

Laurence ROSSATO (2000). Nitrogen filling of the *Brassica napus* L. reproductive tissues: estimation of the flow using isotopic labeling, characterization of proteins implied in storage and accumulation-inducing factors. University Thesis, Caen, France, 136 p.

Abstract - Rapeseed (*Brassica napus* L.) is a closely related species to *Arabidopsis thaliana* and it occupies an important place in the agricultural landscape of the nation. Rapeseed has the high capacity to uptake nitrate during autumn or spring. However, some of the pre-uptake nitrogen (N) is not stored in reproductive tissues due to abscission of senescing leaves, which have a high N content. The first objective of this study was to determine the pattern of N storage during rapeseed development in order to determine the importance of stored N and its mobilization to fill in seeds. Isotopic and electrophoresis techniques were used to study the flow of N in the plant. A second objective was to identify a putative vegetative storage protein (VSP) in rapeseed.

Our results suggested the presence of a mobil N pool in the floral axis and in the taproot between C1 (bolting) and G1 (end of flowering) stage of the plant. This N accumulated during uptake, but also included N from senescing leaves. Stored N was used for pod filling because N uptake was insignificant during grain fill. A 23 kDa protein accumulated in the taproots during flowering, and also was synthesized in roots during leaf senescence. This protein is glycosylated and has two isoforms. Accumulation of this 23 kDa protein is induced by methyl jasmonate and abscissic acid. However changes in N or P level and other environmental conditions like temperature, carbon dioxide level, water stress and wounding did not alter its accumulation. Using polyclonal antibodies, this 23 kDa protein was localized in taproots, leaves, the floral axis and in the inflorescence of the plants treated with methyl jasmonate.

In collaboration with the Institute of Grassland and Environmental Research of Aberystwyth (GB) we studied the effect of methyl jasmonate, a hormone frequently produced by the inflorescence, on the induction of 23 kDa protein, the process of senescence (transpiration, photosynthesis, chlorophyll and soluble protein concentration), and the uptake of N & K. Surprisingly, we found that the accumulation of 23 kDa protein was not related to nutrient uptake, but its accumulation is linked to preferential recycling of endogenous N mostly present in the leaves. Indeed, nitrate uptake is inhibited in less than 6 hrs by methyl jasmonate. In addition, when plants were pre-treated with methyl jasmonate for three days, the 23 kDa protein was totally hydrolyzed during seed filling.

In order to validate our results obtained under controlled growth conditions, we conducted field experiments with two cultivars of rapeseed (Capitol, a pure line and Colosse, a population). Electrophoretic analysis of cv. Capitol taproots revealed that the 23 kDa VSP accumulated significantly beginning in April. This result is in contrast to what we observed in cv. Colosse. These results along with the N transfer analysis within the plant, suggest that the transient N reserve occurred when the plants had few branching and flowers. Thus, the plants store transient N from the senescing leaves in taproots rather than branches and numerous flowers. This, in turn, could be later reused to fill pods and seeds. Our results are discussed in the light of other recently published studies. We propose a functional model for N allocation during pre- and post-flowering stages in rapeseed.

Key words : Rapeseed, ¹⁵N labeling, leaf senescence, N reserve, VSP, regulation, abscissic acid, methyl jasmonate, genotype.

Laurence ROSSATO (2000). Remplissage en azote des tissus reproducteurs de *Brassica napus* L. : estimation des flux par marquage isotopique, caractérisation des protéines impliquées dans la mise en réserve et des facteurs induisant leur accumulation. Thèse de l'Université de Caen, 136 p.

Résumé - Le colza, *Brassica napus* L., Brassicacée génétiquement proche d'*Arabidopsis thaliana* occupe une part importante des surfaces agricoles utiles. Si cette espèce présente des capacités élevées d'absorption du nitrate à l'automne ou au printemps, il est cependant admis qu'une part importante de l'azote précédemment absorbé n'est pas valorisé pour le remplissage des tissus reproducteurs, en raison de l'abscission des feuilles sénescentes dont la teneur en azote peut rester élevée. L'objectif de ce travail a donc été de déterminer l'existence de processus de mise en réserve d'azote au cours du cycle de culture du colza, afin de préciser l'importance de leur remobilisation pour le remplissage des graines. Des techniques isotopiques et électrophorétiques ont été conjointement utilisées afin de quantifier les flux d'azote au sein de la plante et d'identifier d'hypothétiques protéines de réserve (VSP : vegetative storage protein).

Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une mise en réserve transitoire d'azote intervenant dans la hampe florale et le pivot entre le stade C1 (montaison) et le stade G1 (fin de la floraison). Ces réserves azotées seraient en partie seulement synthétisées à partir de l'azote absorbé mais aussi grâce à l'azote mobilisé au sein des feuilles en sénescence. Elles seraient ensuite massivement utilisées pour le remplissage des siliques, alors que l'absorption du nitrate n'est plus significative. Une protéine de 23kDa est largement accumulée dans le pivot lors de la floraison, sa synthèse intervenant lors de la sénescence foliaire. Glycosylée et ayant 2 isoformes, cette protéine présente une synthèse largement induite par le méthyl-jasmonate et l'acide abscissique, alors qu'une modification des conditions trophiques (niveau d'alimentation N ou P) ou environnementales (température, teneur en CO₂, stress hydrique, blessures) n'ont pas d'effet sur son accumulation. La séquence N-terminale une fois déterminée ayant permis l'obtention d'anticorps polyclonaux contre cette VSP putative, il a été possible de la localiser au niveau tissulaire et de démontrer que des protéines immunologiquement homologues pouvaient être accumulées dans le pivot, les feuilles, les hampes et les inflorescences de plantes traitées au méthyl-jasmonate.

Un travail complémentaire conduit en collaboration avec l'Institute of Grassland and Environmental Research d'Aberystwyth (GB), a été réalisé afin de préciser l'effet du méthyl-jasmonate (hormone fréquemment produite par les inflorescences) sur l'induction de la synthèse de cette protéine, les processus de sénescence (transpiration, photosynthèse, teneur en chlorophylles et en protéines solubles) et sur l'absorption du nitrate et du potassium. Les résultats confirment de façon surprenante que l'accumulation de cette protéine de réserve n'est pas liée à l'absorption, mais au recyclage préférentiel de l'azote endogène essentiellement d'origine foliaire. L'absorption de nitrate est en effet très rapidement (en moins de 6 heures) inhibée par le méthyl-jasmonate. Des travaux complémentaires utilisant un prétraitement des plantes de 3 jours au méthyl-jasmonate démontre que la VSP de 23kDa est totalement hydrolysée au cours du remplissage des graines.

Afin de valider les résultats précédemment acquis en conditions contrôlées, des expérimentations ont été conduites en conditions de plein champ sur deux variétés de colza (Capitol et Colosse). L'analyse électrophorétique des protéines des pivots récoltés au champ montre que la VSP de 23kDa s'accumule de façon massive dès le mois d'avril chez une lignée pure, la variété Capitol. Chez une association variétale telle que la variété Colosse, cette protéine ne semble pas significativement accumulée. Ces résultats couplés à l'analyse dynamique des transferts d'azote au sein du végétal suggèrent que cette mise en réserve transitoire d'azote se produit lorsque la plante présente un nombre limité de ramifications et de fleurs. La plante stockerait alors transitoirement l'azote des feuilles sénescentes dans le pivot plutôt que dans les ramifications et les fleurs surnuméraires, puis le réutiliserait progressivement lors du remplissage des siliques et des graines. L'ensemble des résultats est alors discuté par rapport à la bibliographie, alors qu'un modèle fonctionnel de répartition des flux d'azote au sein du colza en périodes de pré- et post-floraison est proposé afin de dégager quelques perspectives de recherche.

Mots-clés : colza, marquage ¹⁵N, sénescence foliaire, réserves azotées, VSP, régulation, acide abscissique, méthyl-jasmonate, génotype.