species (*Brassica napus* L., *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., *Quercus robur* L., *Alnus glutinosa* L. Gaertn., and *Populus nigra* L.) grown under field conditions or on soil under greenhouse conditions (*Pisum sativum* L.) were chosen in order to perform regular leaf harvests from early stages of development up to leaf fall. Leaves from three woody species (*Q. robur*, *A. glutinosa*, *P. nigra*) were harvested from the lower canopy (below 4 m height) with three replicates, each of them consisting of at least 50 leaves from three different trees. *Q. robur* and *P. nigra* were harvested from

trees located in the edges of the same grassland and therefore under the same soil (analysis is given in SD2) and climatic conditions. The age of the different *Q. robur*, *A. glutinosa*, and *P. nigra* trees was calculated using the trunk diameter at breast height (Claessens et al., 2010; Rohner et al., 2013) and was estimated to be between 96 and 134, 40 and 62, and 31 and 39 years, respectively. Only *Q. robur* trees were under reproductive phase. It was assumed that leaf development and senescence was synchronous in trees even if the senescence of some leaves may be affected by shading. For annual species, a specific leaf rank was selected. Leaves of four annual species were harvested from field grown plants with three replicates, each of them consisting of at least 15 (*Z. mays*, leaf rank just below the highest ear), 50 (*T. aestivum*, flag leaf), 50 (*H. vulgare*, flag leaf), or 10 leaves [*B. napus*, leaf rank number 20, identified from scars and harvested previously by Malagoli et al. (2005)]. *Z. mays*, *B. napus*, *T. aestivum*, and *H. vulgare* were harvested in nearby fields with similar soil (analysis given in SD2) and under the same climatic conditions. *P. sativum* L. cv Cameor were grown in controlled greenhouse conditions with temperatures of 18°C during the day and 14°C during the night, a 16 h photoperiod and a mean photosynthetically active radiation of 180  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  guaranteed by the use of high-pressure sodium lamps (MACS 400W; Mazda; Dijon; France) to compensate when daylight was declining. Seeds were sown in 4 L pots filled with a mixture of vermiculite: sand (v:v, 3:1), at a rate of five seeds per pot. Five days after sowing, two plants were removed in order to keep the three most homogeneous ones in the pot. Plants were watered throughout the experiment with a nutrient solution composed of 2 mM  $\text{NO}_3^-$ , 6 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 4\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 mM  $\text{NaNO}_3$ , 2.4 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.4 mM  $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ , 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10.6  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.7  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.2  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ , 84 nM  $\text{CoCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$  and 50  $\mu\text{M}$  Fe(III)-EDTA. Harvests were all carried out 4 h after the beginning of the photoperiod, and were undertaken on the fifth leaf of the plant, at 10 time points from its emergence until its senescence (period of 69 days). At each time point, three pools of plants were harvested and each pool was composed of two to 20 plants depending on leaf biomass.

For each leaf sample, the total number of leaves, fresh weight, and chlorophyll content (SPAD-502 model, Minolta, Tokyo, Japan) were recorded. Dry weight was obtained after placing the samples at 60°C for 4 days (80°C for 48 h for *P. sativum*), and dry samples were kept for further analysis. The life spans of leaves were then estimated by polynomial regressions of leaf dry weight in order to calculate the date of leaf appearance, and hence the total life span of leaves (Figure 1).

### Deficiencies under Hydroponic Conditions and Plant Harvests

Seeds of *B. napus* var. Bohème were surface-sterilized by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by 20% sodium hypochlorite for 10 min. After 10 washes with demineralized water, seeds were germinated on perlite over demineralized water for 2 days in the dark and then for 1 week under natural light in a greenhouse. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to a



20 L tank (18 seedlings per 20 L-plastic tank) containing the following nutrient solution: 1.25 mM KNO<sub>3</sub>, 1.25 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA 2NaFe, 10 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>, 3 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 μM CuSO<sub>4</sub>, 0.7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1 μM CoCl<sub>2</sub>, 0.04 μM NiCl<sub>2</sub>, 0.1 mM SiO<sub>2</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM KCl. The nutrient solution was buffered to pH 6.5 with 2 mM CaCO<sub>3</sub> and was renewed every 2 days. Plants were grown under greenhouse conditions, with a thermoperiod of 20/17°C day/night and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (Philips, MASTER Green Power T400W, Amsterdam, Netherlands) supplying an average photosynthetically active radiation (PAR) of 350 μmol photons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> at canopy height.

After 20 days of growth, plants were separated into fourteen sets: plants were grown with the complete nutrient solution previously described (control plants) or with nutrient solutions (Supplemental Data SD1) deprived of N, K, P, S, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, B, or Ni. The composition of these nutrient solutions was chosen in order to maintain the same concentration of each nutrient. For example, in the P-starvation treatment, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was omitted and the K concentration was maintained at 1.75 mM by the addition of KOH.

Four independent samples each consisting of three individual plants were harvested at the beginning of nutrient-depletion ( $t_0$ ) and after growth cessation ( $t_f$ ). Growth cessation for each deprivation treatment was detected by non-destructive estimation of plant weight obtained by daily measurements of total plant fresh weight of control and deficient plants. Leaves and petioles present at the beginning of nutrient-depletion (referred as “mature leaves” and “mature petioles,” respectively) were distinguished from leaves appearing during depletion (referred as “young leaves” and “young petioles,” respectively). Correction fluid was used to mark mature leaves and petioles at  $t_0$  in order to distinguish them from their younger counterparts during later harvests. At each date of harvest ( $t_0$  and  $t_f$ ), whole roots from control and depleted plants were collected. An aliquot of each tissue was weighed and dried in an oven (60°C) for dry weight (DW) determination and kept for further analysis. Every 5 days throughout the experiment non-destructive determination of chlorophyll content in young and in mature leaves was performed using a SPAD chlorophyll meter (SPAD-502 model, Minolta, Tokyo, Japan). The determination was carried using three replicates of 10 measurements performed on independent leaves.

### Element Analysis by Mass Spectrometry

Plant dry samples were ground to a fine powder with inox beads in an oscillating grinder (Mixer Mill MM400; Retsch, Haan, Germany) for further IRMS, ICP-OES and ICP-MS HR analysis. For the analysis of total N and S contents, an aliquot of around 4 mg DW of each plant organ sample was placed in tin capsules for total N and S analysis in order to analyze between 60 and 80 μg N. The total N amount and S amount in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Nu Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The total N or

S amount ( $N_{tot}$  or  $S_{tot}$ ) in a tissue “ $i$ ” at a given time “ $t$ ” was calculated as:

$$N_{tot} \text{ (or } S_{tot}) = \frac{\% N_{i,t} \text{ (or } S_{i,t}) \times DW_{i,t}}{100} \quad (1)$$

K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mo, Mn and B in greenhouse grown samples and in four species (*Q. robur* L., *A. glutinosa* (L.) Gaertn, *P. nigra* L., *Z. mays* L.) were analyzed by Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry (ICP-OES, Thermo Scientific iCAP 6500) with prior microwave acid sample digestion in an Ethos One microwave (Milestone srl, Milano, Italia) (8 mL of concentrated HNO<sub>3</sub> and 2 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 0.5 g DW). For the quantification by ICP-OES, all the samples were spiked with an internal-standard solution of yttrium to 10 ppm, diluted to 50 ml with Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0% (v/v) of nitric acid.

Other nutrients (P and Ni) in greenhouse grown samples and all nutrients in four species (*T. aestivum* L., *H. vulgare* L., *B. napus*, and *P. sativum* L.) were quantified by Inductively High Resolution Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2<sup>TM</sup>) with prior microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) (800 μL of concentrated HNO<sub>3</sub>, 200 μL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1 mL of Milli-Q water for 40 mg DW). For the determination by HR ICP-MS, all the samples were spiked with two internal-standard solutions, gallium and rhodium, respectively, for a final concentration of 10 and 2 μg.L<sup>-1</sup>, diluted to 50 ml with Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0% (v/v) of nitric acid, then filtered at 40 μm using a teflon filtration system (Filtermate, Courtage Analyses Services, Mont-Saint-Aignan, France). Quantification of each element was performed using external standard calibration curves. The amount of element in each tissue was then calculated as previously explained for N and S.

### Calculations and Statistical Analysis

Data obtained under field conditions relied on three independent biological replicates each corresponding to at least three individual plants while data obtained for plants grown in the greenhouse relied on four independent biological replicates, each corresponding to a pool of four plants. Data are given in the text as the mean ± S.E. For greenhouse experiments, data were checked for normality (Shapiro test) and accordingly, were compared using the parametric test of Student. If the normality condition was not reached, the non-parametric Wilcoxon's test was used. Significance of difference are explained in the legend of each figure (\* $P$ -values < 0.05; \*\* $P$ -values < 0.01; \*\*\* $P$ -values < 0.001. All tests were performed using R software (<http://www.r-project.org>).

The daily apparent nutrient remobilization (ANR) of nutrient from leaves harvested from field conditions was calculated as the slope ( $-a$  which corresponds to nutrient decrease in μg.leaf<sup>-1</sup>.day<sup>-1</sup>) of the linear regression between one nutrient  $i$  amount per leaf as a function of time using the following formula:

$$AN_i(t) = AN_{i(\max)} - a \times \text{time}_{(\text{days})} \quad (2)$$

where  $AN_{i(\max)}$  is the maximum amount of nutrient  $i$  during leaf life span and  $AN_i(t)$  is the amount of nutrient  $i$  at time  $t$ .



Data points ( $n = 12$  at least for *Z. mays* and up to  $n = 42$  for *A. glutinosa*) used for such linear correlation were those located between the harvest showing the highest amount of nutrient  $i$  in leaf [ $AN_{i(\max)}$ ], up to the harvest preceding leaf fall. The significance of remobilization of a nutrient  $i$  was evaluated by an ANOVA test of the correlation coefficient of the linear regression. The confidence interval for the slope ( $-a$ ) was then calculated using a Student test. The total apparent remobilization of nutrient  $i$  in leaf was then calculated as:

$$ANR (\%) = \frac{-a \times D}{AN_{i(\max)}} \quad (3)$$

where  $D$  is the duration i.e., the number of days during which the nutrient  $i$  amount decreased.

For plants grown with nutrient deprivation under hydroponic conditions, the calculation of ANR (%) was done using the following formula:

$$ANR (\%) = \frac{AN_{i(t_0)} - AN_{i(t_f)}}{AN_{i(t_0)}} \times 100 \quad (4)$$

where  $AN_{i(t_0)}$  and  $AN_{i(t_f)}$  are the amount of nutrient  $i$  in one tissue before the nutrient deficiency and after the growth cessation, respectively.

Calculations were performed for roots, mature leaves and mature petioles. Moreover, if the total nutrient per plant between  $t_0$  and  $t_f$  was not significantly different, it can be assumed that no nutrient  $i$  uptake occurred. In such cases the net flow of nutrient  $i$  was then calculated for each tissue and revealed a remobilization from (decreased content: source behavior) or to (increased content: sink behavior) a given tissue. Alternatively, if an increase in the nutrient  $i$  content per plant was significant during its deprivation, it follows that traces of nutrient  $i$  in the nutrient solution were taken up. In such cases, a minimum (underestimated as some uptake having occurred in the meantime) apparent nutrient remobilization was calculated if a significant decrease in the amount of nutrient  $i$ , occurred between times  $t_0$  and  $t_f$  in a given tissue.

## Results

### Changes in Leaf Dry Weight and Chlorophyll Content in Plants Grown under Field Conditions

**Figure 1** shows an example of changes in leaf dry weight (DW) (**Figures 1A,B**) and chlorophyll contents (**Figures 1C,D**) as a function of leaf life span, for *Q. robur* and *Z. mays* (for other species see Supplemental Data SD3–10, A and B). The maximum leaf DW was measured 65 and 36 days after leaf emergence, respectively, which correspond to 30 and 38% of the leaf total life span. Leaf life span was shorter for annual species (100, 95, 86, 94, and 67 days, respectively for *B. napus*, *Z. mays*, *H. vulgare*, *T. aestivum*, and *P. sativum*) than for tree species (218, 185, and 244 days, respectively for *Q. robur*, *P. nigra*, and *A. glutinosa*). The cessation of leaf growth occurred after 16 and 63% of the leaf life span for *P. sativum* and *A. glutinosa*, respectively, and occurred at around 30–40% of the leaf life span for all other species. Leaf

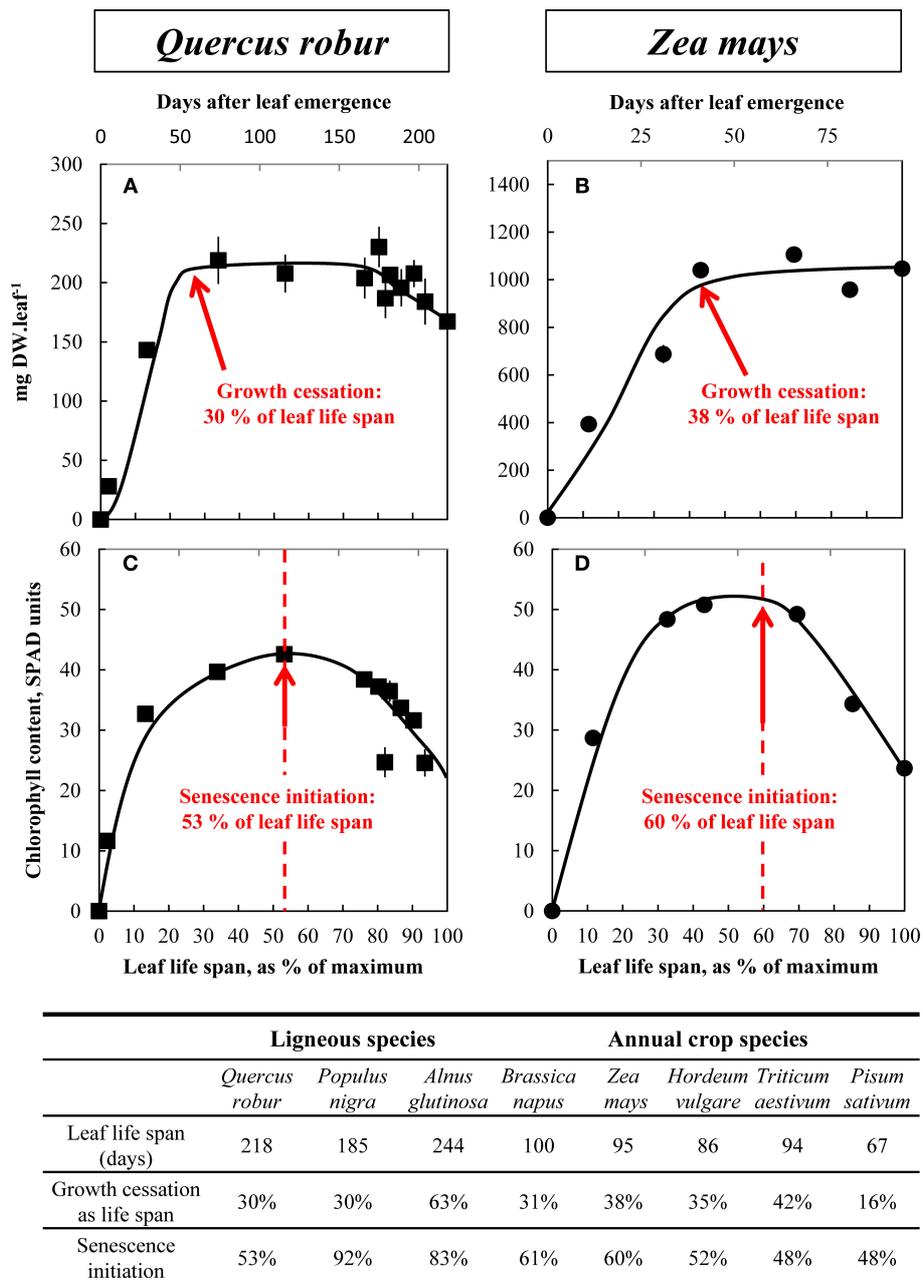
DW remained almost the same and was correlated with leaf area (data not shown), except for *T. aestivum*, *H. vulgare*, and *B. napus* for which a significant decrease in leaf DW was recorded during the last 5 weeks in *T. aestivum* and *H. vulgare* and the last 20 days in *B. napus* (by  $33.6 \pm 0.86$ ,  $59.6 \pm 0.31$ , and  $27.4 \pm 5.51\%$ , respectively, see Supplemental Data SD8, 9, and 10A). To estimate leaf aging, i.e., senescence initiation, chlorophyll accumulation, and its subsequent decrease were estimated. In all species, relative chlorophyll content increased during early growth until it reached a plateau (**Figures 1C,D**) after 53 and 60% of leaf life span for *Q. robur*, and *Z. mays*, respectively. Then, a significant drop in chlorophyll content ( $-42.0 \pm 2.98\%$  in *Q. robur* and  $-53.4 \pm 0.27\%$  in *Z. mays*) occurred in leaves revealing senescence initiation. For most species, senescence seemed to start between 48 and 61% of the leaf life span, except in two tree species: *A. glutinosa* (83%) and *P. nigra* (92%). Late senescence of *P. nigra* and *A. glutinosa* was concomitant with the occurrence of the first atmospheric freezing temperature (end of September and end of October, respectively).

### Changes in Nutrient Contents during Leaf Life Span in Plants Grown under Field Conditions and Estimated Net Remobilization

As typical examples, **Figure 2** presents selected mineral nutrients that follow contrasting but typical behaviors such as N and K (**Figures 2A,B**), S and P (**Figures 2C,D**), and Ca and Mn (**Figures 2E,F**) in *Q. robur* and *Z. mays*. Other nutrients and other species are also provided as Supplemental Data (SD3–10). All nutrients with the exception of Ca and Mn were accumulated up to maximum DW accumulation or slightly latter. At that point their nutrient contents per leaf reached a plateau (except for Mn and Ca in *Z. mays*, **Figure 2F** and Ca in *Q. robur*, **Figure 2E**) and, according to species, decreased. From maximum to minimum content, nitrogen net remobilization can be estimated at  $54.3\% \pm 9.50$  in *Q. robur* and at  $38.7\% \pm 6.80$  in *Z. mays*. Potassium was remobilized by  $47.3\% \pm 8.87$  in *Q. robur* and by  $72.0\% \pm 6.01$  in *Z. mays*. For both species, nutrient remobilization rates coincided with senescence (**Figures 1C,D**) and remobilization was initiated half way through the leaf life span: at 53% and between 50 and 60% of the leaf life span in *Q. robur* and *Z. mays*, respectively. However, discrepancies occurred for given nutrients and according to plant species; for example a net remobilization of S and P was measured in *Q. robur* (by  $39.5\% \pm 8.40$  and  $24.4\% \pm 7.81$ , respectively), both macronutrients that were apparently not remobilized in *Z. mays* (**Figure 2D**). Other nutrients such as Ca and Mn were not subjected to an apparent remobilization (**Figures 2E,F**), being constantly accumulated even during senescence (Ca in *Q. robur*, Ca and Mn in *Z. mays*).

Based on similar data collected for the eight plant species (provided as Supplemental Data SD3–10), the apparent nutrient remobilization (ANR) was calculated for all nutrients and all species and is given in **Figure 3**. Interpretation of these results can be made at two levels, species and nutrients. N was always remobilized, whatever the plant species, with a minimum rate of remobilization of  $-38.7\%$ . Nitrogen remobilization coincided with senescence as illustrated by chlorophyll content





**FIGURE 1 |** Changes in whole leaf-blade biomass (A,B) and chlorophyll content (C,D) during the leaf life span (days after leaf emergence) of *Q. robur* (A,C) and *Z. mays* (B,D). Dashed lines in (C) and (D) indicate the beginning of chlorophyll degradation and hence senescence initiation. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. for  $n = 3$

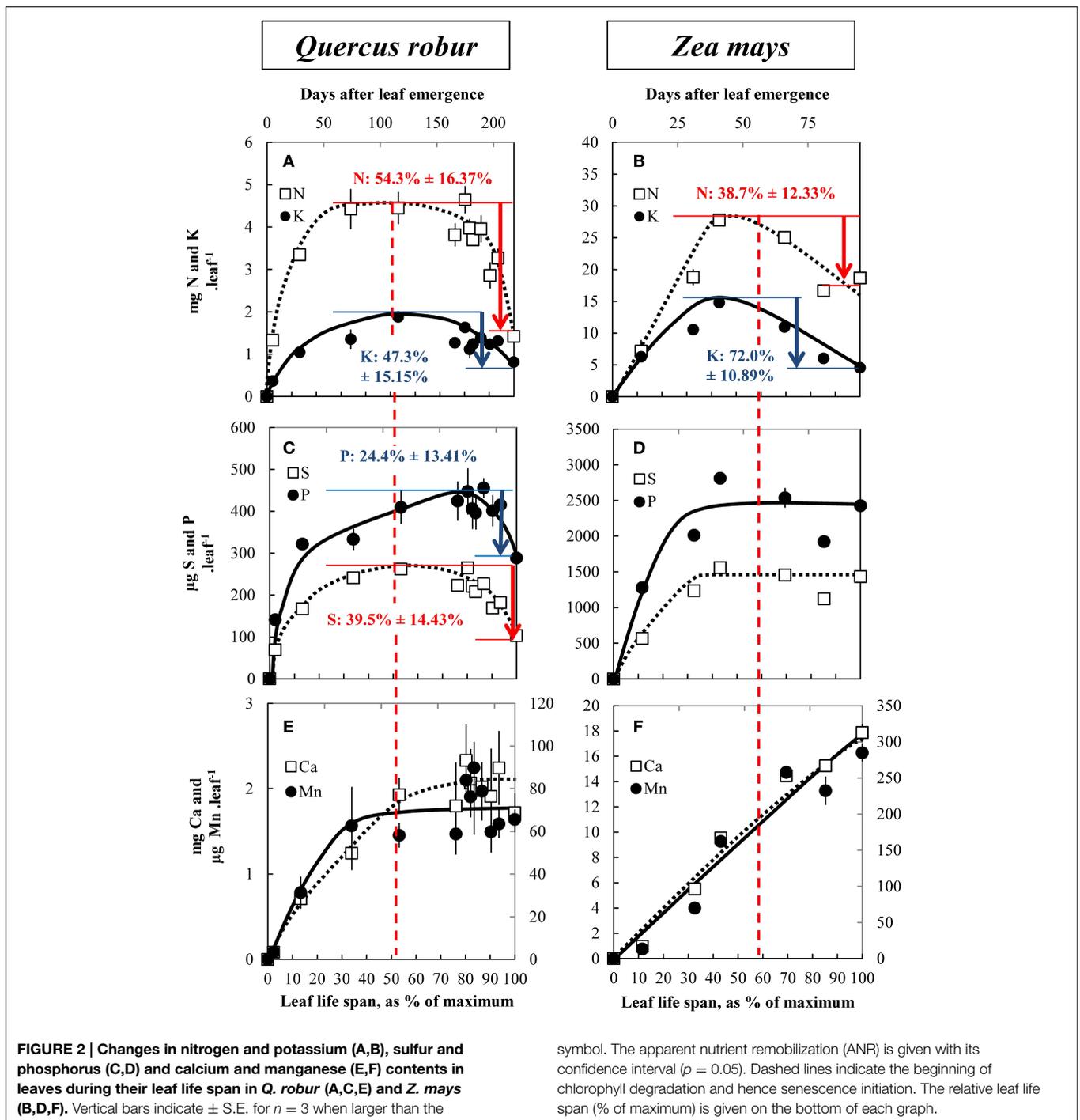
when larger than the symbol. Total leaf life span (days), growth cessation (as % of total leaf life span) and senescence initiation (as % of total leaf life span) are then provided for the eight ligneous and annual crop species. The relative leaf life span (% of maximum) is given on the bottom of each graph.

(Supplementary Data SD3–10B). The N remobilization efficiency varied with species. N was remobilized by about  $-90\%$  in *T. aestivum* and *H. vulgare*, by about  $-72\%$  in *P. sativum*, by  $-50\%$  in *Q. robur*, and only by  $-40\%$  in *Z. mays*, in *P. nigra* and *A. glutinosa*. Remobilization rates of K, S, P, and Mg were highly variable depending on the plant species. Neither P nor S were remobilized in *Z. mays* and *P. nigra*, and this was also the case

for K in the latter species. Mg was remobilized only in *Q. robur*, *B. napus*, *H. vulgare*, and *T. aestivum*. Ca was not remobilized in any of the studied species except for two of the cereals: *H. vulgare* and *T. aestivum*.

Micronutrients were remobilized with various degrees of efficiency. The rate of remobilization varied widely according to species. For example, Fe was remobilized solely in *B. napus*. In



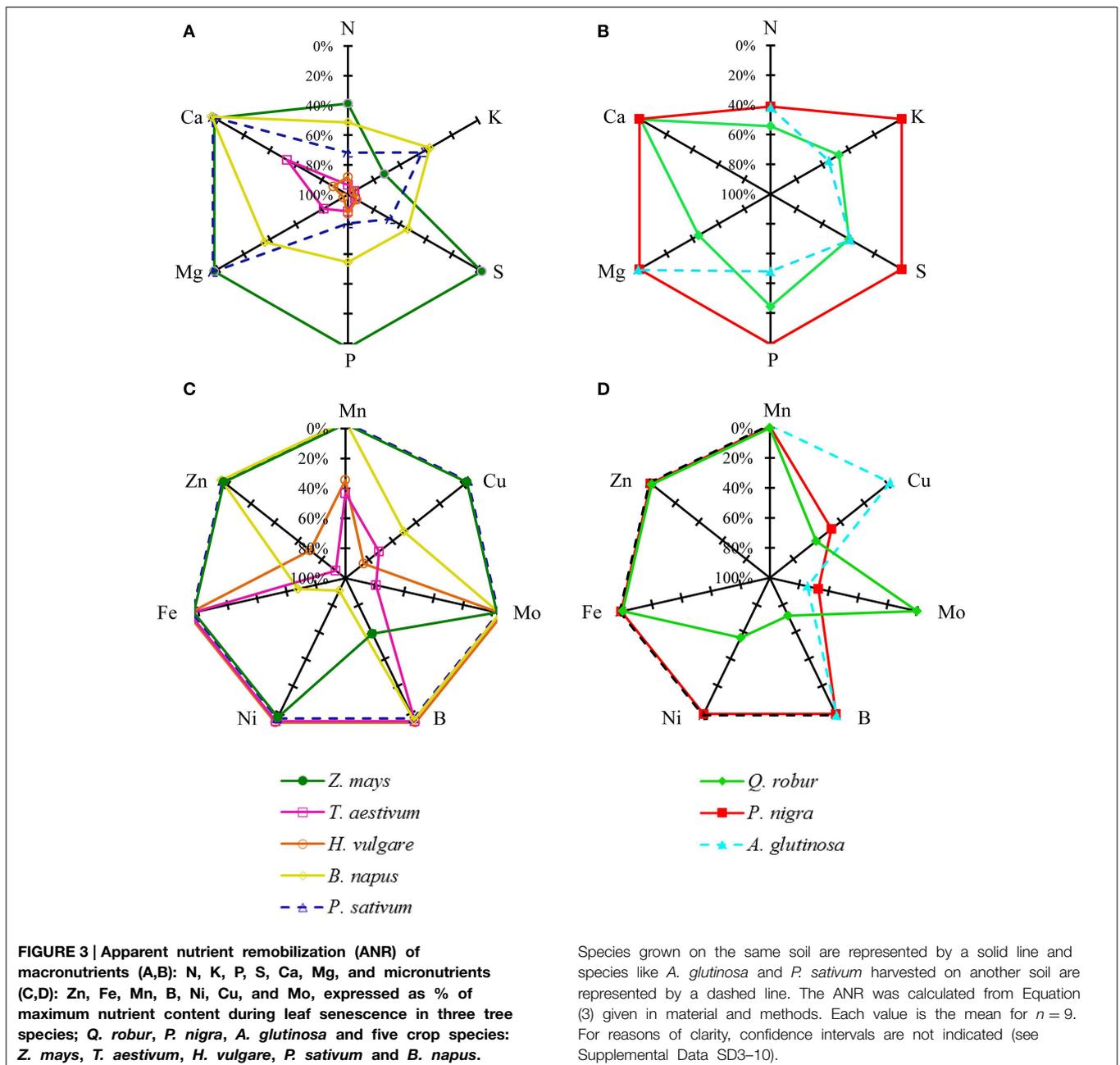


contrast, Cu was widely remobilized in *T. aestivum*, *H. vulgare*, *B. napus*, *P. nigra*, and *Q. robur*.

Taking these results together, macronutrient apparent remobilization efficiency (Figure 3A) could be evaluated for each species. Firstly, considering crop species grown on the same soil, a first group including *T. aestivum* and *H. vulgare* remobilized all macronutrients very efficiently at a rate close to  $-80\%$ . A second group of plant species with an intermediate apparent

remobilization efficiency for macronutrients is characterized by *B. napus* while *Z. mays* corresponds to the third group characterized by a low macronutrient net remobilization efficiency. Grown under different conditions, others species match with the second group (*P. sativum*, *Q. robur* and *A. glutinosa*) or the third group (*P. nigra*). The same species typology was found for remobilization of micronutrients such as Mn and Zn (Figure 3B). Remobilization of Fe, B,





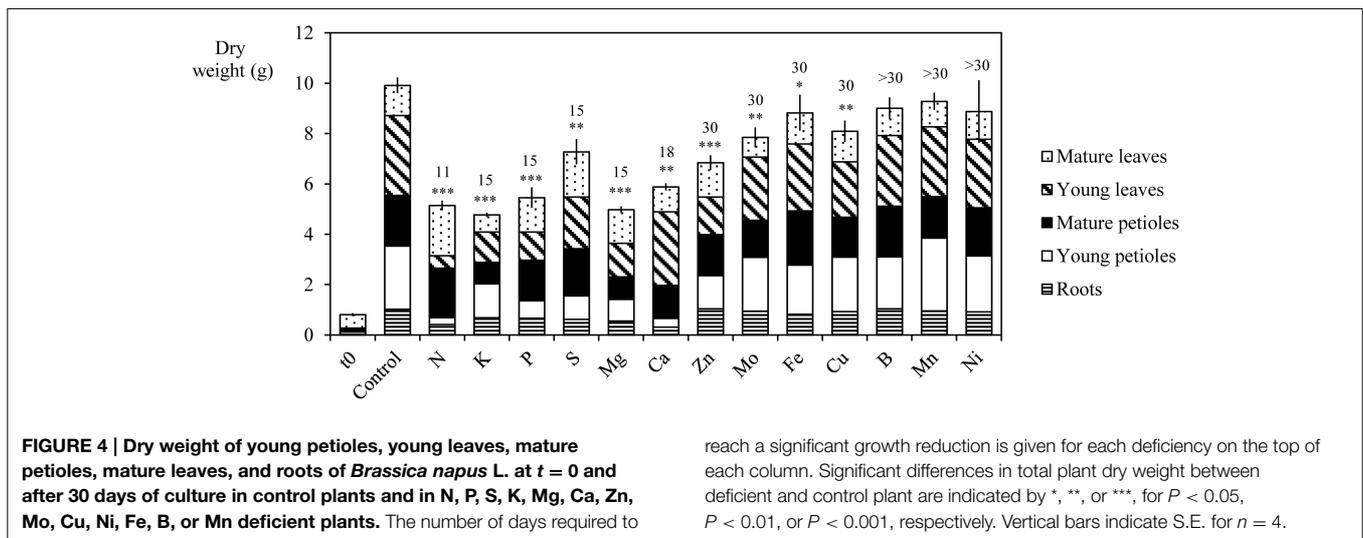
Ni, Cu, Mo, and Mn remained more variable between plant species.

### Alteration of *B. napus* Growth during Mineral Deprivation or Deficiency

Figure 4 synthesizes the influence of nutrient deprivation or deficiency on the growth of *B. napus* L. whole plants. During the experiment, whole plant biomass progressively increased for all treatments despite nutrient deficiency. After 30 days of culture, the whole plant DW of control plants increased from  $0.8 \pm 0.06$  to  $9.9 \pm 0.31$  g. Biomass production was not significantly different between Ni, B, and Mn deficient and control plants despite a significant reduction of chlorophyll content under B and Mn

deficiency (unshown data). The largest reductions involved N-, K-, Mg-, and P-deprived plants whose total DWs were decreased by  $48.0 \pm 1.24$ ,  $51.8 \pm 0.81$ ,  $49.7 \pm 0.98$ , and  $44.9 \pm 2.28\%$ , respectively, relative to control plants. Growth cessation was observed after 11 days for plants with N deficiency treatment and 15 days for K, Mg, P, and S-deprivation. This was mostly the result of a significant reduction in the growth of roots and mature and young petioles, while the DW production by mature leaves was not significantly reduced. Other nutrient deficiencies such as -S, -Ca, -Zn, -Mo, -Cu, and -Fe treatments also induced a significant reduction in total plant DW. These were greater for Ca, Zn, and S deficiencies (by  $42.6 \pm 1.57$ , by  $30.8 \pm 1.79$ , and by  $26.5 \pm 2.82\%$ , respectively) than for Cu, Mo, and Fe





deficiencies (by  $18.3 \pm 2.53$ , by  $20.7 \pm 2.37$ , and by  $10.8 \pm 3.97\%$ , respectively).

### Apparent Nutrient Remobilization in *B. napus* during Mineral Deprivation or Deficiency

Figure 5 provides four examples (S, Ca, Cu, and Zn) of nutrient uptake, apparent remobilization and further allocation within the plant in control and nutrient deprived plants. The simplest case was found for S (Figure 5A), for which no change in plant S content occurred during deficiency. Plant S content was not significantly different at the beginning and at the end of S-deficiency, being  $12.4 \pm 0.86$  and  $13.9 \pm 0.84$  mg S.plant<sup>-1</sup>, respectively, revealing a lack of significant S uptake from potential trace amounts in the nutrient solution. In the meantime, S uptake by control plants was  $138.1 \pm 5.15$  mg S.plant<sup>-1</sup>. However, sulfur distribution within plant tissues was strongly modified during S deficiency, increasing in roots ( $+2.1 \pm 0.33$  mg S), young leaves ( $+3.7 \pm 0.20$  mg S), and petioles ( $+1.1 \pm 0.17$  mg S) at the expense of mature leaves whose S content decreased by  $-4.6 \pm 0.24$  mg S (from  $8.4 \pm 0.42$  to  $3.7 \pm 0.33$  mg S.plant<sup>-1</sup>). In this case, the net remobilization of S can be calculated as  $-55.2 \pm 2.10\%$ .

The same calculations can be done for Ca (Figure 5B) and the conclusions were similar for Mn. During Ca-deprivation, no significant Ca uptake occurred but Ca distribution was also widely affected by deficiency. Root Ca content dropped during deficiency by  $-169.5 \pm 10.58$  mg Ca (from  $173.8 \pm 23.67$  to  $4.3 \pm 0.28$  mg Ca) indicating a massive net remobilization of  $-97.4 \pm 0.16\%$  of root Ca to all shoot tissues.

The third type of response concerns Cu. During Cu-deficiency, Cu content per plant rose from  $29.0 \pm 4.0$  to  $74.8 \pm 3$   $\mu$ g (Figure 5C) while control plants accumulated  $251.5 \pm 6.12$   $\mu$ g of Cu in the same period. The slight increase in total Cu in Cu-depleted plants was the result of Cu traces found in the mineralized water used for the nutrient solution ( $0.47 \pm 0.00$   $\mu$ M), revealing a situation of deficiency rather than deprivation. However, Cu content in mature leaves of

reach a significant growth reduction is given for each deficiency on the top of each column. Significant differences in total plant dry weight between deficient and control plant are indicated by \*, \*\*, or \*\*\*, for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , or  $P < 0.001$ , respectively. Vertical bars indicate S.E. for  $n = 4$ .

Cu-depleted plants was reduced from  $12.2 \pm 1.09$  to  $4.7 \pm 0.99$   $\mu$ g Cu indicating a remobilization of  $-61.4 \pm 4.2\%$  of the Cu initially present in these leaves, which is probably minimized under a depletion situation compared to a deficiency condition.

The fourth type of response involved Zn, Fe, B, and Ni. The limitation of Zn availability (Figure 5D) greatly reduced total Zn uptake by  $-83.0 \pm 0.40\%$  but did not change the Zn partitioning within different plant tissues (Figure 5D). In all organs, the Zn amount increased during Zn-deficiency except in mature leaves where no significant change was observed. There was no apparent remobilization of Zn. Similar to Zn, there was no apparent remobilization of Fe, B, and Ni, but traces of these micronutrients were also found in the nutrient solution.

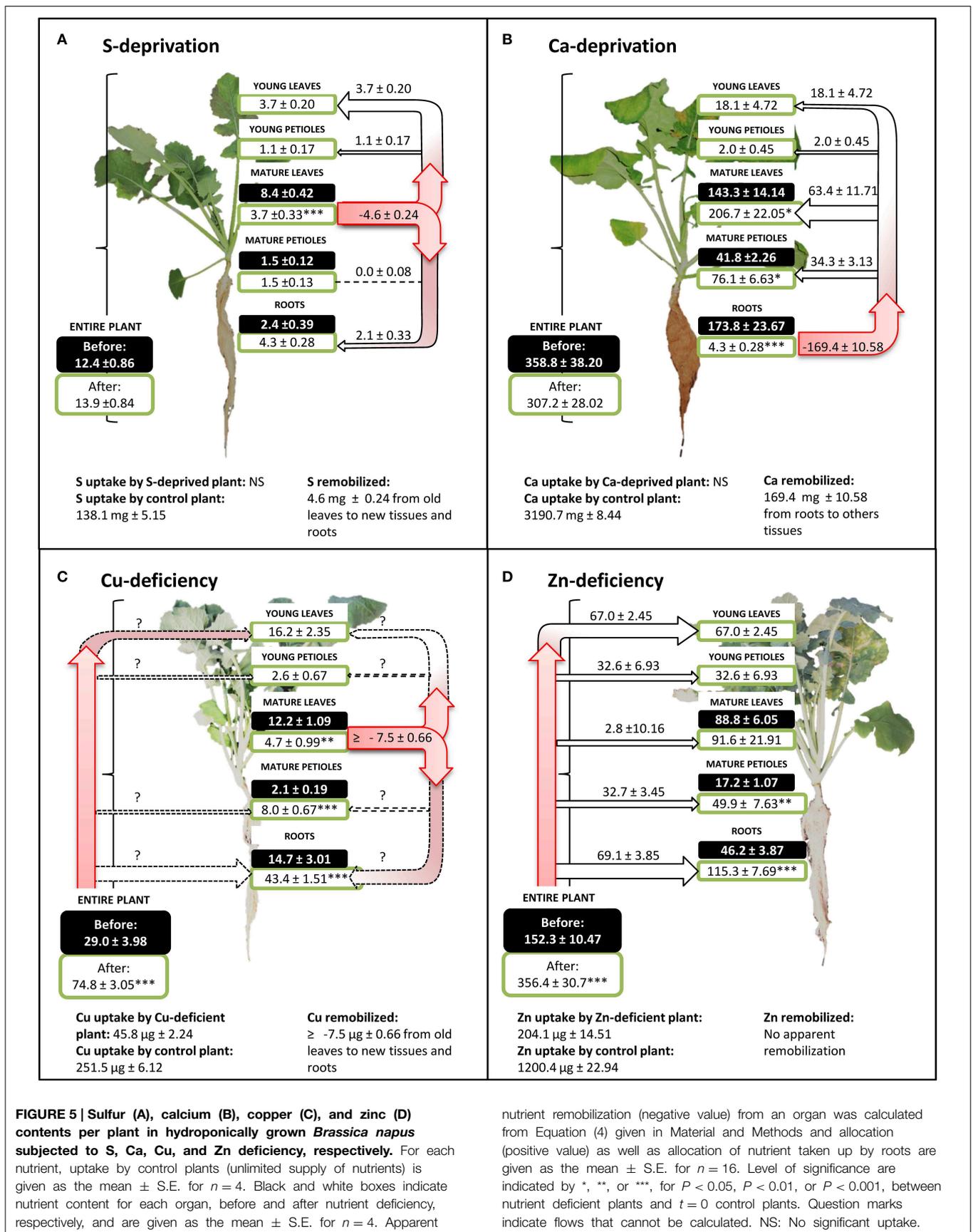
Figure 6 indicates the range of net nutrient remobilizations from leaves under deficiency or deprivation in controlled hydroponic conditions. *B. napus* remobilized N, P, K S, Mg, and Cu from leaves under deficiencies. Even if the nutritional conditions and the developmental stage of *B. napus* under field conditions were different (Figure 3), it must be pointed out that N, P, K, S, Mg, and Cu were also remobilized from leaves.

## Discussion

### General Patterns of Nutrient Accumulation and Remobilization during Leaf Development

The first results of this study synthesized in the Figure 3 show that mineral nutrients have different patterns of leaf accumulation and remobilization, and moreover that remobilization efficiencies are affected by plant species. During the leaf life span, nutrients were accumulated up to a maximum level corresponding to the period of maximum leaf DW or slightly latter. After this point the content per leaf reached a plateau and, according to species, decreased or continued to accumulate. Amongst the nutrients, three typical patterns of remobilization during leaf senescence can be described (Figure 2).

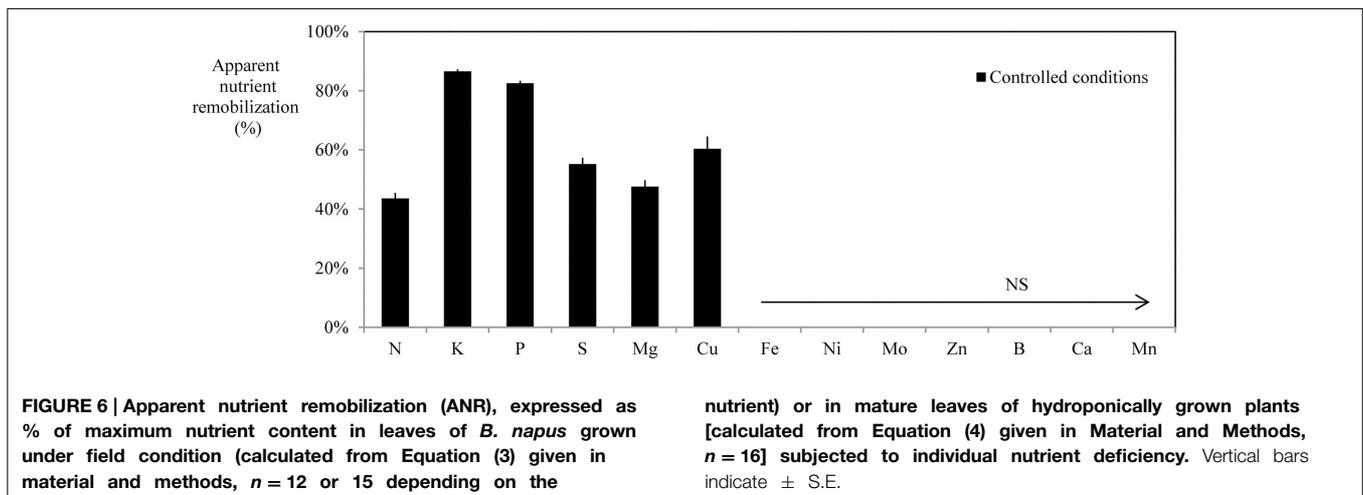




**FIGURE 5 | Sulfur (A), calcium (B), copper (C), and zinc (D) contents per plant in hydroponically grown *Brassica napus* subjected to S, Ca, Cu, and Zn deficiency, respectively.** For each nutrient, uptake by control plants (unlimited supply of nutrients) is given as the mean ± S.E. for  $n=4$ . Black and white boxes indicate nutrient content for each organ, before and after nutrient deficiency, respectively, and are given as the mean ± S.E. for  $n=4$ . Apparent

nutrient remobilization (negative value) from an organ was calculated from Equation (4) given in Material and Methods and allocation (positive value) as well as allocation of nutrient taken up by roots are given as the mean ± S.E. for  $n=16$ . Level of significance are indicated by \*, \*\*, or \*\*\*, for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , or  $P < 0.001$ , between nutrient deficient plants and  $t=0$  control plants. Question marks indicate flows that cannot be calculated. NS: No significant uptake.





The first pattern is characterized by a remobilization that occurred at the start of leaf senescence, as revealed by chlorophyll degradation (Figures 1C,D) whatever the plant species. This is the case for N (Figures 2A,B) whose main storage forms are mainly organic, such as proteins and amino acids. However, the efficiency of leaf N remobilization was highly variable as previously reported in the literature for species such as *B. napus* according to leaf ranks (Malagoli et al., 2005) or to N availability (Desclos et al., 2009) or *A. thaliana* (Himmelblau and Amasino, 2001).

The second pattern of nutrient accumulation and remobilization encompasses phloem-immobile nutrients represented by Ca, and Mn (Figures 2E,F). Ca per leaf reached a plateau in *Q. robur*, *P. sativum*, and *B. napus* but was constantly accumulated throughout the leaf lifetime in *P. nigra*, *A. glutinosa*, and *Z. mays* (see Supplemental Data SD3–10, G) despite cessation of leaf DW accumulation. This latter pattern is consistent with the general assumption that Ca shows a low phloem mobility (Biddulph et al., 1959; White, 2012). Surprisingly, despite this, Ca appeared to be remobilized from senescing leaves of *H. vulgare* and *T. aestivum* (Figure 3A). This follows findings that, under specific induction conditions, leaf Ca remobilization may occur, as reported for few plant species such as *Glycine max* (Mauk and Noodén, 1992), *Phaseolus vulgaris* (Biddulph et al., 1959) after diethyl ether, NaCl or triiodobenzoic acid applies and *Lycopersicon esculentum* being locally scorched (Malone et al., 2002). Such disturbances induced Ca movement in the xylem by a rapid release of water during the dehydration of the plants (Dayod et al., 2010). Alternatively, a second hypothesis to propose is that these two species have a more effective senescence with a more rapid dehydration characterized by a decrease in biomass and a complete loss of chlorophyll (Supplemental Data SD3–10B). A similar pattern of remobilization was recorded for Mn that was not subjected to an apparent remobilization in all studied plant species except again in *T. aestivum* and in *H. vulgare*. Indeed, like Ca, Mn can be leached out of leaves by water (Nable and Loneragan, 1984). Finally, supplementary results found with *B. napus* grown

with Ca or Mn deficiency (Figure 5B for Ca, supplemental data SD8 for Mn) also showed an alternative recycling for these two nutrients, with a massive remobilization (by  $-97.4\% \pm 4.63$  and  $-86.1\% \pm 0.62$  of root content, respectively) from roots to the shoots that was probably via xylem transport.

A third pattern of remobilization can be identified for K, P, S, and Mg and is characterized by highly variable efficiencies of remobilization. Remobilization rates of these four nutrients were different depending on the plant species (Figure 3A). Efficient removal of K and P has been observed from *A. thaliana* leaves (Himmelblau and Amasino, 2001; Waters and Grusak, 2008) and also from senescing leaves of deciduous trees (Hagen-Thorn et al., 2006). In contrast, Teija Ruuhola (2011) found that K concentrations increased significantly throughout the entire leaf live span in *Betula pendula* while Harvey and van den Driessche (1999) observed a differential remobilization of P and K from *P. nigra* leaves depending on drought status (Harvey and van den Driessche, 1999; Teija Ruuhola, 2011). It has been strongly suggested that remobilization of P is induced by P availability. S followed the same pattern as P and K and it was not remobilized in either *P. nigra* or *Z. mays* grown under field conditions. Indeed, S-remobilization has been described as a senescence-independent process, being mostly induced by S deficiency (Abdallah et al., 2011). The majority of investigations concerning Mg remobilization suggest that its remobilization is rather moderate. In our study, Mg was remobilized only in *B. napus*, *H. vulgare*, and *T. aestivum*. It has been found previously that remobilization of Mg in leaves occurred in *T. aestivum* (Hocking, 1994) and *Fraxinus excelsior* (Hagen-Thorn et al., 2006) but not in *Q. robur*, *Tilia cordata*, *Betula pendula* (Hagen-Thorn et al., 2006), *Pisum* sp (White, 2012), or *A. thaliana* leaves (Himmelblau and Amasino, 2001). The storage of these four nutrients differed greatly from N, as they are mainly stored in vacuoles under inorganic forms ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and PP, Pi). This would provide additional argument to suggest that their remobilization could be independent from senescence, being more likely induced by deficiency.



Some micronutrients such as B, Ni, Mo, Fe, Cu, and Zn can also be included in this third class. These nutrients were remobilized with various degree of efficiency depending on plant species. According to the literature, the efficiency of remobilization of these six nutrients differs greatly between species but could also be affected by environment, although with contradictory findings at times. For example, B-remobilization is recognized as species-dependent; this nutrient is transported into the phloem vessels in a complexed form with some diols or polyols (Blevins and Lukaszewski, 1998). B is remobilized in sorbitol-rich species transporting C as polyols such as *Prunus amygdalus*, *P. dulcis*, *P. persica*, *Malus domestica* but is immobile in sorbitol-poor species including *Ficus carica*, *Pistacia vera*, and *Juglans regia* (Brown and Hu, 1996). Our findings show that B was remobilized only in *Q. robur* ( $-71.9\% \pm 17.38$ ) and *Z. mays* ( $-58.8\% \pm 11.51$ ), although we did not find any information in the literature that these species are sorbitol-rich. In our study, apparent Ni remobilization was observed only in *Q. robur* and *B. napus*. Ni mobility is also recognized as species-dependent. Indeed, this nutrient appeared to be mobilized from senescing *Glycine max* leaves (Cataldo et al., 1978) but not from senescing *A. thaliana* leaves (Himelblau and Amasino, 2001). Neumann and Chamel (1986) also reported that phloem mobility of  $^{63}\text{Ni}$  was more important in *P. sativum* than in *Pelargonium zonale* L., although this mobility remained low (Neumann and Chamel, 1986). Declines in the level of leaf Mo were observed in *A. glutinosa*, *P. nigra*, and *T. aestivum* (Figure 3B) but did not appear to be mobilized from *P. sativum*, *H. vulgare*, *B. napus*, and *Z. mays* leaves. Mo was described as a highly phloem-mobile nutrient with foliar application of Mo being the usual procedure for alleviating deficiency. However, some inefficiency in the remobilization of Mo through the phloem may be suggested (White, 2012). Symptoms of Fe, Cu, and Zn also appeared in young leaves, although the phloem translocation of these nutrients is possible (White, 2012). Our findings show that Zn was remobilized only in *H. vulgare* and in *T. aestivum* as previously observed (Hocking, 1994; Hegelund et al., 2012; Kutman et al., 2012), although in other studies no evidence of Zn remobilization has been reported in *T. aestivum* (Garnett and Graham, 2005) or *P. sativum* (Sankaran and Grusak, 2014). In our study, Cu was remobilized in *H. vulgare*, *Q. robur*, *B. napus*, *T. aestivum*, and *P. nigra* while Fe was only remobilized in *B. napus*. Some reports in the literature have shown Fe and Cu remobilization during leaf senescence in *Q. robur* (Abadia et al., 1996), in *Pinus sylvestris* (Nieminen and Helmisaari, 1996), in *A. thaliana* (Himelblau and Amasino, 2001; Waters and Grusak, 2008), in *G. max* (Mauk and Noodén, 1992), and in *T. aestivum* (Hocking, 1994; Guttieri et al., 2013). In contrast, Shi et al. (2011) did not find any decrease in leaf Fe and Cu content during autumn before leaf fall in nine deciduous and evergreen species. These authors have put forward several hypotheses to explain these results such as the lack of sink activity, release of bound metal as protein constituents, the short distance of transport and phloem loading, and the presence of low molecular weight N compounds to bind metals. All species studied in the current work went through their reproductive phase with fairly strong sinks except *P. nigra* and *A. glutinosa*. Another

plausible explanation for the discrepancy in metal translocation was also proposed by Shi et al. (2011) as they suggest that remobilization observed by some authors might be related to a metal-deficiency (due for example to drought conditions or calcareous soil). Another reason for restricted micronutrient remobilization in plant collected under field condition could be due to a contamination from atmospheric contaminants. In summary, the remobilization of nutrients from this third class seems to be strongly affected by nutrient deficiency and species-specific differences. The absence of significant apparent remobilization might be due to (i) a lack of sink activity (*P. nigra* and *A. glutinosa*), (ii) a lack of mobility of the nutrients, (iii) insufficient storage of the nutrients in senescing organs, and finally (iv) an uptake from the soil solution that prevails over remobilization under sufficient root supply.

### Species Dependence of Nutrient Remobilization Efficiency

Differences among species in their ability to remobilize macro and micronutrients from leaves were highlighted in this study, but species comparison can be made only when plant were grown under very similar soil, topographic and climatic conditions, which was the case for *H. vulgare*, *T. aestivum*, and *Z. mays*. The two first species can be considered as the most efficient because they remobilized eight nutrients with high efficiency amongst the 13 essential nutrients monitored (Figure 3) while *Z. mays* only remobilized N, K, and B. A first hypothesis may rely on the effect of the characteristic source/sink ratio of each species that can be strongly influenced by breeding in particular. *T. aestivum* and *H. vulgare* have been selected mostly for yield improvement via increases in grain production per plant leading to a strong reduction in the source to sink ratio. As a consequence, it can be hypothesized that nutrient remobilization has been positively selected toward higher efficiencies. This can be further supported by the high macronutrient apparent remobilization efficiencies recorded in this study that reached nearly -80% for N, K, S, and Mg (Figure 3A) and nearly -40% or more for Mn and Cu (Figure 3B). Moreover, leaf dry weight of *T. aestivum* and *H. vulgare* tended to decrease during the leaf life span (Supplemental Data SD9A and 10A). Such a reduction in leaf DW has been previously reported and explained by the export of amino acids derived from the breakdown of proteins, and this may represent about 40% of the weight loss (as reviewed by Schnyder, 1993). Additionally, the hydrolysis of water soluble carbohydrates such as polyfructans may account for up to 60% of the drop in DW as reported in *T. aestivum* by Wardlaw and Willenbrink (2000). The effect of breeding on remobilization can also be supported by the fact that compared to old cultivars, the new high yielding varieties of winter wheat have been characterized by a larger loss of dry matter from vegetative organs and this effect has been associated with a more rapid and more complete remobilization of water-soluble carbohydrates from the vegetative parts (Mehrhoft and Kühbauch, 1990). *Z. mays* can be characterized by low apparent remobilization efficiency for macronutrients (Figure 3A) with B as the sole remobilized micronutrient. Yet *Z. mays* as well as *T. aestivum* and *H. vulgare* have also been selected for commercially viable traits but with different objectives, focusing on reduction



of the plant development cycle (cold tolerance and greater precocity) under conditions of high soil fertility in order to allow its culture in temperate areas. It may then be hypothesized that such breeding conditions did not increase the nutrient remobilization efficiency from leaves. However, it must be kept in mind that remobilization efficiencies estimated in this study, may not be representative of one species as it has been shown that mineral remobilization can be affected by intra-specific variation as previously shown for cucumber (Waters and Troupe, 2011).

*P. nigra* and *Q. robur*, which showed contrasting remobilization efficiencies (Figure 3), were harvested from the same site, which allows a relative comparison. *Q. robur* can be characterized by an intermediate net remobilization efficiency (between  $-40$  and  $-60\%$ ) for macronutrients with a remobilization of Ni, B, and Cu, while *P. nigra* can be characterized as species with low net remobilization efficiencies of macro and micronutrients (Figure 3). In the latter species, Pottier et al. (2015), found a moderate remobilization of Mg in leaves but without significant reduction in Zn, Mn, Fe, or Cu contents in leaves. While remobilization of macronutrients occurred simultaneously with initiation of senescence in the two species, the duration of leaf senescence differed among the species and this may also be linked to the fact that *Q. robur* produced a large amount of reproductive tissue. Such early senescence, which is probably a genetically governed property (Fracheboud et al., 2009), coupled with development of substantial reproductive sinks would therefore explain the high remobilization efficiency for nutrients found in this species compared to species without reproductive development and temperature induced senescence. A very late senescence occurred in *P. nigra*, probably as a result of the arrival of the first freezing atmospheric temperatures. It has been shown that mature leaves of *Populus tremula* senescing rapidly under oxidative stress induced by low temperatures retained a large proportion of their maximum nutrient content at full senescence, probably because phloem activity declined rapidly (Fracheboud et al., 2009).

Overall, the results from this study and the literature show that remobilization of mineral nutrients is a fairly general but complex mechanism. However, following 13 different nutrients suggests that rather different mechanisms will need to be considered: (i)

remobilization from organic storage forms (such as for N) tightly linked to senescence, (ii) mineral storage that requires more or less specific transporters (S, Mg, K, P), (iii) the effect of deficiency that increased remobilization compensating under reduced root uptake, and (iv) restricted transport (Zn and possibly Fe). Additionally, to our knowledge, Mn and Ca remobilization from roots, demonstrated in this work, has never been described previously, and will require further investigations. Additionally, using eight plant species also suggests that remobilization efficiency is probably affected by previous plant breeding, the plant development scheme (source sink ratio or environmentally induced senescence), and plant evolution with species-specific transport occurring in some cases (B for example).

## Author Contributions

AM, AO, SD, and JY conceived and designed the experiments. AM, SD, AO, and PL performed the field experiments. AM, VB, and MP performed the greenhouse experiments. AM, VB, MG, SD, and AO acquired and analyzed of data. AM, AO, and SD wrote the manuscript. VB, PL, MP, MG, JG, and JY revised the manuscript for important intellectual content.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis used in this study and also appreciate the technical help of Marie-Paule Bataillé, Frédérique Marie, Josette Bonnefoy, and Marion Randu. The authors thank Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript. This work conducted through the SERAPIS project was supported by the Regional Council of Lower Normandy (N°12P03057), the Regional Council of Brittany (N°12008011), the ERDF (European Regional Development Fund) (N°33525) and Timac Agro International.

## Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00317/abstract>

## References

- Abadia, A., Gil, E., Morales, F., Montañés, L., Montserrat, G., and Abadía, J. (1996). Marcescence and senescence in a submediterranean oak (*Quercus subpyrenaica* E.H. del Villar): photosynthetic characteristics and nutrient composition. *Plant Cell Environ.* 19, 685–694. doi: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00403.x
- Abdallah, M., Dubouset, L., Meuriot, F., Etienne, P., Avice, J.-C., and Ourry, A. (2010). Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.* 61, 2635–2646. doi: 10.1093/jxb/erq096
- Abdallah, M., Etienne, P., Ourry, A., and Meuriot, F. (2011). Do initial S reserves and mineral S availability alter leaf S-N mobilization and leaf senescence in oilseed rape? *Plant. Sci.* 180, 511–520. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.11.008
- Alloway, B. J. (2008). *Micronutrient Deficiencies in Global Crop Production*. Dordrecht: Springer Science & Business Media.
- Amtmann, A., and Armengaud, P. (2009). Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 275–283. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.014
- Avice, J.-C., and Etienne, P. (2014). Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Exp. Bot.* 65, 3813–3824. doi: 10.1093/jxb/eru177
- Batten, G., Wardlaw, I., and Aston, M. (1986). Growth and the distribution of phosphorus in wheat developed under various phosphorus and temperature regimes. *Aust. J. Agric. Res.* 37, 459–469. doi: 10.1071/AR9860459
- Biddulph, O., Cory, R., and Biddulph, S. (1959). Translocation of calcium in the bean plant. 123. *Plant Physiol.* 34, 512–519. doi: 10.1104/pp.34.5.512



- Blevins, D. G., and Lukaszewski, K. M. (1998). Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 481–500. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.481
- Brown, P. H., and Hu, H. (1996). Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Ann. Bot.* 77, 497–506. doi: 10.1006/anbo.1996.0060
- Cataldo, D. A., Garland, T. R., and Wildung, R. E. (1978). Nickel in plants: II. Distribution and chemical form in soybean plants. *Plant Physiol.* 62, 566–570. doi: 10.1104/pp.62.4.566
- Cherbuy, B., Joffre, R., Gillon, D., and Rambal, S. (2001). Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. *Tree Physiol.* 21, 9–17. doi: 10.1093/treephys/21.1.9
- Classens, H., Oosterbaan, A., Savill, P., and Rondeux, J. (2010). A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *Forestry* 83, 163–175. doi: 10.1093/forestry/cpp038
- Dakora, F. D., and Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245, 35–47. doi: 10.1023/A:1020809400075
- Dayod, M., Tyerman, S. D., Leigh, R. A., and Gilliam, M. (2010). Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. *Protoplasma* 247, 215–231. doi: 10.1007/s00709-010-0182-0
- Desclos, M., Etienne, P., Coquet, L., Jouenne, T., Bonnefoy, J., Segura, R., et al. (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. doi: 10.1002/pmic.200800984
- Diaz, C., Lemaitre, T., Christ, A., Azzopardi, M., Kato, Y., Sato, F., et al. (2008). Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiol.* 147, 1437–1449. doi: 10.1104/pp.108.119040
- Fan, M.-S., Zhao, F.-J., Fairweather-Tait, S. J., Poulton, P. R., Dunham, S. J., and McGrath, S. P. (2008). Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22, 315–324. doi: 10.1016/j.jtemb.2008.07.002
- Fischer, A. M. (2007). “Nutrient remobilization during leaf senescence,” in *Annual Plant Reviews, Vol. 26, Senescence Processes in Plants*, ed S. Gan (Oxford: Blackwell Publishing Ltd.), 87–107. doi: 10.1002/9780470988855.ch5
- Fracheboud, Y., Luquez, V., Björkén, L., Sjödin, A., Tuominen, H., and Jansson, S. (2009). The control of autumn senescence in European Aspen. *Plant Physiol.* 149, 1982–1991. doi: 10.1104/pp.108.133249
- Garnett, T. P., and Graham, R. D. (2005). Distribution and remobilization of iron and copper in wheat. *Ann. Bot.* 95, 817–826. doi: 10.1093/aob/mci085
- Giehl, R. F. H., Gruber, B. D., and von Wirén, N. (2014). It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *J. Exp. Bot.* 65, 769–778. doi: 10.1093/jxb/ert421
- Giehl, R. F. H., and von Wirén, N. (2014). Root nutrient foraging. *Plant Physiol.* 166, 509–517. doi: 10.1104/pp.114.245225
- Gojon, A., Nacry, P., and Davidian, J.-C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 328–338. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.015
- Gruber, B. D., Giehl, R. F. H., Friedel, S., and von Wirén, N. (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 163, 161–179. doi: 10.1104/pp.113.218453
- Gupta, U. C., Monteiro, F. A., and Werner, J. C. (2001). “Micronutrients in grassland production,” in *Int. Grassl. Congr.* (São Pedro: Proceedings), 149–156.
- Guttieri, M. J., Stein, R. J., and Waters, B. M. (2013). Nutrient partitioning and grain yield of TaNAM-RNAi wheat under abiotic stress. *Plant Soil* 371, 573–591. doi: 10.1007/s11104-013-1713-1
- Hagen-Thorn, A., Varnagirte, I., Nihlgård, B., and Armolaitis, K. (2006). Autumn nutrient resorption and losses in four deciduous forest tree species. *For. Ecol. Manag.* 228, 33–39. doi: 10.1016/j.foreco.2006.02.021
- Harvey, H. P., and van den Driessche, R. (1999). Poplar nutrient resorption in fall or drought: influence of nutrient status and clone. *Can. J. For. Res.* 29, 1916–1925. doi: 10.1139/x99-170
- Heglund, J. N., Pedas, P., Husted, S., Schiller, M., and Schjoerring, J. K. (2012). Zinc fluxes into developing barley grains: use of stable Zn isotopes to separate root uptake from remobilization in plants with contrasting Zn status. *Plant Soil* 361, 241–250. doi: 10.1007/s11104-012-1272-x
- Himelblau, E., and Amasino, R. M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *J. Plant Physiol.* 158, 1317–1323. doi: 10.1078/0176-1617-00608
- Hocking, P. J. (1994). Dry-matter production, mineral nutrient concentrations, and nutrient distribution and redistribution in irrigated spring wheat. *J. Plant Nutr.* 17, 1289–1308. doi: 10.1080/01904169409364807
- Hocking, P. J., and Pate, J. S. (1977). Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Ann. Bot.* 41, 1259–1278.
- Kutman, U. B., Kutman, B. Y., Ceylan, Y., Ova, E. A., and Cakmak, I. (2012). Contributions of root uptake and remobilization to grain zinc accumulation in wheat depending on post-anthesis zinc availability and nitrogen nutrition. *Plant Soil* 361, 177–187. doi: 10.1007/s11104-012-1300-x
- Kutman, U. B., Yildiz, B., and Cakmak, I. (2011). Effect of nitrogen on uptake, remobilization and partitioning of zinc and iron throughout the development of durum wheat. *Plant Soil* 342, 149–164. doi: 10.1007/s11104-010-0679-5
- Malagoli, P., Laine, P., Rossato, L., and Ourry, A. (2005). 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. *Ann. Bot.* 95, 853–861. doi: 10.1093/aob/mci091
- Malone, M., White, P., and Morales, M. A. (2002). Mobilization of calcium in glasshouse tomato plants by localized scorching. *J. Exp. Bot.* 53, 83–88. doi: 10.1093/jexbot/53.366.83
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., and Suzuki, A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann. Bot.* 105, 1141–1157. doi: 10.1093/aob/mcq028
- Masoni, A., Ercoli, L., Mariotti, M., and Arduini, I. (2007). Post-anthesis accumulation and remobilization of dry matter, nitrogen and phosphorus in durum wheat as affected by soil type. *Eur. J. Agron.* 26, 179–186. doi: 10.1016/j.eja.2006.09.006
- Mauk, C. S., and Noodén, L. D. (1992). Regulation of mineral redistribution in pod-bearing soybean explants. *J. Exp. Bot.* 43, 1429–1440. doi: 10.1093/jxb/43.11.1429
- Mehrhoff, R., and Kühbauch, W. (1990). Ertragsstruktur alter und neuer Winterweizensorten unter dem Aspekt der Einlagerung und Remobilisation von Fruktanen im Weizenhalm. *J. Agron. Crop. Sci.* 165, 47–53. doi: 10.1111/j.1439-037X.1990.tb00833.x
- Milla, R., Castro-Diez, P., Maestro-Martinez, M., and Montserrat-Martí, G. (2005). Relationships between phenology and the remobilization of nitrogen, phosphorus and potassium in branches of eight Mediterranean evergreens. *New Phytol.* 168, 167–178. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01477.x
- Millard, P., and Grelet, G. (2010). Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiol.* 30, 1083–1095. doi: 10.1093/treephys/tpq042
- Millard, P., Wendler, R., Grassi, G., Grelet, G.-A., and Tagliavini, M. (2006). Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. *Tree Physiol.* 26, 527–536. doi: 10.1093/treephys/26.4.527
- Moreira, N. K. F. (2009). Yield, uptake, and retranslocation of nutrients in banana plants cultivated in upland soil of central Amazonian. *J. Plant Nutr.* 32, 443–457. doi: 10.1080/01904160802660750
- Murphy, K. M., Reeves, P. G., and Jones, S. S. (2008). Relationship between yield and mineral nutrient concentrations in historical and modern spring wheat cultivars. *Euphytica* 163, 381–390. doi: 10.1007/s10681-008-9681-x
- Nable, R., and Loneragan, J. (1984). Translocation of manganese in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L. Cv. Seaton Park) I. redistribution during vegetative growth. *Funct. Plant Biol.* 11, 101–111.
- Neumann, P. M., and Chamel, A. (1986). Comparative phloem mobility of nickel in nonsenescent plants. *Plant Physiol.* 81, 689–691. doi: 10.1104/pp.81.2.689
- Nieminen, T., and Helmissaari, H.-S. (1996). Nutrient retranslocation in the foliage of *Pinus sylvestris* L. growing along a heavy metal pollution gradient. *Tree Physiol.* 16, 825–831. doi: 10.1093/treephys/16.10.825
- Pottier, M., García de la Torre, V. S., Victor, C., David, L. C., Chalot, M., and Thomine, S. (2015). Genotypic variations in the dynamics



- of metal concentrations in poplar leaves: a field study with a perspective on phytoremediation. *Environ. Pollut.* 199, 73–82. doi: 10.1016/j.envpol.2015.01.010
- Rohner, B., Bugmann, H., and Bigler, C. (2013). Towards non-destructive estimation of tree age. *For. Ecol. Manag.* 304, 286–295. doi: 10.1016/j.foreco.2013.04.034
- Sankaran, R. P., and Grusak, M. A. (2014). Whole shoot mineral partitioning and accumulation in pea (*Pisum sativum*). *Front. Plant Sci.* 5:149. doi: 10.3389/fpls.2014.00149
- Schnyder, H. (1993). The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling—a review. *New Phytol.* 123, 233–245. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03731.x
- Shi, R., Bässler, R., Zou, C., and Römheld, V. (2011). Is iron phloem mobile during senescence in trees? A reinvestigation of Rissmüller's finding of 1874. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 489–493. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.03.004
- Shi, R., Weber, G., Köster, J., Reza-Hajirezaei, M., Zou, C., Zhang, F., et al. (2012). Senescence-induced iron mobilization in source leaves of barley (*Hordeum vulgare*) plants. *New Phytol.* 195, 372–383. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04165.x
- Teija Ruuhola, T. L. (2011). Retranslocation of nutrients in relation to boron availability during leaf senescence of *Betula pendula* Roth. *Plant Soil* 344, 227–240. doi: 10.1007/s11104-011-0742-x
- Wardlaw, I. F., and Willenbrink, J. (2000). Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytol.* 148, 413–422. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00777.x
- Waters, B. M., and Grusak, M. A. (2008). Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line ysl1ysl3. *New Phytol.* 177, 389–405. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02288.x
- Waters, B. M., and Troupe, G. C. (2011). Natural variation in iron use efficiency and mineral remobilization in cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Soil* 352, 185–197. doi: 10.1007/s11104-011-0988-3
- Waters, B. M., Uauy, C., Dubcovsky, J., and Grusak, M. A. (2009). Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J. Exp. Bot.* 60, 4263–4274. doi: 10.1093/jxb/erp257
- White, P. (2012). “Long-distance transport in the xylem and phloem,” in *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd Edn.*, ed P. Marschner (Berlin: Elsevier), 49–70. doi: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00003-0

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Maillard, Diquélou, Billard, Lainé, Garnica, Prudent, Garcia-Mina, Yvin and Ourry. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Salts	Control	Concentrations (µM) of nutrients in the solution deprived in:															
		N	K	Ca	P	S	Mg	Fe	B	Mn	Zn	Cu	Mo	Ni			
CaCO3	2000	3250	5000	0	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
KNO3	1250	0	0	3750	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250
Ca(NO3)2, 4H2O	1250	0	1875	0	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250
KH2PO4	250	250	0	250	0	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
MgSO4	500	500	500	500	0	0	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
EDTA, 2 NaFe, 3 H2O	200	200	200	200	200	200	0	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
H3BO3	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MnSO4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
ZnSO4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CuSO4	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
(NH4)6 Mo7O24	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
CoCl2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
NiCl2	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
SiO2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Na2O	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78	38.78
MgCl2	0	0	0	0	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Na2SO4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	0.7	0	0	0	0	0
CaCl2, 2 H2O	1250	1250	625	0	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250
H2PO4	0	0	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KCl	250	250	0	2000	250	0	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
HCl	0	0	1500	0	0	0	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaOH	0	0	0	0	0	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KOH	0	1250	0	50	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KHSO4	0	0	0	0	0	0	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elements	Control	Concentrations (µM) of nutrients in the solution deprived in:												
		N	K	Ca	P	S	Mg	Fe	B	Mn	Zn	Cu	Mo	Ni
N	3754.2	4.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2	3754.2
K	1750	1750	0	6050	1500	2250	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750
Ca	4500	4500	7500	0	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500
P	250	250	250	250	0	250	250	250	250	250	250	250	250	250
S	508.7	508.7	508.7	508.7	8.7	508.7	508.7	508.7	508.7	508.7	508.7	508.7	508.7	508.7
Mg	500	500	500	500	300	0	500	500	500	500	500	500	500	500
Fe	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
B	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mn	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Zn	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Cu	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Mo	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
Ni	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Cl	2750.28	2750.3	2750.3	2000.3	2800.3	2750.3	3250.3	2750.3	2750.3	2750.3	2750.3	2750.3	2750.3	2750.2
Co	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Si	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Na	477.6	477.6	477.6	477.6	477.6	477.6	477.6	477.6	477.6	487.6	479.0	477.6	477.6	477.6

Supplemental data SD1. Modified Hoagland nutrient solutions used for growing control plants (*Brassica napus* L.) and composition of nutrient solutions used for exposing the plants to deficiencies in nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), sulfur (S), magnesium (Mg), calcium (Ca), iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn), molybdenum (Mo), boron (B) or nickel (Ni).

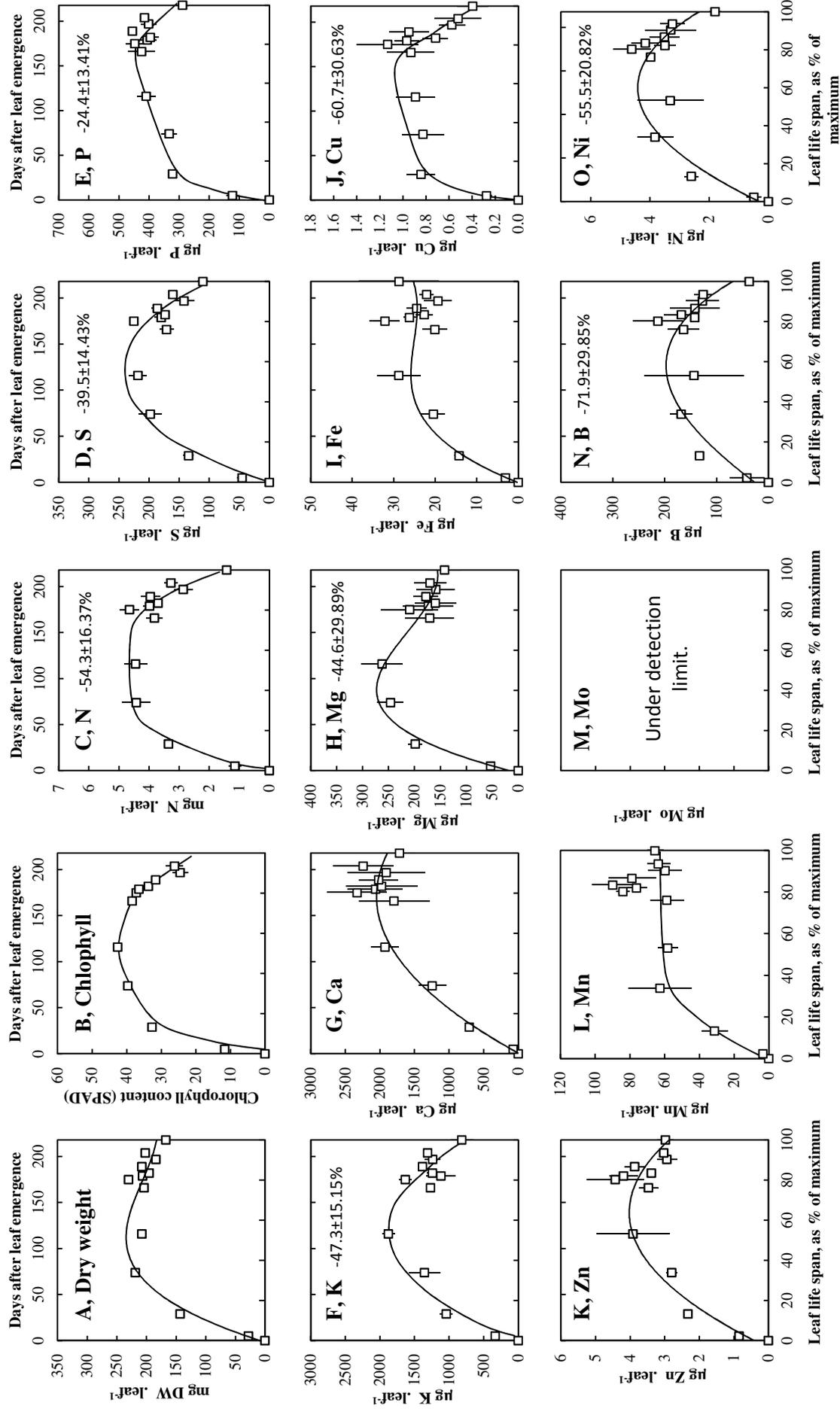


	<i>Triticum aestivum</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Zea mays</i> <i>Brassica napus</i>	<i>Quercus robur</i> <i>Populus nigra</i>	<i>Alnus glutinosa</i>
pH	7.9	6.0	7.9
Organic matter	3.7%	4.6%	3.7%
Cation exchange capacity	14.3 meq/100g	12 meq/100g	16.6 meq/100g
C/N	8.6	9.9	9.9
Total Nitrogen	2500 ppm	2700 ppm	2200 ppm
Exchangeable calcium	11880 ppm	2192 ppm	7234 ppm
Exchangeable magnesium	156 ppm	349 ppm	169 ppm
Exchangeable potassium	306 ppm	474 ppm	210 ppm
Exchangeable phosphorus	75 ppm	64 ppm	17 ppm
Exchangeable sodium	22 ppm	48 ppm	123 ppm
Exchangeable copper	1.9 ppm	3.4 ppm	1.5 ppm
Exchangeable zinc	3.2 ppm	5.8 ppm	2.4 ppm
Exchangeable manganese	11.6 ppm	34.8 ppm	17 ppm
Exchangeable iron	33.8 ppm	694 ppm	55.1 ppm
Boron soluble in water	0.28 ppm	0.48 ppm	0.29 ppm
Molybdenum	<0.5 ppm	<0.5 ppm	<0.5 ppm
Nickel	26 ppm	12 ppm	18 ppm

**Supplemental data SD2.** Analysis of soils sampled in the fields where *T. aestivum*, *H. vulgare*, *Z. mays*, *B. napus*, *Q. robur*, *P. nigra* or *A. glutinosa* were harvested.



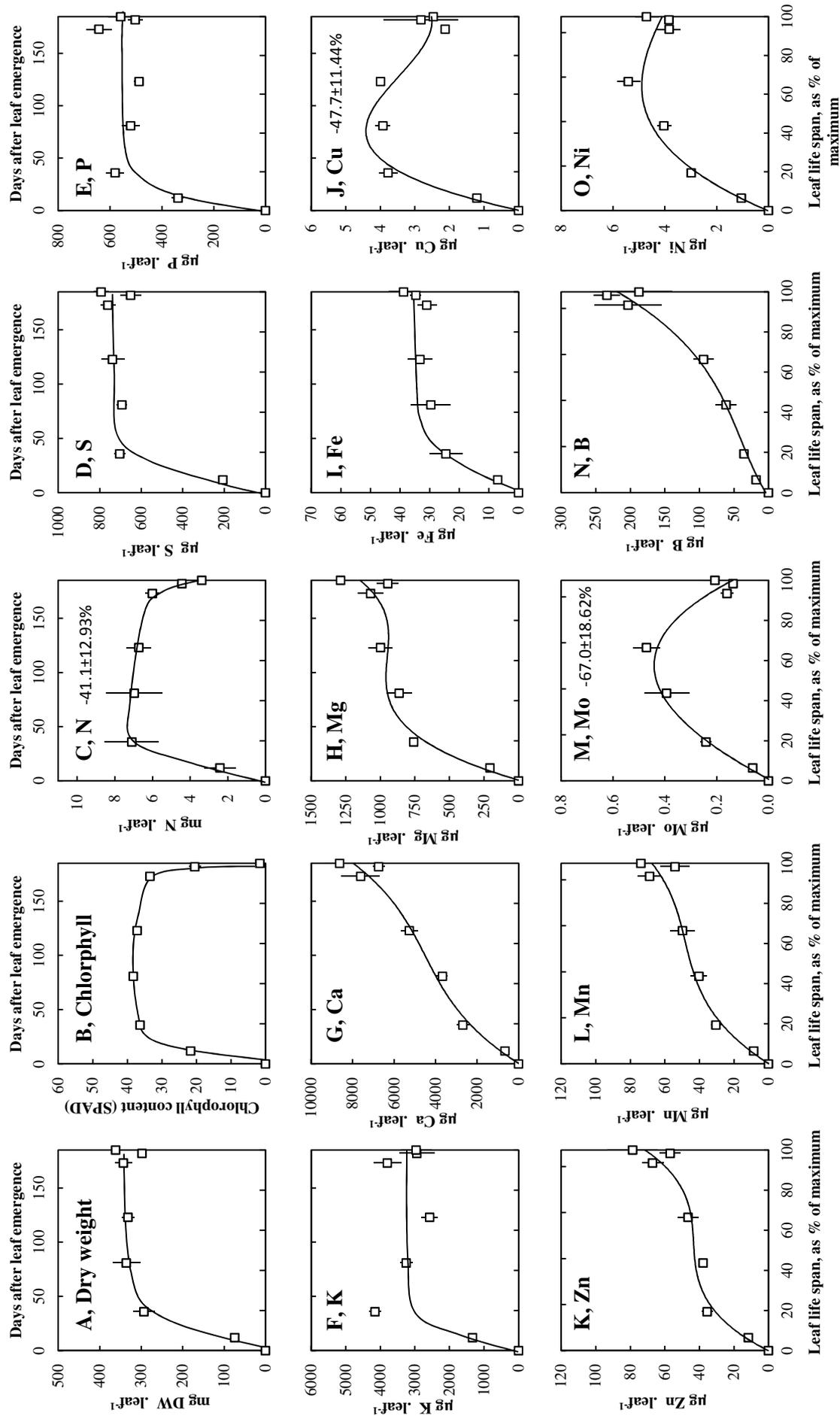
### Supplemental data 3: *Quercus robur* L.



**Supplemental data SD3.** Changes in whole leaf-blade biomass (A), chlorophyll content (B), nitrogen (C), sulfur (D), phosphorus (E), potassium (F), calcium (G), magnesium (H), iron (I), copper (J), zinc (K), manganese (L), molybdenum (M), boron (N) and nickel (O) contents in leaves during their leaf life span in *Quercus robur*. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. When significant, the apparent nutrient remobilization (ANR), given with its confidence interval ( $n=24$ ,  $P=0.05$ ) was calculated from equation 3 given in material and methods. The relative leaf life span (% of maximum) is given on the bottom of each graph.



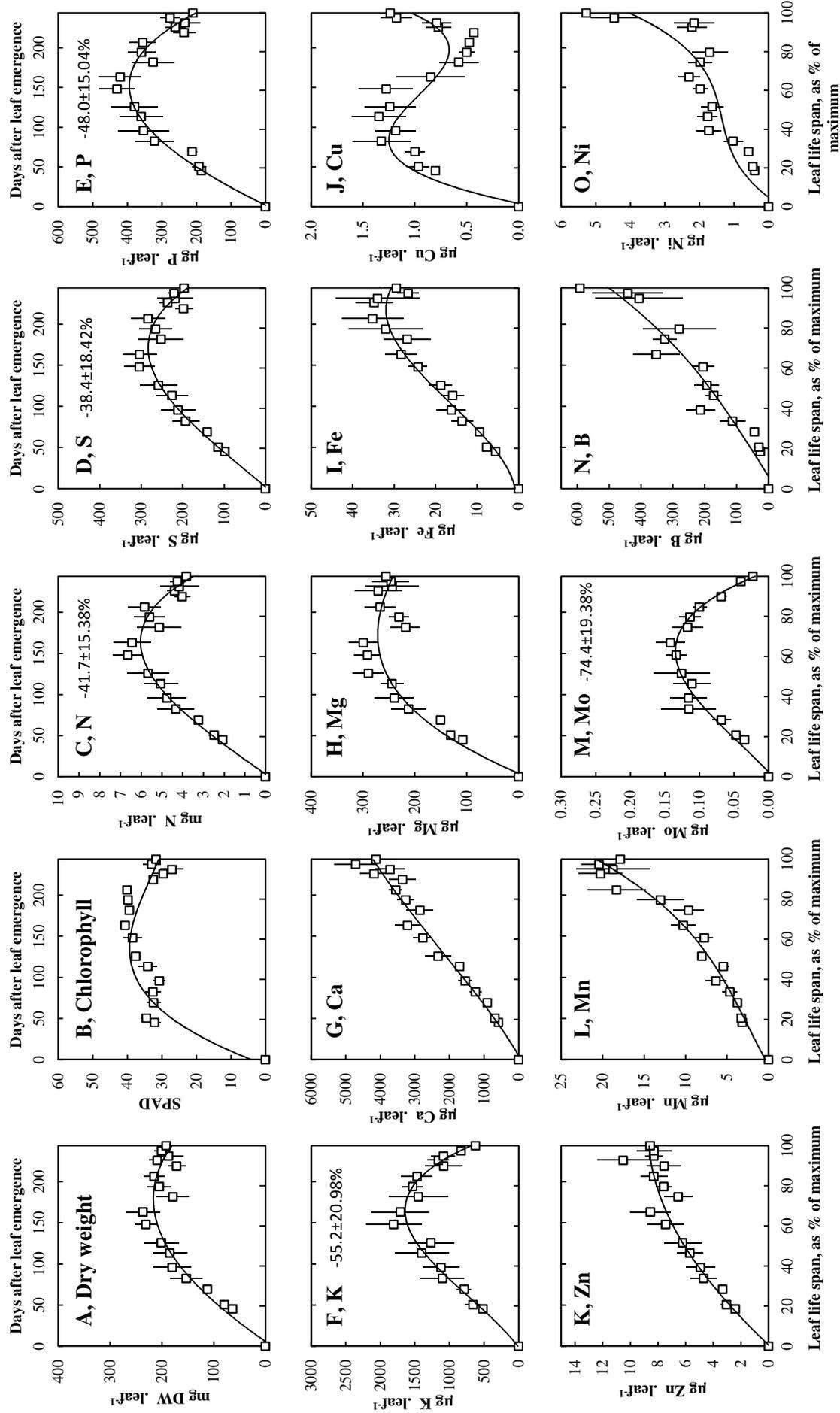
**Supplemental data 4: *Populus nigra* L.**



**Supplemental data SD4.** Changes in whole leaf-blade biomass (A), chlorophyll content (B), nitrogen (C), sulfur (D), phosphorus (E), potassium (F), calcium (G), magnesium (H), iron (I), copper (J), zinc (K), manganese (L), molybdenum (M), boron (N) and nickel (O) contents in leaves during their leaf life span in *Populus nigra*. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. When significant, the apparent nutrient remobilization (ANR), is given on the bottom of each graph.



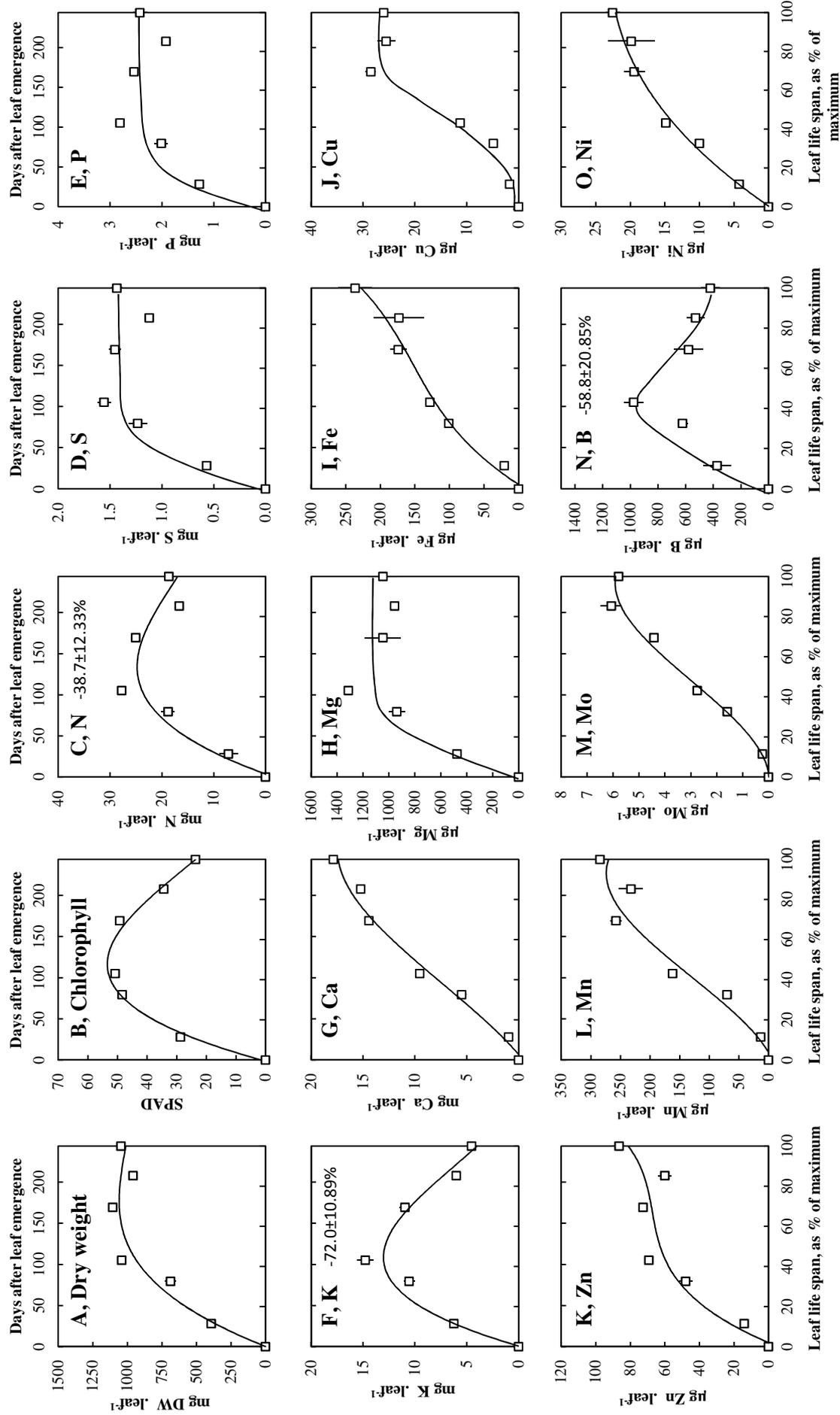
**Supplemental data 5: *Alnus glutinosa* L.**



**Supplemental data SD5.** Changes in whole leaf-blade biomass (A), chlorophyll content (B), nitrogen (C), sulfur (D), phosphorus (E), potassium (F), calcium (G), magnesium (H), iron (I), copper (J), zinc (K), manganese (L), molybdenum (M), boron (N) and nickel (O) contents in leaves during their leaf life span in *Alnus glutinosa*. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. When significant, the apparent nutrient remobilization (ANR), given with its confidence interval ( $n=42$ ,  $P=0.05$ ) was calculated from equation 3 given in material and methods. The relative leaf life span (% of maximum) is given on the bottom of each graph.



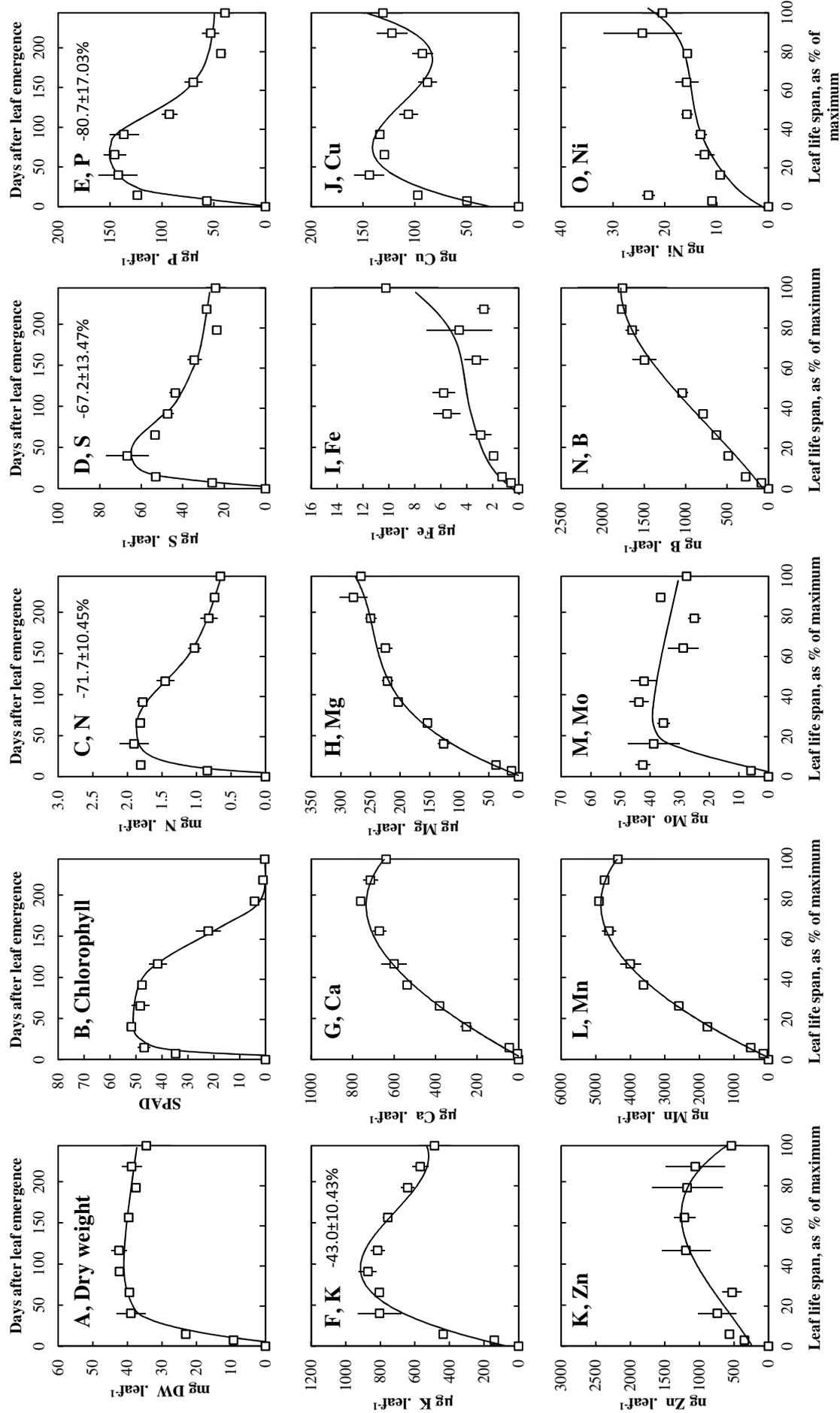
**Supplemental data 6: *Zea mays* L.**



**Supplemental data SD6.** Changes in whole leaf-blade biomass (A), chlorophyll content (B), nitrogen (C), sulfur (D), phosphorus (E), potassium (F), calcium (G), magnesium (H), iron (I), copper (J), zinc (K), manganese (L), molybdenum (M), and nickel (O) contents in leaves during their leaf life span in *Zea mays*. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. When significant, the apparent nutrient remobilization (ANR), given with its confidence interval ( $n=12$ ,  $P=0.05$ ) was calculated from equation 3 given in material and methods. The relative leaf life span (% of maximum) is given on the bottom of each graph.



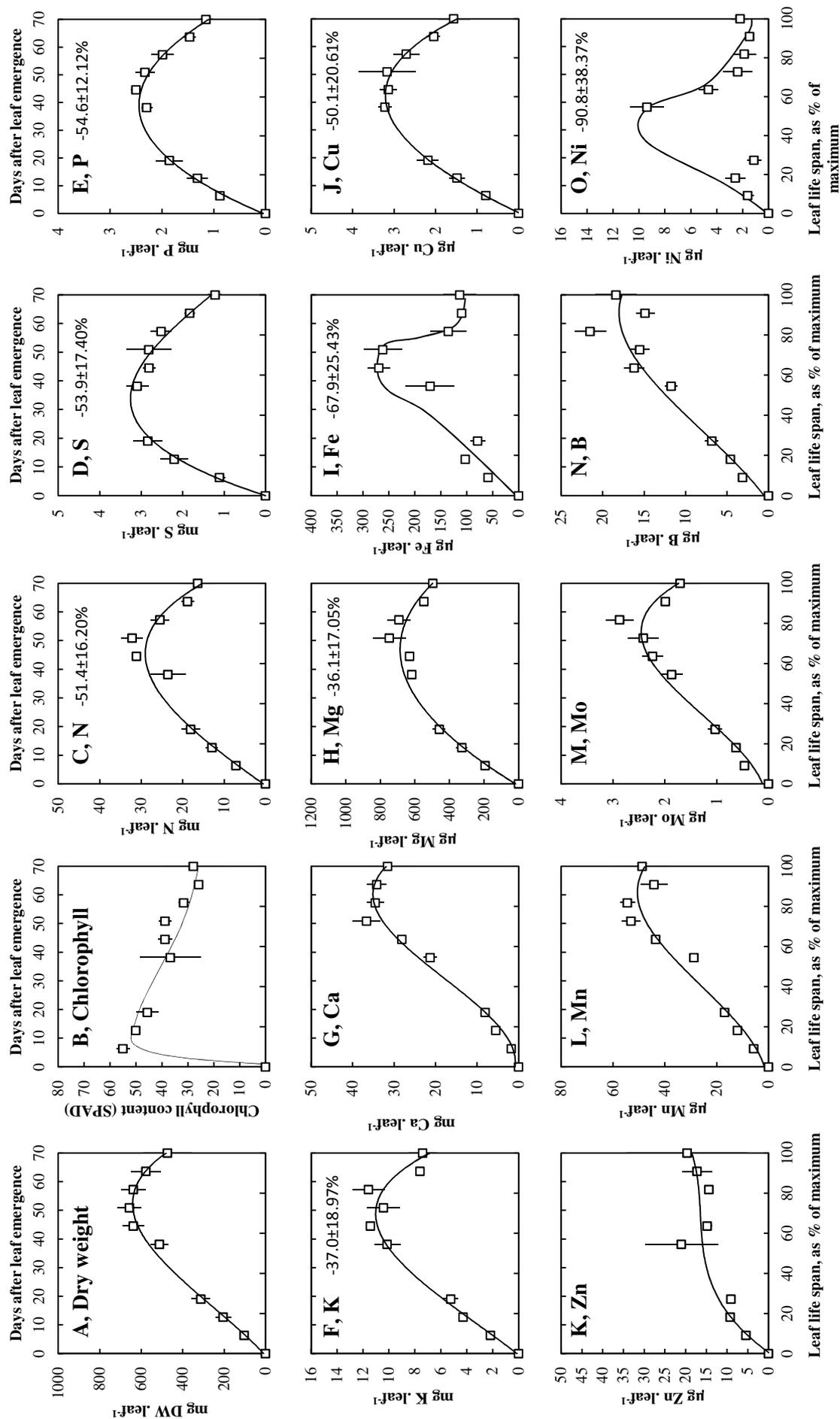
**Supplemental data 7: *Pisum sativum* L.**



**Supplemental data SD7.** Changes in whole leaf-blade biomass (A), chlorophyll content (B), nitrogen (C), sulfur (D), phosphorus (E), potassium (F), calcium (G), magnesium (H), iron (I), copper (J), zinc (K), manganese (L), molybdenum (M), boron (N) and nickel (O) contents in leaves during their leaf life span in *Pisum sativum*. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. When significant, the apparent nutrient remobilization (ANR), given with its confidence interval ( $n=24$ ,  $P=0.05$ ) was calculated from equation 3 given in material and methods. The relative leaf life span (% of maximum) is given on the bottom of each graph.



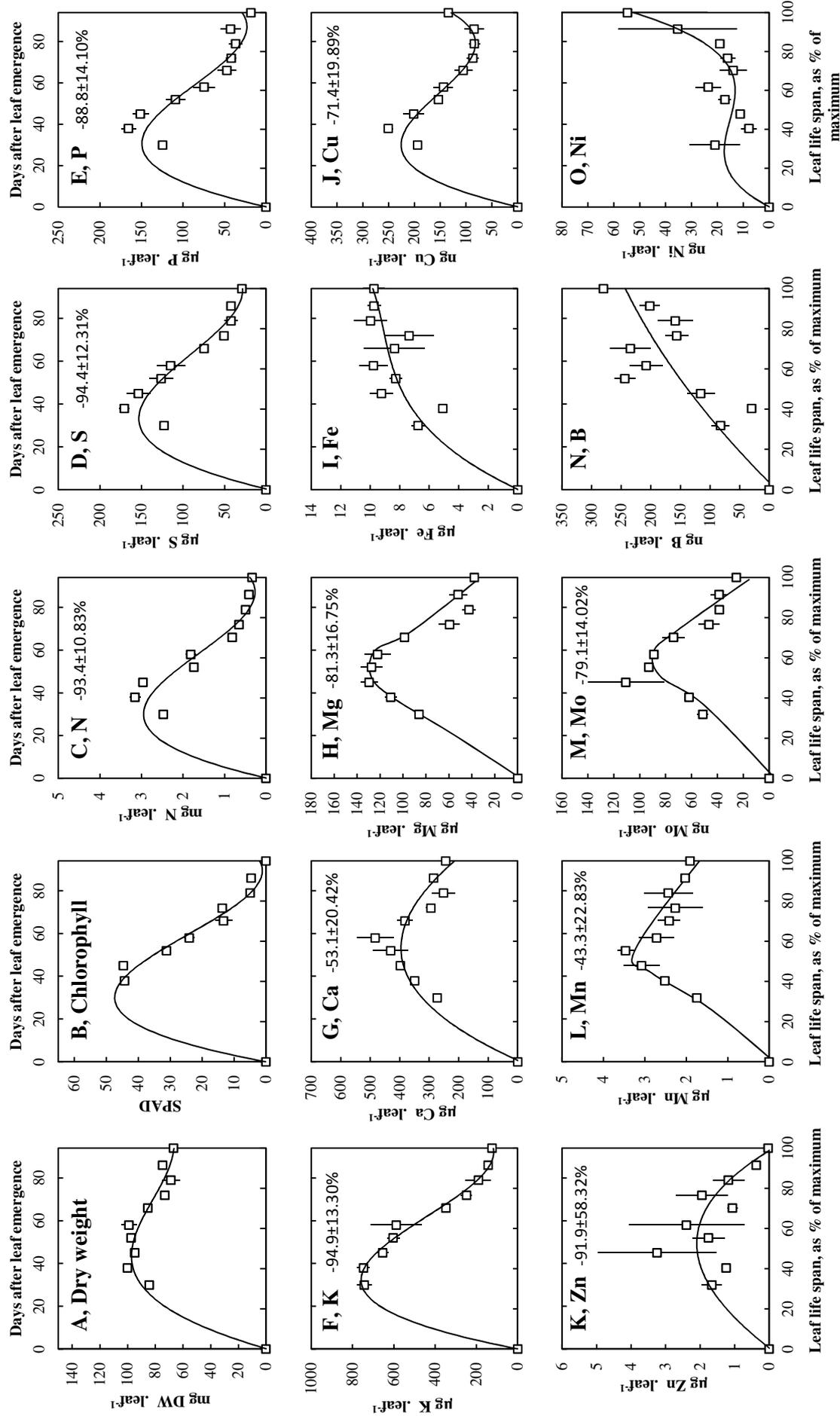
## Supplemental data 8: *Brassica napus* L.



**Supplemental data SD8.** Changes in whole leaf-blade biomass (A), chlorophyll content (B), nitrogen (C), sulfur (D), phosphorus (E), potassium (F), calcium (G), magnesium (H), iron (I), copper (J), zinc (K), manganese (L), molybdenum (M), boron (N) and nickel (O) contents in leaves during their leaf life span in *Brassica napus*. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. When significant, the apparent nutrient remobilization (ANR), given with its confidence interval ( $n=15$ ,  $P=0.05$ ) was calculated from equation 3 given in material and methods. The relative leaf life span (% of maximum) is given on the bottom of each graph.



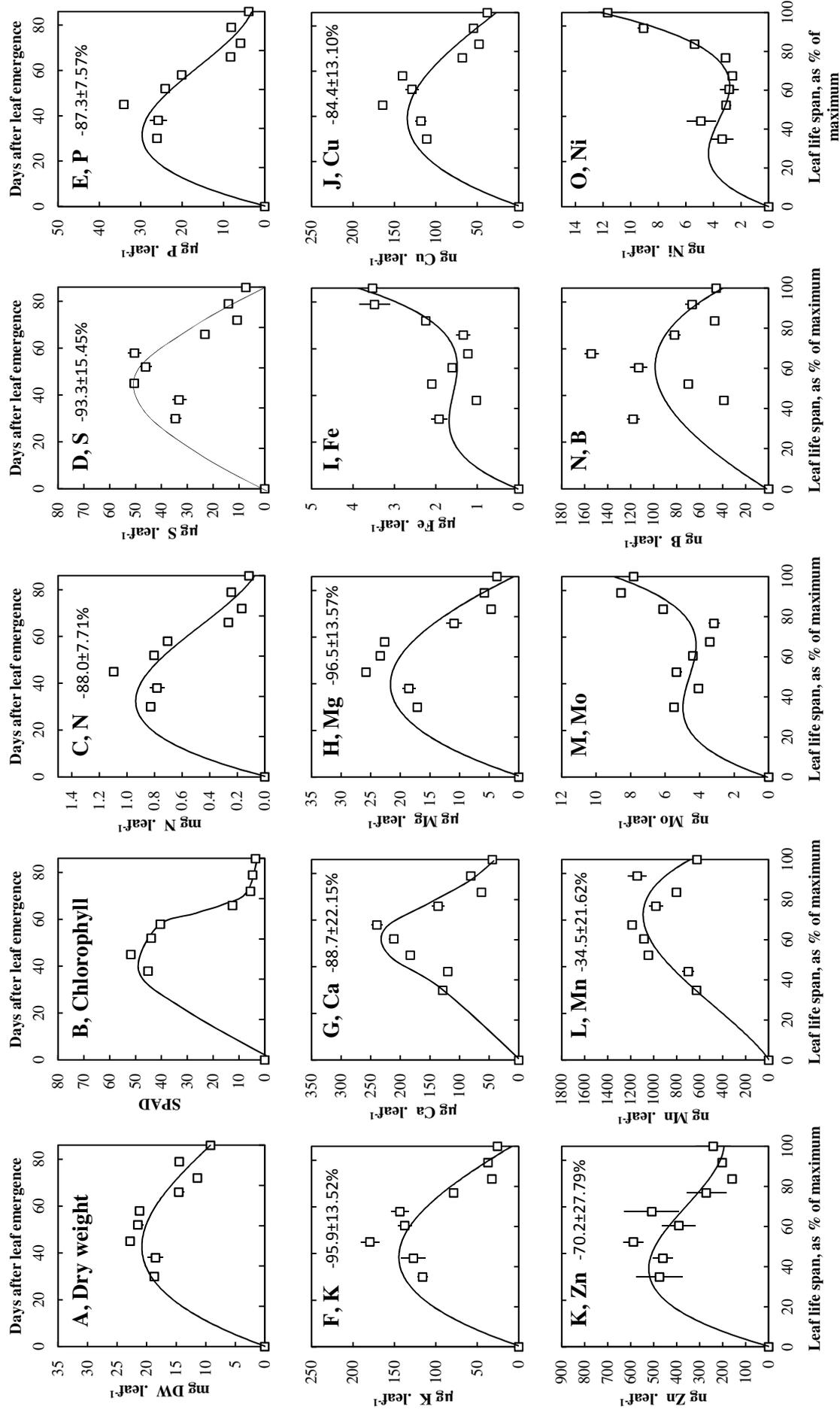
## Supplemental data 9: *Triticum aestivum* L.



**Supplemental data SD9.** Changes in whole leaf-blade biomass (A), chlorophyll content (B), nitrogen (C), sulfur (D), phosphorus (E), potassium (F), calcium (G), magnesium (H), iron (I), copper (J), zinc (K), manganese (L), molybdenum (M), boron (N) and nickel (O) contents in leaves during their leaf life span in *Triticum aestivum*. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. When significant, the apparent nutrient remobilization (ANR), given with its confidence interval ( $n=21$ ,  $P=0.05$ ) was calculated from equation 3 given in material and methods. The relative leaf life span (% of maximum) is given on the bottom of each graph.



## Supplemental data 10: *Hordeum vulgare* L.



**Supplemental data SD10.** Changes in whole leaf-blade biomass (A), chlorophyll content (B), nitrogen (C), sulfur (D), phosphorus (E), potassium (F), calcium (G), magnesium (H), iron (I), copper (J), zinc (K), manganese (L), molybdenum (M), boron (N) and nickel (O) contents in leaves during their leaf life span in *Hordeum vulgare*. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. Vertical bars indicate  $\pm$  s.e. for  $n=3$  when larger than the symbol. When significant, the apparent nutrient remobilization (ANR), given with its confidence interval ( $n=21$ ,  $P=0.05$ ) was calculated from equation 3 given in material and methods. The relative leaf life span (% of maximum) is given on the bottom of each graph.



	Total per plant		Roots		Mature petioles		Mature Leaves		Young petioles		Young leaves	
	Uptake during deficiencies		Balance between tf and t0		Balance between tf and t0		Balance between tf and t0		Balance between tf and t0		Balance between tf and t0	
<b>Ca (mg)</b>	t <sub>0</sub> : 358.8 ± 38.2	t <sub>f</sub> : 307.2 ± 28.02	t <sub>0</sub> : 173.8 ± 23.67	t <sub>f</sub> : 4.3 ± 0.28***	t <sub>0</sub> : 41.8 ± 2.26	t <sub>f</sub> : 76.1 ± 6.63*	t <sub>0</sub> : 143.3 ± 14.14	t <sub>f</sub> : 306.7 ± 22.05*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 2 ± 0.45*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 18.1 ± 4.72*
			-169.4 ± 10.58	(-97.4 % ± 4.63)	34.3 ± 3.13	(43.9 % ± 2.33)	63.4 ± 11.71	(28.3 % ± 4.63)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 66 ± 7.02*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 135.7 ± 19.63*
<b>Mn (µg)</b>	t <sub>0</sub> : 993.1 ± 101.8	t <sub>f</sub> : 838.7 ± 16.13	t <sub>0</sub> : 547.3 ± 47.79	t <sub>f</sub> : 74.2 ± 3.27***	t <sub>0</sub> : 29.9 ± 3.13	t <sub>f</sub> : 38.9 ± 5	t <sub>0</sub> : 415.8 ± 51.33	t <sub>f</sub> : 423.9 ± 22.04	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
			-473.1 ± 21.42	(-86.1 % ± 0.62)	9 ± 2.64	(-34.6 % ± 10.37)	8 ± 24.98	(6.8 % ± 6.43)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 47.8 ± 1.04*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 39.1 ± 1.14*
<b>K (mg)</b>	t <sub>0</sub> : 152.8 ± 12.44	t <sub>f</sub> : 147.8 ± 3.63	t <sub>0</sub> : 23.6 ± 1.08	t <sub>f</sub> : 19.2 ± 0.3**	t <sub>0</sub> : 41.9 ± 3.37	t <sub>f</sub> : 30.3 ± 2.47*	t <sub>0</sub> : 87.4 ± 8.41	t <sub>f</sub> : 11.4 ± 0.47***	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
			-4.4 ± 0.5	(-18.0 % ± 1.89)	-11.5 ± 1.87	(-26.0 % ± 3.91)	-76 ± 3.77	(-86.6 % ± 0.63)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 9.7 ± 0.27*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 45.1 ± 1.99*
<b>N (mg)</b>	t <sub>0</sub> : 195.9 ± 12.03	t <sub>f</sub> : 217.8 ± 6.59	t <sub>0</sub> : 25.1 ± 2.61	t <sub>f</sub> : 19.8 ± 2.75***	t <sub>0</sub> : 27.3 ± 2.07	t <sub>f</sub> : 33 ± 1.92*	t <sub>0</sub> : 143.6 ± 8.07	t <sub>f</sub> : 30.2 ± 3.44***	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
			24.7 ± 1.69	(104.4 % ± 10.01)	5.7 ± 1.26	(23.1 % ± 5.37)	-63.4 ± 3.93	(-43.6 % ± 1.90)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0.7 ± 0.07*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 1.6 ± 0.12*
<b>P (mg)</b>	t <sub>0</sub> : 9.2 ± 0.6	t <sub>f</sub> : 7.6 ± 0.68	t <sub>0</sub> : 1.4 ± 0.21	t <sub>f</sub> : 3.3 ± 0.37	t <sub>0</sub> : 1.4 ± 0.1	t <sub>f</sub> : 0.9 ± 0.1**	t <sub>0</sub> : 6.6 ± 0.31	t <sub>f</sub> : 1.1 ± 0.1***	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 1.1 ± 0.17*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 3.7 ± 0.2*
			2.2 ± 0.24	(138.8 % ± 18.42)	0 ± 0.08	(1.6 % ± 5.06)	-5.4 ± 0.15	(-82.5 % ± 0.81)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 2.2 ± 0.19*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 2 ± 0.07*
<b>S (mg)</b>	t <sub>0</sub> : 12.4 ± 0.86	t <sub>f</sub> : 13.9 ± 0.84	t <sub>0</sub> : 2.4 ± 0.39	t <sub>f</sub> : 3.9 ± 0.31	t <sub>0</sub> : 1.5 ± 0.12	t <sub>f</sub> : 1.5 ± 0.13	t <sub>0</sub> : 8.4 ± 0.42	t <sub>f</sub> : 3.7 ± 0.33***	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
			2.1 ± 0.33	(71.4 % ± 12.60)	0 ± 0.08	(1.6 % ± 5.06)	-4.6 ± 0.24	(-55.2 % ± 2.10)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 2.2 ± 0.19*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 2 ± 0.07*
<b>Mg (mg)</b>	t <sub>0</sub> : 11.5 ± 0.89	t <sub>f</sub> : 13.3 ± 0.55	t <sub>0</sub> : 1.6 ± 0.1	t <sub>f</sub> : 2.1 ± 0.17*	t <sub>0</sub> : 1.9 ± 0.14	t <sub>f</sub> : 2.8 ± 0.5	t <sub>0</sub> : 8.1 ± 0.66	t <sub>f</sub> : 4.2 ± 0.17***	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
			0.6 ± 0.09	(36.4 % ± 6.28)	1 ± 0.23	(54.3 % ± 13.41)	-3.9 ± 0.3	(-47.5 % ± 2.16)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 27.2 ± 0.96*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 10.9 ± 0.71*
<b>Mo (µg)</b>	t <sub>0</sub> : 160.23 ± 12.3	t <sub>f</sub> : 155.84 ± 13.9	t <sub>0</sub> : 38.2 ± 2.62	t <sub>f</sub> : 4.3 ± 0.38***	t <sub>0</sub> : 73.4 ± 0.93	t <sub>f</sub> : 33.4 ± 8.72	t <sub>0</sub> : 108.6 ± 10.22	t <sub>f</sub> : 79.9 ± 11.24	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 2.6 ± 0.67*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 16.2 ± 2.33*
			-33.9 ± 1.19	(-88.5 % ± 0.57)	20.1 ± 3.92	(154.0 % ± 30.91)	-28.7 ± 6.79	(-24.4 % ± 5.86)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 156 ± 46.15*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 97.3 ± 17.07*
<b>Cu (µg)</b>	t <sub>0</sub> : 29 ± 3.98	t <sub>f</sub> : 74.8 ± 3.05**	t <sub>0</sub> : 14.7 ± 3.01	t <sub>f</sub> : 13.4 ± 1.51***	t <sub>0</sub> : 2.1 ± 0.19	t <sub>f</sub> : 8 ± 0.67***	t <sub>0</sub> : 12.2 ± 1.09	t <sub>f</sub> : 4.7 ± 0.99**	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 3 ± 0.75*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 2.7 ± 1.12*
			28.7 ± 1.5	(226.9 % ± 23.50)	5.9 ± 0.31	(284.9 % ± 23.09)	-7.5 ± 0.66	(-60.4 % ± 4.15)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
<b>B (µg)</b>	t <sub>0</sub> : 25.4 ± 2.69	t <sub>f</sub> : 534.9 ± 47.71	t <sub>0</sub> : 1.8 ± 0.19	t <sub>f</sub> : 96.4 ± 19.5**	t <sub>0</sub> : 3.4 ± 0.61	t <sub>f</sub> : 18.8 ± 5.19**	t <sub>0</sub> : 20.2 ± 1.95	t <sub>f</sub> : 36.4 ± 11.57**	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
			94.7 ± 8.72	(5569.5 % ± 591.56)	115.4 ± 2.34	(3733.7 % ± 344.28)	46.2 ± 5.25	(237.1 % ± 29.6)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
<b>Ni (µg)</b>	t <sub>0</sub> : 1.2 ± 0.18	t <sub>f</sub> : 10.3 ± 1***	t <sub>0</sub> : 0.5 ± 0.07	t <sub>f</sub> : 1.8 ± 0.53*	t <sub>0</sub> : 0.2 ± 0.06	t <sub>f</sub> : 1.4 ± 0.24**	t <sub>0</sub> : 0.5 ± 0.14	t <sub>f</sub> : 1.4 ± 0.35*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 3 ± 0.75*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 2.7 ± 1.12*
			1.3 ± 0.24	(39.2 % ± 3.68)	1.2 ± 0.11	(88.0 % ± 2.39)	0.9 ± 0.17	(319.8 % ± 110.01)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 182.2 ± 87.08*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 739.5 ± 526.99*
<b>Fe (µg)</b>	t <sub>0</sub> : 4038.7 ± 495	t <sub>f</sub> : 6862.3 ± 104	t <sub>0</sub> : 1783.1 ± 424.4	t <sub>f</sub> : 961.6 ± 452.7	t <sub>0</sub> : 131 ± 15.12	t <sub>f</sub> : 00.5 ± 84.8**	t <sub>0</sub> : 1124.6 ± 166	t <sub>f</sub> : 178.6 ± 224.0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 32.6 ± 6.93*	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 67 ± 2.45*
			2823.7 ± 517.10	(13.3 % ± 10.47)	469.5 ± 38.52	(376.9 % ± 39.06)	54.1 ± 124.72	(12.1 % ± 12.32)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 91.6 ± 21.91	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
<b>Zn (µg)</b>	t <sub>0</sub> : 152.3 ± 10.47	t <sub>f</sub> : 356.4 ± 30.7*	t <sub>0</sub> : 46.2 ± 3.87	t <sub>f</sub> : 15.3 ± 7.69**	t <sub>0</sub> : 17.2 ± 1.07	t <sub>f</sub> : 49.9 ± 7.63**	t <sub>0</sub> : 88.8 ± 6.05	t <sub>f</sub> : 91.6 ± 21.91	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0
			204.1 ± 14.51	(154.6 % ± 12.01)	32.7 ± 3.45	(193.7 % ± 22.08)	2.8 ± 10.16	(4.7 % ± 11.79)	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0	t <sub>0</sub> : 0 ± 0	t <sub>f</sub> : 0 ± 0

**Supplemental data SD11.** Nutrient contents per plant, in hydroponically grown *Brassica napus* subjected to Ca, Mn, K, N, P, S, Mg, Mo, Cu, B, Ni, Fe or Zn deficiency. Nutrient content is given for each organ, before and after nutrient deficiency respectively, and are given as the mean ± s.e. for n=4. Apparent nutrient remobilization (negative value) was calculated from equation 4 given in material and methods (n=16) from an organ and allocation (positive value) as well as allocation of nutrient taken up by roots are given as the mean ± s.e. Level of significance are indicated by \*, \*\* or \*\*\*, for P<0.05, P<0.01 or P<0.001, between nutrient deficient plants and t=0 control plants, according to a Student test or to a Wilcoxon test (indicated in italic).



---

## CHAPITRE V

### **Modification du ionome lors de carences nutritionnelles chez *Brassica napus* : une focalisation sur les interactions entre le molybdène et d'autres éléments**

---





## CHAPITRE V

### **Modification du ionome lors de carences nutritionnelles chez *Brassica napus* : une focalisation sur les interactions entre le molybdène et d'autres éléments**

---

Lors des expérimentations précédentes, nous avons pu constater que l'application de carences pour chacun des éléments étudiés, visant initialement à quantifier leur potentiel de remobilisation chez le colza, modifiait également l'absorption d'autres éléments, laissant clairement présager de fortes interactions entre nutriments. Pour expliciter celles-ci, le même protocole expérimental a été mis en place afin de caractériser les modifications de la composition du ionome chez le colza en réponse à 13 carences individuelles. Les résultats obtenus nous ont conduits dans un second temps à nous focaliser sur l'absorption du molybdène pour tenter d'expliquer les mécanismes mis en jeu lors des carences conduisant à une augmentation de son absorption.

**Résultats majeurs :** Dix-huit augmentations hautement significatives de l'absorption d'un élément en réponse à l'une ou l'autre des 13 carences utilisées, ont été identifiées. Certaines de ces interactions ont déjà été décrites dans la littérature, d'autres peu ou pas du tout. Le molybdène apparaît comme l'élément dont l'absorption est la plus largement affectée par d'autres carences et en particulier en S, en Fe, en Cu, en Zn, en Mn ou en B. Une carence en Cu ou en Zn pourrait affecter la biosynthèse du facteur MoCo, principale voie d'assimilation du Mo, requérant du Cu et du Zn, et se traduirait par une sur-expression du gène *BnaMot1*, codant un transporteur de molybdate. A contrario, une carence en S, en Fe, en Mn ou en B induit une sur-expression des gènes *BnaSultr1.1* et *BnaSultr1.2* codant des transporteurs racinaires de  $\text{SO}_4^{2-}$  qui conduirait indirectement à une augmentation de l'absorption du  $\text{MoO}_4^{2-}$ .

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article, intitulé «Nutrient deficiencies in *Brassica napus* modify the ionic composition of plant tissues: a focus on crosstalks between molybdenum and other nutrients» qui sera prochainement soumis à Plos One dès que les règles de confidentialité requises par un dépôt de brevet en cours seront levées.



**Nutrient deficiencies in *Brassica napus* modify the ionic composition of plant tissues: a focus on crosstalks between molybdenum and other nutrients.**

Anne Maillard<sup>1,2,3</sup>, Philippe Etienne<sup>1,2,3</sup>, Sylvain Diquélou<sup>1,2,3</sup>, Jacques Trouverie<sup>1,2,3</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>4</sup>, Alain Ourry<sup>1,2,3,5</sup>

1-Normandie Université, Caen, France

2-UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

3-INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

4-Centre Mondial d'Innovation, CMI, Groupe Roullier, 55 boulevard Jules Verger, 35800 Dinard, France

**Corresponding author:** Alain Ourry, Normandie Université - INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, UNICAEN, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France. Phone: +33 231 565 653; Fax: +33 231 565 360; Email: [alain.ourry@unicaen.fr](mailto:alain.ourry@unicaen.fr).

In preparation for submission to Plos One.



## Abstract:

The composition of the ionome is closely linked to plant nutritional status. Under certain deficiencies, crosstalk induces unavoidable accumulation of some nutrients, which upsets the balance and modifies the ionic composition of plant tissues. Rapeseed plants (*Brassica napus* L.) grown under controlled conditions were subject to individual nutrient deficiencies (nutrient solutions deprived of N, K, P, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo or B) and analyzed by HR ICP-MS to determine the impact of deprivation on the plant ionome. Eighteen situations of increased uptake under mineral nutrient deprivations were identified, some of which have already been described (K and Na, S and Mo, Fe, Zn and Cu). Additionally, as Mo uptake was strongly increased under S, Fe, Cu, Zn, Mn or B deprivations, the mechanisms underlying the accumulation of Mo in these deficient plants were investigated. Results suggest that it could be the consequence of different metabolic disturbances: (i) a direct disturbance of Mo metabolism leading to an up-regulation of Mo transporters such as MOT1, as found under Zn or Cu deprivation, which are nutrients required for MoCo synthesis and (ii) a disturbance of S metabolism leading to an up-regulation of root  $\text{SO}_4^{2-}$  transporters, causing an indirect increase in the uptake of Mo in S, Fe, Mn and B deprived plants.

## Key words:

molybdenum, ionome, nutrient deficiencies, interactions, *Brassica napus*.

## Abbreviations:

DW: dry weight, HR ICP-MS: high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, STAS: sulfate transporter and anti-sigma domain.



## I. Introduction

The plant ionome, defined as the mineral nutrient and trace element composition of an organism, is the result of the accumulation of elements from the soil solution (Salt *et al.*, 2008). In addition to oxygen, carbon and hydrogen, 14 mineral elements, N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B, Cl and Ni, are required by plants. To ensure their growth and development, plants must acquire these nutrients to an appropriate content that ensures physiological function without toxicity (Williams and Salt, 2009). Oilseed rape (*Brassica napus* L.) requires higher levels of N, K, P, S, Mn and B than cereal crops for optimum yield (Grant and Bailey, 1993). As a consequence, winter oilseed rape is highly sensitive to deficiency in any one of these nutrients with a reduction in yield (McGrath and Zhao, 1996; Jackson, 2000) and an impact on the quality of harvested products. For example, under S limitation conditions, the protein quality of seeds was affected with a reduction in the accumulation of S-rich seed storage proteins and the lipid quality was also affected by a reduction in accumulation of C18 derivatives (D’Hooghe *et al.*, 2014). Although the uptake of macronutrients is most often considered, micronutrient deficiencies also impact yield in *B. napus*, as demonstrated for B, Mo and Zn (Mei *et al.*, 2009). Conversely, an increase in the availability of B, Mo and Zn increases the seed oil content and the oil quality (Mei *et al.*, 2009). However, the balance between nutrients is also important to consider because the plant yield is limited by the first nutrient that becomes limiting (Grant and Bailey, 1993). Application of high levels of one nutrient when another nutrient is deficient will, at best, be ineffective in increasing yield and at worst, lead to a yield reduction.

To maintain the internal ion concentrations required to satisfy plant needs, nutrient uptake is tightly regulated. Mineral elements are acquired by a complex network of root transporters that regulate import from soil solution to plants. Adjustment of nutrient uptake according to plant needs is hampered by the limiting and fluctuating availability. To cope with this constraint, plants can modulate the activities of their root transporters. Numerous reviews describe the role of root uptake regulation in maintaining the homeostasis of ions such as N, P and S (Gojon *et al.*, 2009), Fe and Cu (Grusak *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2007), Mn and Zn (Grusak *et al.*, 1999) or Ni, Mo and Cl (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009). Some transporters are highly selective for elements, for example MOT1 or ASY, which are two high-affinity molybdate transporters that specifically transport molybdate (Tejada-Jiménez *et al.*, 2007; Hibara *et al.*, 2013). Similarly, YS1 identified in barley roots has high substrate specificity: only the Fe(III)–phytosiderophore complex can be transported (Murata *et al.*, 2006). The control of these specific transporters allows adjustment of the content of a single element without affecting the uptake of others.



However, other non-specific transporters are able to transport several elements. For example, CLC proteins function as anion channels and are able to transport both chloride and nitrate (De Angeli *et al.*, 2009). In response to a given nutrient deficiency, plants will therefore over-express or up-regulate non-specific transporters with the aim of improving the uptake of the deficient nutrient but may indirectly increase the uptake of other nutrients. Elements of the ionome do not behave independently, but as a combination, interacting with each other due to similar chemical properties or biological roles (Baxter, 2015). Some of these interactions have been described extensively. This is the case for K and Na, which share several common transporters such as HKT1 (a high-affinity K<sup>+</sup> transporter), LCT1 (a low-affinity cation transporter) or NSC (non-selective cation channels) that transport cations by passive diffusion (Schachtman and Liu, 1999). These transporters of both Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> cause crosstalk between these two nutrients. Thus in saline soil, Na will compete with K for uptake; plants will preferentially take up Na<sup>+</sup> in place of K<sup>+</sup> (Schachtman and Liu, 1999; Malvi, 2011). The uptake of each of these elements is therefore highly dependent on the concentration of others in the soil solution. A strong interaction has also been reported between different divalent metals through the iron-regulated transporter IRT1, a member of the ZRT, IRT-like proteins (ZIPs) (Puig *et al.*, 2007; Pilon *et al.*, 2009). In addition to Fe, this transporter is able to transport other metals such as Zn and Mn. As a consequence, a low Fe level affects the uptake of the other ions and *vice versa* (Pilon *et al.*, 2009). Low amounts of Zn increase the uptake of Mn, Mo and B (Billard *et al.*, 2015), with suboptimal levels of Zn inducing an up-regulation of expression of *HvPT1* and *HvPT2* encoding high-affinity P transporters, which improves P uptake in *Hordeum vulgare* (Huang *et al.*, 2000).

Similar opposing relationships occur for nearly all elements. Indeed, under S-deficient conditions, high levels of Mo accumulate in tissues (Schiavon *et al.*, 2012). Molybdate and sulfate are chemical analogs (Dudev and Lim, 2004; Bittner, 2014) and therefore may compete for the binding site of the same transporters (Alhendawi *et al.*, 2005). Sulfate transporters have been described as being potentially involved in root uptake of Mo. Indeed, a high-affinity sulfate transporter previously identified from *Stylosanthes hamate*, termed SHST1, is responsible for the uptake of sulfate from the soil solution (Smith *et al.*, 1995) and is also able to transport molybdate (Fitzpatrick *et al.*, 2008).

On the other hand, nutrient symports have been described. With these an optimal supply of an element will lead to the uptake of other elements to create an overall improved physiological state. An optimum supply of S was reported to ensure an optimum uptake of Fe from the soils (Astolfi *et al.*, 2006). Similarly, increased rates of Mo in the growth medium caused a significant increase in P content, while a decrease in P content occurred when Mo rates decreased (Zakikhani



*et al.*, 2014). The composition of the ionome is therefore closely linked to the nutritional status of plants; a deficiency in one element can seriously disrupt the composition of the ionome due to positive and opposite interactions between elements.

The main objectives of this work were to determine the impact of nutrient deficiencies on the ionome of *B. napus*. The uptake of a range of macronutrients (N, P, K, Ca, S and Mg) and micronutrients (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B and Na) was monitored in *B. napus* subject to individual nutrient deficiencies. Additionally, as Mo uptake was strongly modified by S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- and B deficiencies, the mechanisms underlying the accumulation of Mo in these deficient plants were investigated. Consequently, the expression patterns of several molybdate and sulfate transporter genes and of the *BnaCnx1* gene, which is supposed to be involved in the regulation of the MoCo synthesis, were monitored.

## II. Materials and Methods

### II.1. Growth conditions of plants

Seeds of *Brassica napus* var. Bohème were germinated on perlite over demineralized water for 2 days in the dark. Just after third leaf emergence, seedlings were transferred to a 10 l tank (10 seedlings per 10 l -plastic tank) containing the following nutrient solution: 1.25 mM KNO<sub>3</sub>, 1.25 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA 2 NaFe, 10 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 µM MnSO<sub>4</sub>, 3 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 µM CuSO<sub>4</sub>, 0.7 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1 µM CoCl<sub>2</sub>, 0.04 µM NiCl<sub>2</sub>, 0.1 mM SiO<sub>2</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.25 mM KCl. The nutrient solution was buffered to pH 6.5 with 2 mM CaCO<sub>3</sub> and was renewed every 2 days. Plants were grown under greenhouse conditions, with a thermoperiod of 20/17 °C day/night and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (Philips, MASTER Green Power T400W, Amsterdam, Netherlands) supplying an average photosynthetically active radiation (PAR) of 350 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at canopy height.

After 20 days of growth, plants were separated into thirteen sets: plants were grown with the complete nutrient solution previously described (control plants) or with nutrient solutions deprived of N, K, P, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo or B. The composition of these nutrient solutions was chosen in order to maintain the same concentration of each nutrient and the same pH, as described in Maillard *et al.*, 2015.

Four independent samples each consisting of three individual plants were harvested at the beginning of nutrient-deprivation ( $t_0$ ) and after growth cessation ( $t_f$ ). Growth cessation for each deprivation treatment was detected by non-destructive estimation of plant weight obtained by daily measurements of total plant fresh weight of control and deficient plants. Leaves and petioles



present at the beginning of nutrient-deprivation (referred as “old leaves” and “old petioles”, respectively) were distinguished during harvests from leaves appearing during deprivation (referred as “young leaves” and “young petioles”, respectively). In order to distinguish old from young leaves and petioles during the later harvests, they were marked at  $t_0$  using correction fluid. At each date of harvest ( $t_0$  and  $t_f$ ), whole roots from control and depleted plants were collected. An aliquot of each tissue was weighed and dried in an oven (60°C) for dry weight (DW) determination and kept for further analysis.

## II.2. Element analysis by mass spectrometry

Dry plant samples were ground to a fine powder with 0.4 mm diameter inox beads in an oscillating grinder (mixer mill MM400; Retsch, Haan, Germany) for further analysis. For the analysis of total N and S contents, an aliquot of around 4 mg DW of each plant organ sample was placed in tin capsules for total N and S analysis in order to analyze between 60 and 80 µg N. The total N and S amounts in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Nu Instrument, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

K, Ca, P, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni and B were quantified by Inductively High Resolution Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2<sup>TM</sup>) with prior microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) (800 µl of concentrated HNO<sub>3</sub>, 200 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1 ml of Milli-Q water for 40 mg DW). For the determination by HR ICP-MS, all the samples were spiked with two internal-standard solutions of Gallium and Rhodium, respectively, for a final concentration of 10 and 2 µg.l<sup>-1</sup>, diluted to 50 ml with Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0 % (v/v) of nitric acid, then filtered at 0.45 µm using a teflon filtration system (Filtermate, Courtagé Analyses Services, Mont-Saint-Aignan, France). Quantification of each element was performed using external standard calibration curves. The amount of a given element (E) in a tissue “i” at a given time “t” was calculated from dry weight (DW) and element concentration (% E as % of DW) as:

$$E = \frac{\% E_{i,t} \times DW_{i,t}}{100}$$

Uptake of each nutrient by control or deficient plants was calculated as the difference between plant content of each element (sum of all harvested tissues) between  $t_0$  and  $t_f$ . Because the non-destructive estimation of plant growth cessation under deprivation at time  $t_f$ , showed a lag time of 2-5 days, during which growth of control plants was maintained, the normalized uptake of each element ( $U_{NE}$ ) by control plants at time  $t_f$ , was calculated as follows:

**Table I. Q-PCR primer sets.**

<b>Gene</b>	<b>Accession number</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	DQ312264	5'-gcctggatggtgtgacct-3'	5'-gaagttagcagcaccttg-3'
<i>18S rRNA</i>	X16077	5'-cggataaccgtagtaattctag-3'	5'-gtactcattccaattaccagac-3'
<i>BnaSultr1.1</i>	AJ416460	5'-agatattcgatcggaccag-3'	5'- gaaaacgccagcaaagaaag-3'
<i>BnaSultr1.2</i>	AJ311388	5'-ggtgtagtcgctggaatggt-3'	5'-aacggagtgaggaagagcaa-3'
<i>BnaMot1</i>	NM_128127	5'-ctgccaggattggactta-3'	5'-agatccccaacacgaacaag-3'
<i>BnaAsy</i>	XM_009145653	5'-tcagctcatctcccaaagt-3'	5'-agtcctacaacgcctcaaa-3'
<i>BnaCnx1</i>	NM_122108.3	5'-acgaggagcagaagagaca-3'	5'-caacaaagtcttcagcaacca-3'

$$U_{NE} = \frac{U_{AE} \times DW_D}{DW_C}$$

with  $DW_C$ , DW of control plants,  $DW_D$ , DW of deprived plants and  $U_{AE}$ , the uptake of element E achieved by control plants. This normalized uptake reflects the uptake expected by control plants when they reached the DW of nutrient deprived plants at growth cessation, which provides a more rational way to compare uptake of each nutrient by these two sets of plants. This normalization method had no effects ( $U_{NE}=U_{AE}$ ) when deprivation had no significant effect on growth (case of Mn or B deprivation).

### II.3. RNA extraction

Total RNA was extracted from 200 mg of fresh matter. Frozen samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750  $\mu$ l of extraction buffer [0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1 % SDS (w/v), pH 8] and 750 ml of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s and, after addition of 750  $\mu$ l of chloroform/isoamylalcohol (24:1, v:v), the homogenate was centrifuged (15 000 g, 5 min, 4°C). The supernatant was transferred into a 4 M LiCl solution (750  $\mu$ l) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 100  $\mu$ l of sterile water. RNA was then purified with an RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and real time Quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) analysis.

### II.4. Reverse transcriptase (RT) and Q-PCR analysis

For Reverse Transcription (RT), 1  $\mu$ g of total RNA was converted to cDNA with an “iScript cDNA synthesis kit” according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Q-PCR amplifications were performed using specific primers for each housekeeping gene (*EFL- $\alpha$*  and *18S rRNA*) and target genes (Table I). Q-PCRs were performed with 4  $\mu$ l of 200x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) in a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). A 2 step program, composed of 42 cycles of a denaturing step at 95°C for 15 s followed by an annealing and extending step at 60°C for 40 s, was used. For each pair of primers (Table I), a threshold value and PCR efficiency were determined using a cDNA preparation diluted 10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was around 100 %. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after Q-PCRs and by sequencing the Q-PCR product to confirm that the correct amplicon was

**Table II. Effects of N-, K-, Ca-, P-, S-, Mg-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn-, Mo- or B-deprivation on relative biomass production (as % of control plants) and relative uptake (as % of control plants) of the respective nutrients.**

Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (N=4 for biomass production, n=16 for uptake). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between control and nutrient deprived plants for  $P<0.05$ ,  $P<0.01$  and  $P<0.001$ , respectively.

Deprivation	Relative biomass production, as % of control plants	Biomass of control plants at harvest	Relative uptake, as % of control plants	Uptake achieved by control plants	Number of days required to reach a significant growth reduction
-N	29.9% $\pm$ 1.46%***	13.3 g $\pm$ 0.3	-5% $\pm$ 0.98%***	463.7 mg $\pm$ 26.73	11
-K	49.6% $\pm$ 2.25%**	12.8 g $\pm$ 1.35	-0.6% $\pm$ 0.09%***	464.5 mg $\pm$ 38.52	15
-Ca	57.4% $\pm$ 1.57%***	21.5 g $\pm$ 1.11	-2.7% $\pm$ 0.32%***	797.7 mg $\pm$ 25.34	18
-P	32.5% $\pm$ 1.53%***	13.3 g $\pm$ 0.3	-15.1% $\pm$ 0.42%***	54 mg $\pm$ 1.62	15
-S	31.4% $\pm$ 1.02%***	13.3 g $\pm$ 0.3	-0.1% $\pm$ 0.52%***	101.2 $\mu$ g $\pm$ 3.39	15
-Mg	52.2% $\pm$ 2.43%**	12.8 g $\pm$ 1.35	2.5% $\pm$ 0.17%***	35.7 mg $\pm$ 2.86	15
-Fe	86.7% $\pm$ 1.92%*	21.1 g $\pm$ 0.66	-1.9% $\pm$ 0.06%***	13.6 mg $\pm$ 0.8	30
-Cu	81.7% $\pm$ 2.53%*	13.3 g $\pm$ 0.3	20.3% $\pm$ 0.54%***	83.8 $\mu$ g $\pm$ 4.5	30
-Zn	69.2% $\pm$ 1.79%***	13.3 g $\pm$ 0.3	22.1% $\pm$ 0.93%***	400.1 $\mu$ g $\pm$ 17.42	30
-Mn	93.8% $\pm$ 2.24%NS	13.3 g $\pm$ 0.3	-3.6% $\pm$ 0.12%***	1237.1 $\mu$ g $\pm$ 105.53	>30
-Mo	79.3% $\pm$ 2.37%**	13.3 g $\pm$ 0.3	-7.3% $\pm$ 0.18%***	940.5 $\mu$ g $\pm$ 31.94	>30
-B	91.0% $\pm$ 2.61%NS	13.3 g $\pm$ 0.3	27% $\pm$ 1.26%***	529.2 $\mu$ g $\pm$ 67.75	>30

produced from each pair of primers (Eurofins, Ebersberg, Germany or Biofidal, France, according to the sequence considered).

The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample [corresponding to untreated plants at the same time of harvest] and was determined with the delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) method using the following equation: relative expression =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , with  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{treated}} - \Delta Ct_{\text{control}}$  and with  $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - \Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$  (for calculations, the geometric mean was considered between the Ct of the housekeeping genes), where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, the relative expression of the different genes in the control sample of the experiment was equal to 1, and on this basis the relative expression of other treatments was then compared with the control.

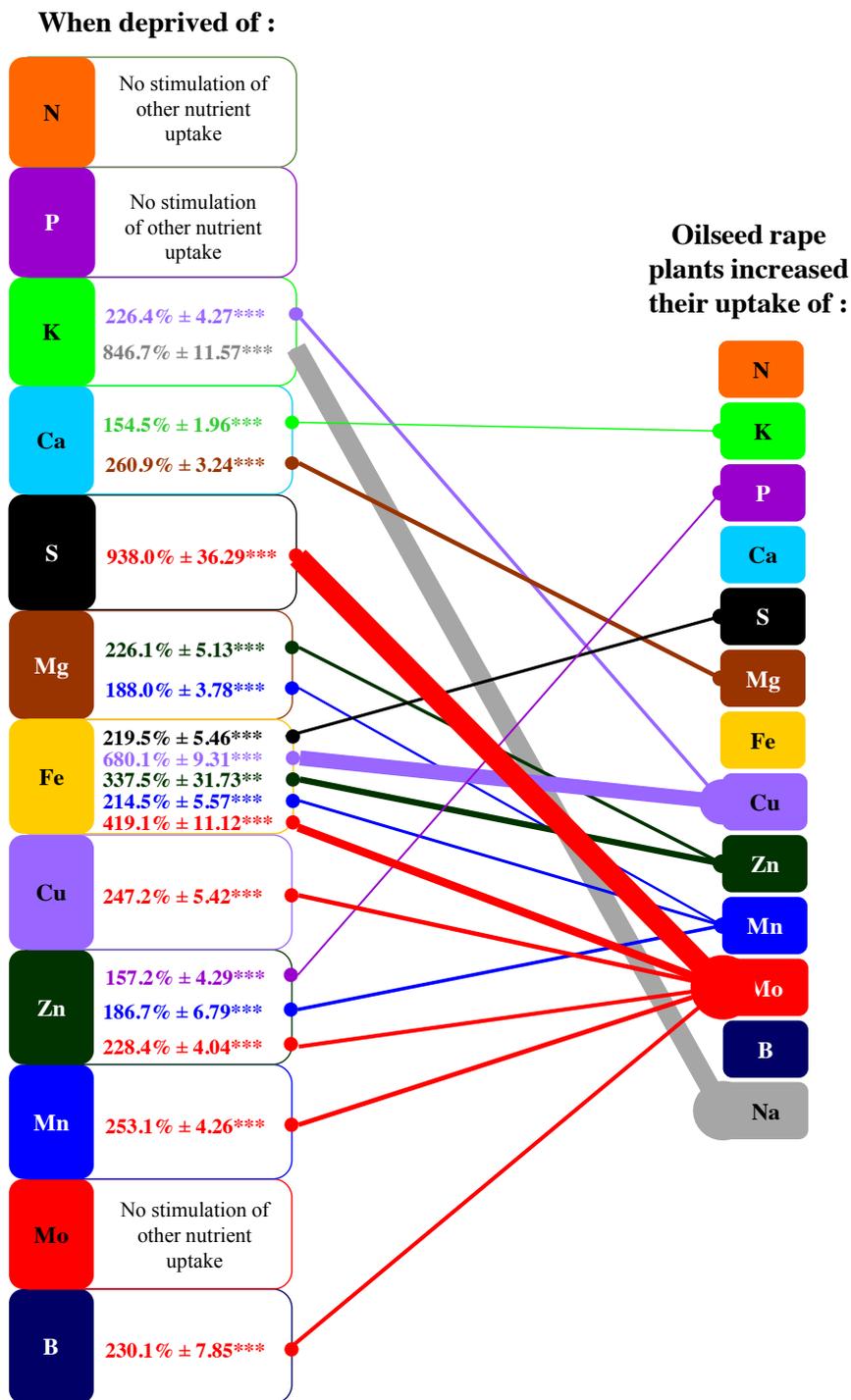
## II.5. Replications and statistical analysis

Experiments were conducted with four independent biological replicates each corresponding to three individual plants. Data for DW are given as the mean  $\pm$  SE for  $n=4$  while uptake data (difference of “element E” plant content between  $t_0$  and  $t_f$ , calculated randomly between two sets of four replicates) are given as the mean  $\pm$  SE for  $n=16$ . Significant differences between Control and Deprived plants and time of harvest ( $t_0$  versus  $t_f$ ) were evaluated using the Student’s test as explained in the legend of each figure.

## III. Results

### III.1. Some mineral nutrient deprivations in *B. napus* reduced growth but increased the uptake of other mineral nutrients

Plant growth rate was significantly reduced by N-, K-, Ca-, P-, S-, Mg-, Fe-, Cu-, Zn- and Mo-treatments relative to control plants (up to 70.1 % reduction in dry weight in N-deprived plant) (Table II). This was the result of a significant reduction in the growth of emerging leaves, petioles and roots (data not shown). The biomass production was not significantly affected in Mn- and B-deprived plants. Compared to control plants, the uptake of each element (table II) between  $t_0$  (start of deprivation) and  $t_f$  (time of growth cessation in deprived plants) during deprivation was effectively reduced by about 100 % for most nutrients. On the other hand, in Cu-, Zn- and B-depleted plants, the respective uptake of Cu, Zn and B reached only 20.3 %, 22.1 % and 27.0 % of the uptake achieved by control plants, indicating that traces of these nutrients were present in the nutrient solution (probably derived from demineralized water) and hence, taken up by plants.



**Figure 1. Crosstalks between deprivation of one nutrient (N-, K-, P-, Ca-, S-, Mg-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn-, Mo- or B-deprivation) through stimulation of relative uptake (as % of uptake by control plants) of other nutrients (N, K, P, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B and Na).**

Data are given as the mean ± s.e. (n=16). \*\*\* indicates significant differences between control and nutrient deprived plants for  $P < 0.001$ . Only highly significant effects ( $P < 0.001$ ) that correspond to at least a 150 % increase in uptake are represented.

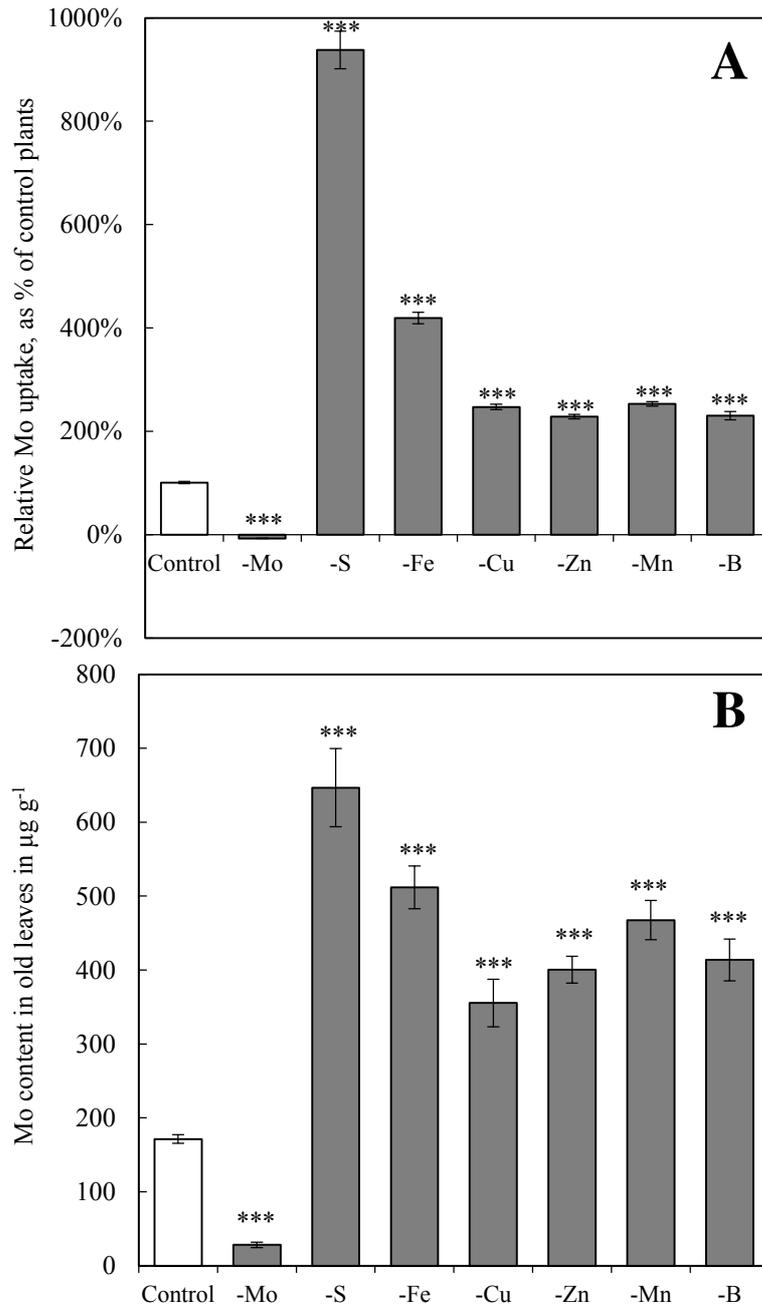
The uptake of other mineral nutrients was affected negatively by some nutrient deprivations (such as N and P, data not shown) and it was only N, P or Mo deprivation that failed to induce an increased uptake of other mineral nutrients (Figure 1). On the other hand, eighteen situations were identified (Figure 1) during which a given mineral nutrient deprivation increased the uptake of other nutrients, despite growth reduction or a growth similar to control plants. For example, K deficiency induced a strong increase in Na ( $846.7 \% \pm 11.57$ ) and Cu ( $226.4 \% \pm 4.27$ ) uptake, relative to uptake in control plants while Ca deprivation increased the uptake of K ( $154.5 \% \pm 1.96$ ) and Mg ( $260.9 \% \pm 3.24$ ). Mg-deprivation induced an increase in Zn and Mn uptake. In Fe-depleted plants, S, Cu (of 680 %), Zn, Mn and Mo uptake were significantly increased relative to control plants. In Cu, Mn or B depleted plants, only Mo uptake was stimulated, while Zn deprivation also stimulated P and Mn uptake.

Overall, Mo appears as the most reactive mineral nutrient and its uptake was significantly increased by S, Fe, Mn, Zn, Cu and B deprivations by about 938 %, 419 %, 253 %, 228 %, 247 % and 230 %, respectively, as summarized in Figure 2A. Such increases in relative uptake were detected directly from leaf nutrient content irrespective of the growth rate (Figure 2B). For example, the Mo content in old leaves was significantly increased by S-deprivation from  $171.4 \pm 5.84 \mu\text{g g}^{-1}$  in control plants to  $646.8 \pm 52.79 \mu\text{g g}^{-1}$ . Similarly, Mo content was also higher in old leaves of Cu-, Zn-, Mn- and B-deprived plants than in control plants.

### III.2. Effects of mineral nutrient deprivation on selected molybdate and sulfate transporters

The relative expression of genes encoding root molybdate transporters such as MOT1 and ASY was quantified by Q-PCR in nutrient deprived plants (Figure 3). The expression of *BnaMot1* relative to control plants was up-regulated in S-, Cu- and Zn-deprived plants by 1.57, 2.32 and 3.78 fold, respectively (Figure 3.A). In the meantime, the level of *BnaMot1* transcripts remained unchanged under other nutrient deprivations (Fe, Mn and B) that increased Mo uptake (Figure 2.A). Similarly, *BnaAsy* relative expression was not affected significantly by S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn-, Mo- or B- deprivation, relative to control plants (Figure 3.B).

As sulfate transporters such as SULTR1.1 and SULTR1.2 have been described to be potentially involved in root uptake of Mo, the expression of genes encoding these transporters was also examined in the roots (Figure 4). In Cu- and Zn-depleted plants, *BnaSultr1.1* (Figure 4.A) and *BnaSultr1.2* (Figure 4.B) gene expression in the roots remained similar to control plants. On the other hand, the level of *BnaSultr1.1* transcripts was strongly up-regulated by S-deprivation (by 219 fold compared to control plants) and to a lesser extent by Mn-, Fe-, Mo- and B- deprivation (by 23,



**Figure 2. Relative Mo uptake (A, as % of control plants, for which Mo uptake was  $940 \pm 32 \mu\text{g Mo plant}^{-1}$ ) and leaf Mo content (B,  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW) in *B. napus* in response to Mo-, S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- or B-deprivation.**

Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (n=16 for uptake, N=4 for Mo concentrations). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between control and nutrient deprived plants for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.

8, 4 and 3 fold, respectively). The gene expression of *BnaSultr1.2* encoding the second high-affinity sulfate transporter was also up-regulated by S-, Fe-, Mn- and B-deprivation relative to control plants (Figure 4.B) by 13, 10, 7 and 4 fold, respectively. While the uptake of S was strongly reduced ( $-100.1 \% \pm 0.52$ ) in S-deprived plants compared to control plants (Figure 5), more surprisingly it was stimulated by Fe- ( $+119.5 \% \pm 5.46$ ) and Mn-deficiency ( $+13.9 \% \pm 1.94$ ) (Figure 5), which also enhanced the transcript accumulation of root  $\text{SO}_4^{2-}$  transporters (Figure 4). The relative S uptake in Mo-, Cu-, Zn- and B-deprived plants was similar to control plants.

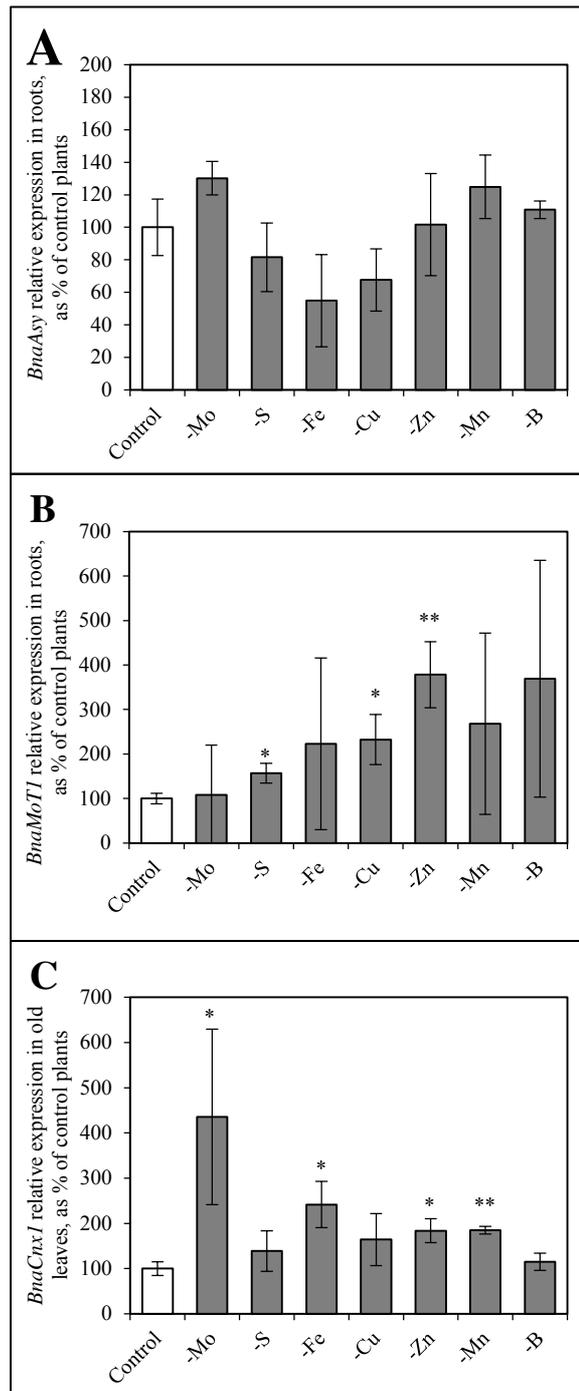
Because Mo uptake was affected by several mineral deficiencies and considering the importance of MoCo synthesis for different enzymes, as well as its complex synthesis pathway requiring several mineral nutrients, the relative expression of *BnaCnx1*, a key gene involved in its synthesis, was quantified. It was found to be up-regulated by Mo deficiency (4.36-fold higher than in control plants) (Figure 3.C) and also significantly increased by about 2 fold in Fe-, Zn- and Mn-depleted plants (Figure 3.C).

## IV. Discussion

### IV.1. Crosstalks identified in response to individual mineral nutrient deficiencies

It is usually assumed that plant nutrient contents are tightly regulated through balanced activities of membrane transporters that mediate the uptake and the distribution of nutrients in order to ensure a relative compositional homeostasis. Macronutrients such as N or P are essential for plant growth and development, being required in structure, in energy storage or for the synthesis of proteins, which contain about 85 % of the N in plants, and therefore they have a role in most plant biochemical processes. A deficiency in one of these elements has a drastic effect on growth and plant metabolism and reduces uptake of a large number of nutrients. For example, in N-deprived plants, uptake of K ( $-71.7 \% \pm 1.96$ ), S ( $-65.4 \% \pm 1.78$ ), P ( $-63.4 \% \pm 2.02$ ) and Ca ( $-73.0 \% \pm 1.99$ ) were strongly negatively affected (data not shown). Likewise, N, K or S uptake was decreased under P-deficiency in *B. napus* by -36.1, -68.1 and -64.0 %, respectively (data not shown).

Other nutrient deficiencies increased the uptake of other elements. Indeed, crosstalk induces unavoidable accumulation of some nutrients, which upsets the balance and modifies the ionic composition of plant tissues as previously shown with Fe or P deficiencies (Baxter *et al.*, 2008b). Eighteen situations of significantly increased uptake under mineral nutrient deprivations were identified (Figure 1), amongst which there was a strong accumulation of Na of  $846.7 \% \pm 11.57$  relative to control plants under K deficiency (Figure 1.). This crosstalk between K and Na is widely documented in the literature (Schachtman and Liu, 1999; Malvi, 2011) resulting from up-regulation



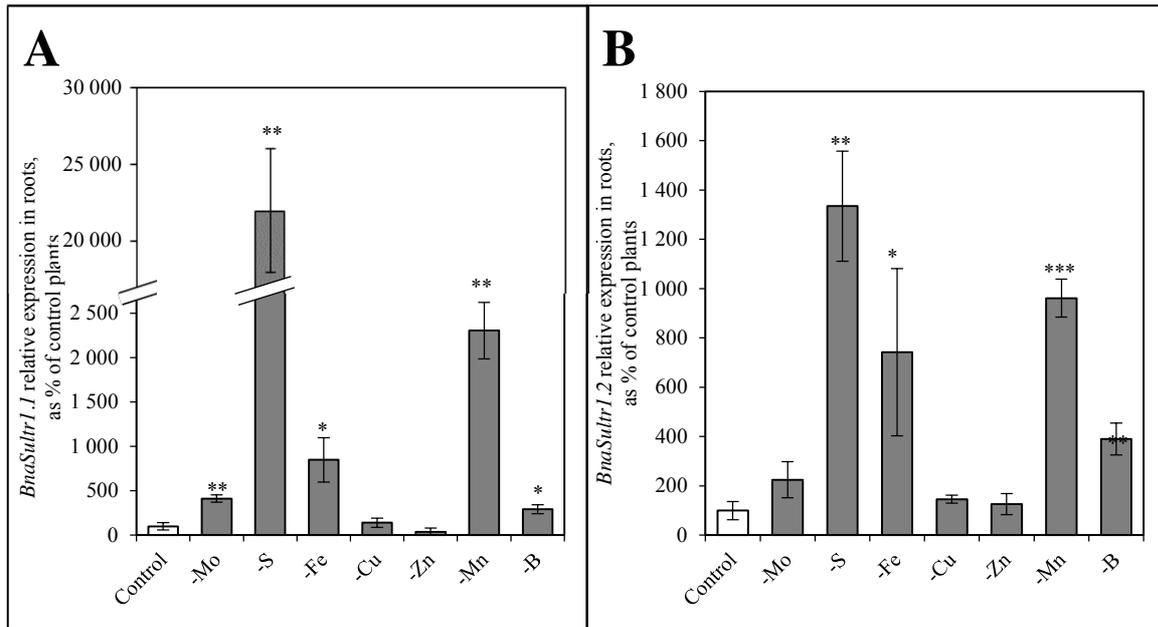
**Figure 3. Effect of Mo-, S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- and B-deprivation on relative expression of genes encoding the molybdate transporters *BnaMot1* (A) and *BnaAsy* (B) expressed in roots and on relative expression of a key gene involved in the MoCo synthesis pathway, *BnaCnx1* (C) expressed in old leaves (data given as % of control plant expression).**

Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (n=4). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between control and nutrient deprived plants for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.

by K-deficiency of non-selective uptake systems such as HKT1 (a high affinity K<sup>+</sup> transporter), LCT1 (a low-affinity cation transporter) or NSC (non-selective cation channels), which transport cations by passive diffusion. Phosphate uptake, which is normally controlled by the P status of plants, was also disturbed under Zn deficiency, leading to an increase in P uptake of 157.2 % in Zn-deficient plants relative to control plants (Figure 1.). This is consistent with previous work in *Gossypium hirsutum* and in *Hordeum vulgare* reporting a high content of P in Zn-deficient plants (Cakmak and Marschner, 1986; Huang *et al.*, 2000). Indeed, Zn plays a role in the down regulated expression of the *HvPt1* and *HvPt2* high-affinity P transporters in *H. vulgare* (Huang *et al.*, 2000). Similarly, Fe deficiency led to an accumulation of Cu, Zn and Mn (Figure 1.). This accumulation has been reported as being caused by an up-regulation of the iron-regulated transporter, IRT1 (a member of the ZRT, IRT-like protein (ZIP) divalent metal transporter family), in response to Fe-deficiency (Puig *et al.*, 2007; Pilon *et al.*, 2009), and which is also able to transport Zn and Mn.

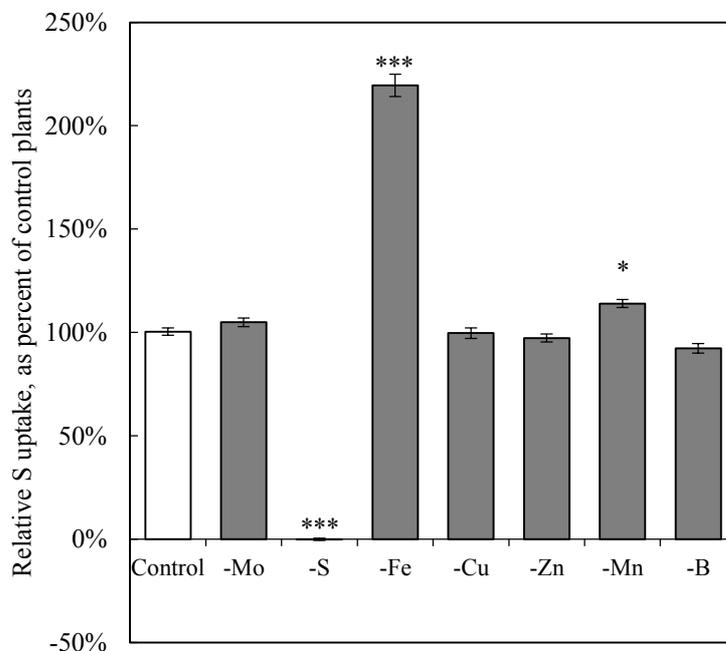
#### IV.2. Increased Mo uptake in Cu and Zn-deficient plants: a consequence of disturbances in MoCo synthesis?

Amongst the quantified nutrients, Mo was the most affected by other deficiencies (Figure 1). Increased Mo uptake was found under Zn- and Cu-deficiencies in *B. napus*. This is consistent with previous work reporting a higher content of Mo in *B. napus* when submitted to Cu- (Billard *et al.*, 2014) or Zn-deficiency (Billard *et al.*, 2015). In contrast, a Mo supply caused secondary Cu and Zn deficiencies (Ndakidemi *et al.*, 2011). Two transporters of molybdate have been identified as being involved in Mo uptake at the soil-root interface: MOT1 and ASY (Tejada-Jiménez *et al.*, 2007; Hibara *et al.*, 2013). The expression of *BnaAsy* remained unchanged under all tested nutrient deficiencies (Figure 3.A), which suggests that the accumulation of Mo in response to Zn- and Cu-deficiency was not due to an up-regulation of the ASY transporter. The sequence similarity and subcellular localization of ASY suggest that it acts as a molybdate transporter, but its Mo uptake activity and Mo affinity have not been studied *in planta*. Another Mo transporter, MOT1 identified in *Clamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jiménez *et al.*, 2007) and *Arabidopsis thaliana* (Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008a) might be necessary for uptake of Mo from the soil. The levels of *BnaMot1* transcripts were increased in Cu- and Zn-deprived plants by 2.32-fold and 3.78-fold, respectively, compared to control plants (Figure 3.B). An upregulation of *BnaMot1* gene expression has already been reported in Cu-depleted plants in *B. napus* (Billard *et al.*, 2014), but to our knowledge has not been previously described under Zn-deficiency. Overall, this suggests that the increase in Mo uptake in Cu- and Zn-deprived plants may be the result of an up-regulation of *BnaMot1* gene expression in roots.



**Figure 4. Effect of Mo-, S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- or B-deprivation on relative expression of genes encoding sulfate transporters: *BnaSultr1.1* (A) and *BnaSultr1.2* (B) expressed in roots of *B. napus* as % of control plants.**

Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (N=4). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between control and nutrient deprived plants for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.



**Figure 5. Relative sulfur uptake in *B. napus* expressed as % of control plant values in response to S-, Fe-, Cu-, Zn-, Mn- or B-deprivation.**

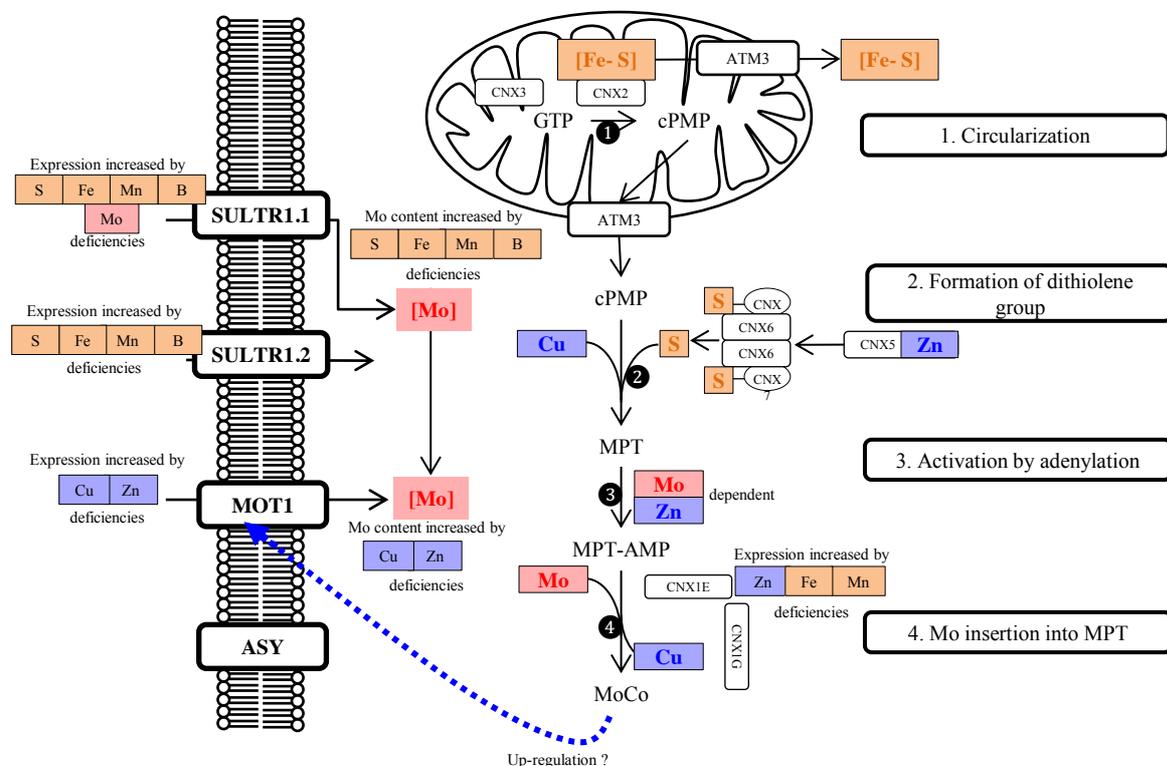
Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (n=16). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between control and nutrient deprived plants for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.

Molybdenum is required for the synthesis of the MoCo factor found at least in six key molybdo-enzymes in plants: nitrate reductase, aldehyde oxidase, sulfite oxidase, xanthine oxidase, nitrogenase and mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) as reviewed by Schwarz and Mendel, 2006, Schwarz *et al.*, 2009, Llamas *et al.*, 2011 and Bittner, 2014. The MoCo biosynthetic pathway involves at least four steps (Figure 6) requiring different elements such as Cu and Zn but also S and Fe (Schwarz and Mendel, 2006; Schwarz *et al.*, 2009; Llamas *et al.*, 2011; Bittner, 2014) (Figure 6). Although the role of Zn is unclear, it could be involved in stabilization of the CNX5 protein, which resulfurates MPT synthase for the next cycle (Llamas *et al.*, 2011). An atom of Cu is required to form the Cu–MPT complex (Figure 6). Once transferred from CNX1G to CNX1E, the adenylation is cleaved in the presence of  $Mg^{2+}$  or  $Zn^{2+}$ . In the final step, the CNX1E domain catalyzes the insertion of Mo into MPT in place of Cu, thus yielding physiologically active MoCo (Figure 6). Cu could potentially act as a protecting agent for the reactive dithiolate before the insertion of Mo as suggested by purification of an *in vivo*-formed Cu–MPT complex (Kuper *et al.*, 2004). It may also have a role in Mo insertion. Therefore MoCo biosynthesis could be affected under Zn or Cu-limited conditions.

The *BnaMot1* up-regulation leading to the accumulation of Mo may be explained by a defect in MoCo synthesis in the case of Zn and Cu deficiencies (Figure 3.B., Figure 6). CNX1, the major enzyme of MoCo synthesis, has been suggested as having a role as a Mo sensor being involved in the down-regulation of MOT1 activity (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009). However, there is no experimental evidence to confirm this hypothesis (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009). *BnaCnx1* expression was up-regulated in Fe-, Zn-, Mn- and Mo-deficient plants (Figure 3.C). There was therefore no apparent link between *BnaCnx1* and *BnaMot1* gene expression, although regulation may be achieved at the post-transcriptional level. The increase in Mo uptake under Cu- and Zn-deficiencies could be the result of a direct disturbance of Mo metabolism leading to an up-regulation of the MOT1 transporter (Figure 6).

#### **IV.3. Increased Mo uptake in S-, Fe-, Mn- and B-deficient plants: an indirect consequence of up-regulation of root sulfate transporters**

Under our conditions, Mo uptake was also significantly increased by S-, Fe-, Mn- and B-deficiencies in *B. napus*. S deficiency strongly increased Mo uptake by 938 % in *B. napus* (Figure 2). This result agrees with several findings reporting that S-deficiency increases Mo uptake, as reported for a few plant species (Hunashikatti *et al.*, 2000; Balik *et al.*, 2006; Schiavon *et al.*, 2012). Under our conditions, Mo uptake was significantly higher in different metal-deprived plants (Mn- and Fe-) (Figure 2). Fe deficiency enhanced Mo uptake by 419 % relative to control plants



**Figure 6. Crosstalk between S, Fe, B, Mn, Cu, Zn and Mo during MoCo synthesis.**

The involvement of S, Fe, Cu, Zn and Mo are presented sequentially in the 4 steps of the Moco biosynthesis pathway. The proteins CNX2 and CNX3 catalyze the conversion of GTP to cPMP. cPMP is then exported from mitochondria by the mitochondrial ABC transporter ATM3. In the cytosol, MPT-synthase composed of CNX6 and CNX7 subunits transfers two atoms of S to cPMP to form MPT. MPT synthase is then sulfurated again by the MPT synthase sulfurase (CNX5), which contains one Zn atom per monomer. At the end of this step, an atom of Cu is bound to MPT to protect the reactive dithiolate before the insertion of Mo. MPT is activated by adenylation to form MPT-AMP. This step is Mo and Zn-dependent. In the final step, MPT-AMP is transferred to the CNX1-E domain, which cleaves the adenylate from MPT and then catalyzes the insertion of Mo in place of Cu to form MoCo. Under Cu- and Zn-deficiencies, accumulation of Mo might be due to feedback signals from disturbances in MoCo synthesis (due to low Cu and Zn contents), which could induce an up-regulation of the *BnaMot1* gene (encoding MOT1 transporter). In contrast, under S-, Fe-, Mn- and B-deficiencies, the increase in Mo uptake seems to be an indirect cause of the prior up-regulation of the *BnaSutr1.1* and *BnaSutr1.2* genes, which encode root sulfate transporters.

GTP: Guanosine TriPhosphate; cPMP: cyclic Pyranopterin MonoPhosphate; MPT: MolybdoPTerin; MPT-AMP: Adenylated MolybdoPTerin; CNX: Cofactor for Nitrate reductase and Xanthine deshydrogenase; [Fe-S]: Iron sulfur cluster.

(Figure 2). An inverse relationship between the shoot contents of Fe and Mo has been highlighted already by Zakikhani *et al.*, (2014), with the highest Fe content in shoots being reported under a low-Mo supply and *vice versa*. In contrast, Baxter *et al.*, 2008b reported that the Mo content in shoot tissues was reduced in Fe-deficient plants. It was then suggested that this could be due to acidification of the rhizosphere in response to Fe deficiency, which could lead to a decrease in Mo solubility by the adsorption of molybdate by iron oxides leading to a decrease in Mo uptake (Baxter *et al.*, 2008b). However under our conditions, the pH of the nutrient solution was maintained constant to avoid changes in the availability of nutrients. It had also been shown that Mn and Mo uptake are inversely proportional. Indeed, a Mn deficiency was also observed in response to a high Mo supply (Ndakidemi *et al.*, 2011). In accordance with these results, an increase in the Mo uptake of 253 % in Mn-deprived plants was recorded (Figure 2). To a lesser extent, the uptake of Mo was also enhanced by B deprivation (+230 %). Likewise, (Ndakidemi *et al.*, 2011) reported that Mo supply decreased B uptake in roots of *P. vulgaris*.

Compared to control plants, the level of *BnaAsy* transcripts remained unchanged in S-, Fe, Mn- and B-deprived plants (Figure 3.A), whereas *BnaMot1* expression was only increased in response to S-deficiency (Figure 3.B). Indeed, it has been reported that the level of *BnaMot1* transcripts was higher in S deficient *Triticum aestivum* (Shinmachi *et al.*, 2010). Finally, Mo-deficiency did not induce an accumulation of *BnaMot1* transcripts (Figure 3B), which is a similar result to that reported in *Arabidopsis thaliana* (Ide *et al.*, 2011).

An alternative transport system ensuring the provision of Mo to the cell should therefore be considered. Prior to 2007, molecular mechanisms controlling Mo uptake were unknown (Hawkesford and Barraclough, 2011). So it was thought that molybdate transport occurred non-specifically through sulfate transporters due to the fact that molybdate is similar to sulfate in terms of net charge, structure and hydrogen binding properties (Dudev and Lim, 2004; Bittner, 2014). A high-affinity sulfate transporter previously identified from *Stylosanthes hamate*, termed SHST1, is responsible for the uptake of sulfate from the soil solution (Smith *et al.*, 1995), and is also able to transport molybdate (Fitzpatrick *et al.*, 2008). SULTR1.1 and SULTR1.2, both homologs of SHST1, could be implicated in Mo uptake. Indeed, in response to S-, Fe-, Mn-, Mo- and B-deprivation, gene expression of *BnaSultr1.1*, and to a lesser extent *BnaSultr1.2*, was increased in roots (Figure 4.A-B). The accumulation of Mo in S-, Fe-, Mn- and B-deficient plants may be the indirect consequence of this increase in gene expression of sulfate transporters. Moreover, as expected, the up-regulation of the *BnaSultr1.1* gene led to an increase in S uptake in Fe- and Mn-deficient plants (Figure 5.). The interaction between S and Fe metabolisms is important, as most of the metabolically active Fe is bound to S in Fe-S clusters (Fioreri *et al.*, 2013). The main function



of Fe–S cluster proteins is electron transfer, with a key function in respiratory chain complexes in mitochondria and in the photosynthetic apparatus in the chloroplasts (Forieri *et al.*, 2013). Fe-S cluster proteins are also involved in MoCo factor synthesis. S and Fe are therefore intrinsically linked, with the S availability affecting the uptake of Fe (Astolfi *et al.*, 2006). S deprivation has been reported to limit Fe-deficiency responses in *Solanum lycopersicum* (Zuchi *et al.*, 2009). Similarly, and to a lesser extent, S and Mn metabolism are linked. Manganese is also involved in redox reactions within the photosynthetic electron transport system in chloroplasts. Mn-deficiency, just like Fe-deficiency, could therefore lead to an up-regulation of root sulfate transporters. Overall, the increase in Mo uptake could result from S metabolism disturbances leading in turn to S transporter up-regulation, and indirectly causing Mo accumulation in S-, Fe-, Mn- and B-deprived plants (Figure 6).

## V. Conclusion

The use of individual mineral nutrient deficiencies provides a way to decipher the multiple interactions that may exist between the uptake and metabolic use of minerals. About eighteen different interactions were identified at the uptake level, some of which were already described (K and Na, S and Mo, Fe, Zn and Cu). The uptake of Mo was the most frequently affected, being increased under S, Fe, Cu, Zn, Mn or B deprivations and the results suggest that this could be the consequence of different metabolic disturbances: (i) a direct disturbance of Mo metabolism leading to up-regulation of Mo transporters such as MOT1, as found under Zn or Cu deficiency, which are nutrients required for MoCo synthesis and (ii) a disturbance of S metabolism leading to up-regulation of root  $\text{SO}_4^{2-}$  transporters, indirectly causing an increased uptake of Mo in S, Fe, Mn and B deficient plants.

### Acknowledgements

This work, conducted through the SERAPIS project, was supported by the Regional Council of Lower Normandy (grant number 12P03057), the Regional Council of Brittany (grant number 12008011), the European Regional Development Fund (grant number 33525) and the Centre Mondial d’Innovation - Roullier Group. The authors acknowledge the PLATIN’ (Plateau d’Isotopie de Normandie) core facility for element analysis used in this study. The authors thank Dr Laurence Cantrill for improving the English of this manuscript.



---

## CHAPITRE VI

**Le transport racinaire aspécifique de nutriments  
permet de développer des indicateurs précoces de  
la nutrition minérale :  
le cas du molybdate et du sulfate**

---





## CHAPITRE VI

### **Le transport racinaire aspécifique de nutriments permet de développer des indicateurs précoces de la nutrition minérale : le cas du molybdate et du sulfate**

---

Les résultats du chapitre précédent ont montré que le ionome est largement affecté par une carence nutritionnelle, conduisant par exemple à une augmentation de l'absorption du Mo lors d'une carence en Fe, en Cu, en Zn, en Mn ou en B mais aussi beaucoup plus largement lors d'une carence en S durant laquelle l'expression des gènes *BnaSultr1.1* et *BnaSultr1.2* est massivement accrue. Une carence en S a été appliquée chez *B. napus* afin de décrire précisément la cinétique d'accumulation du Mo. Parallèlement, l'expression des transporteurs de sulfate et molybdate ont été suivis par analyses transcriptomiques. Dans un second temps, le ratio [Mo]:[S] comme indicateur potentiel de la nutrition soufrée a été évalué en conditions plein champ chez le colza puis en hydroponie chez cinq autres espèces (*B. oleracea*, *T. aestivum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* et *Solanum lycopersicum*).

**Résultats majeurs :** Dès le premier jour d'une carence en S, l'absorption de Mo est significativement augmentée chez *B. napus*. L'accumulation progressive et continue de Mo ne semble pas liée à une augmentation de l'expression des transporteurs de molybdate : MOT1 et ASY mais pourrait être la conséquence d'une plus forte expression du gène *BnaSultr1.1*, codant un transporteur de sulfate. La modification du ratio foliaire [Mo]:[S] qui en résulte est aussi observée en condition de plein champ lorsque différents niveaux de fertilisation soufrée sont appliqués. Des valeurs seuils ont été déterminées permettant de hiérarchiser plusieurs parcelles de colza en fonction de leurs besoins en S. L'accumulation du Mo en réponse à une carence en S est également observée chez les autres espèces végétales étudiées, ce qui permettrait de généraliser l'utilisation du ratio [Mo]:[S] comme indicateur de la nutrition soufrée à de nombreuses espèces cultivées.

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article, intitulé «Root unspecific transport of nutrient gives access to early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate» qui sera prochainement soumis à Journal of Experimental Botany dès que les règles de confidentialité requises par un dépôt de brevet en cours seront levées.



**Non-specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate**

Anne Maillard<sup>1,2,3\*</sup> - Elise Sorin<sup>1,2,3,4\*</sup>, Philippe Etienne<sup>1,2,3</sup>, Sylvain Diquélou<sup>1,2,3</sup>, Stanislav Kopriva<sup>5</sup>, Mustapha Arkoun<sup>4</sup>, Karine Gallardo<sup>6</sup>, Florence Cruz<sup>4</sup>, Jean-Claude Yvin<sup>4</sup>, Alain Ourry<sup>1,2,3</sup>.

1- Normandie Université, Caen, France

2- UNICAEN, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

3- INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France

4- Centre Mondial d'Innovation, CMI, Groupe Roullier, 27 Avenue Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France

5- University of Cologne, Bot Inst & Cluster Excellence Plant Sci, D-50931 Cologne, Germany

6- INRA, UMR1347 Agroécologie, Pôle GEAPSI, F-21000 Dijon, France

\*The two first authors had an equal contribution

Corresponding author: Alain Ourry, Normandie Université – INRA, UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, Esplanade de la Paix, CS14032, 14032 Caen Cedex 5, France. Phone: +33 231 565 653; Fax: +33 231 565 360; Email: alain.ourry@unicaen.fr.

In preparation for submission to Journal of Experimental Botany.



## Abstract

Under sulfur (S) deficiency, crosstalk between nutrients induced accumulation of other nutrients, particularly molybdenum (Mo). This disturbed balance between S and Mo could provide a way to detect S deficiency and therefore avoid losses in yield and seed quality in cultivated species. Under hydroponic conditions, S deprivation was applied to *Brassica napus* to determine the precise kinetics of S and Mo uptake and whether sulfate transporters were involved in Mo uptake. Leaf contents of S and Mo were also quantified in a field-grown S deficient oilseed rape crop with different S and N fertilization applications to evaluate the [Mo]:[S] ratio, as an indicator of S nutrition. A large set of commercial crops was then assessed to detect potential cases of S deficiency in France. To test genericity of this indicator, the [Mo]:[S] ratio was also assessed with other cultivated species under different controlled conditions. During S deprivation, Mo uptake was strongly increased in *B. napus*. This accumulation was not a result of the induction of the molybdate transporters, Mot1 and Asy, but could be a direct consequence of Sultr1.1 induction. Under field conditions, Mo content was also increased in leaves by a reduction in S fertilization. The [Mo]:[S] ratio significantly discriminated between the plots with different rates of S fertilization. Threshold values were estimated for the hierarchical clustering of commercial crops according to S status. The use of the [Mo]:[S] ratio was also reliable to detect S deficiency for other cultivated species under controlled conditions. The analysis of the leaf [Mo]:[S] ratio seems to be a practical indicator to detect early S deficiency under field conditions and thus improve S fertilization management.

## Key words

*Brassica napus*, molybdenum, S nutrition, sulfur, *Triticum aestivum*

## Abbreviations

DW: dry weight, HR ICP-MS: high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry, STAS: sulfate transporter and anti-sigma domain.



## I. Introduction

It is usually assumed that plants need to maintain a certain level of homeostasis between mineral nutrients. As a consequence, plants must constantly acquire nutrients from soil solution by a complex network of root specific transporters whose expression is usually up-regulated during deficiency (See Nacry *et al.*, 2013 for N, Ashley *et al.*, 2006 for K, Hawkesford, 2003 for S). However, some nutrients might compete for the active site of non-specific transporters (Malvi, 2011). For example, non-selective cation uptake systems that are able to transport both  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  have been identified in plant root cells, such as HKT1 (a high affinity  $\text{K}^+$  transporter), LCT1 (a low-affinity cation transporter) or NSC (non-selective cation channels) (Schachtman and Liu, 1999). As a consequence, at higher levels of  $\text{Na}^+$ , plants will take up  $\text{Na}^+$  instead of  $\text{K}^+$  (Malvi, 2011). Another case of interactions between competitive ions present in the rhizosphere concerns sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), molybdate ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ), selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) and tungstate ( $\text{WO}_4^{2-}$ ) (Shinmachi *et al.*, 2010; Schiavon *et al.*, 2012). Molybdate uptake has long been assumed to occur through the sulfate transporters (Mendel, 2005; Schiavon *et al.*, 2012). Indeed, these two anions are chemical analogs and both possess a double negative charge, a tetrahedral structure, a similar size, and hydrogen-bonding properties (Dudev and Lim, 2004; Bittner, 2014) and therefore may compete for the binding site of the same transporters (Alhendawi *et al.*, 2005).

The sulfate transporter family consists of 14 genes in *Arabidopsis* that can be subdivided into five groups according to sequence similarities (for review see Hawkesford, 2003; Kopriva *et al.*, 2009). The members of the first group, showing a high-affinity for sulfate, are assumed to be principally responsible for primary root uptake. The members of the second group are also localized in the root and shoot tissues and are considered as low-affinity sulfate transporters, while the transporters of the third group are localized in leaf tissues. To date, the specific role of the latter group needs to be clarified. Transporters of group four are localized in the tonoplast and are assumed to be responsible for the efflux of sulfate from the vacuoles into the cytoplasm (Kopriva *et al.*, 2009). A fifth group comprising two isoforms in *Arabidopsis* (*AtSultr5.1* and *AtSultr5.2*) has been proposed but their sequences are considerably shorter, around 450 amino acids, compared to nearly 650 amino acids for the other groups (Hawkesford, 2003) and they do not include the sulfate transporter anti-sigma domain (STAS), which is critical in the transport of sulfate and the stability of transporters (Llamas *et al.*, 2011). Thus, this latest group is different enough to be considered as an independent family (less than 13 % identity with other groups) (Llamas *et al.*, 2011). Most sulfate transporters (for example *Sultr1.1*, *Sultr1.2*, *Sultr2.1*, *Sultr4.1* and *Sultr4.2*) are strongly up-regulated by S deficiency through increased gene expression as demonstrated in numerous plant species (Takahashi *et al.*, 2000; Parmar *et al.*, 2007; Abdallah *et al.*, 2010; Shinmachi *et al.*, 2010;



Casieri *et al.*, 2012). Fitzpatrick *et al.*, 2008 found that uptake of molybdate in *Stylosanthes hamata* can be achieved by SHST1, a high-affinity sulfate transporter from group 1. Molybdate uptake was not reduced when challenged with a competitive anion such as sulfate, whereas the sulfate uptake via SHST1 was reduced in presence of molybdate (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Another transporter from group 5, previously annotated SULTR5.2, was then identified as the first molybdate transporter in *Clamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jiménez *et al.*, 2007) and *Arabidopsis* (Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008a; Bittner, 2014) and was therefore renamed MOT1. However, the localization and the involvement of MOT1 in the uptake of molybdate remain unclear. Indeed, Tomatsu *et al.*, (2007) reported the localization of MOT1 in plasma membranes and in vesicle membranes, while Baxter *et al.*, (2008a) established its localization in the mitochondria. A second molybdate transporter, MOT2 (previously named SULTR5.1) was then identified in *Arabidopsis* as being involved in molybdate export from vacuole to cytosol, especially during translocation of molybdate into maturing seeds (Gasber *et al.*, 2011; Bittner, 2014). Another molybdate transporter also named CrMOT2 has been described in *Chlamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jiménez *et al.*, 2011) and is different from its namesake described previously. The knockdown expression of this CrMot2 gene leads to a reduction of molybdate uptake proportional to the decrease in its transcript level (Tejada-Jiménez *et al.*, 2011). More recently, a homolog of *CrMot2*, (named *Asy* for Abnormal Shoot in Youth) has been reported in higher plants (Hibara *et al.*, 2013). Its localization in the plasma membrane together with the severe phenotypes in *asy* mutants supplied with sufficient Mo suggest that the ASY transporter is crucial for molybdate uptake (Hibara *et al.*, 2013).

Balik *et al.*, (2006) have demonstrated an antagonistic relationship between the sulfate and molybdate uptake by plants. Previous studies in *Brassica napus* (Balik *et al.*, 2006) and *Brassica juncea* (Schiavon *et al.*, 2012) showed an accumulation of Mo in response to S limitation. These authors suggested that the repression of sulfate uptake observed under S deficiency could be due to molybdate binding to the active sites of the root sulfate transporters, which was favored by the lack of competition with sulfate. Moreover, Shinmachi *et al.*, (2010) showed under field conditions that a significant accumulation of Mo in *Triticum aestivum* plants with low S fertilization was concomitant with the increased expression of root sulfate transporters. It has also been shown that mineral S application leads to a significant decrease in Mo concentration and uptake in *B. juncea* (Schiavon *et al.*, 2012; Harris *et al.*, 2014) and *Brassica oleracea* (Hunashikatti *et al.*, 2000) or that the absence of sulfate in nutrient medium causes a significant accumulation of Mo in *Solanum lycopersicum* (Alhendawi *et al.*, 2005). Considering the effects of S deficiency on the Mo accumulation previously described, it could be hypothesized that the leaf [Mo]:[S] ratio might



serve as an indicator of S nutrition to predict S deficiency. For S-demanding crops such as oilseed rape, S deficiency provokes multiple plant physiological changes leading to losses in yield and seed quality through modified lipid and protein composition of seeds (Janzen and Bettany, 1984; McGrath and Zhao, 1996; Scherer, 2001; Malhi *et al.*, 2007; D’Hooghe *et al.*, 2014). It has already been suggested that the analysis of plants rather than soil *via* total S,  $\text{SO}_4^{2-}$  or N:S, malate:sulfate or  $([\text{Cl}^-]+[\text{NO}_3^-]+[\text{PO}_4^{3-}]):[\text{SO}_4^{2-}]$  ratios could be used to detect plant S requirements (for review see Blake-Kalff *et al.*, 2001; Sorin *et al.*, 2015) but these parameters are affected by growth stage and growth rates or need laboratory analyses, making them unreliable as diagnostic indicators (Blake-Kalff *et al.*, 2000; Blake-Kalff *et al.*, 2001). It is therefore essential to find an accurate indicator of plant S status that is suitable as a reliable and relevant diagnostic tool under field conditions in order to evaluate the S requirements of *B. napus* and of other important cultivated species in the context of the high risk of S deficiency.

The main objectives of this work were to study the interaction effects between S and Mo uptake and accumulation in oilseed rape. The first objective was to confirm that Mo accumulation occurred during S deprivation in oilseed rape under controlled conditions, with a precise kinetic description of Mo uptake together with the transcript levels of genes encoding sulfate and molybdate transporters. Additionally, the putative molybdate uptake by sulfate transporters was assessed in *Atsultr1.1* and *Atsultr1.2 Arabidopsis* mutants grown under S deficiency. The second objective was then to investigate how the [Mo]:[S] ratio in leaves of oilseed rape grown under field conditions was affected by S and N fertilization, and consequently if it constitutes a relevant early indicator to predict the risk of S deficiency at a larger scale. Finally, the last objective was to test the functionality of the [Mo]:[S] ratio as an indicator of S deficiency in other cultivated species such as *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Solanum lycopersicum* grown under controlled conditions.

## II. Materials and Methods

### II.1. Hydroponic experiments and tissue sampling

Seeds of *B. napus* L. var. Bohème were germinated on perlite over demineralized water for seven days in the dark and then five days under natural light. Just after the first leaf emergence, seedlings were transferred to hydroponic conditions (18 seedlings per 20 l -plastic tank) in a greenhouse, between October and December, with a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (Master Greenpower T400W, Philips, Amsterdam, Netherlands) ( $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 16h. The aerated nutrient solution contained: 3.75 mM  $\text{KNO}_3$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ ,



0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA 2NaFe, 14 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>, 3 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 μM CuSO<sub>4</sub>, 0.7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1 μM CoCl<sub>2</sub>, 0.04 μM NiCl<sub>2</sub> and buffered to pH 6.6 with 0.91 mM CaCO<sub>3</sub>. This solution was renewed according to the rate of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> depletion monitored daily by using NO<sub>3</sub><sup>-</sup> test strips (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) in order to maintain optimal nutrition conditions.

After four weeks of growth, plants were separated into two batches supplied with a modified nutrient solution chosen in order to achieve S deficiency and to maintain the same concentration of other nutrients: (i) control plants (+S) were grown with 508.7 μM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, (ii) S-deprived plants (-S) were grown with 8.7 μM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Supplemental data SD1). These nutrient solutions were also renewed according to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> depletion by monitoring the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> level in the tank (at the end of the experiment this was about every two days).

Four independent samples each consisting of four individual plants were harvested at day 0 and after 1, 2, 3, 7, 13, 21 and 28 days of treatment. Leaves present at the beginning of treatment applications (d0) were identified and marked, and these organs were referred to as “emerged leaves”, while leaves appearing during treatments were harvested separately as “new emerging leaves”. At each date of harvest, whole roots from control and depleted plants (-S) were also harvested. Thereafter, leaves, petioles and roots were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. An aliquot of each tissue was freeze-dried for dry weight (DW) determination and ground, using an oscillating grinder (MM400, Retsch, Haan, Germany), to fine powder for element analysis.

## II.2. Field experiments and plant sampling

### II.2.1. Study of different fertilization rates on an S deficient field

The experimental site was selected from a previous study (Sarda *et al.*, 2014) showing an S deficiency in *B. napus* L. grown in 2009. This field of 11.3 ha was located at Ondefontaine, France (48°59'18.69" N, 00°41'56.70" W). A winter oilseed rape crop (*B. napus* L., 95 % cv DK Exstorm and 5 % cv Alicia) was sown with a density of 35-40 plants m<sup>-2</sup> on 27 august 2013. The previous crop was spring barley (*Hordeum vulgare* L.). Chemical analyses of the loam soil provided an S content of 220 mg kg<sup>-1</sup> and a pH value of 6.4. Before crop establishment, organic fertilizer (40 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> of bovine manure) was applied to the whole field corresponding to 122 kg N ha<sup>-1</sup> and 44 kg S ha<sup>-1</sup>. The field was separated into seven randomized plots fertilized with different doses of N and S mineral fertilizer. One plot was unfertilized. Other plots were fertilized on 27 February 2014 with three different doses of S fertilizer at 0, 12 and 36 kg S ha<sup>-1</sup> with a combined fertilizer comprising ammonium and nitrate and sulfuric anhydride, 26 % N and 36 % SO<sub>3</sub> and



complemented with ammonium nitrate to obtain 65 kg N ha<sup>-1</sup> on each plot. Then, on 27 March 2014, a second N fertilization with 60 kg N ha<sup>-1</sup> (liquid N containing 50 % urea, 25 % ammonium and 25 % nitrate) was applied to three plots, which thus received 125 kg N ha<sup>-1</sup> after two fertilizer applications.

Five harvests were performed between January and July 2014: before fertilization (at the rosette stage and at the start of stem elongation (GS30), January 30<sup>th</sup> 2014 and February 12<sup>th</sup> 2014), 15 days after S fertilization (start of the visible bud stage (GS50), March 14<sup>th</sup> 2014), 47 days after S fertilization (silique formation stage (GS70), April 15<sup>th</sup> 2014) and finally after 60 days (silique formation stage (GS70), April 28<sup>th</sup> 2014). Two batches of leaves comprising mature leaves (from the lower canopy) and young leaves (from the higher canopy), each of them consisting of three replicates of 20 leaves, were randomly collected from each plot. Leaves were freeze-dried for DW determination and ground, using an oscillating grinder (MM400, Retsch, Haan, Germany) to fine powder for further analysis.

### II.2.2. Study of 45 commercial crops before fertilization and flowering

Forty-five commercial crops of oilseed rape were selected in France according to different locations (given in Supplemental data SD2), different agricultural practices (dose of fertilizers, previous crop, tillage), and under contrasting soil and climate conditions that may affect SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> leaching and hence SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> availability. The farmers, identified with the help of DATAGRI (Lyon, France), collaborated in the present study. Crops have been numbered arbitrarily, from 1' to 45'. Two batches of leaves comprising mature leaves (from the lower canopy) and young leaves (from the higher canopy), each of them consisting of 20 leaves, were randomly collected from each of the 45 fields in February 2014, just at the end of winter corresponding to the start of stem elongation (GS30) and before fertilization. Leaves were freeze-dried before laboratory processing.

### II.3. Multispecies experiment under controlled conditions

In order to assess whether data obtained with *B. napus* could be extrapolated to other species, experiments using *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *S. lycopersicum* and *P. sativum* grown under controlled conditions were conducted under different culture conditions described in Supplemental data SD3 with optimal and sub-optimal S alimentation. Leaves were harvested and frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C until freeze-drying for further analysis.

**Table I. Accession number and Q-PCR primer sets. *EF1-α* and *18S rRNA* were housekeeping genes used for relative gene expression by Q-PCR analysis.**

Gene	Accession number	Forward	Reverse
<i>EF1-α</i>	DQ312264	5'-gcctggtatggttgacct-3'	5'-gaagttagcagcacccttg-3'
<i>18S rRNA</i>	X16077	5'-cggataaccgtagtaattctag-3'	5'-gtactcattccaattaccagac-3'
<i>BnaSultr1.1</i>	AJ416460	5'-agatattgcgatcggaccag-3'	5'-gaaaacgccagcaagaaag-3'
<i>BnaSultr1.2</i>	AJ311388	5'-ggtgtagtcgctggaatggt-3'	5'-aacggagtgaggaagagcaa-3'
<i>BnaAsy</i>	XM_009145653	5'-tcagctcatctccaaagt-3'	5'-agtctacacagcctcaa-3'
<i>BnaMot1</i>	NM_128127	5'-ctcgcaggattggactta-3'	5'-agatccccaacacgaacaag-3'

#### II.4. Element analysis by mass spectrometry

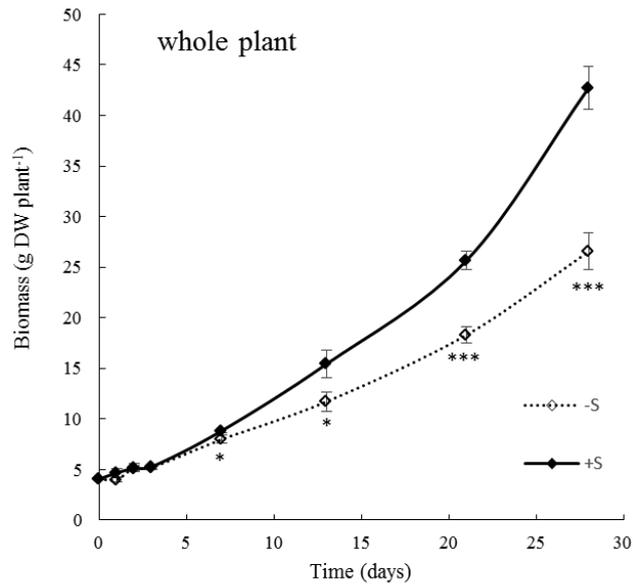
For the analysis of total N and S contents, an aliquot of around 4 mg DW of each plant organ sample was placed in tin capsules for total N and S analysis in order to analyze between 60 and 80 µg N. The total N amounts and S amounts in plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Nu Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The total N or S amount ( $N_{tot}$  or  $S_{tot}$ ) in a tissue “i” at a given time “t” was calculated as:

$$N_{tot} \text{ (or } S_{tot}) = \frac{\% N_{i,t} \text{ (or } S_{i,t}) \times DW_{i,t}}{100}$$

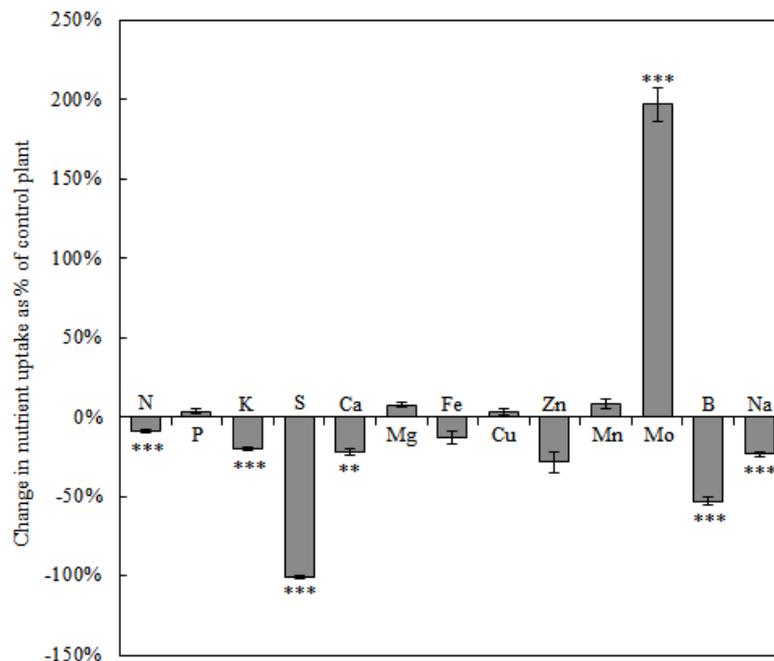
P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mo, Mn, B, Ni and Na in samples were quantified by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2TM, Bremen, Germany) with prior microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) using 800 µl of concentrated HNO<sub>3</sub> (Thermo Fischer, Illkirch, France), 200 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (SCP SCIENCE, Quebec, Canada) and 1 ml of Milli-Q water for 40 mg DW. For the determination by HR ICP-MS, all the samples were spiked with two internal-standard solutions, gallium and rhodium (SCP SCIENCE, Quebec, Canada), for a final concentration of 10 and 2 µg l<sup>-1</sup>, respectively, diluted to 50 ml with Milli-Q water to obtain solutions containing 2.0 % (v/v) of nitric acid, then filtered on a 40 µm teflon filtration system (Courtage Analyses Services, Mont-Saint-Aignan, France). Quantification of each element was performed using external standard calibration curves. The quality of mineralization and analysis were checked using a certified reference material of Citrus leaves (CRM NCS ZC73018, Sytab, Metz, France). The amount of each element in each tissue was then calculated as previously explained for N and S.

#### II.5. Reverse transcription (RT) and q-PCR analysis

Total RNA was extracted from 200 mg of root and leaf fresh matter as previously described (Sorin *et al.*, 2015). For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit according to the manufacturer’s protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Q-PCR amplifications were performed using specific primers (Table I) for each housekeeping gene (*EF1-α* and *18S rRNA*) and target genes (*BnaSultr1.1*, *BnaSultr1.2*, *BnaAsy*, *BnaMot1*). Q-PCRs were performed with 4 µl of 100x diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1x SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) in a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). A program of three steps composed of an activation step at 95°C for 3 min and a denaturing step of 40 cycles at 95°C for 15 s followed by an annealing and an extending step at 60°C for 40 s was used for all pairs of primers (Table I). For



**Figure 1: Change in whole plant biomass (g DW plant<sup>-1</sup>) of *B. napus* L. in control (+S, black line), and S-deprived (-S, dashed line) plants during the 28 days of the experiment.** Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (n=4). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant difference between control and S-deprived plants for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.



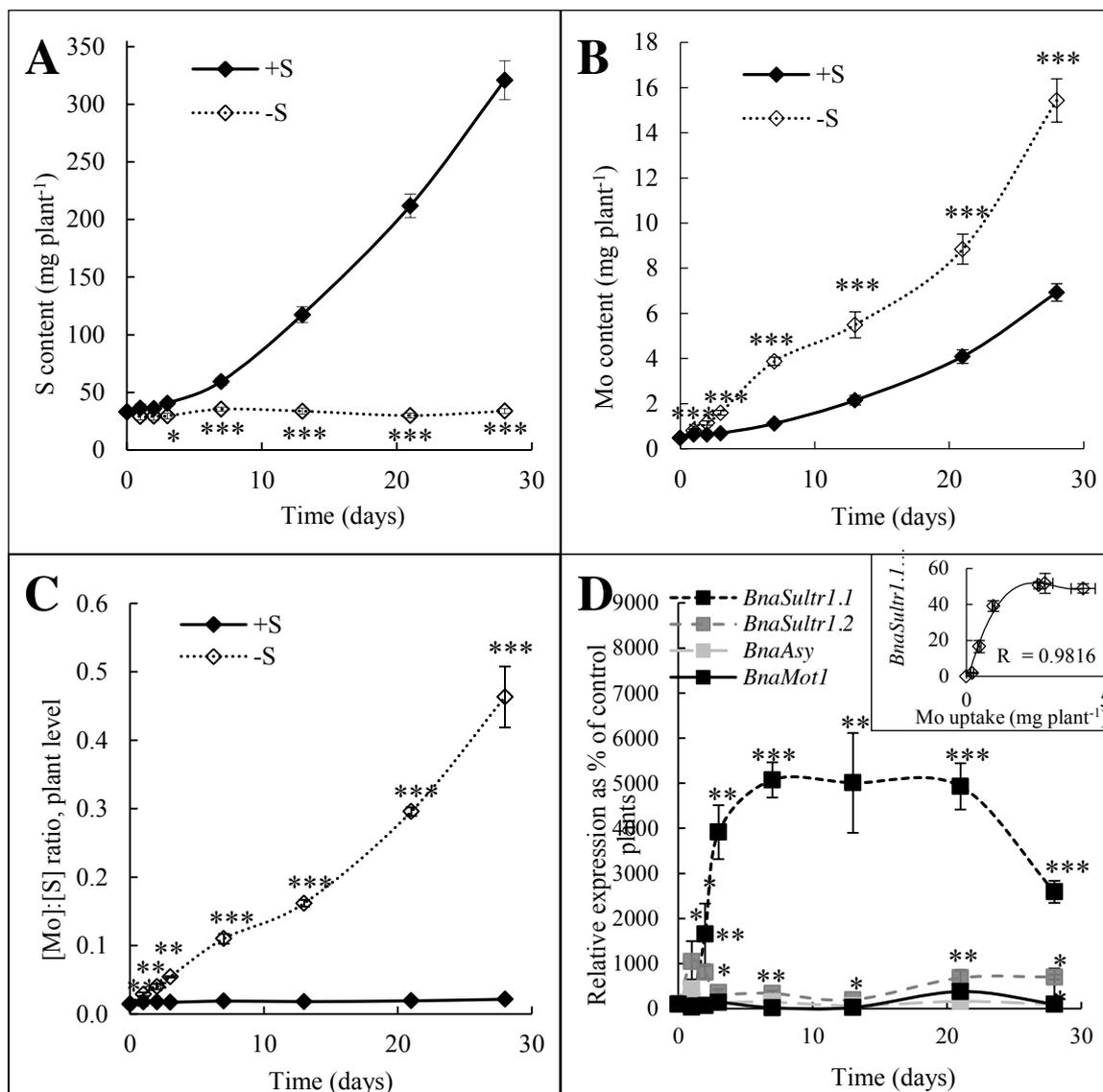
**Figure 2: Changes in uptake of macro (N, P, K, S, Ca and Mg) and micronutrients (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B and Na) in *B. napus* after 21 days of S deprivation.**

A theoretical uptake by S-deprived plants was calculated for each nutrient, which reflects the uptake expected by S-deprived plants if DW was identical to control plants. Change in nutrient uptake was calculated as the difference between S-deprived and control plants and expressed as % of uptake achieved by control plants. Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (n=16). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between control and S-deprived plants for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.

each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency was determined using a cDNA preparation diluted >10-fold. For all pairs of primers, PCR efficiency was around 100 %. The specificity of PCR amplification was examined by monitoring the presence of the single peak in the melting curves after q-PCRs and by sequencing the q-PCR product to confirm that the correct amplicon was produced from each pair of primers (Eurofins, Ebersberg, Germany). For each sample, the subsequent q-PCRs were performed in triplicate. The relative expression of the genes in each sample was compared with the control sample (corresponding to control plants at d0) and was determined with the delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) method using the following equation: relative expression =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , with  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}$  and with  $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$  (for calculations, we considered the geometric mean between Ct of the housekeeping genes), where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification. Using this analysis method, relative expression of the target gene in the control sample was equal to 1 (Livak and Schmittgen, 2001), and the relative expression of other treatments was then compared with the control.

## II.6. Statistical analysis

For each measurement, hydroponic experiments on *B. napus* were conducted with four independent biological replicates constituted of four individual plants, except for q-PCR analysis, which was conducted with three biological replicates. Data are given as mean  $\pm$  SE for n=4 (or n=3 for q-PCR data). All data of the hydroponic experiment were analyzed by Student's test (Excel software) and marked by one or several asterisks when significantly different between controls and S-deprived plants (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Under field conditions, for the study of different fertilization rates on an S deficient field, three replicates corresponding to a pool of 20 leaves of 20 independent plants were collected. Data are given as mean  $\pm$  SE for n=3 and were analyzed by Student's test (Excel software) and marked by different letters when they were significantly different between treatments at a given date, at  $P < 0.05$ . All experiments on different species in controlled conditions were conducted with four independent biological replicates, except for *P. sativum* culture with three replicates. Data are reported as mean  $\pm$  SE for n=4 (or n=3 for *P. sativum* data). All data of the multispecies experiment were analyzed by Student's test (Excel software) and marked by one or several asterisks when significantly different between controls and S-deprived plants (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Figure 3:** (A) Cumulated S and (B) Mo contents (mg plant<sup>-1</sup>) in *B. napus* control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants. (C) Kinetic of the [Mo]:[S] ratio in *B. napus* from control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants. (D) Effect of S deprivation on relative expression of root transporters: *BnaSultr1.1*, *BnaSultr1.2*, *BnaAsy* and *BnaMot1* genes expressed in % of control plants. The insert provides the correlation between Mo uptake and the relative expression of *BnaSultr1.1*.

Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (n=4 or n=3 for q-PCR data). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between control and S-deprived plants for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.

### III. Results

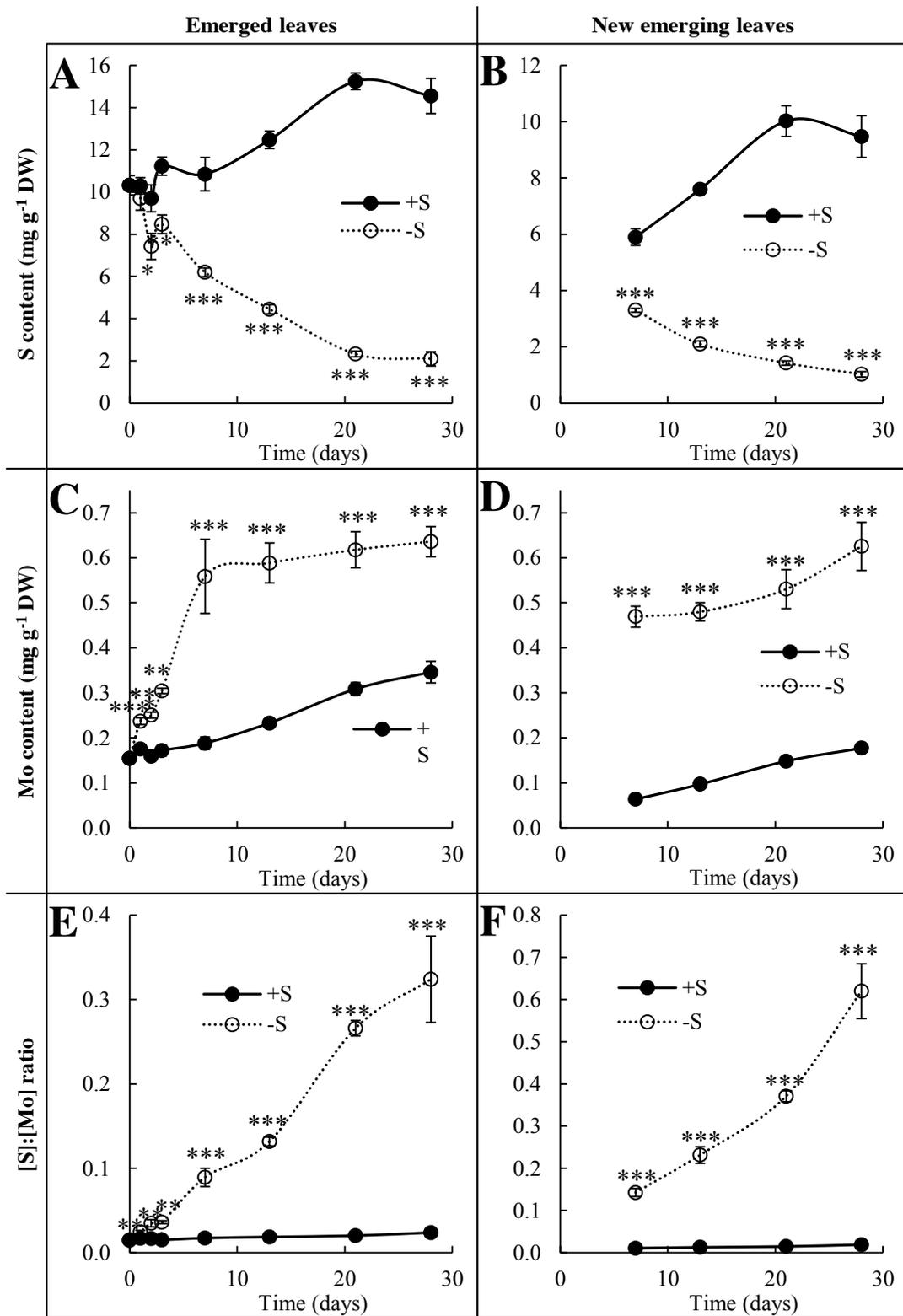
#### III.1. S deprivation reduced S, N, K, Ca, B and Na uptake but strongly increased Mo uptake

Plant growth rates were similar for control and S-deprived plants until the 7<sup>th</sup> day of S deprivation (Figure 1) and were then significantly reduced. For example, after 21 days, the biomass of S-deprived plants decreased by 29 % compared to the biomass of control plants. To overcome the biomass reduction, a theoretical uptake by S-deprived plants was calculated for each nutrient (Figure 2) using the DW of control plants and the nutrient concentration measured in S-deprived plants. This theoretical uptake reflects the uptake expected by S-deprived plants if DW production was identical to control plants. As expected, after 21 days of S deprivation, S uptake decreased by  $-100.7 \pm 0.90$  % relative to control plants. The uptake of some nutrients was reduced in line with the reduction in the growth rate or more strongly: for N ( $-8.7 \pm 1.06$  %), K ( $-20.2 \pm 0.88$  %), Ca ( $-22.0 \pm 2.41$  %), Na ( $-23.4 \pm 1.85$  %) and B ( $-52.9 \pm 2.82$  %). Conversely, S deprivation strongly increased the uptake of Mo by  $197.0 \pm 10.73$  %. The uptake of P, Mg, Fe, Cu, Zn and Mn were not significantly affected by S deprivation.

#### III.2. S deprivation strongly and immediately increased uptake of Mo without induction of molybdate transporter genes.

In S-deprived plants, plant S content (Figure 3A) remained at a nearly steady state level, revealing a lack of significant S uptake from potential trace amounts in the nutrient solution. In control plants, the plant S content steadily increased with time and was significantly higher than in S-deprived plants from 3 days of S deprivation. Plant Mo content (Figure 3B) increased with time in S-deprived plants, similar to control plants, but at a significantly greater rate; for example by 2.23 fold relative to control after 28 days of S deprivation. From the first day, the Mo content was significantly increased by 28 % in S-deprived plants relative to control *i.e.* before a significant difference in S content that occurred after only 3 days. As a consequence, the [Mo]:[S] ratio at the whole plant level (Figure 3C) significantly increased as early as one day after S deprivation, and was increased by about 21 fold after 28 days of S deprivation. In control plants, the [Mo]:[S] ratio remained constant as a function of time.

The relative expression of genes encoding different molybdate (*BnaMot1* and *BnaAsy*) and sulfate (*BnaSultr1.1* and *BnaSultr1.2*) transporters was quantified in roots during the 28 days of treatment (Figure 3D). A very strong accumulation of *BnaSultr1.1* transcripts occurred during the first 7 days and remained at a steady state level between 7 and 21 days. The *BnaSultr1.2* transcript



**Figure 4: Kinetic of (A-B) S and (C-D) Mo contents (mg g<sup>-1</sup> DW) and (E-F) the [Mo]:[S] ratio in emerged (on the left) and new emerging (on the right) leaves of *B. napus* from control (+S, black line) or S-deprived (-S, dashed line) plants.**

Data are given as the mean  $\pm$  s.e. (n=4). \*, \*\* and \*\*\* indicate significant differences between control and S-deprived plants for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.

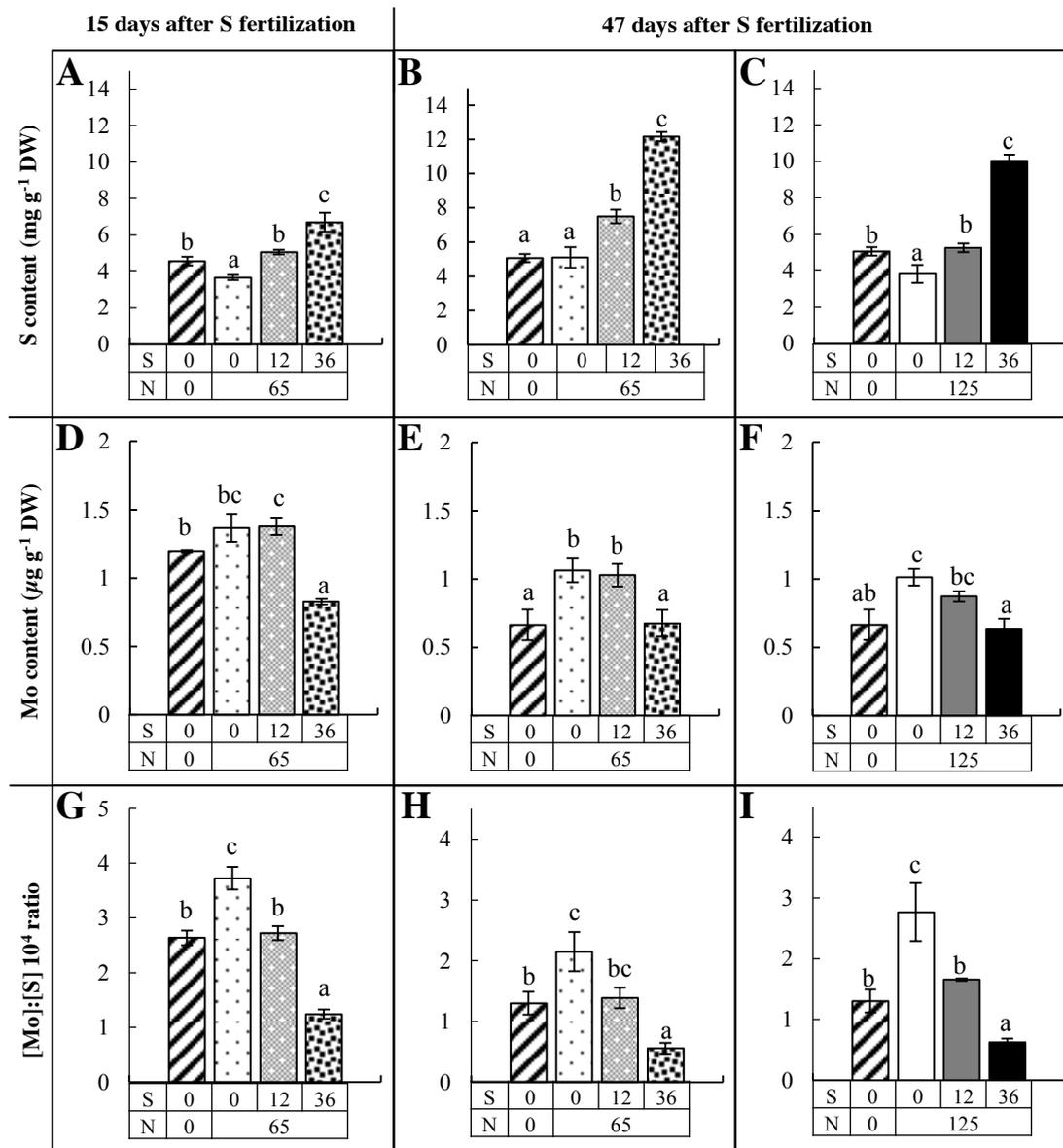
level was also significantly up-regulated, but to a lesser extent than *BnaSultr1.1* in response to S deprivation from the first day of treatment. In contrast, expression of genes encoding root molybdate transporters (*BnaMOT1* and *BnaASY*) (Figure 3D) was not affected by S deprivation despite the strong increase in Mo uptake by S-deprived plants (Figure 3B). The relative expression of *BnaSultr1.1* appeared to be correlated with Mo uptake (polynomial order 2,  $R = 0.98$ ) during the 21 days of S deprivation (insert Figure 3D).

### III.3. In leaves of S-deprived plants, Mo and S contents changed in opposite ways

Under hydroponic conditions, no matter which leaves were assayed (emerged leaves or new emerging leaves), the S content steadily increased with time in control plants (Figure 4A-B). Predictably and according to deprivation, in emerged leaves from S-deprived plants the S content significantly decreased as early as 2 days after S deprivation (Figure 4A). The S content decreased with the same pattern in new emerging leaves (Figure 4B). Molybdenum content steadily increased with time in the two groups of leaves of control plants but the accumulation of Mo was significantly and rapidly (from 1 day) increased by S deprivation and until the end of the experiment (Figure 4C-D). Compared to control plants, the Mo content in emerged leaves (Figure 4C) was increased by 197 % and 84 % after 7 and 28 days of S deprivation, respectively. The increase in Mo content was even more pronounced in new emerging leaves (Figure 4D) where it increased by 637 % and 253 % after 7 and 28 days of S deprivation, respectively. In these two groups of leaves, the [Mo]:[S] ratio (Figure 4E-F) strongly increased with time in S-deprived plants and remained at a constant level in control plants. Indeed, there was significant increase of 45 % in the [Mo]:[S] ratio in emerged leaves (Figure 4E) after the first day of S deprivation and after 28 days this increase reached 1 256 %. At the same time, the [Mo]:[S] ratio in new emerging leaves (Figure 4F) was also increased by 3 158 % in S-deprived plants.

### III.4. Under field conditions, lower S availability increased leaf Mo content and hence the [Mo]:[S] ratio

The S content, Mo content and the [Mo]:[S] ratio were also quantified in mature (Figure 5) and young leaves (Supplemental data SD4) of oilseed rape grown under field conditions, 15, 47 and 60 days after S fertilization. To simplify reading, only the data after 47 days are presented because the results obtained at 60 days showed similar trends. Sulfur content (Figure 5A-C) was decreased significantly in mature leaves by a reduction in S fertilization (from 36, 12 to 0 kg S ha<sup>-1</sup>), whatever the level of N fertilization (65 or 125 kg N ha<sup>-1</sup>). The highest Mo content (Figure 5D-F) was found in mature leaves of plants receiving N fertilization and with no or low S



**Figure 5: (A, B, C) S content (mg g<sup>-1</sup> DW), (D, E, F) Mo content (μg g<sup>-1</sup> DW) and (G, H, I) the [Mo]:[S] 10<sup>4</sup> ratio (to simplify reading the [Mo]:[S] ratio is presented with a multiplier factor of 10<sup>4</sup>) in mature leaves of *B. napus* grown under field conditions after (A, D, G) 15 and (B, C, E, F, H, I) 47 days of fertilization.**

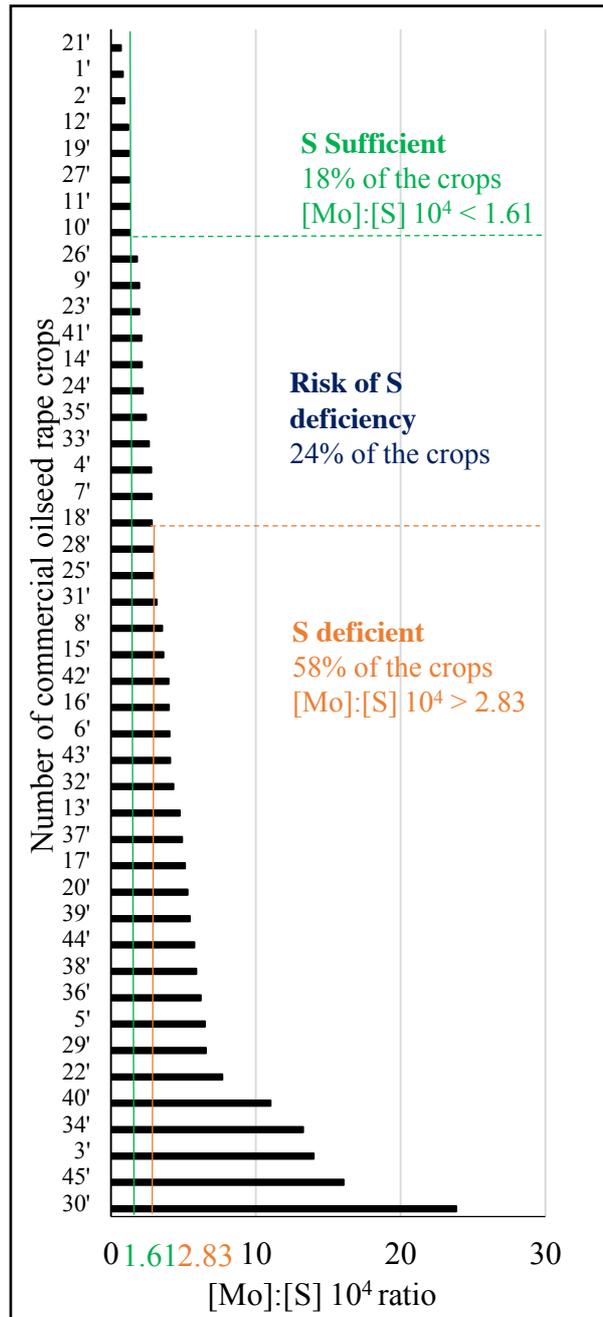
Plants received no mineral fertilization (hatched bars, 0 kg S.ha<sup>-1</sup>, 0 kg N.ha<sup>-1</sup>), or 0 kg S ha<sup>-1</sup> (white bar), 12 kg S ha<sup>-1</sup> (gray bar) or 36 kg S ha<sup>-1</sup> (black bar) with 65 kg N ha<sup>-1</sup> (dashed bars) or 125 kg N ha<sup>-1</sup> (full bars). Within the same graph, letters when different between fertilization treatments indicate significant differences for  $P < 0.05$ .

fertilization (0 or 12 kg S ha<sup>-1</sup>). The [Mo]:[S] ratio (Figure 5G-I) differentiated the plots according to S fertilization: 0, 12 and 36 kg S ha<sup>-1</sup>. Indeed, mature leaves of plants with N fertilization (65 or 125 kg N ha<sup>-1</sup>) and without S had the highest [Mo]:[S] ratio, whereas mature leaves of plants with 36 kg S ha<sup>-1</sup> had the lowest [Mo]:[S] ratio and mature leaves of plants with 12 kg S ha<sup>-1</sup> had an intermediate [Mo]:[S] ratio. The same trends were also found in young leaves (Supplemental data SD4) but the effect of S fertilization on the [Mo]:[S] ratio was slightly higher in mature leaves.

Interactions between N and S fertilization were also found. It can be assumed that the growth rate was mostly dependent on the N fertilization rate. For example, 15 days after S fertilization, the biomass of mature leaves was  $5.03 \pm 0.38$  g DW leaf<sup>-1</sup> in unfertilized plot whereas in plot with 65 kg N ha<sup>-1</sup> and 0 kg S ha<sup>-1</sup> the biomass was  $6.70 \pm 0.01$  g DW leaf<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ , data not shown). The supply of N mineral fertilization had a direct negative consequence on S content in leaves as a result of the increased growth rate. Indeed, the leaf S content of unfertilized plants was significantly higher than (Figure 5A and C) or similar to (Figure 5B) the S content in mature leaves of plants receiving N fertilization for the same S fertilization rate. Consequently, the Mo content in leaves in unfertilized plot was similar to (Figure 5D, at 15 days after S fertilization) or significantly lower than (Fig 5.E-F, at 47 days after S fertilization) mature leaves of plants receiving N fertilization. As a result, the [Mo]:[S] ratio was significantly lower (Figure 5G-I) in the absence of N mineral fertilization in mature leaves, than in N fertilized plots with no S, therefore reflecting lower S requirements.

In the same way, plant growth was stimulated by a second N fertilization of 60 kg N ha<sup>-1</sup> (corresponding to plots with 125 kg N ha<sup>-1</sup>) and the relative S content in mature leaves was reduced. For example, when comparing Figure 5B and C, the S content in mature leaves of plants with 125 kg N ha<sup>-1</sup> was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than for plants with 65 kg N ha<sup>-1</sup> and for a given level of S fertilization (0, 12 or 36 kg S ha<sup>-1</sup>). In contrast, the N fertilization rate had no significant effect on the Mo content of mature leaves (Figure 5E compared to Figure 5F). As a result, when comparing mature leaves of plants receiving 125 kg N ha<sup>-1</sup> (Figure 5I) to 65 kg N ha<sup>-1</sup> (Figure 5H), the [Mo]:[S] ratio was higher in leaves of plants with a higher N fertilization, regardless of the rate of S fertilization, which also reflected the higher requirement for S of N fertilized plants.

Threshold values of the [Mo]:[S] ratio were then determined 15 days after S fertilization, corresponding to development stage in mature leaves of oilseed rape before flowering, to determine whether or not S fertilization was required. Threshold values of the [Mo]:[S] ratio were calculated as the sum or difference between the means of data presented in Figure 5G and the 95 % confidence intervals for S sufficient plots (36 kg S ha<sup>-1</sup>, 1.63) and of S deficient plots (0 kg S ha<sup>-1</sup>,



**Figure 6: Classification of 45 commercial oilseed rape crops from different locations in France (see Supplemental data SD1) according to their [Mo]:[S] 10<sup>4</sup> ratio in mature leaves quantified before flowering and S fertilization.**

Threshold values of the [Mo]:[S] 10<sup>4</sup> ratio classified these oilseed rape crops into three S status groups: S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient plants.

2.83), respectively. Such thresholds would allow clustering of the plots into three groups: S sufficient (ratio <1.61), at risk of S deficiency (ratio between 1.61 and 2.83) and S deficient (ratio >2.83). This classification into three groups has been tested on 45 commercial oilseed rape crops from different locations in France and for which mature leaves were harvested before flowering and S fertilization (Figure 6). The use of these threshold values suggested that 18, 24 and 58 % of the crops were classified as S sufficient, at risk of S deficiency and S deficient, respectively.

### III.5. Test of genericity of the [Mo]:[S] ratio as S-deficiency indicator

The [Mo]:[S] ratio was calculated in leaves of other cultivated species: *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *P. sativum* and *S. lycopersicum*, grown in controlled conditions. In all species, S content was significantly reduced and Mo content was significantly increased by S deficiency (Table II). For example, in *B. napus* the Mo content increased as early as 1 day after deprivation, in *T. aestivum* as early as 2 days and in *Z. mays* as early as 5 days of S deficiency, whereas the S content was reduced later. Consequently, the [Mo]:[S] ratio was highly and significantly increased by S deficiency following 1 day of treatment in *B. napus*, 2 days in *T. aestivum*, 5 days in *Z. mays* and this rise was amplified over time. For *B. oleracea*, *P. sativum* and *S. lycopersicum*, no early harvest was performed, but significant increases in leaf Mo content and in the [Mo]:[S] ratio were found after 20, 19 and 65 days, respectively. Values of the [Mo]:[S] ratio were species-dependent, with values ranging from 3 to 250 in control plants and from 27 to 5 934 in S-deprived plants, as a result of a high accumulation of Mo in *B. napus*, *T. aestivum* and in *Z. mays*.

## IV. Discussion

### IV.1. Perturbations of Mo homeostasis by non-specific transport of molybdate and sulfate

It is usually assumed that plant nutrient contents are tightly regulated through balanced activities of membrane transporters that mediate the uptake and distribution of nutrients so that a relative compositional homeostasis is maintained. However, under deficiencies, crosstalk induces unavoidable accumulations of some nutrients that upsets the balance and modifies the ionic composition of plant tissues (Baxter, 2009). In our study, among all mineral nutrients, only Mo uptake was strongly increased by S deficiency in *B. napus* (Figure 2) leading to its accumulation in leaves (Figure 3B). From the first day of S deprivation, the Mo content was dramatically increased by 128 % in S-deprived plants relative to plants continuously supplied with S. This accumulation of Mo in response of S deficiency has previously been reported in *Brassicaceae* species. Schiavon *et*

**Table II: Sulfur content (mg g<sup>-1</sup> DW) and Mo content (μg g<sup>-1</sup> DW) and the [Mo]:[S] ratio in leaves of *B. napus*, *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *P. sativum* and *S. lycopersicum* following different S treatments (+S: control treatment, -S: S deficiency treatment) to plants grown under controlled conditions (given in Supplemental Data SD3).**

Data are given as the mean ± SE (n=4 or n=3 for *P. sativum* data). \*, \*\*, and \*\*\* indicate significant differences between control and S-deprived plants for P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively.

Species	Days after -S treatment	S (mg g <sup>-1</sup> DW)		Mo (μg g <sup>-1</sup> DW)		Ratio [Mo]:[S]	
		+S	-S	+S	-S	+S	-S
<i>B. napus</i>	0		10.33 ± 0.46	154.57 ± 10.16		149.75 ± 7.34	
	1	10.30 ± 0.39	9.70 ± 0.56	175.35 ± 6.87	237.01 ± 7.70 ***	170.23 ± 1.12	247.40 ± 18.67 **
	21	15.25 ± 0.39	2.33 ± 0.14 ***	308.49 ± 14.02	617.82 ± 40.08 ***	202.21 ± 6.52	2660.38 ± 91.28 ***
<i>B. oleracea</i>	20	4.83 ± 0.46	1.90 ± 0.04 ***	4.02 ± 0.21	5.03 ± 0.16 **	8.44 ± 0.49	26.53 ± 1.16 ***
	2	3.60 ± 0.18	3.45 ± 0.22	90.17 ± 9.43	201.48 ± 7.72 ***	249.52 ± 18.17	584.45 ± 24.95 ***
<i>T. aestivum</i>	8	3.47 ± 0.06	3.12 ± 0.00 **	85.14 ± 1.23	719.90 ± 36.62 ***	245.32 ± 5.56	2306.22 ± 110.52 ***
	24	3.37 ± 0.02	1.85 ± 0.05 ***	79.83 ± 2.08	977.11 ± 32.63 ***	236.67 ± 5.58	5285.33 ± 236.13 ***
	0		2.82 ± 0.10	22.62 ± 0.85		80.18 ± 1.54	
<i>Z. mays</i>	5	3.05 ± 0.03	2.11 ± 0.13 ***	24.67 ± 0.48	468.16 ± 28.15 ***	80.86 ± 0.82	2224.10 ± 72.16 ***
	18	2.39 ± 0.05	0.95 ± 0.04 ***	27.95 ± 1.65	562.63 ± 34.46 ***	116.67 ± 5.06	5934.41 ± 137.28 ***
	0		2.75 ± 0.09	20.48 ± 4.22		73.76 ± 12.95	
<i>P. sativum</i>	19	2.73 ± 0.10	2.20 ± 0.14 *	9.43 ± 0.50	12.46 ± 0.34 **	34.49 ± 0.67	57.63 ± 5.58 **
	65	10.10 ± 0.71	1.83 ± 0.27 ***	2.86 ± 0.03	5.09 ± 0.82 *	2.88 ± 0.21	27.90 ± 1.96 ***
<i>S. lycopersicum</i>							

*al.*, (2012) reported that S deficient *B. juncea* accumulated significantly more Mo than control plants. Conversely, the supply of S significantly decreased the uptake of Mo by *B. oleracea* (Hunashikatti *et al.*, 2000), *B. juncea* (Harris *et al.*, 2014) and by *B. napus* (Balik *et al.*, 2006).

Two root membrane molybdate transporters have been reported so far as responsible for Mo uptake in plants: MOT1 (Tomatsu *et al.*, 2007) and ASY (Hibara *et al.*, 2013). In our study, under S deprivation, the expression of *BnaMot1* and *BnaAsy* remained similar to control plants (Figure 3D) and consequently, it may be assumed that the increase in Mo uptake was not a result of an induction of these specific Mo transporters. This is consistent with previous work reporting that root *TaeMot1* expression in *T. aestivum* was not significantly affected by S deficiency despite increased concentration of Mo in plant tissues (Shinmachi *et al.*, 2010). Indeed, the involvement of MOT1 in plant Mo uptake remains unclear as recent results established the localization of MOT1 in mitochondria (Baxter *et al.*, 2008a) and not in plasma membranes and in vesicle membranes as previously proposed by Tomatsu *et al.*, (2007). Alternatively, some authors have suggested that the accumulation of Mo could be due to non-specific transport by sulfate carriers (Schiavon *et al.*, 2012). Indeed, molybdate and sulfate through their similar chemical properties (charge, size, structure, bonding-properties) could compete for the same binding sites (Dudev and Lim, 2004; Bittner, 2014). In our results, others genes (*BnaSultr1.1* and *BnaSultr 1.2*) encoding high-affinity sulfate transporters of group 1 have been studied in order to clarify their ability to also transport molybdate. The increased uptake of Mo in S-deprived plants was strongly correlated with an increase in *BnaSultr1.1* expression at least during the first 7 days (Figure 3D). Similarly, in *T. aestivum*, under S deficiency expression of genes encoding the sulfate transporters, *TaeSultr1.1* and *TaeSultr4.1*, increased and coincided with a 3.7 fold increase in Mo contents in grain (Shinmachi *et al.*, 2010). Regardless of the correlation between Mo uptake and the expression of *BnaSultr1.1* (Figure 3D), to determine the role of *Sultr1.1* and *Sultr1.2* in the uptake of Mo a collaborative experiment using *Atsultr1.1* and *Atsultr1.2* mutants is under progress (Stanislav Kopriva, Botanical Institute and Cluster of Excellence in Plant Science, University of Cologne). Pending the data from this experiment, data available on the Purdue ionomics information management system (See Baxter *et al.*, (2007) and <http://www.ionomicshub.org/arabidopsis/piims/showIndex.action>) have been selected for *Atsultr1.1* and *Atsultr1.2* mutants (Table III). The double KO of *Atsultr1.1* and *Atsultr1.2* transcription led to a decrease in the S and Mo content (Table III), suggesting that these two transporters could be involved in the uptake of S and Mo. Moreover, the content of Mo in the *Atsultr1.1* mutant was reduced. In the *Atsultr1.2* mutant the content of S was increased suggesting that the expression of the *AtSultr1.1* gene was upregulated to maintain the uptake of S, which could

**Table III (provisional): Data extracted from the Purdue ionomics information management system related to S and Mo contents in lines (Line median in  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) of the *Arabidopsis* single mutant KO, *Atsultr1.1* or *Atsultr1.2*, and of the *Arabidopsis* double mutant KO, *Atsultr1.1-1.2*, and in wild type (Background median in  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).**

Median percentage change was the difference between the content in mutant and wild type. *P* values are given for  $n > 4$ . Sulfur and Mo contents were estimated from  $^{34}\text{S}$  and from  $^{95}\text{Mo}$  (in *Atsultr1.1*) or as  $^{98}\text{Mo}$  (in other mutants), respectively.

		<i>Atsultr1.1-1.2</i> DKO Tray 2042 –Pot d sultr1;1 1;2 DKO	<i>Atsultr1.1</i> KO Tray 399- Pot b SALK_093256_homo	<i>Atsultr1.2</i> KO Tray 2042 – Pot h 78730 single mutant (-++)
S	Line Med ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	5340	N/A	8063
	Background Med ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	6527	N/A	6527
	<b>% Difference Med</b>	<b>-18.18</b>	<b>N/A</b>	<b>23.53</b>
	<b><i>P</i> value</b>	<b>0.02360</b>	<b>N/A</b>	<b>0.01280</b>
Mo	Line Med ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0.6395	6.029	1.721
	Background Med ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1.188	7.227	1.188
	<b>% Difference Med</b>	<b>-46.15</b>	<b>-16.58</b>	<b>44.92</b>
	<b><i>P</i> value</b>	<b>0.000E-1</b>	<b>0.000E-1</b>	<b>0.07670</b>

lead to an increase in Mo uptake, as suggested by the increase in Mo content in leaves. Therefore, the overall results suggest that a very early increase in Mo uptake following S deprivation is a direct consequence of the strong and early increased expression of *Sultr1.1* encoding a root sulfate transporter.

#### IV.2. A potential indicator derived from early molecular events

Under field conditions, the Mo and S contents also changed in opposite ways in leaves of plants submitted to different S fertilization rates. The lowest Mo contents were found in leaves of plants with the highest S fertilization that had the highest S content. Reciprocally, the highest Mo and lowest S contents were found in leaves of plants supplied with the lowest S fertilizations (Figure 5 A-F and Supplemental data SD4 A-F). Similar low Mo content in leaves in S fertilized plants and a range of leaf concentrations (*i.e.* between 1 and 3  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW) have been previously reported by Balik *et al.*, (2006) in oilseed rape plants and by Hunashikatti *et al.*, (2000) in cabbage under field conditions. However, the leaf Mo contents obtained in our field experiment were lower than those found under hydroponic conditions. This can easily be explained by the fact that the Mo concentration in the nutrient solution was far higher than in the soil solution; nevertheless, the trend of Mo accumulation during S deficiency was similar. Because of the opposing variations in leaf S and Mo contents, the [Mo]:[S] ratio was lower in plants with an optimal S fertilization than in plants with reduced S fertilization (Figure 5 G-I and Supplemental data SD4 G-I). In our study, the [Mo]:[S] ratio therefore discriminated different rates of S fertilization and revealed the S status of plants.

It was also found that the increase in plant growth rates that were triggered by N fertilization increased plant S requirements, resulting in a decrease in the S content in oilseed rape leaves under field conditions (Figure 5 A-C and Supplemental data SD4 A-C) as previously reported (Zhao *et al.*, 1993). A second N fertilization (60 kg ha<sup>-1</sup>) had no major impact on the Mo content of leaves, while the leaf Mo content was lower in N unfertilized plants (Figure 5E compared to Figure 5F and Supplemental data SD4 E-F). This lower Mo accumulation found in unfertilized plants could be explained by a reduced growth rate and thus by lower S requirements. As a consequence, N fertilization could interfere in the evolution of the [Mo]:[S] ratio. Indeed, a supplementary N fertilization increased the [Mo]:[S] ratio and the total lack of N fertilization decreased the [Mo]:[S] ratio (Figure 5 H-I and Supplemental data SD4 H-I). Nevertheless, this ratio still allowed differentiation of the plots with different rates of S fertilization.

To allow the effective use of the [Mo]:[S] ratio under field conditions, threshold values are required to estimate the S status of oilseed rape crops, and a first estimation has been calculated



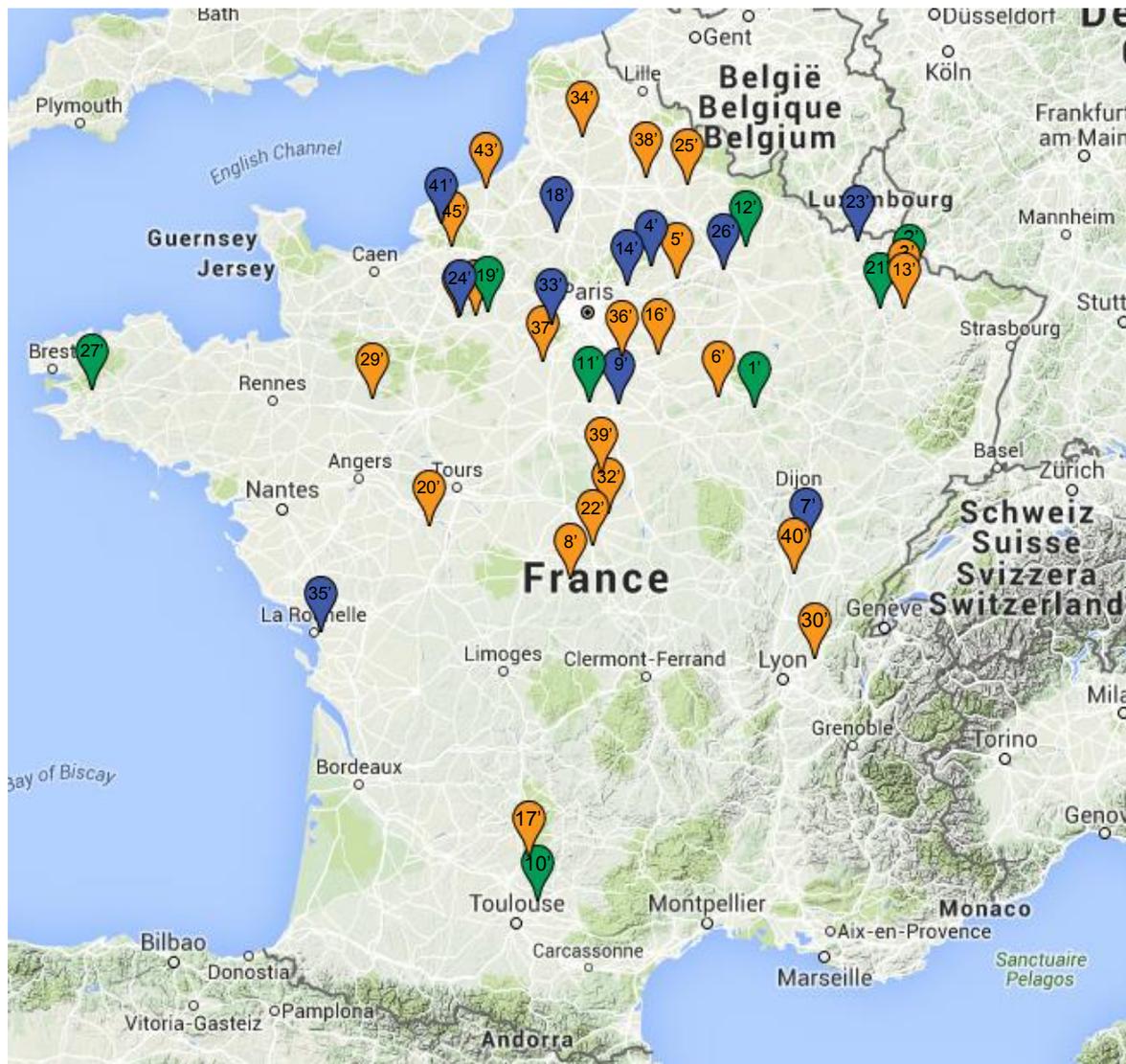
from a field experiment using different levels of S fertilization. According to these threshold values, three S status groups were defined: S deficient, at risk of S deficiency and S sufficient, with the additional intermediate class taking into account the area of uncertainty. The study of 45 commercial oilseed rape crops in France suggested that more than 50 % were potentially S deficient (Figure 6), highlighting the need for optimizing S fertilization practices. However, more accurate determination of [Mo]:[S] ratio threshold values would require a larger set of experiments during which S fertilization would need to be modulated and the effects on seed yield and quality monitored.

Because oilseed rape is well known for its high S requirements, other cultivated species such as *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *P. sativum* and *S. lycopersicum* have been tested (Table II) for their response to S deficiency. In all of them, the leaf [Mo]:[S] ratio was significantly increased by reduced S availability, as a result of a decrease in leaf S content coupled with an accumulation of Mo. The general response pattern can also be supported by results from the literature with the same or different species, for example, globe amaranth (*Gomphrena globosa*) (Wang *et al.*, 2009), cabbage (Hunashikatti *et al.*, 2000), wheat (Shinmachi *et al.*, 2010) and tomato (Alhendawi *et al.*, 2005). A decrease in the [Mo]:[S] ratio resulting from an inadequate S supply seems to be a general response of higher plants, whatever their intrinsic requirements for S.

Overall, the analysis of the leaf [Mo]:[S] ratio is a practical alternative to detect early S deficiency under field conditions, given that molecular indicators require laboratory analysis and use of control plants, which are not easily performed under field conditions. Alternatively, new breakthrough technologies using X ray fluorescence or laser metal analysis, also available as portable field tools, would allow an easy quantification of the [Mo]:[S] ratio.

#### Acknowledgements

The authors thank M. Chédeville for providing the experimental site at Ondefontaine and for technical help to fertilize plots, and all farmers identified by DATAGRI who collaborated in this study. Acknowledgements go to Vegenov for their participation in the multispecies experiment. The authors acknowledge the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis used in this study and also appreciate the technical help of Marie-Paule Bataillé, Frédéline Marie and Josette Bonnefoy. The authors are grateful for the technical help of Julie Levallois for molecular analysis. The authors thank Dr Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript. This work, conducted through the SERAPIS project, was supported by the Regional Council of Lower Normandy (grant number 12P03057), the Regional Council of Brittany (grant number 12008011), the European Regional Development Fund (grant number 33525) and the Centre Mondial d'Innovation – Groupe Roullier.



**Supplemental data SD2: Location of 45 commercial crops in France with crops classified into three S status groups: S deficient in orange, at risk of S deficiency in blue and S sufficient in green.**

Supplemental data SD1: Composition of the two nutrient solutions used for control and S deprivation during the treatment period of *B. napus* and *Z. mays*. Nutrient concentrations are expressed in mM.

Nutrients	Control (+S)	S deprivation (-S)
KNO <sub>3</sub>	3.75	3.75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25	0.25
EDTA, 2NaFe	0.20	0.20
MgSO <sub>4</sub>	0.50	0
CaCl <sub>2</sub>	0.50	0
MgCl <sub>2</sub>	0	0.50
CaCO <sub>3</sub>	0.91	1.41
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.4 x 10 <sup>-2</sup>	1.4 x 10 <sup>-2</sup>
MnSO <sub>4</sub>	5 x 10 <sup>-3</sup>	5 x 10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	3 x 10 <sup>-3</sup>	3 x 10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub>	7 x 10 <sup>-4</sup>	7 x 10 <sup>-4</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	7 x 10 <sup>-4</sup>	7 x 10 <sup>-4</sup>
CoCl <sub>2</sub>	1 x 10 <sup>-4</sup>	1 x 10 <sup>-4</sup>
NiCl <sub>2</sub>	4 x 10 <sup>-5</sup>	4 x 10 <sup>-5</sup>

Supplemental data SD2: Location of 45 commercial crops in France with crops classified into three S status groups: S deficient in orange, at risk of S deficiency in blue and S sufficient in green.

Supplemental data SD3: Growth conditions used for multispecies experiment.

*Z. mays*:

Seeds of *Z. mays* cv Ronaldinio were germinated on perlite over demineralized water for seven days in the dark and then five days under natural light. Just after first leaf emergence, seedlings were transferred to hydroponic conditions (18 seedlings per 20L-plastic tank) in a greenhouse, between March and April, with a thermoperiod of 20°C (day) and 15°C (night). Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (Master Greenpower T400W, Philips, Amsterdam, Netherlands) (350 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 16h. The aerated nutrient solution contained: 3.75 mM KNO<sub>3</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA 2NaFe, 14 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>, 3 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 μM CuSO<sub>4</sub>, 0.7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1 μM CoCl<sub>2</sub>, 0.04 μM NiCl<sub>2</sub> and was buffered to pH 6.6 with 0.91 mM CaCO<sub>3</sub>. This solution was renewed according to the rate of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> depletion monitored daily by using NO<sub>3</sub><sup>-</sup> test strips (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) in order to maintain optimal nutrition conditions. After 8 days of growth, plants were separated into two batches supplied with a modified nutrient solution chosen in order to achieve S deficiency and to maintain the same concentration of other nutrients (Supplemental data SD1): (i) control plants



(control) were grown with  $508.7 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ , (ii) S limited plants (-S) were grown with  $8.7 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ . Nutrient solutions were also renewed according to  $\text{NO}_3^-$  depletion by monitoring the  $\text{NO}_3^-$  level in the tank.

*T. aestivum:*

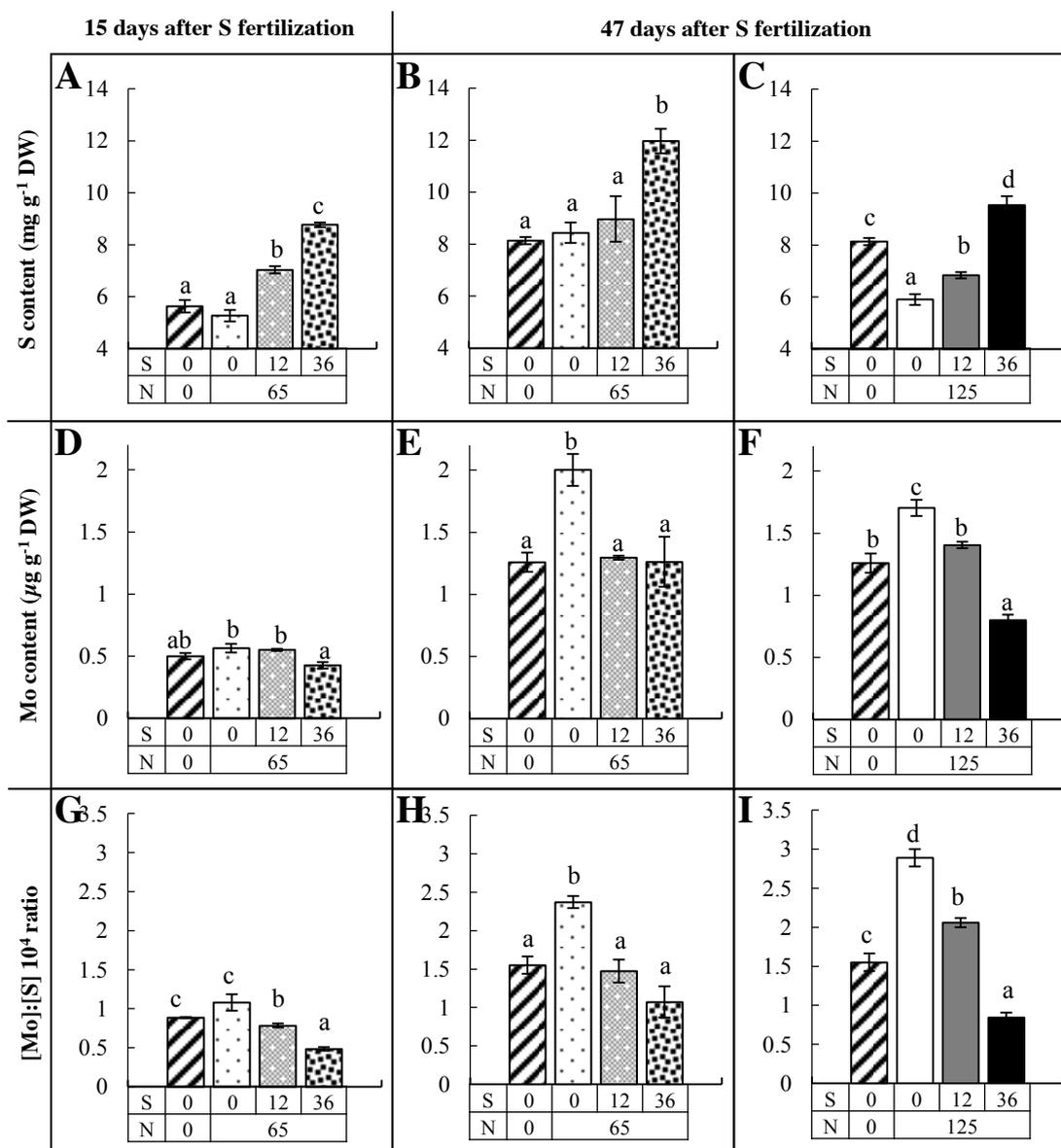
Seeds of *T. aestivum* L. cv Sankara were germinated on perlite over demineralized water for five days in the dark and then five days under light. Seedlings were transferred to hydroponic conditions (30 seedlings per 7L-plastic tank) in a growth chamber, with a thermoperiod of  $22^\circ\text{C}$  (day) and  $18^\circ\text{C}$  (night). Plants received artificial light provided by neon lamps (Lumilux cool daylight, 36W, Osram, Munich, Germany) ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of photosynthetically active radiation at the canopy height) for 12h. The aerated nutrient solution contained: 2 mM  $\text{KNO}_3$ , 1  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 mM EDTA 2NaFe, 23  $\mu\text{M H}_3\text{BO}_3$ , 5  $\mu\text{M MnSO}_4$ , 2  $\mu\text{M ZnSO}_4$ , 0.9  $\mu\text{M CuSO}_4$ , 0.3  $\mu\text{M} (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0.1  $\mu\text{M CoCl}_2$  and was buffered to pH 6 with KOH. This solution was renewed every two or three days. After 11 days of growth, plants were separated into two batches: (i) control plants were grown with  $507.9 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ , (ii) S limited plants were grown with  $7.9 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ , replacing  $\text{MgSO}_4$  by  $\text{MgCl}_2$ .

*B. oleracea:*

*B. oleracea* cv Nikolas plants were grown individually in pots filled with a mixture of perlite: vermiculite (v:v, 1:1) in 1L pots for one month then in 2L pots. Plants were grown in a growth chamber, with temperatures of  $21^\circ\text{C}$  during the day and  $18^\circ\text{C}$  during the night, a 14 h photoperiod and a mean photosynthetically active radiation of  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  was guaranteed by the use of neon lamps (Lumilux soft white, L58W/840, Osram, Munich, Germany). Plants were watered throughout the experiment, every two days with a nutrient solution composed of 4.5 mM  $\text{KNO}_3$ , 3.6  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1.4  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 35  $\text{mg l}^{-1}$  Fe-EDTA (FerVeg E13, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France) and 3.5  $\text{mg l}^{-1}$  OligoMix (Oligoveg S2, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France). For S deficiency treatment the same solution described above was used except that  $\text{MgSO}_4$  was removed and  $\text{MgCl}_2$  was adjusted to 0.5 mM.

*S. lycopersicum:*

*S. lycopersicum* cv Plaisance on Emperador was grown in a greenhouse between April and July under natural light temperatures controlled to  $20^\circ\text{C}$  during the day and  $15^\circ\text{C}$  during the night. One plant per 1 l pot was cultivated for one month and transferred to 3 l pots filled with a mixture



**Supplemental data SD4: (A, B, C) S content (mg g<sup>-1</sup> DW), (D, E, F) Mo content (μg g<sup>-1</sup> DW) and (G, H, I) the [Mo]:[S] 10<sup>4</sup> ratio (to simplify reading the [Mo]:[S] ratio is presented with a multiplier factor of 10<sup>4</sup>) in young leaves of *B. napus* grown under field conditions after (A, D, G) 15 and (B, C, E, F, H, I) 47 days of fertilization.**

Plants received no mineral fertilization (hatched bars, 0 kg S.ha<sup>-1</sup>, 0 kg N.ha<sup>-1</sup>), or 0 kg S ha<sup>-1</sup> (white bar), 12 kg S ha<sup>-1</sup> (grey bar) or 36 kg S ha<sup>-1</sup> (black bar) with 65 kg N ha<sup>-1</sup> (dashed bars) or 125 kg N ha<sup>-1</sup> (full bars). Within the same graph, letters when different between fertilization treatments indicate significant differences for  $P < 0.05$ .

of perlite: vermiculite (v:v, 1:1) and were watered every day by a nutrient solution containing: 5.2 mM KNO<sub>3</sub>, 6.2 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.9 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mg l<sup>-1</sup> Fe-EDTA (FerVeg E13, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France) and 3.5 mg l<sup>-1</sup> OligoMix (Oligoveg S2, Angibaud et spécialité, La Rochelle, France). For S deficiency treatment the same solution described above was used except that MgSO<sub>4</sub> was removed and MgCl<sub>2</sub> was adjusted to 2.2 mM.

*P. sativum*:

*P. sativum* L. plants (genotype Cameor) were grown in a randomized complete-block design in a greenhouse temperature controlled to 19°C during the day and 15°C during the night. Artificial lighting was used to reach 16h light per day: 400 W sodium lamps, 6 lamps in 17.32 m<sup>2</sup>, radiation in the range 400-700 nm, and photosynthetic characteristics of 695 μmol s<sup>-1</sup>. Pea seeds were directly sown at 2 cm depth in 2 l pots containing 25 % sand (type B3, Biot, France) and 75 % perlite. Three mature seeds were sown per pot, then after emergence, only one seedling was kept in each pot. Control plants were supplied with a nutrient solution containing 4 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.3 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NaCl, 0.72 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.10 mM FeNa-EDTA, 8.2 μM MnCl<sub>2</sub>, 1 μM CuCl<sub>2</sub>, 1 μM ZnCl<sub>2</sub>, 30 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH adjusted to 6.3 using H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> before addition of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). An automatic plant watering system, with two drippers per pot, was used for all plants. For applying S deficiency (at the eight-leaf stage), the pots were rinsed with 4 x 2 l of deionized water and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> from the solution described above was replaced by 1.16 mM MgCl<sub>2</sub>.

Supplemental data SD4:

(A, B, C) S content (mg g<sup>-1</sup> DW), (D, E, F) Mo content (μg g<sup>-1</sup> DW) and (G, H, I) the [Mo]:[S] 10<sup>4</sup> ratio (to simplify reading the [Mo]:[S] ratio is presented with a multiplier factor of 10<sup>4</sup>) in young leaves of *B. napus* grown under field conditions after (A, D, G) 15 and (B, C, E, F, H, I) 47 days of fertilization. Plants received no mineral fertilization (hatched bars, 0 kg S.ha<sup>-1</sup>, 0 kg N.ha<sup>-1</sup>), or 0 kg S ha<sup>-1</sup> (white bar), 12 kg S ha<sup>-1</sup> (grey bar) or 36 kg S ha<sup>-1</sup> (black bar) with 65 kg N ha<sup>-1</sup> (dashed bars) or 125 kg N ha<sup>-1</sup> (full bars). Within the same graph, letters when different between fertilization treatments indicate significant differences for *P*<0.05.



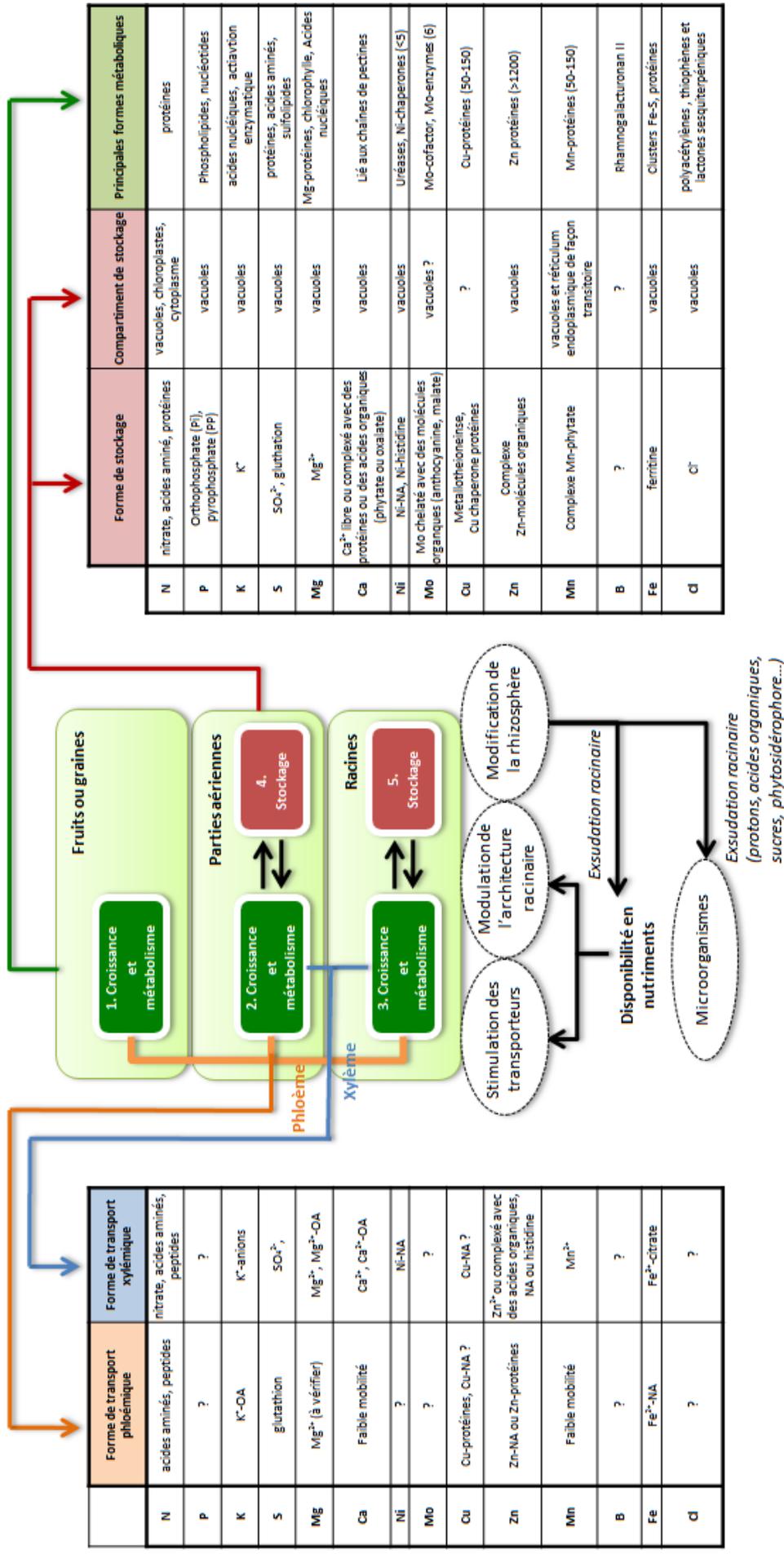
---

# **CHAPITRE VII**

## **Discussion générale et perspectives**

---





**Figure VII.1. Schéma conceptuel des principales stratégies utilisées par les plantes supérieures en réponse à une carence minérale comprenant la stimulation de l'activité des transporteurs racinaires, la modulation de l'architecture racinaire, la modification de la rhizosphère par l'exsudation racinaire et enfin la remobilisation entre organes des ressources stockées.**

En se basant sur la littérature (Marschner, 2011), le tableau de gauche présente la forme sous laquelle chaque élément est transporté *via* le xylème et le phloème. Le tableau de droite indique pour chaque nutriment les principales formes métaboliques auxquelles il est associé, la forme sous laquelle il peut être stocké et le compartiment de stockage sub-cellulaire. NA : Nicotianamine

## CHAPITRE VII

### Discussion générale et perspectives

---

#### I. Discussion générale

La nutrition minérale des végétaux repose sur des mécanismes physiologiques et génétiques complexes contrôlant l'absorption des nutriments, leur transport, leur accumulation et leur remobilisation au sein de la plante, mécanismes rappelés brièvement au sein du schéma conceptuel de la Figure VII.1. Une meilleure compréhension et description des mécanismes impliqués pour chaque élément ainsi que des interactions potentielles entre éléments sont requises afin, par exemple, d'optimiser la fertilisation et donc l'utilisation des ressources minérales dont certaines peuvent devenir limitantes au cours du cycle de végétation. Dans ce contexte, nous avons tout d'abord entrepris d'estimer, dans un cadre volontairement assez large, la remobilisation de 13 éléments lors de la sénescence foliaire chez cinq espèces cultivées et trois espèces ligneuses, pour ensuite nous focaliser sur la remobilisation de ces 13 éléments, cette fois uniquement chez le colza en condition de carence. Ceci nous a ensuite conduit à évaluer l'effet de carences individuelles sur la composition du ionome, chez cette même espèce. Les résultats acquis nous ont finalement amené à nous focaliser sur le molybdène, élément dont l'absorption est stimulée sous l'effet de différentes carences, afin d'une part d'identifier les mécanismes impliqués et d'autre part de proposer une application de ces connaissances à l'élaboration d'un indicateur de la nutrition soufrée.

Dans la littérature, **la remobilisation des éléments est généralement associée à la sénescence foliaire** (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). En effet, l'entrée en sénescence correspond, pour la feuille, à la transition d'un comportement d'organe puits (importation nette d'éléments nutritifs) à celui de source (exportation nette) par différents mécanismes comme l'autophagie (Pottier *et al.*, 2014), alors que de nouveaux puits se développent (Malagoli *et al.*, 2005b). Lors de la sénescence, les constituants cellulaires sont catabolisés, les protéines et les enzymes sont dégradées alors que les solutés mobiles sont exportés vers les nouveaux puits *via* le phloème. Ce lien entre sénescence et remobilisation s'appuie essentiellement sur les connaissances acquises concernant les mécanismes gouvernant la remobilisation de l'N. En effet, celle-ci est toujours associée à la sénescence puisque son recyclage nécessite la dégradation de composés organiques : acides aminés et protéines solubles comme certaines enzymes de l'appareil photosynthétique telle que la Rubisco qui constitue quantitativement la plus importante réserve d'N



(Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). De plus, une limitation en N va accélérer la sénescence des feuilles les plus âgées au profit des plus jeunes (Etienne *et al.*, 2007). Mais cette stratégie n'est pas la seule : le S, par exemple, est remobilisé lorsque sa disponibilité devient limitante afin de maintenir la croissance indépendamment de la sénescence (Abdallah *et al.*, 2011). Pour la première partie de la thèse, c'est la première stratégie de remobilisation associée à la sénescence que nous avons étudiée.

*Nous avons donc commencé par évaluer la remobilisation apparente de 13 éléments essentiels durant la sénescence foliaire chez cinq espèces de grandes cultures : le blé, l'orge, le maïs, le colza et le pois ainsi que chez trois espèces ligneuses : le chêne, le peuplier et l'aulne.*

Seules quelques études ont décrit la remobilisation de tous les éléments essentiels durant la sénescence (Hocking et Pate, 1977; Himelblau et Amasino, 2001; Waters et Grusak, 2008; Moreira, 2009). Cette approche multi-élémentaire permet de proposer des processus généraux touchant au moins la majorité des macro-éléments et de suggérer, sinon des mécanismes similaires, au moins des régulations communes. Cependant, en se basant uniquement sur une espèce, le potentiel de remobilisation peut être sous-estimé puisque celui-ci est largement espèce-dépendante, nous avons donc adopté une approche plus large multi-élémentaire et multi-espèces. Cette première partie de la thèse, compte tenu du nombre d'espèces et du nombre d'éléments étudiés, repose sur l'analyse d'échantillons foliaires récoltés en condition de plein champ. Cette démarche, si elle permet une récolte aisée d'un grand nombre d'échantillons, présente cependant certaines limites dont notamment l'absence d'informations précises concernant les contraintes nutritionnelles auxquelles les plantes sont confrontées. Une autre limite liée à ce dispositif expérimental repose sur le fait que la remobilisation foliaire des 13 éléments considérés a été évaluée en tant que remobilisation apparente, c'est à dire à partir du bilan quantitatif réalisé tout au long du cycle de vie de la feuille. Il en dérive un certain nombre de restrictions en termes d'interprétation. Par exemple, un élément pourrait être effectivement remobilisé sans qu'une remobilisation apparente soit détectable, si une même quantité d'élément issue de l'absorption est alloué à la feuille. Enfin, il est possible que certains éléments ne soient remobilisés des feuilles que lorsque la disponibilité dans le sol est insuffisante, comme démontré pour le soufre par Abdallah *et al.*, (2010) ; ce type de situation ne peut être appréhendé ou caractérisé avec le dispositif expérimental utilisé.

**Au cours de cette expérimentation, nous avons tout d'abord montré que la remobilisation foliaire associée à la sénescence est fonction des éléments et des espèces végétales.** Chez les huit espèces considérées, la sénescence foliaire s'accompagne d'une



diminution de la teneur en chlorophylle (données supplémentaires SD3-10B, Chap. IV) et du contenu en N des feuilles (Figure 3, données supplémentaires SD3-10C, Chap. IV) indissociable de ce mécanisme. L’N est donc toujours remobilisé quelle que soit l’espèce considérée avec néanmoins des efficacités de remobilisation variables allant de 38,7 % chez le maïs à 93,4 % chez le blé (données supplémentaires SD3-10C, Chap. IV). **Pour les autres éléments, l’efficacité de remobilisation est dépendante de l’espèce considérée (données supplémentaires SD3-10, Chap. IV), notamment (1) de la mise en place et du déroulement du processus de sénescence, (2) du développement ou non de tissus reproducteurs et de l’importance de ces derniers sur le rapport source/puit au sein de la plante.** Enfin, la remobilisation effective ou non de certains éléments est également conditionnée par des facteurs intrinsèques, telle que la forme de stockage, de transport mais aussi la mobilité dans le phloème ou dans le xylème de l’élément considéré (Figure VII.1).

(1) **La durée de la sénescence foliaire apparaît très variable d’une espèce à l’autre** (Figure 1, Chap. IV). Par exemple, le peuplier contrairement au chêne entre de façon brutale et tardive en sénescence, probablement en raison de l’arrivée des premières températures gélives (données supplémentaires SD4B, Chap. IV). A basse température, la sénescence est accélérée, en raison de l’exacerbation du stress oxydatif qui accompagne celle-ci (Fracheboud *et al.*, 2009). Cette sénescence tardive induite par l’environnement pourrait avoir limité la remobilisation des nutriments chez cette espèce. En effet, le peuplier présente une faible capacité de remobilisation, ne remobilisant que l’N, le Cu et le Mo (Figure 3, Chap. IV). Les feuilles chutées ont conservé une grande partie de leurs réserves en nutriments probablement en raison d’un transport phloémique limité. A l’inverse, le chêne se développant dans les mêmes conditions pédoclimatiques remobilise la plupart des macro-nutriments avec une efficacité comprise entre -40 et 60 %, ainsi que le Ni, le B et le Cu (Figure 3, Chap. IV). Sa sénescence a été plus précoce, probablement associée au développement de tissus reproducteurs (dès Juillet) et en conséquence plus longue. Ces résultats peuvent être reliés à ceux de Fracheboud *et al.*, (2009) qui ont montré que les génotypes de tremble (*Populus tremula*) qui débutent leur sénescence plus tôt ont une sénescence moins rapide que les génotypes débutant leur sénescence plus tardivement. Ainsi, la plus forte efficacité de remobilisation du chêne comparé au peuplier pourrait être due à leurs durées de sénescence, très courte chez la deuxième espèce.

(2) **Cette différence d’efficacité de remobilisation entre ces deux espèces peut aussi être interprétée comme étant la conséquence de la force de puits exercée par les tissus reproducteurs.** En effet, le chêne contrairement au peuplier produit dès le mois de juillet une grande quantité de tissus reproducteurs. Le développement des organes reproducteurs chez cette



espèce précède légèrement le début de la sénescence et de la remobilisation foliaire, (SD3, chapitre IV). Cette implication de la force puits des tissus reproducteurs peut également être invoquée pour expliquer les différences observées entre le blé et l'orge, particulièrement efficaces en termes de remobilisation, et le maïs grain, tous trois cultivés dans des conditions pédoclimatiques communes. Les deux premières remobilisent huit nutriments parmi les treize suivis alors que le maïs ne remobilise que trois de ceux-ci (Figure 3, Chap. IV). Il est possible d'émettre l'hypothèse que ces différences d'efficacité sont dues à des effets indirects des stratégies de sélection utilisées. Ainsi, le blé comme l'orge ont été sélectionnés afin de maximiser le rendement en grains *via* par exemple l'augmentation du poids moyen d'un grain, du nombre de grains par épis et du nombre d'épis par plante. La sélection de ces variétés à haut rendement va donc accroître la force de puits exercée par les tissus reproducteurs sur les tissus sources, les feuilles en particulier. Cette modulation de la force de puits se répercute sur l'efficacité et l'intensité de la remobilisation. En effet, l'efficacité de remobilisation apparente enregistrée dans cette étude atteint 80 % pour l'N, le K, le S et le Mg et près de 40 % pour le Mn et le Cu (Figure 3, Chap. IV). Cette forte efficacité s'accompagne d'une réduction significative de la biomasse des feuilles lors de la sénescence. Une telle réduction de la biomasse foliaire a déjà été reportée et serait due à l'hydrolyse et l'exportation des glucides solubles ainsi qu'à l'exportation des acides aminés (Schnyder, 1993; Wardlaw et Willenbrink, 2000). Les nouvelles variétés à haut rendement de blé d'hiver, comparés aux anciens cultivars, se caractérisent d'ailleurs par une plus grande perte de biomasse des organes végétatifs lors de la sénescence qui se traduit par une remobilisation plus rapide et plus importante des glucides (Mehrhoff et Kühbauch, 1990). Cependant, cette sélection ne s'est pas traduite de façon identique pour tous les éléments. En effet les travaux de Rothamsted montrent notamment que la sélection de variétés de blé à haut rendement a eu pour conséquence au cours des 60 dernières années une diminution des teneurs en Cu, en Fe, en Mg et en Zn du grain, et cela indépendamment de leur disponibilité dans le sol.

Il semble que les objectifs principaux des programmes de sélection du maïs aient été assez largement différents, visant par exemple à adapter la longueur du cycle de développement à des conditions climatiques particulières (températures optimales, pluviométrie) dans des conditions de fertilisations optimales et n'ont pas entraîné d'effets aussi drastiques sur le rapport source/puits (Duvick, 2005). Ce dernier point pourrait expliquer la faible efficacité de remobilisation des éléments foliaires chez cette espèce. Il faut néanmoins garder à l'esprit que ces efficacités de remobilisation peuvent présenter une variabilité intraspécifique. En effet, elles peuvent également varier selon les génotypes d'une même espèce, comme précédemment montré pour le K, le P, le Fe et le Cu chez le concombre par Waters et Troupe, (2011) ainsi que pour le Mg, le Fe, le Cu, le Mn,



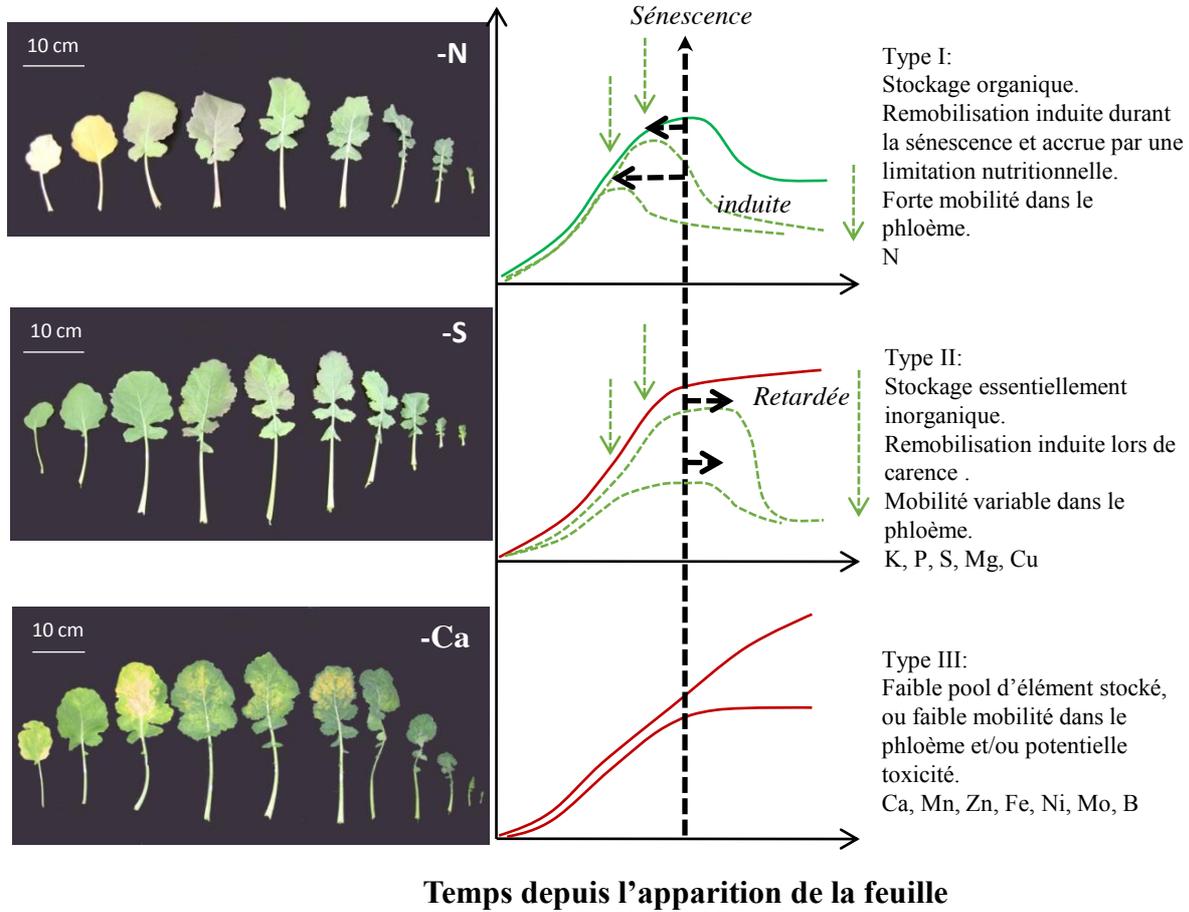
le Zn et le Cd chez le peuplier par Pottier *et al.*, (2015). Cette variation intraspécifique, probablement due à des ratios source/puits variables, pourrait constituer un levier pour l'amélioration de l'efficacité de remobilisation foliaire des nutriments chez des espèces cultivées peu efficaces pour la remobilisation foliaire comme le maïs ou le colza.

*Dans un second temps, afin de pallier aux conditions restrictives d'interprétation liées au dispositif de champ utilisé, nous avons fait le choix de mettre en place une culture de colza en condition d'hydroponie au cours de laquelle une privation totale pour chacun des éléments étudiés a été appliquée afin de maximiser l'ampleur de leur remobilisation apparente sans devoir recourir à des marquages isotopiques.*

Nous avons ainsi démontré une remobilisation apparente du N, du K, du P, du S, du Mg et du Cu depuis les feuilles lors d'une carence chez le colza (Figure 6, chapitre IV), ce qui est assez cohérent avec le fait que ces éléments apparaissent remobilisables lors de la sénescence en condition de plein champ (Figure 3A,C, chapitre IV). Dans la majorité des carences nutritives réalisées, nous avons ainsi pu nous affranchir de l'absorption, sauf pour certains oligoéléments tels que le Cu, le Zn, le Fe, le Ni et le B (données supplémentaires SD11, Chap. IV) pour lesquels des traces subsistaient dans la solution nutritive (liée à la qualité de l'eau osmosée utilisée). Ainsi, bien que la remobilisation foliaire du Cu chez le colza soit avérée, elle est probablement sous-estimée (Figure 5C, Chap. IV). Par contre, aucune remobilisation foliaire du Fe, du Ni, du Mo, du Zn et du B (Figure 6, Chap. IV) n'a pu être quantifiée lors d'une carence individuelle de l'un de ces éléments. Ces résultats sont globalement cohérents avec ce qui a été observé en condition de plein champ lors de la sénescence chez cette même espèce (Figure 3A,C, chapitre IV) sauf pour le Fe et le Ni qui étaient remobilisés des feuilles dans ces conditions. Une étude plus précise de la remobilisation de ces éléments nécessiterait l'emploi d'isotopes stables ou radioactifs (\*), tels que le  $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{59}\text{Fe}^*$  (Grusak, 1994) ou le  $^{63}\text{Ni}^*$  (Neumann et Chamel, 1986).

Un autre avantage de l'étude réalisée chez le colza en condition de carence, repose sur la possibilité de considérer non seulement les feuilles mais aussi d'autres tissus. Ainsi bien que les feuilles soient capables de remobiliser nombre d'éléments, d'autres organes tels que les tiges et les racines peuvent également contribuer significativement à la remobilisation des ressources stockées. **Les racines, très peu étudiées dans les flux de remobilisation entre organes, contribuent à la remobilisation du K, du Mo mais aussi de façon plus originale du Ca et du Mn** (Figure 5B, données supplémentaires SD11, Chap. IV). Cette remobilisation pourrait alors être associée à un transport xylémique. En effet, le Ca et le Mn sont deux éléments considérés comme ayant une très faible mobilité dans le phloème. La remobilisation de ces deux nutriments à partir des feuilles a

## Quantité d'un élément dans une feuille



**Figure VII.2. Bilan de masse élémentaire d'une feuille au cours de son développement traduisant trois types possible de remobilisation des éléments minéraux.**

(A) La remobilisation des éléments de type I est initiée au début de la sénescence foliaire par la dégradation de constituants cellulaires permettant la dégradation de molécules organiques, c'est le cas de l'N principalement stocké au sein des protéines et des acides aminés. (B) La remobilisation des éléments de type II, présentant un stockage et un transport essentiellement sous forme minérale, est fortement affecté par la disponibilité en nutriments sans être connectée fonctionnellement à la sénescence foliaire. (C) Les éléments de type III ne sont pas remobilisés, ils sont continuellement accumulés tout au long de la durée de la vie de la feuille. Cette faible remobilisation pourrait être la conséquence d'une faible mobilité dans le phloème ou d'une potentielle toxicité conduisant à la séquestration de cet élément.

toutefois été reportée précédemment mais dans des conditions très particulières où le flux transpiratoire était augmenté permettant leur remobilisation *via* le xylème (Biddulph *et al.*, 1959; Nable et Loneragan, 1984; Mauk et Noodén, 1992; Malone *et al.*, 2002; Dayod *et al.*, 2010). C'est ce qui aurait pu se produire chez le blé et l'orge en condition de plein champ où la sénescence a été particulièrement intense se traduisant par une diminution de la biomasse sèche des feuilles.

Le potentiel de remobilisation d'un élément donné dépend donc de nombreux facteurs parmi lesquels peuvent être considérés (Figure VII.1) : son aptitude à être transporté par voie phloémique ou xylémique, son éventuelle forme de stockage, sa localisation et la structure métabolique à laquelle il est associé. De plus, il peut être émis l'hypothèse que certains produits issus du catabolisme présentent une toxicité éventuelle conduisant à leur séquestration. L'ensemble de ces données réunies dans la figure VII.1 ainsi que les résultats obtenus, **nous permettent de proposer une typologie regroupant les éléments en trois groupes (Figure VII.2) selon leur potentiel de remobilisation :**

- de **Type I tels que l'N, toujours remobilisé, quelle que soit l'espèce.** La remobilisation de l'N est synchrone et fonctionnellement connectée à la sénescence car il est essentiellement stocké sous la forme de molécules organiques. L'augmentation de la remobilisation foliaire de cet élément est accrue lors d'une carence, cette dernière conduisant par ailleurs à une entrée en sénescence plus précoce (Figure VII.2, Etienne *et al.*, 2007).

- de **Type II tels que le K, le P, le S, le Mg et le Cu dont la remobilisation foliaire intervient lors d'une carence et potentiellement lors de la sénescence.** Pour la majorité d'entre eux, à l'exception du Cu, une part non négligeable de l'élément est stockée sous forme minérale au sein des vacuoles, et peut être véhiculée sous cette forme par les vaisseaux conducteurs (Figure VII.1). L'hypothèse que la remobilisation de ces éléments soit principalement induite par une carence nutritionnelle sans réelle connexion fonctionnelle avec la sénescence peut être émise. La remobilisation des éléments de type II est variable, elle est fortement affectée par la force de puits, la taille du pool d'élément stocké, la durée de la sénescence et la disponibilité en nutriments dans la solution du sol. A titre d'exemple, (Abdallah *et al.*, 2010) ont montré que le S foliaire est remobilisé en cas de carence chez le colza, et que cela peut s'accompagner d'un retard de sénescence (Figure VII.2), comme l'illustre l'expression de gènes marqueurs de la sénescence tel que *BnaSag12*. L'absence de remobilisation d'un élément pourrait être due à un manque de force puits, un manque de mobilité des nutriments, un stockage insuffisant des nutriments ou une absorption depuis la solution du sol qui prévaut sur la remobilisation lorsque la disponibilité en nutriment n'est pas limitante. Les nutriments stockés dans les vacuoles sous la forme d'ions inorganiques (P, K, S, Mg, par exemple) (Figure VII.1) pourraient être plus facilement remobilisés



que ceux stockés sous la forme de molécules organiques telles que les protéines nécessitant la dégradation de structures cellulaires telles que les chloroplastes. Ainsi, en cas de carence en S, chez le colza, le S endogène préalablement stocké dans les organes végétatifs sous la forme de sulfate est remobilisé pour maintenir la croissance (Abdallah *et al.*, 2010). Il est exporté depuis la vacuole vers le phloème *via* l'induction des transporteurs tonoplastiques : SULTR4.1 et SULTR4.2 (Kataoka *et al.*, 2004; Dubousset *et al.*, 2009). Ce mécanisme est indépendant de la sénescence, le S pouvant être remobilisé sans nécessairement une dégradation des structures ou composants cellulaires. Lorsque la remobilisation du sulfate vacuolaire devient insuffisante pour maintenir la croissance (Abdallah *et al.*, 2011), la sénescence foliaire est induite, permettant la dégradation de composés organiques soufrés telles que des protéines solubles dans le but d'augmenter le S remobilisé pour les organes en développement (Avicé et Etienne, 2014).

Les éléments tels que le Ni, le Mo et le B, potentiellement remobilisables chez quelques espèces seulement (Figure 3C, D, Chap. IV) pourraient être rattachés à ce type II, bien qu'ils soient essentiellement associés à des structures moléculaires complexes (uréeses, facteur MoCo, Rhamnogalacturonane II, respectivement), nécessitant une dégradation préalable et ne présentant pas par ailleurs de forme de stockage réellement identifiées (Figure VII.1). D'autres éléments tels que le Fe ou le Zn pourraient également être rattachés à cette catégorie. Bien que présentant une mobilité reconnue dans le phloème sous forme complexée (Figure VII.1), nous n'avons pas observé de remobilisation de ces éléments que ce soit sous l'effet d'une carence (quel que soit le tissu : feuilles ou racines) ou lors de la sénescence en condition de plein champ (sauf le Zn chez le blé et l'orge et le Fe chez le colza). Ces résultats mériteraient cependant d'être affinés, compte tenu de la forte implication de ces éléments dans un grand nombre de protéines (plus de 1 200 protéines à Zn) qui sont sûrement hydrolysées, au moins en partie lors de la sénescence foliaire. Il peut être alternativement émis l'hypothèse que les produits de dégradation contenant ces éléments présentent une toxicité conduisant à leur nécessaire séquestration.

**- de Type III tels que le Ca et le Mn dont la remobilisation foliaire lors d'une carence ou lors de la sénescence ne semble pas possible hormis chez le blé et l'orge.** Leur bilan de masse à l'échelle d'une feuille traduit soit un seuil d'accumulation soit une accumulation continue au cours de la vie de la feuille. Ces éléments sont considérés comme peu mobiles dans le phloème (Biddulph *et al.*, 1959; White, 2012). Face à ce défaut de remobilisation foliaire, nous avons cependant démontré, que le Ca et le Mn, sont massivement remobilisés des racines (-97,4 %  $\pm$  4,63 et -86.1 %  $\pm$  0,62 du contenu racinaire respectivement) probablement *via* le xylème chez *B. napus* lors d'une carence (Figure 5B et données supplémentaires SD11, Chap. IV).



**Parallèlement, grâce au dispositif expérimental de carence ciblée, nous avons pu mettre en lumière de multiples interactions nutritionnelles : l'absorption de multiples éléments est affectée par une carence en un élément.** La **figure VII.3** dresse le bilan exhaustif des mesures d'absorption de chaque élément nutritif en réponse à une carence en 14 éléments essentiels (N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, B, Ni et Cl) ainsi que les données obtenues avec des carences en trois éléments bénéfiques (Co, Si et Na) non présentées dans ce manuscrit. L'absorption de chaque élément a été estimée de façon relative à celle d'un témoin ayant une production de biomasse identique au carencé, afin d'extraire l'effet direct d'une limitation de croissance due à une carence. De cette façon, deux groupes de réponse peuvent être caractérisés :

- **le premier groupe de réponse** (résultats non présentés dans ce manuscrit), **indique qu'une carence, en particulier d'un macro-élément, affecte négativement l'absorption de nombreux autres éléments minéraux et ceci indépendamment de la croissance.** C'est le cas des carences en N et en P qui présentent des effets délétères sur l'absorption de presque tous les macro-éléments mais aussi d'une partie des micro-éléments (Figure VII.3). A titre d'exemple, une carence en N réduit fortement l'absorption de K (-71,7 %  $\pm$  1,96), de S (-65,4 %  $\pm$  1,78), de P (-63,4 %  $\pm$  2,02) ou de Ca (-73,0 %  $\pm$  1,99). De la même façon, une carence en P réduit l'absorption de K et de S. L'implication de l'N et du P, respectivement dans la synthèse des protéines et le métabolisme énergétique, deux fonctions requises pour l'activité des transporteurs, explique aisément les effets négatifs mesurés sur l'absorption des autres éléments. Des interactions négatives similaires (cela en considérant une diminution au moins supérieure à -30 % par rapport au témoin et un seuil de probabilité  $P < 0.001$ ) ont été constatées lors de carence en S (sur Mg et Na), en Ca (sur S, Mn, B et Na), en Mg, Zn, Cu, Mo, B, Cl, Na, Co, Ni et même en Si. Nous avons choisi de ne pas nous focaliser sur ces réponses déjà en partie explicitées dans la littérature.

- **le deuxième groupe de réponse, plus original car moins décrit dans la littérature, correspond aux carences minérales qui affectent positivement, à biomasse produite égale, l'absorption d'autres éléments (Figure VII.3 ; Figure 1, Chap. V).** Ces interactions ionomiques pourraient être dues à différents mécanismes : interactions au niveau de la disponibilité dans le sol, au niveau de l'absorption ou/et au niveau du métabolisme. Dans le modèle d'interactions construit par Baxter, en 2009 présenté dans la synthèse bibliographique (Figure II.17), les interactions non exhaustives entre éléments dans les tissus végétaux résultant de régulations génétiques, physiologiques et chimiques entre éléments avaient été envisagées, mais seules quelques-unes ont pu être expliquées. **Un total de 18 interactions ont été identifiées pour lesquelles l'absorption d'un élément est très significativement augmenté lors d'une carence** (au seuil d'une augmentation au moins supérieure de 50 % à celle du témoin et avec une probabilité  $P < 0.001$ ).



Ainsi, à titre d'exemple, l'absorption du Zn est augmentée lors d'une carence en Mg, en Fe ou en Na. Cette augmentation des teneurs en Zn chez les plantes carencés en Mg et en Fe pourrait résulter de l'expression accrue de canaux à cations aspécifiques. De même, les transporteurs ayant une forte affinité pour le  $Fe^{2+}$  tels que IRT1, surexprimés lors d'une carence en Fe transportent également d'autres cations divalents tels que le  $Zn^{2+}$ , le  $Cu^{2+}$ , le  $Mn^{2+}$  ou encore le  $Cd^{2+}$  (Pilon *et al.*, 2009), d'où l'accroissement de leur absorption lors d'une carence en Fe. Le rôle osmotique des ions  $Mg^{2+}$  et  $Na^+$  pourraient également impliquer d'autres cations tels que  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$  et ainsi permettre une homéostasie osmotique et/ou un équilibre cations/anions.

**Le Mo est l'élément dont l'absorption varie avec la plus forte intensité en réponse à une carence.** Son absorption augmente de 938 %, 419 %, 247 %, 228 %, 253 % et 230 % en cas de carences en S, Fe, Cu, Zn, Mn et B (Figure 2, Chap. V). Le Mo a une fonction essentielle mais cependant limitée dans la plante puisqu'il ne participe, sous la forme du cofacteur MoCo, qu'à la fonctionnalité de six enzymes : la nitrate réductase, la nitrogénase, la sulfite oxydase, la xanthine oxydase, l'aldéhyde oxydase et l'amidoxine réductase (mARC pour mitochondrial amidoxime reducing component) dont le rôle est encore inconnu (Mendel, 2005; Schwarz et Mendel, 2006; Schwarz *et al.*, 2009; Bittner, 2014). Nous avons donc recherché l'origine de l'accumulation de Mo lors de ces carences minérales en essayant de déterminer si ces interactions interviennent au niveau métabolique ou plus directement au niveau de l'absorption.

**L'accumulation de Mo lors d'une carence en Zn ou en Cu est sans doute due à un défaut de synthèse du facteur MoCo, puisque sa voie de synthèse requière la présence de ces deux éléments** (Schwarz et Mendel, 2006; Schwarz *et al.*, 2009; Llamas *et al.*, 2011; Bittner, 2014). En cas de carence en Zn et en Cu, l'expression du transporteur spécifique de Mo : BnaMOT1 est induite (Figure 3, Chap. V). L'implication de la protéine CNX1, intervenant dans la dernière étape de la voie de biosynthèse du MoCo lors de l'insertion du Mo, a été suggérée comme ayant un rôle dans la régulation de la concentration intracellulaire de Mo *via* la régulation de l'activité du transporteur MOT1 (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009). Néanmoins, notre travail n'a pas permis de mettre en évidence des relations entre les niveaux d'expression de CNX1 et de MOT1, invalidant potentiellement cette hypothèse (Figure 3, Chap. V). Ainsi, les produits de l'assimilation du Mo, tels que la concentration en facteur MoCo, pourraient exercer une régulation négative de MOT1. Le dosage du facteur MoCo pourrait être envisagé afin d'étayer cette hypothèse.

**L'accumulation de Mo lors d'une carence en S, en Fe, en Mn ou en B pourrait avoir une origine différente de celle mise en évidence lors d'une carence en Cu ou en Zn.** En effet, ces éléments ne sont pas connus pour intervenir dans la voie de biosynthèse du MoCo sauf au sein des clusters [Fe-S] requis pour la synthèse du MoCo ; par exemple, CNX2 qui catalyse la



circularisation de la GTP en cPMP lors de la première étape dans la mitochondrie possède deux clusters [4Fe-4S] (Llamas *et al.*, 2011). Une interaction au niveau de l'absorption pourrait être à l'origine de cette accumulation. En effet, malgré une augmentation de l'expression de *TaeMot1* en cas de carence en S chez le blé, le transporteur *MOT1* ne peut pas expliquer à lui seul la remarquable accumulation de Mo (Shinmachi *et al.*, 2010). Quelques auteurs ont donc suggéré que le Mo pourrait être absorbé par des transporteurs de sulfate (Shinmachi *et al.*, 2010; Schiavon *et al.*, 2012). Ainsi, chez *Stylosanthes hamata*, l'absorption du molybdate à partir de la solution du sol est assurée par *SHST1*, un transporteur de sulfate du groupe 1 (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Le Mo et le S sont absorbés sous la forme d'anions bivalents :  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{MoO}_4^{2-}$ , présentant des propriétés chimiques similaires (charge, taille, structure, propriétés de liaison chimique) et pouvant donc de ce fait rivaliser pour les mêmes sites d'absorption (Dudev et Lim, 2004; Bittner, 2014). En réponse aux carences en S, Fe, Mn, Mo et B, l'expression des gènes *BnaSultr1.1*, et dans une moindre mesure *BnaSultr1.2*, codant pour deux transporteurs racinaires de S, est induite (Figure 4.A-B, Chap. V). Lors de la carence en S, l'expression de *BnaSultr1.1* est corrélée à l'accumulation de Mo (Figure 3D, Chap. VI) au moins en phase initiale. Le Mo pourrait donc être en partie absorbé *via* le transporteur de sulfate *SULTR1.1*. Cette dernière hypothèse s'appuie également sur l'analyse des données de la plateforme de phénotypage ionomique de l'Université de la Purdue obtenues avec des mutants d'*A. thaliana*, KO *Atsultr1.1* et *Atsultr1.2*. En effet, le mutant double KO *Atsultr1.1* et *Atsultr1.2* présente des teneurs en S et en Mo plus faibles. De même, la teneur en Mo du mutant KO *Atsultr1.1* est également réduite. A l'inverse, le mutant KO *Atsultr1.2* se caractérise par une augmentation de la teneur en Mo des feuilles, et il est possible d'émettre l'hypothèse que cela résulterait d'une sur-expression de *Atsultr1.1* (données non disponibles). Ces résultats préliminaires ne permettent néanmoins pas de conclure quant au rôle des transporteurs de sulfate dans l'acquisition du Mo mais laisse fortement envisager une implication de *Atsultr1.1*. Pour valider cette hypothèse, une validation fonctionnelle par des approches de génétique inverse des gènes *AtSultr1.1* et *AtSultr1.2* est nécessaire.

**Les interactions détaillées ci-dessus permettent de mettre en évidence que les éléments du ionome constituent un réseau d'éléments interdépendants et permettent d'envisager la ionomique comme outil d'évaluation du statut nutritionnel des plantes.** L'analyse simultanée de plusieurs éléments peut donc nous permettre d'accéder à un niveau de compréhension plus fin des conséquences d'une modification de la nutrition minérale chez le colza et des mécanismes impliqués. En effet, la diminution de l'absorption ou de l'accumulation d'un élément peut être la conséquence indirecte d'une carence en un autre élément. De nombreux exemples peuvent être

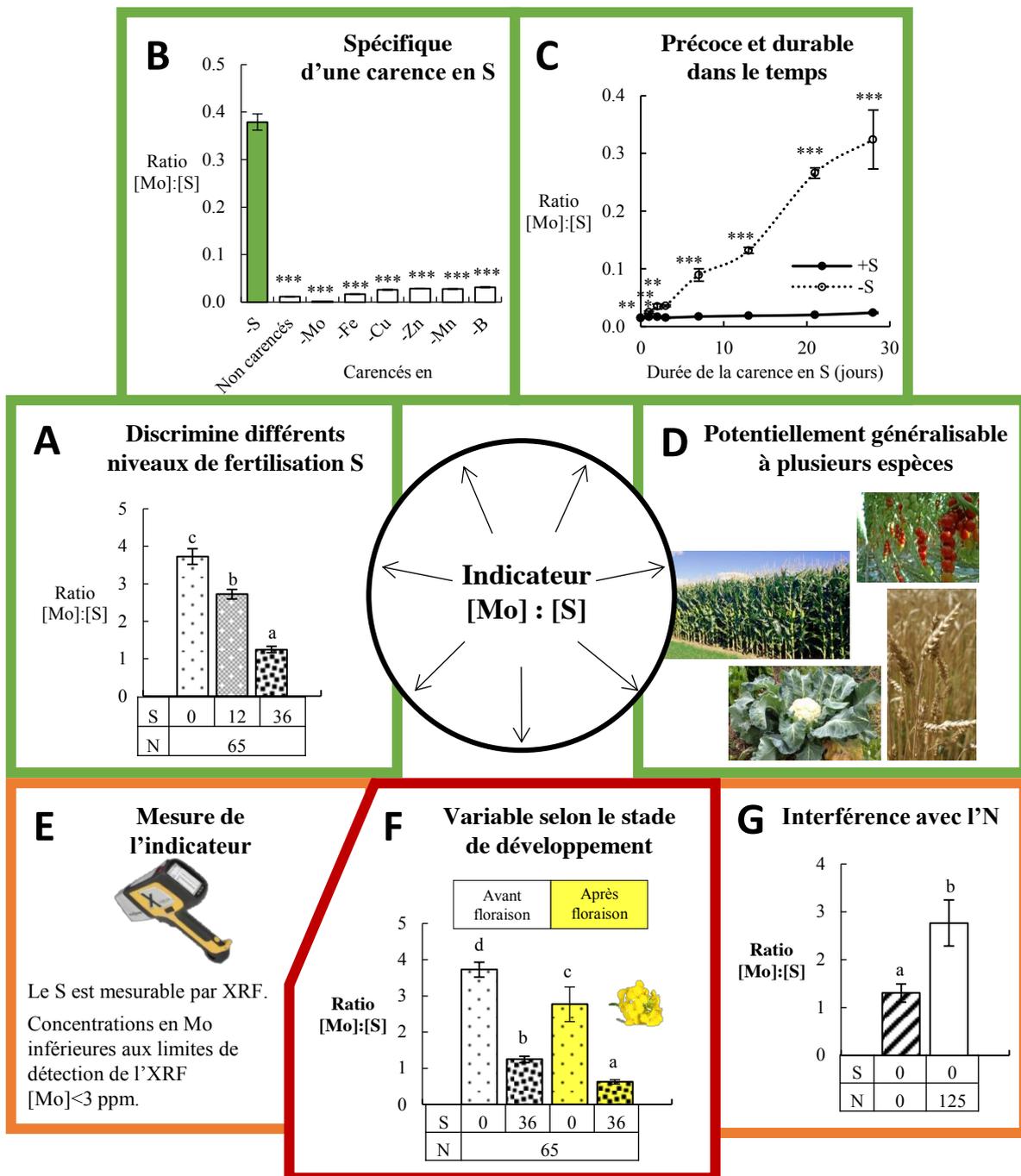


extraits de la littérature qui montrent notamment que l'origine des interactions peut être diverse. Celles-ci peuvent être due à une complexation dans le sol comme le Se qui précipite avec certains métaux lourds tels que le Hg réduisant sa disponibilité dans les sols pollués (Wang *et al.*, 2014). Elles peuvent également être la conséquence d'interactions au niveau de l'absorption. Ainsi, une toxicité secondaire en Zn a été reportée en cas de carence en Fe qui résulte directement de la compétition entre ces deux cations bivalents au niveau de l'absorption par le transporteur IRT1 (Guerinot, 2000). Une disponibilité limitée en un nutriment peut avoir une incidence sur les voies métaboliques impliquant des enzymes dépendantes de cet élément, entraînant une sur-régulation de l'absorption de certains éléments pour contrebalancer son absence. Par exemple, une carence en Ni va avoir un effet délétère sur l'absorption d'N sous la forme d'urée, puisque celui-ci est essentiel à l'activité de l'uréase (Arkoun *et al.*, 2013). Lors de la conduite d'une culture, il paraissait essentiel d'évaluer les effets d'une carence nutritionnelle sur la composition du ionome.

**D'ailleurs selon Baxter *et al.*, (2008b), la composition du ionome peut être considérée comme un indicateur du statut physiologique des plantes.** En effet, celle-ci est modulée en cas de carences, de modifications morphologiques (cadre de caspary), ou en réponse à des facteurs abiotiques (sécheresse, disponibilité en eau...). De plus, la modification de la seule teneur en un élément ne permet pas de diagnostiquer une carence. Par exemple, pour détecter une carence en S, plusieurs indicateurs ont été proposés dont la teneur en S total (Pinkerton, 1998), n'exigeant qu'une seule mesure. Cependant, la teneur en S total peut être influencée par différents facteurs indépendants de la nutrition soufrée, tels que la salinité, la disponibilité en eau ou la température, le stade de croissance ou la vitesse de croissance (Blake-Kalff *et al.*, 2000; Scherer, 2001). Une concentration en S classée comme limitante une année pourrait donc être classée comme suffisante l'année suivante. De plus, la teneur en certains éléments est maintenue à un niveau constant malgré une limitation dans le milieu. A titre d'exemple, l'homéostasie du Fe est maintenue dans les tissus aériens de plantules d'*Arabidopsis* croissant dans un milieu de culture où la concentration en Fe varie de 1 à 10  $\mu\text{M}$  FeHBED (Baxter *et al.*, 2008b).

**L'utilisation d'une combinaison d'éléments pourrait permettre de diagnostiquer une carence.** Un ratio d'ions pourrait permettre d'obtenir un indicateur spécifique d'une carence minérale.

Compte tenu de l'accumulation importante de Mo lors de la carence en S décrite précédemment (Figure 2A, chap. V ; Figure 3A, chap VI), **le ratio [Mo]:[S] pourrait être utilisé comme un indicateur de la nutrition S afin de prédire une carence en S.** En effet, en conditions



**Figure VII.4. Le ratio [Mo]:[S] présente plusieurs avantages et inconvénients.**

(A) Il permet de discriminer des parcelles ayant reçu différents niveaux de fertilisation S (Figure 5, chap. VI). (B) C'est un indicateur spécifique de la carence en S, le ratio [Mo]:[S] des feuilles matures de plantes non carencées ou présentant d'autres carences minérale étant plus faibles (données extraites du chapitre V). (C) Il répond de façon précoce (dès le 1<sup>er</sup> jour de carence en S) et de façon durable dans le temps. (D) L'accumulation de Mo en cas de carence en S est une réponse généralisée de plusieurs espèces : blé, maïs, pois, chou-fleur et tomate. Cet indicateur présente également des inconvénients : (F) il évolue au cours du développement (Figure 5, chap. VI). En effet, les valeurs de ratio sont plus importantes avant floraison qu'après floraison pour un même niveau d'apport de fertilisation S. (G) Il dépend également de la fertilisation azotée, il est augmenté par un apport de N, qui en augmentant la croissance, accroît les besoins en S (Figure 5, chap. VI). (E) Cet indicateur nécessite pour son usage la mesure des teneurs en S et en Mo de feuilles matures de colza. A l'heure actuelle, un outil portable (XRF) reposant sur la diffraction des rayons X permet de mesurer les teneurs en S, mais les teneurs en Mo restent inférieures aux limites de détection [Mo] < 3 ppm et nécessitent donc un équipement plus précis (ICP-MS ou ICP-OES).

de plein champ l'utilisation du ratio [Mo]:[S] nous a permis de discriminer trois niveaux de fertilisations soufrées appliquées sur colza cultivé sur une parcelle oligotrophe (Figure VII.4A ; Figure 5, chap. VI), et révélant ainsi le statut nutritionnel S des plantes. Les plantes ne recevant aucune fertilisation soufrée accumulaient plus de Mo que les plantes ayant reçu un apport suffisant de fertilisation soufrée, confirmant ainsi les données obtenues en condition contrôlées (Figure 2A, chap. V ; Figure 3A, chap VI). Conséquemment, le ratio [Mo]:[S] était plus faible pour les plantes recevant une fertilisation S optimale que pour les plantes ayant reçu une faible fertilisation S (Figure 5G-I et données supplémentaires SD4G-I, chap. VI A). Cet indicateur présente l'avantage de répondre de façon **précoce** à une carence en S, puisque le ratio [Mo]:[S] **suit la cinétique d'induction du gène codant le transporteur SULTR1.1** en augmentant de façon significative dès le premier jour de carence en S (Figure 3B-D, chap. VI ; Figure VII.4C). De plus, cette réponse est durable dans le temps (Figure 3B, chap. VI ; Figure VII.4C).

La spécificité de ce ratio n'a pas été abordée directement lors de cette étude. Cependant, au cours de nos expérimentations, l'impact d'une fertilisation azotée et de carences minérales sur le ratio [Mo]:[S] a été mis en évidence. **La fertilisation azotée a un impact sur l'évolution du ratio [Mo]:[S]**. En effet, l'apport de fertilisant azoté augmente le ratio [Mo]:[S] et une absence de fertilisation le réduit (Figure 5 HI et données supplémentaires SD4 HI, chap. VI ; Figure VII.4G). Le ratio [Mo]:[S] traduit donc les besoins en S largement dépendant de la fertilisation azotée puisque cette dernière accroît la production de biomasse. D'autres carences minérales pourraient interférer avec cet indicateur puisque **l'accumulation de Mo n'est pas une réponse spécifique à la carence en S**. Chez le colza, l'absorption du Mo est également accrue en réponses aux carences en Zn, Cu, Fe, Mn et B (Figure 2A, chap. V). Cependant, le ratio [Mo]:[S] demeure à des niveaux bien plus faibles lors de ces carences que lors de carences en S ( $P < 2,5 \times 10^{-19}$ ), puisque le dénominateur [S] est peu affecté par ces carences et le numérateur [Mo] est accumulé en plus faible quantité chez les plantes carencées en Zn, Cu, Fe, Mn et B que chez les plantes carencées en S (Figure VII.4B). **Le ratio [Mo]:[S] pourrait donc être considéré comme un indicateur spécifique de la carence en S**, en tout cas pour la majorité des espèces cultivées. En effet, dans les sols contraignants, arides et alcalins ou mal drainés un excès de Mo a été constaté dans les fourrages (Meyer *et al.*, 1999). Pour ces sols, la validité du ratio [Mo]:[S] nécessite d'être étudiée.

Actuellement, ce ratio est dépendant du stade de développement. Deux gammes de ratio ont en effet été mesurées : avant et après floraison (Figure 5G-I, chap. VI ; Figure VII.4F). Pour permettre le diagnostic d'une carence en S et un ajustement de la fertilisation soufrée si nécessaire, des valeurs seuils pour le ratio [Mo]:[S] ont été déterminées à partir des données obtenues avant floraison lors de l'expérimentation au champ sur la parcelle oligotrophe en S, selon l'intervalle de



confiance à 95 % des valeurs moyennes des parcelles bien alimentées en S ( $36 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) et des parcelles non-alimentées en S ( $0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ). Néanmoins, cette première identification de valeurs seuils devra être affinée et réévaluée afin de permettre un diagnostic plus fiable du statut soufré des cultures de colza. Pour conduire à un diagnostic rapide, l'indicateur [Mo]:[S] doit pouvoir être mesuré au champ. De nouveaux outils d'analyse portables de type XRF (analyseurs de fluorescence à rayons X) ou LIBS (spectroscopie sur plasma induit par laser), permettant la mesure de nombreux éléments minéraux, sont devenus récemment disponibles et rendent cette analyse multi-élémentaire à des fins de diagnostic réalisable en condition de plein champ. Toutefois, actuellement, seule la mesure de S est permise par ces techniques, les teneurs en Mo au champ étant inférieures aux limites de détection (Figure VII.4E). D'autres techniques analytiques disponibles uniquement au laboratoire, sont utilisables telles que l'utilisation de torche plasma couplée à des détecteurs optique ou de masse. L'augmentation du ratio [Mo]:[S] résultant d'une disponibilité insuffisante en S semble être une réponse généralisée des plantes supérieures quels que soient leurs besoins intrinsèques en S. En effet, le ratio [Mo]:[S] était significativement augmenté en réponse à une carence en S chez *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Zea mays*, *P. sativum* et *S. lycopersicum* (Figure VII.4D). Le ratio [Mo]:[S] comme indicateur pourrait donc être étendu à d'autres espèces cultivées.

Au bilan, cette thèse a permis de proposer une typologie regroupant les éléments en trois groupes selon leur potentiel de remobilisation : un premier groupe d'élément toujours remobilisé dont la remobilisation est dépendante de la sénescence, un second groupe dont l'efficacité de remobilisation serait plutôt conditionnée par la disponibilité dans le sol de l'élément considéré et par le rapport source/puit au sein de la plante, de façon relativement indépendante de la sénescence. Enfin, un troisième groupe a été proposé pour des éléments non mobiles dans le phloème pouvant être remobilisés à partir des racines *via* le xylème. Nous avons également mis en évidence de nombreuses interactions entre nutriments qui, au-delà d'une meilleure compréhension de la gestion des nutriments par les plantes, nous ont permis de proposer une première application pour la gestion de la fertilisation soufrée des cultures.



## II. Perspectives de recherche et de développement

Deux thématiques de recherche ont été développées au cours de ce travail doctoral. La première visait à identifier des stratégies potentiellement différentes, selon les éléments, en termes de mise en réserve et de remobilisation. La deuxième visait à caractériser les modifications de la composition ionomique du colza en réponse à 13 carences individuelles. Dans un cas comme dans l'autre, de nombreuses perspectives de recherche peuvent être proposées et permettent d'envisager des expérimentations complémentaires afin d'une part, de poursuivre le décryptage des mécanismes de remobilisation et des interactions nutritionnelles et d'autre part, de développer l'utilisation du ratio [Mo]:[S] pour le pilotage de la fertilisation soufrée de différentes cultures.

### II.1. Perspectives de recherches au niveau fondamental

- **Vérifier l'absence de remobilisation de certains éléments par utilisation d'isotopes stables.** L'approche expérimentale que nous avons mise en place avait pour objectif d'estimer la remobilisation nette de chaque élément considéré, et pour cela de se placer en condition de privation totale. Si les résultats obtenus sont particulièrement probants pour la plupart des éléments, il n'en est pas de même pour le Cu, le Zn, le Fe, le Ni et le B pour lesquels la privation totale n'a pu être atteinte en raison de contaminations des solutions nutritives liées à la qualité de l'eau osmosée utilisée pour l'élaboration des solutions nutritives ; ces contaminations ont permis le maintien d'une absorption non négligeable. Pour ces éléments, l'importance des processus de remobilisation a pu être sous-estimée. **L'évaluation de la remobilisation réelle de ces éléments, et ainsi la confirmation ou l'infirmerie de l'absence de remobilisation foliaire, supposerait l'utilisation d'isotopes stables ou radioactifs (\*)** tels que le  $^{54}\text{Fe}$  ou  $^{59}\text{Fe}^*$ , le  $^{65}\text{Zn}^*$ , le  $^{65}\text{Cu}$ , le  $^{10}\text{B}$  ou le  $^{63}\text{Ni}^*$ . Par exemple, cette approche permettrait de statuer quant au potentiel de remobilisation du Zn pour lequel des données contradictoires existent dans la littérature (Hocking, 1994; Garnett et Graham, 2005; Kutman *et al.*, 2012). Pour notre part, nous n'avons pas mis en évidence de remobilisation significative de cet élément que ce soit en conditions contrôlées chez le colza et en conditions de plein champ pour les autres espèces, à l'exception du blé et de l'orge. En complément de cette approche isotopique, l'identification des sous-produits issus de l'hydrolyse des protéines contenant du Zn permettrait de mieux comprendre la participation de celles-ci aux processus de remobilisation (Zn, mais aussi autres éléments). La mesure des ratios isotopiques du Zn, du Ni et du B pourrait être conduite au sein de l'UMR EVA par ICP-MS-HR alors que la mesure du ratio isotopique du Fe nécessiterait un équipement plus performant de type ICP-MS multi-collecteurs.

- **Déterminer pour certains éléments, si leur remobilisation peut être indépendante de la sénescence.** La remobilisation est généralement fortement associée au mécanisme de sénescence.



Par exemple, une carence en N induit une sénescence foliaire au cours de laquelle l’N est remobilisé. Au contraire, en cas de limitation en S, chez le colza, le  $\text{SO}_4^{2-}$  vacuolaire est activement remobilisé des feuilles au profit des organes en développement, cela de manière indépendante de la sénescence. D’autres éléments pourraient être remobilisés de manière similaire, indépendamment de la sénescence, comme le Mg, le Cl et d’autres éléments stockés sous forme minérale dans la vacuole, grâce à l’induction de leurs transporteurs tonoplastiques. Afin de préciser les liens entre sénescence et remobilisation, plusieurs indicateurs de la sénescence, comme l’indicateur moléculaire *SAG12-Cab* (Gombert *et al.*, 2006), ainsi que la dynamique des teneurs en Rubisco et en chlorophylle, pourraient être mesurés parallèlement au suivi des processus de remobilisation lors de carences nutritionnelles.

- **Préciser les modalités de remobilisation racinaire du Ca et du Mn.** L’un des résultats les plus originaux obtenus lors de ce travail concerne la mise en évidence d’une remobilisation racinaire massive du Ca et du Mn lors d’une carence nutritionnelle chez le colza. L’hypothèse d’une remobilisation par voie xylémique a été proposée. Afin d’appréhender cette remobilisation, la composition de phloème et du xylème en cas de carence devra être étudiée. Cette approche pourrait aussi associer la mesure des niveaux d’expressions de certains transporteurs, comme d’une part HACC, cADPR, IP3 et IP6 (White et Broadley, 2003) et d’autre part NRAMP3 et NRAMP4 (Lanquar *et al.*, 2005) qui contrôlent respectivement l’efflux vacuolaire de Ca et de Mn. Cette dernière approche ne pourra être complète, car les transporteurs responsables du chargement du Ca dans le xylème restent inconnus à l’heure actuelle (Song *et al.*, 2011).

- **Déterminer comment la sélection génotypique affecte l’ampleur de la remobilisation foliaire.** L’étude que nous avons effectuée sur plusieurs espèces en condition de plein champ montre un important potentiel de remobilisation et ce pour de nombreux éléments chez l’orge et le blé. Il pourrait être pertinent, en utilisant des génotypes anciens, et comme cela a été fait chez le tournesol (analyse rétroactive des effets de la sélection par le modèle SUNLAB, Kang *et al.*, 2012), de déterminer les mécanismes ayant été positivement favorisés par cette sélection progressive. Cela pourrait permettre d’une part, d’accéder à des co-régulations possibles de la remobilisation de plusieurs éléments, et d’autre part, d’identifier de nouvelles pistes de sélection pour améliorer les espèces peu efficaces en terme de remobilisation foliaire.

- **Comprendre les mécanismes de certaines toxicités par des méthodes de ionomique.** Les interactions ionomiques mises en évidence dans cette étude sont particulièrement riches et complexes. Nous avons montré qu’une carence en un élément nutritif augmente ou restreint l’absorption d’autres éléments minéraux. Une toxicité en un élément pourrait également avoir un impact sur le ionome. C’est par exemple, le cas en milieu salin d’une teneur en Na et Cl qui



excèdent le seuil de toxicité tout en induisant des risques de carences, liée à la compétition entre le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$  et entre le  $\text{Cl}^-$  et le  $\text{NO}_3^-$  (Botella *et al.*, 1997). Un autre exemple, pourrait concerner une pathologie animale, la molybdénose pour laquelle une consommation d'aliments riches en Mo induit des carences en Cu chez les ruminants (Ward, 1978). Au-delà des teneurs en Mo et en Cu dans les fourrages, le ratio Mo : Cu est également important à considérer pour l'alimentation animale (Ward, 1978). Les différents résultats obtenus lors de ce travail, pourrait fournir un éclairage nouveau sur les facteurs à l'origine de fortes teneurs en Mo des aliments pour bétail et pourrait peut être même permettre d'identifier des pratiques culturales susceptibles de réduire la prévalence de cette pathologie.

**- Démontrer l'implication fonctionnelle de *sultr1.1* et/ou de *sultr1.2* dans l'absorption du molybdate.** Parmi les interactions identifiées lors de nos approches expérimentales, le Mo était un élément particulièrement réactif puisqu'il était largement accumulé en cas de carence en S, Fe, Zn, Cu, Mn et B. Nos travaux sur le S, suggèrent que l'absorption du Mo pourrait être due à une absorption conjointe de ces deux éléments par le transporteur de sulfate racinaire SULTR1;1. Des données de la Plateforme ionomique de la Purdue viennent appuyer cette hypothèse puisque les teneurs en Mo des feuilles du mutant KO *sultr1.1* et du double mutant DKO *sultr1.1* et *sultr1.2* d'*Arabidopsis thaliana* est significativement réduite. L'implication des transporteurs de sulfate racinaire SULTR1.1 et SULTR1.2 devrait donc être testée par la mesure de l'absorption du sulfate et du molybdate et la quantification des transcrits de simples mutants *Atsultr1.1* et *Atsultr1.2*. Ce travail est d'ailleurs en cours de réalisation dans le cadre d'une collaboration avec le Professeur S. Kopriva de l'Université de Cologne.

**- Préciser les effets de carences en Zn ou en Cu sur la voie de synthèse du MoCo.** Dans le cas d'une carence en Zn ou en Cu, l'accumulation constatée de Mo pourrait être due à un défaut de synthèse du facteur MoCo, puisque sa voie de biosynthèse requière ces deux éléments. La protéine CNX1 intervenant dans la dernière étape de la voie de biosynthèse du MoCo, pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'absorption de Mo. Néanmoins, le niveau d'expression de *BnaCnx1* n'a pas permis dans cette étude d'expliquer l'augmentation de l'absorption de Mo. Chez le colza, plusieurs copies de ce même gène pourraient exister, en effet, d'autres séquences ayant plus de 90 % d'identité avec la séquence du gène *AtCnx1* chez *Arabidopsis* ont été identifiées. Les transcrits de ces gènes devraient être quantifiés. Les produits intermédiaires de la voie de synthèse du MoCo pourraient également exercer une régulation négative sur l'absorption de Mo et leur quantification pourrait permettre de tester cette hypothèse.

**- Caractériser d'autres interactions ionomiques pouvant conduire à l'identification de nouveaux indicateurs de nutrition minérale.** L'interaction particulièrement forte entre les teneurs



en Mo et en S a permis d'accéder à un indicateur de la nutrition soufrée : le ratio [Mo]:[S]. D'autres interactions ioniques ont été mises en évidence telles que l'interaction entre Na et K ou entre Fe, Zn et Mn (Figure VI.3). A partir de ces résultats, d'autres indicateurs pourraient être envisagés en suivant la même approche expérimentale que celle ayant conduit au développement de l'indicateur [Mo]:[S]. Par exemple, en cas de carence en K, une forte accumulation de Na est observée en raison de l'implication de nombreuses familles de transporteurs dans l'absorption à la fois de Na<sup>+</sup> et de K<sup>+</sup> : HKT (high-affinity K<sup>+</sup> transporter), HAK (high-affinity K<sup>+</sup> transporters), LCT (low-affinity cation transporter) et NSC (non-selective cation channels) (Schachtman et Liu, 1999). Un indicateur de la carence en K pourrait être développé sous la forme du ratio [Na]:[K] ou sous la forme du ratio [Na]: ([K]+[Cl]) afin de pallier l'effet d'un stress salin. De la même façon, un indicateur de nutrition ferrique pourrait être développé, en s'appuyant sur les résultats déjà acquis. En effet, en cas de carence en Fe, plusieurs métaux bivalents sont accumulés tels que le Zn et le Mn, en raison d'une compétition pour les mêmes sites d'absorption tels que IRT1 (Korshunova *et al.*, 1999). L'utilisation du ratio ([Zn]+[Mn]):[Fe] pourrait donc être envisagé comme indicateur de la nutrition ferrique.

## II.2. Perspectives de développement

- **Affiner et valider les valeurs seuils proposées pour l'indicateur [Mo]:[S].** L'utilisation de l'indicateur [Mo]:[S] nécessite l'établissement de valeurs dites critiques ou seuils pour diagnostiquer une limitation en S. La justesse du diagnostic dépend donc directement de l'établissement de ces valeurs seuils. Dans le chapitre V., des valeurs seuils ont été proposées afin d'attribuer à chaque parcelle une qualification de i) carencée, ii) présentant un risque de carence ou iii) non carencée en S. Ces valeurs seuils ont été déterminées à partir des données obtenues avant floraison lors de l'expérimentation au champ sur la parcelle oligotrophe en S d'Ondefontaine, selon l'intervalle de confiance à 95 % des valeurs moyennes des parcelles bien alimentées en S (36 kg.ha<sup>-1</sup>) et des parcelles non-alimentées en S (0 kg.ha<sup>-1</sup>). Néanmoins, ces valeurs seuils devraient être confirmées et affinées sur un plus grand nombre de parcelles en relation avec le rendement et la qualité des graines obtenus, après ou non, correction de la fertilisation S.

- **Proposer un diagramme d'interprétation ou un algorithme pour interpréter les valeurs du ratio [Mo]:[S].** Un diagnostic et des recommandations associées pourraient permettre un ajustement de la fertilisation soufrée par le développement d'un algorithme ou plus simplement d'un diagramme d'interprétation des valeurs de ratios obtenues. L'algorithme ou le diagramme d'interprétation devraient prendre en compte, en plus de la valeur du ratio [Mo]:[S], certains paramètres tels que les objectifs de rendement ou encore une évaluation indirecte de la disponibilité



en N (type de fertilisation, dose de l'apport, précédent cultural, reliquat en sortie d'hiver, association avec des légumineuses). Des paramètres pédoclimatiques (type de sol, pluviométrie, climat, etc...) pourraient également y être associés afin d'affiner les recommandations.

- **Optimiser la quantification du ratio [Mo]:[S]**. Une utilisation fonctionnelle de cet indicateur nécessiterait idéalement sa mesure en condition de plein champ. L'utilisation de système portable tel que l'XRF permet d'analyser le S directement à partir d'une poudre végétale. Au contraire, les teneurs en Mo mesurées dans les feuilles des plantes cultivées au champ étaient inférieures aux limites de détection de cet appareil. Le développement d'une méthode de compression de la poudre végétale pourrait permettre d'abaisser les limites de détection de l'XRF. Alternativement, l'utilisation de techniques analytiques de laboratoire (ICP-MS ou ICP-OES) pourrait être envisagée puisque l'analyse élémentaire d'une poudre végétale ne nécessite pas de modalités très contraignantes en termes de conservation et de transport des échantillons.

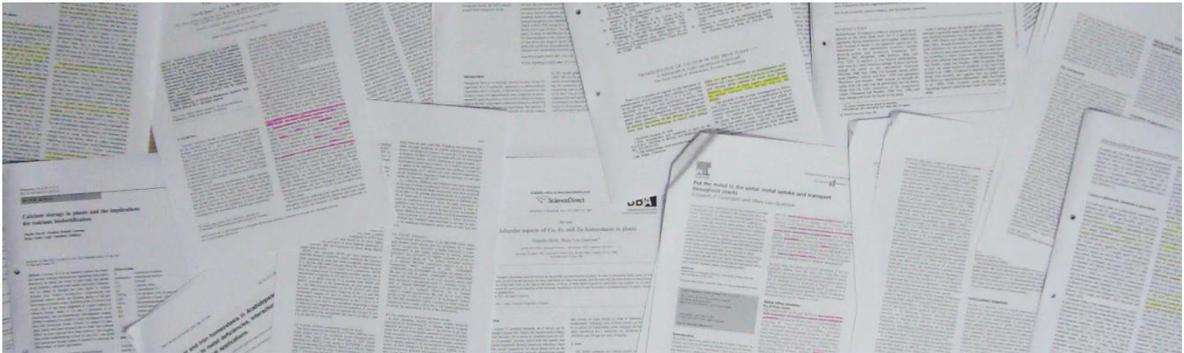
- **Etendre l'utilisation de l'indicateur [Mo]:[S] à d'autres cultures**. L'utilisation du ratio [Mo]:[S] comme indicateur pourrait être étendue à d'autres espèces cultivées telles que *B. oleracea*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *P. sativum* et *S. lycopersicum*. En effet, la diminution du ratio [Mo]:[S] résultant d'une disponibilité insuffisante en S semble être une réponse généralisée des plantes supérieures. Comme pour le colza, l'accumulation de Mo chez ces espèces devra être vérifiée en conditions de plein champ, puis des valeurs seuils devront être déterminées selon une méthodologie identique à celle que nous avons développée.



---

# Références bibliographiques

---





## Références bibliographiques

---

- Abadia A, Gil E, Morales F, Montañés L, Montserrat G, Abadía J** (1996) Marcescence and senescence in a submediterranean oak (*Quercus subpyrenaica* E.H. del Villar): photosynthetic characteristics and nutrient composition. *Plant Cell Environ* **19**: 685–694
- Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice J-C, Ourry A** (2010) Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *J Exp Bot* **61**: 2635–2646
- 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 Sci* **180**: 511–520
- Abreu IA, Cabelli DE** (2010) Superoxide dismutases - a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* **1804**: 263–274
- Agüera E, Cabello P, De La Haba P** (2010) Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus*) plants. *Physiol Plant* **138**: 256–267
- Ahluwalia B, Duffus CM** (1982) Mineral Ion Nutrition of Developing Barley Grains 1. Effect of Magnesium Deficiency on Ion Content of Immature Embryos and Endosperms. *Ann Bot* **50**: 93–103
- Akhtar MS, Oki Y, Adachi T** (2008) Intraspecific variations of phosphorus absorption and remobilization, P forms, and their internal buffering in Brassica cultivars exposed to a P-stressed environment. *J Integr Plant Biol* **50**: 703–716
- Alhendawi RA, Kirkby EA, Pilbeam DJ** (2005) Evidence that Sulfur deficiency enhances Molybdenum transport in xylem sap of tomato plants. *J Plant Nutr* **28**: 1347–1353
- Alloway BJ** (2008) Micronutrient deficiencies in global crop production. Springer Science & Business Media
- A. Moreira NKF** (2009) Yield, uptake, and retranslocation of nutrients in banana plants cultivated in upland soil of central amazonian. *J Plant Nutr* **32**: 443–457
- Amtmann A, Armengaud P** (2009) Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 275–283
- Andersson I** (2008) Catalysis and regulation in Rubisco. *J Exp Bot* **59**: 1555–1568
- Arkoun M, Jannin L, Lâiné P, Etienne P, Masclaux-Daubresse C, Citerne S, Garnica M, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A** (2013) A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil* **362**: 79–92
- Arnon DI, Stout PR** (1939) The Essentiality of Certain Elements in Minute Quantity for Plants with Special Reference to Copper. *Plant Physiol* **14**: 371–375
- Arnon DI, Wessel G** (1953) Vanadium as an essential element for green plants. *Nature* **172**: 1039–1040



- Ashley MK, Grant M, Grabov A** (2006) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J Exp Bot* **57**: 425–436
- Astolfi S, Cesco S, Zuchi S, Neumann G, Roemheld V** (2006) Sulfur starvation reduces phytosiderophores release by iron-deficient barley plants. *Soil Sci Plant Nutr* **52**: 43–48
- Avice J-C, Etienne P** (2014) Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Exp Bot*. doi: 10.1093/jxb/eru177
- Balik J, Pavlikova D, Tlustos P, Sykora K, Cerny J** (2006) The fluctuation of molybdenum content in oilseed rape plants after the application of nitrogen and sulphur fertilizers. *Plant Soil Environ. - UZPI Czech Repub.*
- Barber SA** (1995) *Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach*. John Wiley & Sons
- Barker AV, Pilbeam DJ** (2006) *Handbook of Plant Nutrition*. CRC Press
- Batten G, Wardlaw I, Aston M** (1986) Growth and the distribution of phosphorus in wheat developed under various phosphorus and temperature regimes. *Aust J Agric Res* **37**: 459–469
- Baxter I** (2009) Ionomics: Studying the Social Network of Mineral Nutrients. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 381–386
- Baxter I** (2015) Should we treat the ionome as a combination of individual elements, or should we be deriving novel combined traits? *J Exp Bot* **erv040**
- Baxter I, Muthukumar B, Park HC, Buchner P, Lahner B, Danku J, Zhao K, Lee J, Hawkesford MJ, Guerinot ML, et al** (2008a) Variation in Molybdenum content across broadly distributed populations of *Arabidopsis thaliana* is controlled by a mitochondrial Molybdenum transporter (MOT1). *PLoS Genet* **4**: e1000004
- Baxter I, Ouzzani M, Orcun S, Kennedy B, Jandhyala SS, Salt DE** (2007) Purdue ionomics information management system. An integrated functional genomics platform. *Plant Physiol* **143**: 600–611
- Baxter IR, Vitek O, Lahner B, Muthukumar B, Borghi M, Morrissey J, Guerinot ML, Salt DE** (2008b) The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 12081–12086
- Benito B, Haro R, Amtmann A, Cuin TA, Dreyer I** (2014) The twins K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in plants. *J Plant Physiol* **171**: 723–731
- Biddulph O, Cory R, Biddulph S** (1959) Translocation of Calcium in the bean plant. 123. *Plant Physiol* **34**: 512–519
- Billard V, Maillard A, Garnica M, Cruz F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A, Etienne P** (2015) Zn deficiency in *Brassica napus* induces Mo and Mn accumulation associated with chloroplast proteins variation without Zn remobilization. *Plant Physiol Biochem* **86**: 66–71
- Billard V, Ourry A, Maillard A, Garnica M, Coquet L, Jouenne T, Cruz F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Etienne P** (2014) Copper-deficiency in *Brassica napus* induces Copper remobilization, Molybdenum accumulation and modification of the expression of chloroplastic proteins. *PLoS ONE* **9**: e109889



- Biswal B, Mohapatra PK, Biswal UC, Raval MK** (2012) Leaf senescence and transformation of chloroplasts to gerontoplasts. *In* JJ Eaton-Rye, BC Tripathy, TD Sharkey, eds, Photosynthesis. Springer Netherlands, pp 217–230
- Bittner F** (2014) Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Plant Nutr* **5**: 28
- Blake-Kalff MMA, Harrison KR, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP** (1998) Distribution of Sulfur within oilseed rape leaves in response to Sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol* **118**: 1337–1344
- Blake-Kalff MMA, Hawkesford MJ, Zhao FJ, McGrath SP** (2000) Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil* **225**: 95–107
- Blake-Kalff MMA, Zhao F-J, Hawkesford MJ, McGrath SP** (2001) Using plant analysis to predict yield losses caused by sulphur deficiency. *Ann Appl Biol* **138**: 123–127
- Blevins DG, Lukaszewski KM** (1998) Boron in plant structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 481–500
- Botella MA, Martinez V, Pardines J, Cerda A** (1997) Salinity induced potassium deficiency in maize plants. *J Plant Physiol* **150**: 200–205
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F** (2012) Function of nutrients: Micronutrients. *In* P Marschner, ed, Marschners Miner. Nutr. High. Plants Third Ed. Academic Press, San Diego, pp 191–248
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A** (2007) Zinc in plants. *New Phytol* **173**: 677–702
- Brown PH, Hu H** (1996) Phloem mobility of Boron is species dependent: Evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Ann Bot* **77**: 497–506
- Brown PH, Welch RM, Cary EE** (1987) Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol* **85**: 801–803
- Burns IG, Durnford J, Lynn J, McClement S, Hand P, Pink D** (2012) The influence of genetic variation and nitrogen source on nitrate accumulation and iso-osmotic regulation by lettuce. *Plant Soil* **352**: 321–339
- Cakmak I, Marschner H** (1986) Mechanism of phosphorus-induced zinc deficiency in cotton. I. Zinc deficiency-enhanced uptake rate of phosphorus. *Physiol Plant* **68**: 483–490
- Casieri L, Gallardo K, Wipf D** (2012) Transcriptional response of *Medicago truncatula* sulphate transporters to arbuscular mycorrhizal symbiosis with and without sulphur stress. *Planta* **235**: 1431–1447
- Cataldo DA, Garland TR, Wildung RE** (1978) Nickel in Plants: II. Distribution and Chemical Form in Soybean Plants. *Plant Physiol* **62**: 566–570
- Cherbuy B, Joffre R, Gillon D, Rambal S** (2001) Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. *Tree Physiol* **21**: 9–17



- 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 Physiol* **44**: 914–921
- Claessens H, Oosterbaan A, Savill P, Rondeux J** (2010) A review of the characteristics of black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) and their implications for silvicultural practices. *Forestry* **83**: 163–175
- Clemens S** (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**: 1707–1719
- Colangelo EP, Guerinot ML** (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 322–330
- Committee AM** (1987) Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst* **112**: 199–204
- Conn SJ, Conn V, Tyerman SD, Kaiser BN, Leigh RA, Gilliham M** (2011) Magnesium transporters, MGT2/MRS2-1 and MGT3/MRS2-5, are important for magnesium partitioning within *Arabidopsis thaliana* mesophyll vacuoles. *New Phytol* **190**: 583–594
- Conte S, Stevenson D, Furner I, Lloyd A** (2009) Multiple antibiotic resistance in *Arabidopsis* is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant Physiol* **151**: 559–573
- Crafts-Brandner SJ, Hölzer R, Feller U** (1998) Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiol Plant* **102**: 192–200
- Crain JS, Houk RS, Eckels DE** (1989) Noise power spectral characteristics of an inductively coupled plasma-mass spectrometer. *Anal Chem* **61**: 606–612
- Dakora FD, Phillips DA** (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* **245**: 35–47
- Dau H, Haumann M** (2008) The manganese complex of photosystem II in its reaction cycle—Basic framework and possible realization at the atomic level. *Coord Chem Rev* **252**: 273–295
- Davidian J-C, Kopriva S** (2010) Regulation of sulfate uptake and assimilation - the same or not the same? *Mol Plant* **3**: 314–325
- Dayod M, Tyerman SD, Leigh RA, Gilliham M** (2010) Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. *Protoplasma* **247**: 215–231
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse J-M, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H** (2009) CLC-mediated anion transport in plant cells. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **364**: 195–201
- Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F** (2010) From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J Exp Bot* **erq409**
- Desclos M, Etienne P, Coquet L, Jouenne T, Bonnefoy J, Segura R, Reze S, Ourry A, Avice J-C** (2009) A combined <sup>15</sup>N 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



- D'Hooghe P, Dubousset L, Gallardo K, Kopriva S, Avice J-C, Trouverie J** (2014) Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated to alterations of seed yield and quality in sulphur-limited *Brassica napus* L. *Mol Cell Proteomics* mcp–M113
- Diaz C, Lemaitre T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, 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 Physiol* **147**: 1437–1449
- Díaz-Quintana A, Leibl W, Bottin H, Sétif P** (1998) Electron transfer in photosystem I reaction centers follows a linear pathway in which Iron-Sulfur cluster FB is the immediate electron donor to soluble Ferredoxin. *Biochemistry (Mosc)* **37**: 3429–3439
- Diner BA, Petrouleas V, Wendoloski JJ** (1991) The iron-quinone electron-acceptor complex of photosystem II. *Physiol Plant* **81**: 423–436
- Dixon NE, Gazzola TC, Blakeley RL, Zermer B** (1975) Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc* **97**: 4131–4133
- Dolfing J, Chardon WJ, Japenga J** (1999) Association between colloidal iron, aluminum, phosphorus, and humic acids. *Soil Sci* **164**: 171–179
- Droux M** (2004) Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynth Res* **79**: 331–348
- Drummond RSM, Tutone A, Li Y-C, Gardner RC** (2006) A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system. *Plant Sci* **170**: 78–89
- Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, Etienne P, Meuriot F, Hawkesford MJ, Gombert J, Segura R, Bataille M-P, Reze S, et al** (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. *J Exp Bot* **60**: 3239–3253
- Dudev T, Lim C** (2004) Oxyanion selectivity in sulfate and molybdate transport proteins: An ab Initio/CDM Study. *J Am Chem Soc* **126**: 10296–10305
- Duvick DN** (2005) The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). *In* B-A in Agronomy, ed, Academic Press, pp 83–145
- El Kassis E, Cathala N, Rouached H, Fourcroy P, Berthomieu P, Terry N, Davidian J-C** (2007) Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiol* **143**: 1231–1241
- 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. *Funct Plant Biol* **34**: 895–906
- Fan M-S, Zhao F-J, Fairweather-Tait SJ, Poulton PR, Dunham SJ, McGrath SP** (2008) Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS* **22**: 315–324
- Fischer AM** (2007) Nutrient remobilization during leaf senescence. *In* S Gan, ed, *Annu. Plant Rev. Vol. 26 Senescence Process. Plants*. Blackwell Publishing Ltd, pp 87–107



- Fitzpatrick KL, Tyerman SD, Kaiser BN** (2008) Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. *FEBS Lett* **582**: 1508–1513
- Forieri I, Wirtz M, Hell R** (2013) Toward new perspectives on the interaction of iron and sulfur metabolism in plants. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2013.00357
- Fracheboud Y, Luquez V, Björkén L, Sjödin A, Tuominen H, Jansson S** (2009) The control of autumn senescence in european aspen. *Plant Physiol* **149**: 1982–1991
- Gansel X, Muñoz S, Tillard P, Gojon A** (2001) Differential regulation of the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J* **26**: 143–155
- Garcia L, Welchen E, Gonzalez DH** (2014) Mitochondria and copper homeostasis in plants. *Mitochondrion* **19, Part B**: 269–274
- Garnett TP, Graham RD** (2005) Distribution and remobilization of iron and copper in wheat. *Ann Bot* **95**: 817–826
- Gasber A, Klaumann S, Trentmann O, Trampczynska A, Clemens S, Schneider S, Sauer N, Feifer I, Bittner F, Mendel RR, et al** (2011) Identification of an *Arabidopsis* solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate. *Plant Biol* **13**: 710–718
- Gassmann W, Rubio F, Schroeder JI** (1996) Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *Plant J* **10**: 869–882
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N** (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **11**: 937–948
- Giehl RFH, Gruber BD, Wirén N von** (2013) It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *J Exp Bot* **65**: 769–778
- Giehl RFH, von Wirén N** (2014) Root nutrient foraging. *Plant Physiol* **166**: 509–517
- Gilbert GA, Knight JD, Vance CP, Allan DL** (2000) Proteoid root development of Phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. *Ann Bot* **85**: 921–928
- Gladyshev VN, Kryukov GV, Fomenko DE, Hatfield DL** (2004) Identification of trace element-containing proteins in genomic databases. *Annu Rev Nutr* **24**: 579–596
- Gojon A, Nacry P, Davidian J-C** (2009) Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 328–338
- 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. *J Exp Bot* **57**: 1949–1956
- Gout E, Rébeillé F, Douce R, Bligny R** (2014) Interplay of  $\text{Mg}^{2+}$ , ADP, and ATP in the cytosol and mitochondria: unravelling the role of  $\text{Mg}^{2+}$  in cell respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E4560–4567
- Grant CA, Bailey LD** (1993) Fertility management in canola production. *Can J Plant Sci* **73**: 651–670



- Grotz N, Guerinot ML** (2006) Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1763**: 595–608
- Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N** (2013) Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol* **163**: 161–179
- Grusak MA** (1994) Iron transport to developing ovules of *Pisum sativum* (I. Seed import characteristics and phloem Iron-loading capacity of source regions). *Plant Physiol* **104**: 649–655
- Grusak MA, Pearson JN, Marentes E** (1999) The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Res* **60**: 41–56
- Guerinot ML** (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1465**: 190–198
- Gupta UC, Monteiro FA, Werner JC** (2001) Micronutrients in grassland production. *Int. Grassl. Congr.* pp 149–156
- Guttieri MJ, Stein RJ, Waters BM** (2013) Nutrient partitioning and grain yield of TaNAM-RNAi wheat under abiotic stress. *Plant Soil* **371**: 573–591
- Hagen-Thorn A, Varnagiryte I, Nihlgård B, Armolaitis K** (2006) Autumn nutrient resorption and losses in four deciduous forest tree species. *For Ecol Manag* **228**: 33–39
- Hänsch R, Mendel RR** (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol* **12**: 259–266
- Hansen TH, Laursen KH, Persson DP, Pedas P, Husted S, Schjoerring JK** (2009) Micro-scaled high-throughput digestion of plant tissue samples for multi-elemental analysis. *Plant Methods* **5**: 1–11
- Harris J, Schneberg KA, Pilon-Smits EAH** (2014) Sulfur-selenium-molybdenum interactions distinguish selenium hyperaccumulator *Stanleya pinnata* from non-hyperaccumulator *Brassica juncea* (*Brassicaceae*). *Planta* **239**: 479–491
- Harvey HP, van den Driessche R** (1999) Poplar nutrient resorption in fall or drought: influence of nutrient status and clone. *Can J For Res* **29**: 1916–1925
- Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Møller IS, White P** (2012) Functions of Macronutrients. *In* P Marschner, ed, *Marschners Miner. Nutr. High. Plants* Third Ed. Academic Press, San Diego, pp 135–189
- Hawkesford MJ** (2003) Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family - redundancy or specialization? *Physiol Plant* **117**: 155–163
- Hawkesford MJ, Barraclough P, eds** (2011) The molecular and physiological basis of nutrient use efficiency in crops. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex ; Ames, Iowa
- Hegelund JN, Pedas P, Husted S, Schiller M, Schjoerring JK** (2012) Zinc fluxes into developing barley grains: use of stable Zn isotopes to separate root uptake from remobilization in plants with contrasting Zn status. *Plant Soil* **361**: 241–250
- He G, Zhang J, Hu X, Wu J** (2010) Effect of aluminum toxicity and phosphorus deficiency on the growth and photosynthesis of oil tea (*Camellia oleifera* Abel.) seedlings in acidic red soils. *Acta Physiol Plant* **33**: 1285–1292



- Hibara K-I, Hosoki W, Hakoyama T, Ohmori Y, Fujiwara T, Itoh J-I, Nagato Y** (2013) Abnormal Shoot in Youth, a homolog of molybdate transporter gene, regulates early shoot development in rice. *Am J Plant Sci* **04**: 1–9
- Himelblau E, Amasino RM** (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *J Plant Physiol* **158**: 1317–1323
- Hinsinger P** (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* **237**: 173–195
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM** (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* **321**: 117–152
- Hocking PJ** (1994) Dry-matter production, mineral nutrient concentrations, and nutrient distribution and redistribution in irrigated spring wheat. *J Plant Nutr* **17**: 1289–1308
- Hocking PJ, Pate JS** (1977) Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Ann Bot* **41**: 1259–1278
- Hörtensteiner S, Feller U** (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot* **53**: 927–937
- Huang C, Barker SJ, Langridge P, Smith FW, Graham RD** (2000) Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and-deficient barley roots. *Plant Physiol* **124**: 415–422
- Hu H, Brown PH** (1997) Absorption of boron by plant roots. *Plant Soil* **193**: 49–58
- Hunashikatti MG, Channal HT, Sarangamath PA, Manjunathaiah HM, Hebsur NS** (2000) Effect of sulphur and molybdenum on the dry matter yield and uptake of S and Mo by cabbage. *Karnataka J Agric Sci* **13**: 840–845
- Husted S, Persson DP, Laursen KH, Hansen TH, Pedas P, Schiller M, Hegelund JN, Schjoerring JK** (2011) The role of atomic spectrometry in plant science. *J Anal At Spectrom* **26**: 52–79
- Ide Y, Kusano M, Oikawa A, Fukushima A, Tomatsu H, Saito K, Hirai MY, Fujiwara T** (2011) Effects of molybdenum deficiency and defects in molybdate transporter MOT1 on transcript accumulation and nitrogen/sulphur metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **62**: 1483–1497
- Ishida H, Izumi M, Wada S, Makino A** (2014) Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1837**: 512–521
- Jackson GD** (2000) Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agron J* **92**: 644–649
- Janzen HH, Bettany JR** (1984) Sulfur nutrition of rapeseed: I. Influence of fertilizer Nitrogen and Sulfur rates. *Soil Sci Soc Am J*. doi: 10.2136/sssaj1984.03615995004800010019x
- Kafkafi U, Valoras N, Letey J** (1982) Chloride interaction with nitrate and phosphate nutrition in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *J Plant Nutr* **5**: 1369–1385
- Kang F, Letort V, Magaldi H, Cournede P-H, Lecoeur J** (2012) SUNLAB: A functional-structural model for genotypic and phenotypic characterization of the sunflower crop. *IEEE*, pp 192–199



- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H** (2004) Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2693–2704
- Kauss H** (1987) Some aspects of Calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* **38**: 47–71
- Kirkby E** (2012) Introduction, definition and classification of nutrients. In P Marschner, ed, *Marschners Miner. Nutr. High. Plants Third Ed.* Academic Press, San Diego, pp 3–5
- Kirkby EA, Knight AH** (1977) Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants. *Plant Physiol* **60**: 349–353
- Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T, Matoh T** (1999) Borate-Rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca<sup>2+</sup> retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol* **119**: 199–204
- Kopriva S, Mugford SG, Matthewman C, Koprivova A** (2009) Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Rep* **28**: 1769–1780
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Gueriot ML, Pakrasi HB** (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37–44
- Krämer U, Talke IN, Hanikenne M** (2007) Transition metal transport. *FEBS Lett* **581**: 2263–2272
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A-S, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F** (2014) Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **65**: 789–798
- Kuper J, Llamas A, Hecht H-J, Mendel RR, Schwarz G** (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* **430**: 803–806
- Kutman UB, Kutman BY, Ceylan Y, Ova EA, Cakmak I** (2012) Contributions of root uptake and remobilization to grain zinc accumulation in wheat depending on post-anthesis zinc availability and nitrogen nutrition. *Plant Soil* **361**: 177–187
- Kutman UB, Yildiz B, Cakmak I** (2010) Effect of nitrogen on uptake, remobilization and partitioning of zinc and iron throughout the development of durum wheat. *Plant Soil* **342**: 149–164
- Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Gueriot ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L, et al** (2003) Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **21**: 1215–1221
- Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, et al** (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J* **24**: 4041–4051
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive F d, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A** (1999) Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J Cell Mol Biol* **18**: 509–519



- Léran S, Varala K, Boyer J-C, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, et al** (2014) A unified nomenclature of Nitrate Transporter 1 / Peptide Transporter family members in plants. *Trends Plant Sci* **19**: 5–9
- Li L-G, Sokolov LN, Yang Y-H, Li D-P, Ting J, Pandey GK, Luan S** (2008) A mitochondrial magnesium transporter functions in *Arabidopsis* pollen development. *Mol Plant* **1**: 675–685
- Lill R** (2009) Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature* **460**: 831–838
- Lill R, Kispal G** (2000) Maturation of cellular Fe–S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**: 352–356
- Li L, Tutone AF, Drummond RS, Gardner RC, Luan S** (2001) A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2761–2775
- Liu XF, Supek F, Nelson N, Culotta VC** (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *J Biol Chem* **272**: 11763–11769
- Liu Y, Donner E, Lombi E, Li R, Wu Z, Zhao F-J, Wu P** (2013) Assessing the contributions of lateral roots to element uptake in rice using an auxin-related lateral root mutant. *Plant Soil* **372**: 125–136
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* **25**: 402–408
- Llamas A, Tejada-Jimenez M, Fernandez E, Galvan A** (2011) Molybdenum metabolism in the alga *Chlamydomonas* stands at the crossroad of those in *Arabidopsis* and humans. *Metallomics* **3**: 578–590
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 280–287
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* **129**: 244–256
- Loudet O, Saliba-Colombani V, Camilleri C, Calenge F, Gaudon V, Koprivova A, North KA, Kopriva S, Daniel-Vedele F** (2007) Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2. *Nat Genet* **39**: 896–900
- Maathuis FJ** (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 250–258
- Maillard A, Diquélou S, Billard V, Laîné P, Garnica M, Prudent M, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A** (2015) Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Front Plant Sci* **6**: 317
- 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: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Ann Bot* **95**: 853–861
- 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. II. An  $^{15}\text{N}$ -labelling-based Simulation Model of N Partitioning Between Vegetative and Reproductive Tissues. *Ann Bot* **95**: 1187–1198
- Malhi SS, Gan Y, Raney JP** (2007) Yield, seed quality, and Sulfur uptake of *Brassica* oilseed crops in response to Sulfur fertilization. *Agron J*. doi: 10.2134/agronj2006.0269
- Malone M, White P, Morales MA** (2002) Mobilization of calcium in glasshouse tomato plants by localized scorching. *J Exp Bot* **53**: 83–88
- Malvi UR** (2011) Interaction of micronutrients with major nutrients with special reference to potassium. *Karnataka J. Agric. Sci.* 24:
- Mao D-D, Tian L-F, Li L-G, Chen J, Deng P-Y, Li D-P, Luan S** (2008) AtMGT7: An *Arabidopsis* gene encoding a low-affinity magnesium transporter. *J Integr Plant Biol* **50**: 1530–1538
- Marschner P** (2011) The role of the rhizosphere in nutrient use efficiency in crops. In Icolm J Hawkesford, P Barraclough, eds, *Mol. Physiol. Basis Nutr. Use Effic. Crops*. Wiley-Blackwell, pp 47–63
- Martínez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guamet JJ** (2008) Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J Cell Mol Biol* **56**: 196–206
- Martinez HEP, Novais RF, Rodrigues LA, Sacramento LVS do** (2005) Phosphate forms in plant and their internal buffering in five soybean cultivars. *Rev Bras Ciênc Solo* **29**: 249–257
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A** (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot* **105**: 1141–1157
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M** (2008) Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biol* **10**: 23–36
- Masoni A, Ercoli L, Mariotti M, Arduini I** (2007) Post-anthesis accumulation and remobilization of dry matter, nitrogen and phosphorus in durum wheat as affected by soil type. *Eur J Agron* **26**: 179–186
- Masson P, Dalix T, Bussière S** (2010) Determination of major and trace elements in plant samples by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *Commun Soil Sci Plant Anal* **41**: 231–243
- Mauk CS, Noodén LD** (1992) Regulation of mineral redistribution in pod-bearing Soybean Explants. *J Exp Bot* **43**: 1429–1440
- May TW, Wiedmeyer RH** (1998) A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *At Spectrosc* **19**: 6
- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch JP** (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **24**: 459–467
- McGrath SP, Zhao FJ** (1996) Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *J Agric Sci* **126**: 53–62



- Mehrhoff R, Kühbauch W** (1990) Ertragsstruktur alter und neuer Winterweizensorten unter dem Aspekt der Einlagerung und Remobilisation von Fruktanen im Weizenhalm. *J Agron Crop Sci* **165**: 47–53
- Mei Y, Lei S, FangSen X, JianWei L, YunHua W** (2009) Effects of B, Mo, Zn, and their interactions on seed yield of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Pedosphere* **19**: 53–59
- Mendel RR** (2005) Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalton Trans Camb Engl* 2003 3404–3409
- Meyer RD, Phillips RL, Marcum DB** (1999) Molybdenum, copper and selenium in alfalfa and other forages. 29 Th Calif. Alfalfa Symp.
- Milla R, Castro-Díez P, Maestro-Martínez M, Montserrat-Martí G** (2005) Relationships between phenology and the remobilization of nitrogen, phosphorus and potassium in branches of eight Mediterranean evergreens. *New Phytol* **168**: 167–178
- Millard P, Grelet G** (2010) Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiol* **30**: 1083–1095
- Millard P, Wendler R, Grassi G, Grelet G-A, Tagliavini M** (2006) Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. *Tree Physiol* **26**: 527–536
- Miwa K, Fujiwara T** (2010) Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Ann Bot* **105**: 1103–1108
- Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li L, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinot ML** (2009) The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 3326–3338
- Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T** (2006) A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant J* **46**: 563–572
- Murphy KM, Reeves PG, Jones SS** (2008) Relationship between yield and mineral nutrient concentrations in historical and modern spring wheat cultivars. *Euphytica* **163**: 381–390
- Nable R, Loneragan J** (1984) Translocation of Manganese in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L. Cv. Seaton Park) I. Redistribution during vegetative growth. *Funct Plant Biol* **11**: 101–111
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A** (2013) Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil* **370**: 1–29
- Ndakidemi PA, Bambara S, Makoi JH, others** (2011) Micronutrient uptake in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by rhizobium inoculation, and the supply of Molybdenum and Lime.
- Neumann PM, Chamel A** (1986) Comparative Phloem mobility of nickel in nonsenescent plants. *Plant Physiol* **81**: 689–691
- Nieminen T, Helmisaari H-S** (1996) Nutrient retranslocation in the foliage of *Pinus sylvestris* L. growing along a heavy metal pollution gradient. *Tree Physiol* **16**: 825–831



- Nouet C, Motte P, Hanikenne M** (2011) Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci* **16**: 395–404
- O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG** (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 109–139
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F** (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* **129**: 886–896
- Parent S-É, Parent LE, Egozcue JJ, Rozane D-E, Hernandez A, Lapointe L, Hébert-Gentile V, Naess K, Marchand S, Lafond J, et al** (2013) The plant ionome revisited by the nutrient balance concept. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2013.00039
- Parmar S, Buchner P, Hawkesford MJ** (2007) Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during Sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biol* **9**: 647–653
- Péret B, Desnos T, Jost R, Kanno S, Berkowitz O, Nussaume L** (2014) Root architecture responses: in search of phosphate. *Plant Physiol* **166**: 1713–1723
- Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F** (2009) Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 347–357
- Pinkerton A** (1998) Critical sulfur concentrations in oilseed rape (*Brassica napus*) in relation to nitrogen supply and to plant age. *Aust J Exp Agric - AUST J EXP AGR*. doi: 10.1071/EA97103
- Ponka P** (1999) Cell biology of heme. *Am J Med Sci* **318**: 241–256
- Pottier M, García de la Torre VS, Victor C, David LC, Chalot M, Thomine S** (2015) Genotypic variations in the dynamics of metal concentrations in poplar leaves: A field study with a perspective on phytoremediation. *Environ Pollut Barking Essex 1987* **199**: 73–82
- Pottier M, Masclaux-Daubresse C, Yoshimoto K, Thomine S** (2014) Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds. *Front Plant Sci* **5**: 11
- Probst TU, Berryman NG, Lemmen P, Weissfloch L, Auberger T, Gabel D, Carlsson J, Larsson B** (1997) Comparison of Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with quantitative neutron capture radiography for the determination of Boron in biological samples from cancer therapy. *J Anal At Spectrom* **12**: 1115–1122
- Puig S, Andrés-Colás N, García-Molina A, PeñArrubia L** (2007) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications: *Arabidopsis* Cu and Fe homeostasis. *Plant Cell Environ* **30**: 271–290
- Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass AD** (1999) AtAMT1 gene expression and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J Cell Mol Biol* **19**: 143–152
- Rohner B, Bugmann H, Bigler C** (2013) Towards non-destructive estimation of tree age. *For Ecol Manag* **304**: 286–295



- Rubinigg M, Posthumus F, Ferschke M, Elzenga JTM, Stulen I** (2003) Effects of NaCl salinity on <sup>15</sup>N-nitrate fluxes and specific root length in the halophyte *Plantago maritima* L. *Plant Soil* **250**: 201–213
- Salon C, Avice J-C, Larmure A, Ourry A, Prudent M, Voisin A-S** (2011) Plant N fluxes and modulation by Nitrogen, heat and water stresses: a review based on comparison of legumes and non legume plants. doi: 10.5772/23474
- Salt DE** (2004) Update on plant ionomics. *Plant Physiol* **136**: 2451–2456
- Salt DE, Baxter I, Lahner B** (2008) Ionomics and the study of the plant ionome. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 709–733
- Sankaran RP, Grusak MA** (2014) Whole shoot mineral partitioning and accumulation in pea (*Pisum sativum*). *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00149
- Sarda X, Diquelou S, Abdallah M, Nesi N, Cantat O, Le Gouee P, Avice JC, Ourry A** (2014) Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *J Agric Sci* **152**: 616–633
- Schaaf G, Honsbein A, Meda AR, Kirchner S, Wipf D, von Wirén N** (2006) AtIREG2 encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots. *J Biol Chem* **281**: 25532–25540
- Schachtman D, Liu W** (1999) Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Sci* **4**: 281–287
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM** (1998) Phosphorus uptake by plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol* **116**: 447–453
- Scherer HW** (2001) Sulphur in crop production - invited paper. *Eur J Agron* **14**: 81–111
- Schiavon M, Pilon M, Malagoli M, Pilon-Smits EAH** (2015) Exploring the importance of sulfate transporters and ATP sulphurylases for selenium hyperaccumulation—a comparison of *Stanleya pinnata* and *Brassica juncea* (*Brassicaceae*). *Plant Physiol* **6**: 2
- Schiavon M, Pittarello M, Pilon-Smits EAH, Wirtz M, Hell R, Malagoli M** (2012) Selenate and molybdate alter sulfate transport and assimilation in *Brassica juncea* L. *Czern.:* implications for phytoremediation. *Environ Exp Bot* **75**: 41–51
- 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 Soil* **177**: 255–264
- Schnyder H** (1993) The role of carbohydrate storage and redistribution in the source-sink relations of wheat and barley during grain filling — a review. *New Phytol* **123**: 233–245
- Schwarz G, Mendel RR** (2006) Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol. Annual Reviews, Palo Alto*, pp 623–647
- Schwarz G, Mendel RR, Ribbe MW** (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**: 839–847
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F** (2011) Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol* **156**: 997–1005



- Shin H, Shin H-S, Dewbre GR, Harrison MJ** (2004) Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J* **39**: 629–642
- Shinmachi F, Buchner P, Stroud JL, Parmar S, Zhao FJ, McGrath SP, Hawkesford MJ** (2010) Influence of Sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of Sulfur, Selenium, and Molybdenum in wheat. *Plant Physiol* **153**: 327–336
- Shi R, Bässler R, Zou C, Römheld V** (2011) Is iron phloem mobile during senescence in trees? A reinvestigation of Rissmüller's finding of 1874. *Plant Physiol Biochem PPB Société Fr Physiol Végétale* **49**: 489–493
- Shi R, Weber G, Köster J, Reza-Hajirezaei M, Zou C, Zhang F, von Wirén N** (2012) Senescence-induced iron mobilization in source leaves of barley (*Hordeum vulgare*) plants. *New Phytol* **195**: 372–383
- Smith FW, Ealing PM, Hawkesford MJ, Clarkson DT** (1995) Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 9373–9377
- Song W-Y, Choi K-S, Alexis DA, Martinoia E, Lee Y** (2011) *Brassica juncea* plant cadmium resistance 1 protein (BjPCR1) facilitates the radial transport of calcium in the root. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 19808–19813
- Sorin E, Etienne P, Maillard A, Zamarreño A-M, Garcia-Mina J-M, Arkoun M, Jamois F, Cruz F, Yvin J-C, Ourry A** (2015) Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. *J Exp Bot* **erv321**
- Stroud JL, Zhao FJ, Buchner P, Shinmachi F, McGrath SP, Abecassis J, Hawkesford MJ, Shewry PR** (2010) Impacts of sulphur nutrition on selenium and molybdenum concentrations in wheat grain. *J Cereal Sci* **52**: 111–113
- Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K** (2000) The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J Cell Mol Biol* **23**: 171–182
- Takano J, Kobayashi M, Noda Y, Fujiwara T** (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Bor1p is a boron exporter and a key determinant of boron tolerance. *FEMS Microbiol Lett* **267**: 230–235
- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N, Fujiwara T** (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* **18**: 1498–1509
- Tanaka N, Kato M, Tomioka R, Kurata R, Fukao Y, Aoyama T, Maeshima M** (2014) Characteristics of a root hair-less line of *Arabidopsis thaliana* under physiological stresses. *J Exp Bot* **65**: 1497–1512
- Teija Ruuhola TL** (2011) Retranslocation of nutrients in relation to boron availability during leaf senescence of *Betula pendula* Roth. **344**: 227–240
- Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E** (2011) Algae and humans share a molybdate transporter. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 6420–6425



- Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E, Llamas A** (2009) Homeostasis of the micronutrients Ni, Mo and Cl with specific biochemical functions. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 358–363
- Tejada-Jiménez M, Llamas Á, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E** (2007) A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 20126–20130
- Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H** (2003) AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J Cell Mol Biol* **34**: 685–695
- Thomine S, Vert G** (2013) Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 322–327
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI** (2000) Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4991–4996
- Thompson JJ, Houk RS** (1987) A study of internal standardization in Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Appl Spectrosc* **41**: 801–806
- Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T** (2007) An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18807–18812
- Verma TS, Minhas RS** (1987) Zinc and phosphorus interaction in a wheat-maize cropping system. *Fertil Res* **13**: 77–86
- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat J-F, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for Iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223–1233
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass ADM** (2000) Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by Nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiol* **123**: 307–318
- Wan B, LaNoue KF, Cheung JY, Scaduto RC** (1989) Regulation of citric acid cycle by calcium. *J Biol Chem* **264**: 13430–13439
- Wang MY, Wu LH, Zhang J** (2009) Impacts of root sulfate deprivation on growth and elements concentration of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) under hydroponic condition. *Plant Soil Environ* **55**: 484–493
- Wang X, Tam NF-Y, Fu S, Ametkhan A, Ouyang Y, Ye Z** (2014) Selenium addition alters mercury uptake, bioavailability in the rhizosphere and root anatomy of rice (*Oryza sativa*). *Ann Bot* **114**: 271–278
- Ward GM** (1978) Molybdenum toxicity and hypocuprosis in ruminants: a review. *J Anim Sci* **46**: 1078–1085
- Wardlaw IF, Willenbrink J** (2000) Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytol* **148**: 413–422
- Waters BM** (2011) Moving magnesium in plant cells. *New Phytol* **190**: 510–513



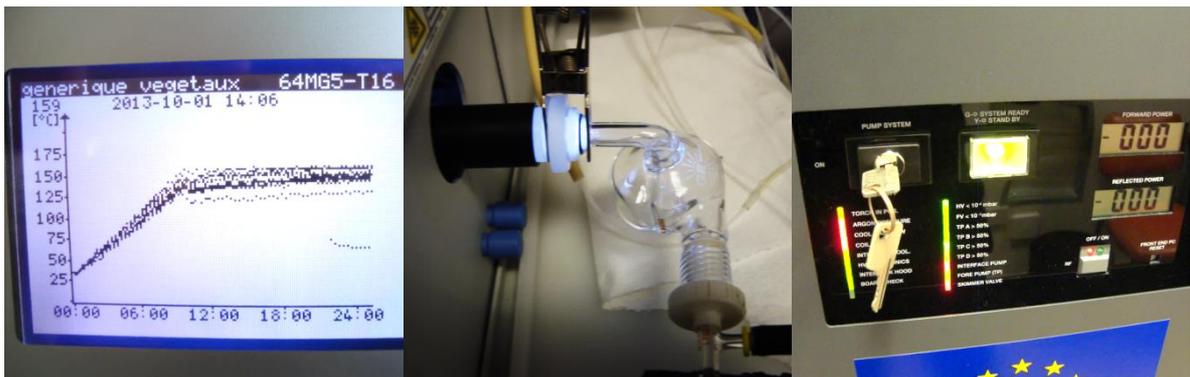
- Waters BM, Grusak MA** (2008) Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line ysl1ysl3. *New Phytol* **177**: 389–405
- Waters BM, Troupe GC** (2011) Natural variation in iron use efficiency and mineral remobilization in cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Soil* **352**: 185–197
- Waters BM, Uauy C, Dubcovsky J, Grusak MA** (2009) Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *J Exp Bot* **60**: 4263–4274
- Watt M, Evans JR** (1999) Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiol* **121**: 317–323
- White P** (2012) Long-distance Transport in the Xylem and Phloem. Marschner's Miner. Nutr. High. Plants Third Ed. Academic Press, p 668
- White PJ, Broadley MR** (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets--iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol* **182**: 49–84
- White PJ, Broadley MR** (2003) Calcium in plants. *Ann Bot* **92**: 487–511
- Williams LE, Mills RF** (2005) P(1B)-ATPases--an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 491–502
- Williams L, Salt DE** (2009) The plant ionome coming into focus. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 247–249
- Witte C-P** (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Sci* **180**: 431–438
- Yruela I** (2013) Transition metals in plant photosynthesis. *Met Integr Biometal Sci* **5**: 1090–1109
- Zakikhani H, Khanif YM, Anuar AR, Radziah O, Soltangheisi A** (2014) Effects of different levels of molybdenum on uptake of nutrients in rice cultivars. *Asian J Crop Sci* **6**: 236–244
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG** (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6529–6534
- Zhao F, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK** (1993) Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Sci Food Agric* **63**: 29–37
- Zuchi S, Cesco S, Varanini Z, Pinton R, Astolfi S** (2009) Sulphur deprivation limits Fe-deficiency responses in tomato plants. *Planta* **230**: 85–94



---

# Annexes

---





## Annexe I

### Procédure de Mise en route journalière de l'ICP-MS-HR

---

#### Démarrage du plasma

1. Ouvrir la vanne d'argon (manomètre mural supérieur) et vérifier que la pression est à 7 bars (réglage torche allumée avec le manomètre inférieur).
2. Allumer l'ordinateur.
-  3. Ouvrir l'application : Instrument (4<sup>ème</sup> icône). La communication s'établit entre le PC embarqué et le PC externe.
4. Replacer les 2 tuyaux de la pompe péristaltique, les serrer sur les galets.
5. Vérifier qu'il reste assez de solution de lavage (bouteille de 2 litres de HNO<sub>3</sub> à 2 %) et que le bidon de drainage n'est pas plein.
6. Cliquer sur « On » : en haut à gauche du schéma de l'ICP.
7. Répondre ok : les tubulures sont bien connectées.
8. Répondre ok pour le démarrage de la pompe péristaltique.
  - ↳ Le débit d'eau passe en vert ainsi que la spire, les gaz se mettent en route.
  - ↳ La pompe interface démarre, le sample gaz se coupe.
  - ↳ Attention, le plasma va s'allumer, si un bruit de crissement survient, couper le bouton RF en façade de l'appareil. Sur le schéma (Figure A-I.1), la torche recule et s'allume (plasma bleu).
    - ↳ Le sample gaz se rallume.
    - ↳ Le spray apparaît sur le schéma, la valve skimmer devient verte elle s'ouvre.
    - ↳ Lorsque l'appareil est fonctionnel, l'icône « Ready » devient jaune ⇒ On peut commencer à faire un scan.
9. Réaliser un 'Wash'.
10. Indiquer la position de la solution de tune à 100 ppt sur le schéma du passeur puis cliquer sur « Go to ».
  - ↳ Le bras du passeur se déplace.
11. Contrôler que le drainage de la chambre de nébulisation se fait bien.

#### Arrêt du plasma :

1. Sur le logiciel Instrument, mettre le plasma sur Off.
2. Puis après l'arrêt de l'instrument, arrêter l'Argon en fermant le manomètre supérieur.
3. Desserrer les 2 tuyaux de la pompe péristaltique.



Tune des paramètres principaux :

1. Ouvrir l'application « Tune » (11<sup>ème</sup> icône).
-  2. Cliquer sur l'icône jaune : Create Scan List, puis sur Load, ouvrir le LR. Cliquer sur  ok.
3. Cliquer sur la flèche verte pour lancer le scan.
-  4. Régler le sample gas en faisant un clic droit sur l'icône 3 : - 1 ctrl / +1 ctrl
-  5. Régler de la même façon la position de la torche (X et Y deflection seulement) en effectuant un clic droit sur la première icône : -3 / +3.
6. Enregistrer les réglages en cliquant sur la disquette.

Calibration en masse (pas forcément nécessaire si on travaille en LR).

-  1. Arrêter le scan dans la fenêtre Tune en cliquant sur le carré rouge.
2. Ouvrir l'application « Séquence Editor ».
3. File - Open
-  Data :  Thermo\_automass\_cal.seq
4. Dans la séquence, sélectionner un échantillon puis cliquer sur l'icône « Reset item » puis « All » afin tous de les réactualiser.
- ↳ Le symbole ✓ devant les échantillons disparaît.
5. Cliquer sur le drapeau bleu.
6. En bas de l'écran, décocher les rapports de sample et sequence, cocher les cases « Acquire » et « Evaluate ».
7. Vérifier que le bras du passeur se situe dans la solution : solution de tuning à 100 ppt.
8. Cliquer sur « Run » en bas de l'écran.
9. Après le start : cliquer sur « Continue » pour lancer l'échantillon « Thermo\_LR\_Wide ».
10. Ne pas lancer l'échantillon suivant en cliquant sur Continue, mais ouvrir l'application « Mass Calibration » (5<sup>ème</sup> icône).
11. Ouvrir le fichier que l'on vient de générer en cliquant sur : File – Open
-  Data :  Themo\_automass\_cal :  Thermo\_LR\_Wide.mdc
- Le fichier le plus récent n'a pas de numéro.
12. Vérifier la calibration et la rectifier si besoin.

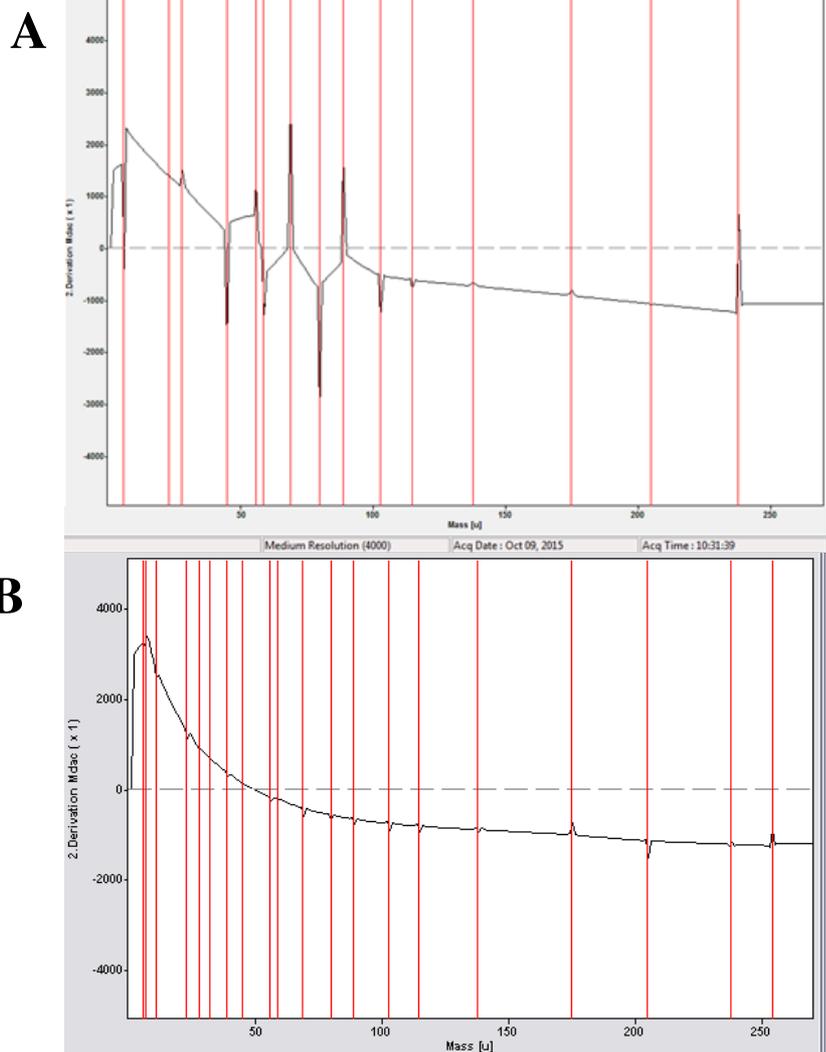


Figure A-I.2. Courbe de calibration en masse (A) non optimisée (certaines masses ont été mal assignées, assignation à une interférence voisine ou à un isotope voisin) puis (B) optimisée, chaque pic est correctement identifié, en moyenne résolution sur l'ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).

## Lecture de la courbe :

La courbe doit être la plus régulière et la plus lisse possible (Figure A-I.2.). Chaque trait rouge correspond à une masse référencée. Un décoché correspond à une masse mal identifiée. La hauteur des pics correspond au  $\Delta M$ . Elle doit être la plus courte possible.

## Observation des pics de masses :

La liste des éléments calibrés peut être ouverte en cliquant sur « Manuel Calibration ». En double-cliquant sur l'un des éléments on peut le visualiser. La calibration doit être vérifiée en les faisant défiler grâce à l'icône : courbe + flèche. La ligne rouge doit passer au milieu du pic.

## Rectifier la calibration des masses :

Les isotopes que l'on souhaite reconnaître peuvent être confondus avec des interférences. Pour recalibrer un isotope, il faut d'abord le sélectionner dans la liste puis le supprimer en cliquant sur l'icône poubelle. Il faut ensuite recalibrer manuellement le pic correspondant réellement à l'élément en cliquant sur le pic puis en entrant son nom : Symbole de l'élément + Masse (en règle générale la masse véritable se situe à droite du pic correspondant à l'interférence). S'il s'agit d'une interférence on peut la chercher directement en cliquant sur « Display Interferences », puis il faut la sélectionner et cliquer sur « Add » ou « Change ». La nouvelle calibration doit ensuite être enregistrée en cliquant sur « Save calibration » icône disquette.

↳ On peut ouvrir de nouveau la liste d'élément en cliquant sur « Manual Calibration », retrouver l'isotope modifié, et le visualiser pour apprécier la correction. La ligne rouge doit passer au milieu du pic.

Si la calibration est mauvaise, pour repartir du bon pied, il est possible de reprendre des fichiers de calibration de secours (cf. 1.2 : SOS Calibration).

13. Retourner dans l'application « Sequence Editor », cliquer sur « Continue » pour lancer l'échantillon suivant.
14. Recommencer la calibration pour l'échantillon LR\_Narrow, en rectifiant les masses mal calibrées.
15. Procéder de la même façon des pour les 4 échantillons suivants : Thermo\_MR\_Wide, Thermo\_MR\_Narrow, Thermo\_HR\_Wide, Thermo\_HR\_Narrow.
16. Fermer les applications « Mass Calibration » et « Sequence Editor ».



Réglage des lentilles :

Après la calibration en masse, l'appareil est chaud, on peut régler les lentilles.

1. Dans l'application « Tune », cliquer sur la flèche verte pour lancer le scan.
  2. Clic droit sur l'icône des lentilles. 
  3. Faire varier les différents paramètres de manière à obtenir le meilleur signal
- Focus: - 5 Shift / + 5 Shift : -25 V / + 25V
  - X-deflection: - 5 x Shift / + 5 x Shift
  - Y-deflection: - 5 x Shift / + 5 x Shift
  - Shape: - 1x Shift / + 1x shift.

Réglage des paramètres en MR :

-  1. Dans la fenêtre Tune, cliquer sur Create Scan List : icône jaune.
2. Cliquer sur Load.
3. Ouvrir le fichier correspondant à la MR.
-  4. Cliquer sur la flèche verte pour lancer le scan.
5. Régler la Focus Quad1 avec - 6 x Shift / + 6 x Shift. On attend R > 4 000.

Réglage des paramètres en HR

-  1. Dans la fenêtre Tune, cliquer sur Create Scan List : icône jaune.
2. Cliquer sur Load.
3. Ouvrir le fichier correspondant à la HR.
-  4. Cliquer sur la flèche verte pour lancer le scan.
5. Régler la Focus Quad1 avec - 6 x Shift / + 6 x Shift. On attend R > 10 000.

Daily Test – Test journalier permettant d'évaluer la performance de l'Element :

1. Ouvrir l'application « Sequence Editor » = 10ème icône.
2. Ouvrir Sequence/Data/Thermo\_Daily\_Test.seq. Les résultats générés sont automatiquement enregistrés dans un dossier du même nom.
3. Dans le passeur pompage de la solution de tune, on regarde dans l'application « Tune » si celle-ci est arrivée.
4. Dans l'application « Sequence Editor », on sélectionne les différents échantillons puis cliquer sur Reset.
5. Cliquer sur le drapeau bleu.
6. Cocher en bas de l'écran ASCII Report afin de générer un rapport de résultat de la séquence.



7. Cliquer sur « Browse » Puis sélectionner « Thermo Daily Test ».
8. Cliquer sur Run.
9. Cocher la case « Do not show this box again » afin de ne plus reposer la question, que la séquence se déroule en automatique.
10. Pour visualiser les résultats au fur et à mesure, sélectionner l'échantillon puis cliquer sur « Result ».
11. A la fin du test, ouvrir le fichier ASCII sous Excel généré enregistré sous Sequence/Data/Thermo\_Daily\_Test. Aller sous Windows : C://Element/User/Data/Thermo Daily Test/ Ouvrir : Thermo\_Daily\_Test ASC File. Le fichier s'ouvre sous Excel.
12. Cliquer sur Ctrl +D pour générer le rapport.
13. Enregistrer le fichier Excel sous : C:// Element / User / Data / Thermo Daily Test.

Lecture du test journalier :

Sensibilité : 1 000 000 cps pour 1 ppb de  $^{115}\text{In}$  soit 100 000 cps minimum attendu pour 100 ppt d'Indium 115. L'Element 2 est 10 fois moins sensible pour de petites masses (ex : Lithium, Bore...). Il est à l'inverse 30 % plus sensible pour de grosses masses tel que l'Uranium.

Stabilité : 2 % RSD maximum pour le Li, l'U et l'In

Usure de la fente d'entrée : dans la colonne "Resolution AVG", la valeur pour l'IN115(LR) donne une indication de l'usure de la fente d'entrée. Celle-ci est bonne à changer lorsque la valeur devient inférieure à 270.

Moyenne résolution : les valeurs en MR de  $^{59}\text{Co}$  (MR) et  $^{115}\text{In}$ (MR) doivent être supérieures à 4 000, sinon régler à nouveau la valeur de Focus\_Quad1 dans l'application « Tune ».

Haute résolution : les valeurs en HR de Ar38(HR), Ar40Ar40(HR) et In115(HR) doivent être supérieures à 10 000 (sinon régler à nouveau la valeur de Focus\_Quad1).

Valeur de transmission : suivi de l'usure de la fente source. Quand les valeurs de transmission arrivent à 6 % et 0,5 % respectivement pour la fente MR et HR, alors un changement de la source sleep tong est nécessaire. Pour changer la fente LR, il faut démonter tout le bloc. Les 2 lames parallèles ne le sont plus à cause de la collision des ions. La fréquence de changement de la fente source est environ tous les 18 mois avec une utilisation journalière.

$T(\text{MR}) = S(\text{MR}) / S(\text{LR}) = 10 \%$  doit être supérieure à 6 %

$T(\text{HR}) = S(\text{HR}) / S(\text{LR}) = 2,5 \%$  doit être supérieur à 0,5 %

Le taux d'oxyde de l'Uranium doit être inférieur à 15%.

Le taux de Baryum doublement chargé est donné à titre indicatif.



Détermination du coefficient ACF : analog convertor factor:

1. Dans l'application "Sequence Editor", ouvrir le fichier Sequence/Data/Thermo\_Manual\_ACF.seq.
2. Cliquer sur Reset – All
3. Cliquer sur le drapeau bleu.
4. Décocher ASCII report, puis cliquer sur Run. Le coefficient est calculé lorsque l'on a les 2 modes.
5. Taper regedit sous windows afin d'éditer le registre pour voir la valeur de l'ACF.
6. Aller dans : finnigan / Element/ landll / MS Parameter. Pour rafraîchir l'affichage taper F5. Le coefficient ACF est d'environ 40.
7. Attention : ne jamais changer la valeur d'ACF Change Limit : 5.0

Pour contrôler l'ACF, contrôler dans l'application « Tune » pour un isotope que l'on a la même sensibilité en pulse counting qu'en analogique.

$$PC = ACF \times AN$$

Créer notre méthode

1. Ouvrir l'application « Methode Editor » = 6<sup>ème</sup> icône.
2. Cliquer sur « Method Wizard »
3. Sous : General / Elements : Cliquer sur les éléments que l'on souhaite analyser. Renseigner le type d'analyse : « Quantitative Analysis », ainsi que la durée d'analyse : 1 minute (23 éléments : 2 min 30). Configuration File : Thermo Standard Methods.mwiz.
4. Sous : Resolution : Le logiciel propose directement la résolution appropriée en fonction de la masse de l'isotope à analyser.  $R = M/\Delta M$ . Pour les éléments servants de standard internes, toutes les résolutions doivent être cochées.
5. Sous : Internal Standard : Sélection du standard interne. Clic droit puis tous les cocher comme « Use as Int. Std for all ».
6. Sous : Timing :  
 Mass Window (%) : LR = 125 % - MR = 150 % - HR = 175 %  
 Samples per Peak = nombre de canaux d'acquisition pour 100 % de mass window.  
 Sample time (s) = temps par canal d'acquisition. Moins il y a de canaux, plus il faut augmenter le temps d'acquisition. Garder au minimum 10 msec par canal d'acquisition.  
 Ex : LR = 10 msec      MR = 25 msec    HR = 50 msec  
 50 msec pour le Se car très peu de sensibilité.
7. Sous : Evaluation :



Integration Window: LR = 20 - MR = 60 - HR = 60

Peak search window : Cette fenêtre ne doit pas être trop grande, il faut qu'il trouve uniquement le pic recherché. MR = 60 % - HR = 60 % - LR = 0 Pas besoin de chercher le pic en basse résolution.

Integration type : Average

Regression type : Linear.

8. Settings = résumé, 3 icônes pour afficher les masses analysées en LR, MR et HR successivement.
9. Sauver la configuration.
10. Cliquer sur « Setup global parameters » (icône de la Terre). Dans Runs and Passes (Passes = Balayage), mettre 2 sec de délai dans Res. Switching. Pour Locked, mettre toujours « Non » » sinon pas de callage des masses.
11. Sauver la méthode.
12. Fermer l'application Method editor.

#### Déterminer la mass Offset.

1. Injecter un étalon comprenant tous les éléments de la méthode créée.
2. Regarder si il arrive grâce à l'application Tune.
3. Ouvrir l'application « Sequence Editor ».
4. Ouvrir la séquence : Sequence / Data / Thermo\_Determine\_Mass\_Offset.seq
5. Puis dans Analysis Parameter, entrer les paramètres suivants :
  - Method : nom de la méthode que l'on vient de créer ou que l'on souhaite utiliser.
  - Tune Parameters : nom du fichier de Tune.
6. Cliquer sur Reset item, puis All.
7. Cliquer sur le drapeau bleu
8. Décocher les fichiers de rapport puis cliquer sur : Run.
9. Une fois le 1<sup>er</sup> échantillon acquis « Determine mass offset », sélectionner la ligne puis cliquer sur Results.
10. Dans la fenêtre Results, cliquer sur File / Update calculating Mass Offset to.../Open en ouvrant la méthode créée sous Method Editor, on voit qu'une valeur a été définie à Method Mass Offset.
11. Avec la fonction Show ou en cliquant sur 'View Spectra', ouvrir l'acquisition en cours.
12. Waiting for online spectrum apparait -> Le spectre entier apparait de 0 à 260 uma.
13. Cliquer sur l'icône avec un pic et une flèche.
14. Le pic doit être centré dans la fenêtre avec le trait rouge.



15. Si le pic est trop à gauche, le ramener avec – 0,00
16. Si le pic est trop à droite, le ramener avec + 0,00
17. Changer la résolution avec ►► ou faire défiler avec la flèche lecture ► puis s'arrêter avec le symbole Pause II sur la résolution choisie.

Faire une séquence d'étalonnage :

1. Ouvrir l'application « Sequence editor ».
2. Cliquer sur New Sequence Standard.

BLK : blanc

ISO : dilution isotopique

MCAL : pour calibration en masse

SPIKE : pour les ajouts dosés

STD : étalon

CMP : compound

3. Prendre un Blanc et le faire glisser entre Start et Stop.
4. Puis un standard : Std\_500, etc...
5. A la fin de la séquence : quand on souhaite arrêter automatiquement l'ICP-MS-HR, cliquer sur Stop Echantillon. Puis dans PCL Script, cliquer sur Browse, aller chercher le fichier Shutdown 23 (dernier du répertoire).
6. Sélectionner la méthode que l'on vient de créer.
7. Tune parameter : « hot ».
8. A la place de calibration à droite mettre le nom de la méthode : ex : étalonnage\_UMR\_Caen.
9. Response file que si l'on est en semi-quantitatif.
10. Take-up time = 90 secondes. Apport échantillon du passeur à la torche.
11. Wash Time : 15 sec / Pump speed during wash : 12
12. Aller chercher le fichier de concentration pour chaque étalon (standard –browse).
13. Enregistrer la séquence.
14. Appuyer sur Reset – All – Drapeau bleu.
15. Sélectionner rapport ASCII pour les échantillons et pour la séquence. Browse. Sélectionner le type de rapport que l'on souhaite : intensités, concentrations, etc...



L'affichage Spred Sheet : sous forme de tableau permet de remplir plus rapidement ces paramètres pour chaque échantillon : possibilité d'étirer comme dans excel.

Pour voir les droites d'étalonnage se former au cours de la séquence : cliquer sur File, puis sur « Online Calibration ».

Pour voir les résultats : sélectionner un échantillon, cliquer sur Results puis sur le C jaune pour voir les concentrations des différents éléments dans l'échantillon.

Pour améliorer les résultats : supprimer un point d'étalonnage en le sélectionnant puis clic droit puis "desable" ou décocher "enable".

Pour obtenir les résultats sous la forme d'un rapport : revenir dans Sequence Editor, changer le fichier de calibration pour Sample. Sélectionner les Sample, décocher la case « acquire » puis cliquer sur « Run », il ne les repasse pas, il refait seulement l'évaluation, il recalcule les concentrations. Aller chercher le fichier de résultats sous Windows. C://Element/Data/Etalonnage\_UMR\_Caen. Ouvrir le fichier de résultats Excel.

**Tableau A-II.1. Paramètres de la méthode d'analyse de 18 isotopes par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

Isotope	Masse précise de l'isotope	Décalage de masse (u)	Fenêtre de masse en % du pic	Masse de l'aimant (u)	Scan de balayage de masse (u)	Nom du standard interne	Temps nécessaire à l'aimant pour se stabiliser sur la masse ciblée (s)	Temps par canal d'acquisition	Nombre de canaux d'acquisition par pic	Durée d'analyse par isotope	Taille de la fenêtre utilisée pour calculer l'intensité du pic		Type de scan	Mode de détection du signal : counting, analogique ou les 2.	Type d'intégration	Type de régression
											pic	pic				
<b>Basse résolution</b>																
Na23	22,9892	0,003	100	22,989	22,951 - 23,028	Ga71	0,3	0,01	20	0,2	0	20	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Ga71	70,9242	0	100	70,924	70,806 - 71,042	Rh103	0,06	0,01	50	0,5	0	20	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Mo95	94,9053	0	100	94,905	94,747 - 95,063	Rh103	0,02	0,01	20	0,2	0	20	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Mo98	97,9049	0,027	100	94,905	97,742 - 98,068	Rh103	0,001	0,01	20	0,2	0	20	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Rh103	102,905	0,02	100	94,905	102,733 - 103,076	Ga71	0,001	0,01	20	0,2	0	20	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Cd111	110,9036	0	100	94,905	110,719 - 111,088	Rh103	0,001	0,025	20	0,5	0	20	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Pb208	207,9761	0,0701	100	192,962	207,629 - 208,323	Rh103	0,001	0,025	20	0,5	0	20	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
<b>Moyenne résolution</b>																
B11	11,0088	0,0012	125	11,009	11,007 - 11,010	Ga71	0,3	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Mg24	23,9845	0,0036	125	23,985	23,981 - 23,988	Ga71	0,056	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Al27	26,981	0,0037	125	23,985	26,977 - 26,985	Ga71	0,001	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Si28	27,9764	0,0039	125	23,985	27,972 - 27,981	Ga71	0,001	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
P31	30,9732	0,0041	125	23,985	30,968 - 30,978	Ga71	0,001	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
S32	31,9715	0,0041	125	31,972	31,967 - 31,977	Ga71	0,039	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Ca44	43,9549	0,0058	125	43,955	43,948 - 43,962	Ga71	0,042	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Mn55	54,9375	0,0064	125	43,955	54,929 - 54,946	Ga71	0,001	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Fe56	55,9344	0,0066	125	43,955	55,926 - 55,943	Ga71	0,001	0,025	20	0,625	40	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Co59	58,9327	0,0075	125	58,933	58,923 - 58,942	Ga71	0,042	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Ni60	59,9302	0,007	125	58,933	59,921 - 59,940	Ga71	0,001	0,05	20	1,25	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Cu63	62,9291	0,0071	125	58,933	62,919 - 62,939	Ga71	0,001	0,05	20	1,25	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Zn66	65,9255	0,0075	125	58,933	65,915 - 65,936	Ga71	0,001	0,05	20	1,25	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Ga71	70,9242	0,0081	125	58,933	70,913 - 70,935	Rh103	0,001	0,02	20	0,5	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Rh103	102,905	0,0125	125	102,905	102,889 - 102,921	Ga71	0,062	0,025	20	0,625	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
<b>Haute résolution</b>																
K39	38,9632	0	125	38,963	38,961 - 38,966	Ga71	0,3	0,05	20	1,25	30	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Ga71	70,9242	-0,0004	125	70,924	70,920 - 70,929	Rh103	0,06	0,05	20	1,25	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Se77	76,9194	-0,0004	125	70,924	76,915 - 76,924	Ga71	0,001	0,2	20	5	30	50	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire
Rh103	102,905	0,0034	125	102,905	102,899 - 102,911	Ga71	0,051	0,05	20	1,25	60	60	EScan	Les 2	Moyenne	Linéaire

## Annexe II

### Méthode d'analyse de 18 isotopes d'intérêt

---

Une méthode d'analyse (Tableau A-II.1.) a été développée pour 18 isotopes d'intérêt mesurés en basse, moyenne ou haute résolution.

Un certain nombre de paramètres sont entrés afin de mesurer chaque isotope :

- Isotope : Nom et numéro atomique de l'isotope d'intérêt
- Accurate mass : Masse exacte de l'isotope
- Mass offset : Décalage de masse
- Mass window : Fenêtre de masse en % du pic
- Magnet mass : Masse de l'aimant
- Mass range : Scan de balayage de masse (u)
- IS name : Nom du standard interne
- Setting time : Temps nécessaire à l'aimant pour se stabiliser sur la masse ciblée (s)
- Sample time : Temps par canal d'acquisition (s)
- Samples per peak : Nombre de canaux d'acquisition par pic
- Segment duration : Durée d'analyse par isotope
- Search window : Taille de la fenêtre utilisée pour calculer le centre du pic
- Integration window : Taille de la fenêtre utilisée pour calculer l'intensité du pic
- Scan type : Type de scan : Escan (scan du champ électrique), Bscan (scan du champ magnétique) ou SyncScan (scan combinant les 2 types précédents)
- Detection mode : Mode de détection du signal : counting, analogique ou les 2
- Integration type : Type d'intégration
- Regression type : Type de régression

**Tableau A-III.1. Composition et fabrication des solutions étalons pour le dosage de 18 isotopes par ICP-MS-HR (Element 2, Thermo Fisher).**

<b>Etalons</b>	<b>SM 100</b>	<b>SM20</b>	<b>SM10</b>	<b>SM5</b>	<b>SM1</b>	<b>SM0,2</b>	<b>SM0,05</b>
<b>Fabrication des solutions dans 50 ml</b>	50 µl QC4 +20 ul Fe, Na, Al +47,5 ul Si+95 µl Mg+250 ul P+500µl S+995 ul Ca+1,45 ml K						
		10 ml SM100 dans 50 ml	5 ml SM100 dans 50 ml	2,5 ml SM100 dans 50 ml	500 ul SM100 dans 50 ml	1 ml SM10 dans 50 ml	2,5 ml SM1 dans 50 ml
<b>Se (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Pb (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Co (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Cd (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Cu (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Ni (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Mo (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Zn (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>B (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Mn (ppb)</b>	100	20	10	5	1	0,2	0,05
<b>Na (ppb)</b>	500	100	50	25	5	1	0,25
<b>Fe (ppb)</b>	500	100	50	25	5	1	0,25
<b>Al (ppb)</b>	500	100	50	25	5	1	0,25
<b>Si (ppb)</b>	1000	200	100	50	10	2	0,5
<b>Mg (ppb)</b>	2000	400	200	100	20	4	1
<b>P (ppb)</b>	5000	1000	500	250	50	10	2,5
<b>S (ppb)</b>	10000	2000	1000	500	100	20	5
<b>Ca (ppb)</b>	20000	4000	2000	1000	200	40	10
<b>K (ppb)</b>	30000	6000	3000	1500	300	60	15
<b>Reliquat en mL</b>	32	50	49	50	47,5	50	50
<b>Solution de standards internes en µL</b>	64	100	98	100	95	100	100

## Annexe III

### Préparation des solutions étalons

---

- Laver l'ensemble des tubes servant aux solutions étalon à l'eau ultra-pure.
- Vérifier la précision des pipettes sur la balance.
- Préparer la **Solution Mère SM100** (gamme d'étalonnage indiquée sur le tableau suivant) en apportant dans un tube noté SM100 :
  - o 50 µl de solution QC4
  - o 20 µl des solutions Fe, Na et Al
  - o 47,5 µl de la solution Si
  - o 95 µl de la solution Mg
  - o 250 µl de la solution P
  - o 500 µl de la solution S
  - o 995 µl de la solution Ca
  - o 1,45 ml de la solution K
  - o Compléter à 50 ml par de l'eau ultrapure à 2 % HNO<sub>3</sub>.
- Préparer la **Solution Mère SM20** en apportant dans un tube noté SM20, **10 ml de solution SM100**, puis compléter à 50 ml par de l'eau ultra-pure à 2 % HNO<sub>3</sub>.
- Préparer la **Solution Mère SM10** en apportant dans un tube noté SM20, **5 ml de solution SM100**, puis compléter à 50 ml par de l'eau ultra-pure à 2 % HNO<sub>3</sub>.
- Préparer la **Solution Mère SM5** en apportant dans un tube noté SM20, **2,5 ml de solution SM100**, puis compléter à 50 ml par de l'eau ultra-pure à 2 % HNO<sub>3</sub>.
- Préparer la **Solution Mère SM1** en apportant dans un tube noté SM20, **500 µl de solution SM100**, puis compléter à 50 ml par de l'eau ultra-pure à 2 % HNO<sub>3</sub>.
- Préparer la **Solution Mère SM0,2** en apportant dans un tube noté SM20, **1 ml de solution SM10**, puis compléter à 50 ml par de l'eau ultra-pure à 2 % HNO<sub>3</sub>.
- Préparer la **Solution Mère SM0,5** en apportant dans un tube noté SM20, **2,5 ml de solution SM1**, puis compléter à 50 ml par de l'eau ultra-pure à 2 % HNO<sub>3</sub>.
- Préparer la **Solution Mère SM0** en complétant un tube noté SM0 à 50 ml par de l'eau ultra-pure à 2 % HNO<sub>3</sub>.
- Ajouter ensuite à chaque tube étalon la solution de standards internes de la façon suivante selon le tableau (Tableau A-III.1.). Pour la solution SM0 ne figurant pas dans le tableau, ajouter 100 µl de la solution de standards internes.
- Noter la date de préparation des solutions sur les tubes.
- Les solutions étalons une fois les tubes rebouchés devront être conservées à 4°C.



## Annexe IV

### Procédure de minéralisation

---

#### Quelques règles s'appliquant tout au long de ce protocole:

Cette manipulation nécessite un équipement de protection approprié en raison de l'utilisation d'acide nitrique chaud et sous pression : blouse, gants non talqués et lunettes de protection. Elle doit être entièrement réalisée sous hotte.

- N'utiliser que des contenants plastiques (pas de fioles en verres, éprouvette en verre...)
- Rincer à l'eau ultra-pure tous le matériel y compris neuf tels que les tiges du système de filtration, les tubes plastiques, etc...
- Utiliser des gants non talqués pour éviter toute contamination des échantillons.

#### Préparation de la solution de lavage : Eau + 2 % HNO<sub>3</sub> :

Tarer une balance avec une bouteille plastique. Ajouter un fond d'eau ultra-pure dans la bouteille puis ajouter 20 ml d'acide HNO<sub>3</sub> qualité Optima Grade (Fisher) à l'aide d'une pipette de 10 ml. Compléter avec de l'eau ultrapure par pesée jusqu'à 1 000 g.

#### Préparation de la **solution A** de minéralisation pour 16 réacteurs:

Dans un tube PEP de 50 ml préalablement rincé à l'eau ultra-pure, préparer **la solution A** en ajoutant :

- 16 ml d'HNO<sub>3</sub> qualité Optima Grade (Fisher)
- 4 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qualité PlasmaPURE Plus 30-32 % (SCP Science))

#### Préparation de la **solution de standards internes** : Gallium (10 ppm) + Rhodium (2 ppm) + Iridium (2 ppm) (noter la date de la préparation de cette solution sur le tube) :

Rincer un tube PEP de 50 ml avec de l'eau ultra-pure, y ajouter :

- quelques ml d'eau ultra-pure puis 1 ml d'HNO<sub>3</sub> - qualité Optima Grade (Fisher)
- 125 µl de solution mère Ga à 1 000 ppm, conservée à 4°C
- 25 µl de solution mère de Rh à 1 000 ppm, conservée à 4°C
- 25 µl de solution mère d'Ir à 1 000 ppm, conservée à 4°C
- Puis compléter au trait de jauge (50 ml) avec de l'eau ultra-pure.

**Ne pas jeter le reste de la solution après son utilisation, il servira aussi aux analyses ICP-MS.**

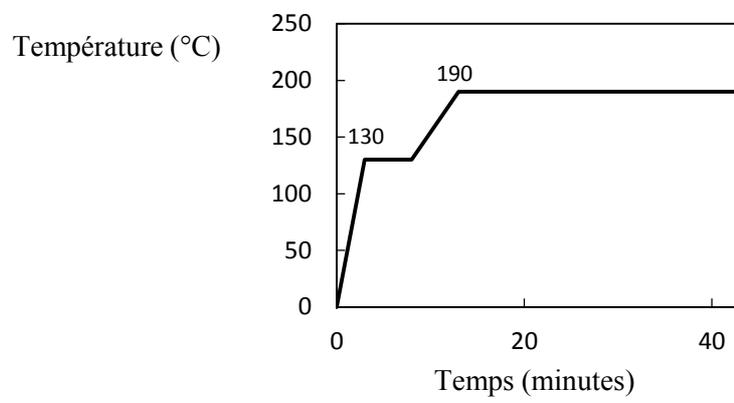


Figure A-IV.1. Cycle de minéralisation microonde (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) choisi.

Pesée des échantillons végétaux :

- Enfiler des gants non talqués.
- Utiliser une fiche de minéralisation pour indiquer le numéro du réacteur, le nom de l'échantillon et le masse sèche pesée.
- Peser 40 mg de matière sèche dans les réacteurs en Téflon de 50 ml. Afin d'éviter que les tubes soient électrostatiques, utiliser l'appareil prévu à cet effet. **Prévoir un blanc par série de minéralisation et un matériel de référence certifié : citrus leaves** (CRM NCS ZC73018 : Citrus Leaves - Sylab).

Cycle de minéralisation :

- Ajouter dans les tubes Téflon à l'aide d'une micropipette, 900 µl d'eau ultra-pure.
- Ajouter dans les tubes Téflon à l'aide d'une micropipette, 1 ml de **la solution de minéralisation A** ( $\text{HNO}_3$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  8 : 2 (soit 800 µl de  $\text{HNO}_3$  (qualité Optima Grade (Fisher)) + 200µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (qualité PlasmaPURE Plus 30-32 % (SCP Science))
- Ajouter 100 µl de la solution de standards internes à l'aide d'une micropipette.
- Refermer le tube Téflon par la capsule puis visser le bouchon, jusqu'à ce que son centre muni d'un ressort soit à la même hauteur que le reste du bouchon.
- Charger les 16 tubes sur le rotor HVT50 T16 en les plaçant par ordre de numéros et le placer dans le four micro-ondes,
- Effectuer un cycle de minéralisation : Choisir (Menu Library, touche F1) le programme HVT16 végétaux 40 qui correspond à 10 minutes de rampe pour monter à 130°C suivi d'un plateau de 5 minutes puis 5 minutes de rampe pour atteindre 190°C maintenue pendant 10 minutes (Figure A-IV-1). La température de chaque échantillon peut être suivie en continue (les blancs présentent en général une température plus faible d'environ 20°C.
- Mettre en marche la ventilation de la Sorbonne, puis lancer le programme de minéralisation.
- Une fois le cycle de minéralisation finie, attendre une vingtaine de minutes pour le refroidissement des tubes, puis sortir le rotor du micro-onde.

Reprise des minéralisats :

- Aligner les réacteurs en Téflon sous la hotte.
- Les ouvrir sous la hotte grâce à la clé. (*Attention, lors de cette ouverture, des vapeurs acides s'échappent, port des équipements de sécurité obligatoire*).
- Reprendre les minéralisats avec de l'eau dans un tube PEP de 50 ml, en rinçant soigneusement trois fois le réacteur avec de l'eau.
- Compléter au trait de jauge à 50 ml avec la solution eau.



Filtration des minéralisats :

- Filtrer à l'aide d'un filtre Téflon 0,45 µm et d'une tige. Attention, pour réussir cette filtration, il est nécessaire d'enfoncer le plus verticalement possible le système de filtration (*il est impératif de porter les lunettes de protection*).
- Conserver les échantillons soigneusement fermés et étiquetés au réfrigérateur.
- Laver les tubes Téflon avec de l'eau ultra-pure, ainsi que les capsules et les bouchons.





---

Anne MAILLARD. 2015.

**Adaptations des végétaux à un environnement minéral fluctuant : mécanismes impliqués et interactions entre nutriments.**

*Thèse de doctorat de l'Université de Caen Normandie, 151 p.*

---

**Résumé :** La nutrition minérale des végétaux repose sur des mécanismes physiologiques et génétiques complexes contrôlant l'absorption des nutriments, leur transport, leur accumulation, leur assimilation et leur remobilisation au sein de la plante. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et des interactions potentielles entre éléments est requise afin d'optimiser l'acquisition et l'utilisation des ressources minérales notamment lorsque certaines sont limitantes. Dans ce contexte, nous avons tout d'abord entrepris d'estimer la remobilisation apparente de 13 éléments lors de la sénescence foliaire chez cinq espèces cultivées et trois espèces ligneuses. Le potentiel de remobilisation d'un élément apparaît fortement dépendant de l'espèce. Chez certaines, telles que le maïs ou le peuplier, une faible proportion de nutriments des feuilles est remobilisée au cours de la sénescence d'automne au contraire du blé, de l'orge ou du chêne. Ces différences dans l'efficacité de remobilisation pourrait être affectée par la durée de la sénescence, par le ratio organes reproducteurs : appareil végétatif ou par la disponibilité des éléments minéraux dans le sol. Nous nous sommes ensuite focalisés sur la remobilisation de ces 13 éléments, cette fois uniquement chez le colza en condition de carence et sur les conséquences de ces carences sur la composition du ionome. Dix-huit augmentations majeures de l'absorption en réponse à une carence nutritionnelle ont été identifiées, certaines étant encore inexplorées. Les résultats acquis nous ont finalement amenés à nous focaliser sur le molybdène, élément qui était largement accumulé sous l'effet de carences en S, en Fe, en Cu, en Zn ou en B, afin d'une part d'identifier les mécanismes impliqués et d'autre part de proposer une application de ces connaissances pour l'élaboration d'un indicateur de la nutrition soufrée : le ratio [Mo] :[S].

**Mots-clés :** *Brassica napus*, interactions, ionome, carences, indicateur de nutrition, molybdène, remobilisation, soufre.

---

Anne MAILLARD. 2015.

**Plant adaptations to fluctuating nutritional environment: involved mechanisms and crosstalks between nutrients.**

*PhD of Caen - Normandy University, 151 p.*

---

**Abstract:** Mineral nutrition of plants is based on complex physiological and genetic mechanisms controlling nutrients uptake, their transport, accumulation, assimilation and remobilization. A better understanding of the mechanisms involved for each element and crosstalks between elements is required to optimize the acquisition and the use of nutrients available in the environment. In this context, we estimated the remobilization of 13 elements during leaf senescence in five crop species and three tree species. The potential of remobilization for each element was highly species-dependent. In some species such as maize or poplar, a low efficiency of remobilization was recorded during the autumn senescence instead of wheat, barley or oak. The nutrient remobilization efficiency may be affected by the duration of senescence, the development of new sinks (reproductive organs) or the availability of mineral elements in the soil solution. Further experiments were performed with rapeseed plants subjected to individual nutrient deficiencies to maximize the remobilization. In a second time, we have determined the impact of deprivation on the plant ionome. Eighteen situations of major increased uptake under mineral nutrient deprivations were identified, some of which have not been yet described. Additionally, Mo uptake which was strongly increased under S, Fe, Cu, Zn, Mn or B deprivations, was more particularly studied in order firstly to identify involved mechanisms and secondly to provide application of this knowledge for the development of a new early indicator of S nutrition: the [S]: [Mo] ratio.

**Keywords:** *Brassica napus*, crosstalks, ionome, nutrient deficiencies, nutrient indicator, molybdenum, remobilization, sulfur.