



UNIVERSITÉ de CAEN/BASSE-NORMANDIE

U.F.R : Institut de biologie fondamentale et appliquée

École Doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé et Environnement

THÈSE

présentée par

Melle Marie DESCLOS

et soutenue

le 10 décembre 2008

En vue de l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ de CAEN

Spécialité : Biologie animale et végétale

Arrêté du 07 août 2006

Titre : Modifications physiologique et protéomique associées à la remobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle chez le colza (*Brassica napus* L.)

MEMBRES du JURY

Mme Céline MASCLAUX-DAUBRESSE, Chargé de Recherche, HDR, INRA Versailles (**Rapporteur**)

Mr Alain BOUCHEREAU, Professeur, Université de Rennes (**Rapporteur**)

Mme Karine GALLARDO, Chargé de recherche, INRA Dijon

Mr Frédéric Le DILY, Professeur, Université de Caen

Mr Philippe ETIENNE, Maître de Conférences, Université de Caen

Mr Jean-Christophe AVICE, Professeur, Université de Caen (**Directeur de Thèse**)

Remerciements

Ces trois années de thèse au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA « Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S » ont été une période qui m'a permis de m'épanouir sur les plans professionnels et personnels. Nombreux sont ceux que je voudrais remercier pour leur aide et leur soutien.

Je tiens tout d'abord à remercier Alain Ourry pour m'avoir accueillie au sein de l'UMR. Je le remercie de la confiance qu'il a témoignée à mon égard.

Je témoigne également ma reconnaissance à l'actuel directeur du laboratoire, le Professeur Frédéric Le Dily, pour ses conseils et sa participation au sein du Jury.

J'ai eu la chance de bénéficier d'une bourse de thèse co-financée par la région Basse-Normandie et le département « Environnement-Agronomie » de l'INRA. J'ai ainsi pu mener ces travaux de recherche dans les meilleures conditions tout en bénéficiant de l'opportunité d'une première expérience dans l'enseignement.

Je suis très honorée que Céline Masclaux-Daubresse et Alain Bouchereau aient accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier Karine Gallardo pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail en tant qu'examinateur. Un grand merci aux autres membres du Jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie très chaleureusement mes encadrants de thèse, Jean-Christophe Avice et Philippe Etienne, pour m'avoir fait confiance pendant ces trois années. Je profite de ces quelques lignes pour leur écrire ce que je ne leur ai pas assez dit ! Je suis très heureuse d'avoir vécu cette belle aventure à leurs côtés. Ce projet de thèse n'aurait pu aboutir sans leur présence. C'est parce qu'ils sont deux entités très distinctes que je souhaite adresser quelques lignes de remerciements à chacun.

Je remercie Jean-Christophe pour sa rigueur scientifique et rédactionnelle, ses conseils et sa disponibilité. Son implication assidue et son exigence m'ont permis de me surpasser professionnellement. Je le remercie également pour son invitation au congrès Colza en Chine en compagnie de Philippe L. J'en garde de très bons souvenirs !

Je remercie Philippe pour les discussions scientifiques que nous avons partagées, ses compétences de biologiste moléculaire, sa confiance, ses explications très pédagogiques (ses métaphores particulières), et surtout son humour. Je lui souhaite bon courage pour son HDR et espère que ce premier co-encadrement de thèse sera le début d'une longue série.

Je remercie les membres des différents comités de pilotage : Judith Burstin, Françoise Lecahérec, Laurent Leport et Jean-Michel Allirand, pour m'avoir chaleureusement conseillée et suivie au cours de ces trois années de thèse.

Je souhaite adresser quelques lignes de remerciements à Marie Pascale Prud'Homme et Nathalie Noiraud-Romy qui m'ont encadrée durant mon stage de Master de recherche. Les nombreuses choses apprises à leurs côtés ont été un premier pas dans le monde de la recherche et m'ont été utiles lors de cette thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leur aide, leur disponibilité et surtout leur bonne humeur. Elles y font régner une ambiance très sympathique et propice au travail.

Ma reconnaissance s'adresse également au staff technique : à Alexandra et à Sandrine pour leur aide apportée en biologie moléculaire, à Anne-Françoise et à Raphaël pour leurs conseils sur la culture de colza, à Marie-Paule et à Josette pour la partie IRMS/micropesées, à Josiane pour toutes ces petites choses faites au sein du laboratoire « Protéine » qui vous facilitent la vie, à Jérôme pour les pesées, les broyages et les micropesées, à Patrick pour les mesures de photosynthèse, et enfin à Christine pour la gestion administrative.

Merci à Françoise Lecahérec pour son initiation aux dosages d'activités protéolytiques, son accueil très chaleureux au sein de son laboratoire, et sans oublier, sa bonne adresse de logement chez l'habitant à Rennes.

Je remercie Laurent Coquet pour l'identification des spots protéiques et les longues minutes/heures passées à répondre à mes questions.

Je tiens également à remercier Philippe Laîné, Vianey Pichereau et Aurélie Verneuil pour leur initiation à la spectrométrie.

Je n'oublie pas l'ensemble des doctorants avec lesquels j'ai partagé cette expérience commune, Bertrand, Julie, Fabien, Jérémy, Tiphaine, Sébastien, Lucie, Virgine, Maha, Alexandre, Romain, Mustapha, Laëticia et Antonin. Je souhaite un bon courage aux doctorants encore présents au laboratoire ainsi qu'à ceux des laboratoires voisins : Hervé, Alban et Amine.

Pendant ces trois années, des moments de détente ont agréablement animé mon quotidien. Pour cela, je tiens chaleureusement à remercier Marie-Paule, Tiphaine, Alex et Sandrine pour les séances de relaxation-étirements et Fitness-step, les très honorables membres de la confrérie du Saucisson-Bière pour les moments de rigolade les vendredis soirs, les joueurs de poker (Romain, Philippe, Josette, Tiphaine, Laurent) ainsi que Frédo et Séverine pour leurs soirées « barbecues-uno » en compagnie de Bertrand, Julie, Jérémy, Alexandra et Julien.

Un grand merci à Frédo pour son écoute. Une belle amitié est née !

J'ai une pensée émue pour ma meilleure amie Caroline qui malgré 10 000 km de distance a toujours été là pour moi. Je suis très heureuse que la première personne avec laquelle j'ai fait connaissance à l'école (il y a maintenant 23 ans !) soit présente à la fin de mes études. Merci également à « la troisième D », Justine, pour sa bonne humeur et son enthousiasme.

Ces quelques lignes ne sont pas suffisantes pour remercier mon âme-sœur, Narayan, pour son soutien sans faille et permanent ainsi que sa compréhension. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir suivie tout au long de cette formidable expérience.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à mes parents, à mon frère et à ma grand-mère pour leur soutien constant et leur patience. Ils m'ont transmis leur amour de la nature et du monde agricole. Je profite de cette occasion pour m'excuser auprès de ma mère (et auprès de mon père dans une moindre mesure) pour mon côté « peu aimable ». Malgré mon humeur parfois désagréable, je tiens à la remercier pour avoir toujours fait preuve d'un dévouement sans limites.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C.J (ou °C.d) : degrés-jour	EUA ou NUE : Efficience d'utilisation de l'azote (Nitrogen use efficiency)
1-DE : Électrophorèse mono-dimensionnelle	FPS : Farnesyl diphosphate synthase
2-DE : Électrophorèse bidimensionnelle	FR : Far Red
ABA : Acide abscissique	G-3P : Glyceraldehyde-3-phosphate
ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique	GABA : Acide α -amino butyrique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	GDH : Glutamate deshydrogénase
AlaAT : Alanine aminotransférase	GLN : Glutamine synthétase
ANOVA : Analyse de variance	GOGAT : Glutamate synthase
APNE : N-Acetyl-DL-Phenyl-Alanine β -Naphthyl ester	GS : Glutamine synthase
APS : Ammonium persulfate	GUS : β -glucuronidase
APX : Peroxydases d'ascorbate	H₂O : Hydroxyde d'hydrogène
ARN : Acide ribonucléique	H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
ATP : Adénosine triphosphate	ha : Hectare
ATZ : AnilinoThioZolinone	HCl : Acide chlorhydrique
BCIP : p-toluidine salt	HPLC : Chromatographique liquide haute performance
BET : Bromure d'éthidium	IAA : Acide indole-3-acétique
BICAM : Bicarbonate d'ammonium	IEF : Isoélectrofocalisation
BnAAP1 : <i>Brassica napus</i> amino acid permease 1 (Transporteur d'acides aminés)	IPT : Isopentenyltransférase
BnD22 : <i>Brassica napus</i> Drought 22 kDa	IRGA : Infra Red Gas Analyser
BSA : Sérum albumine bovine	IRMS : Isotope ratio mass spectrometer
CHAPS : 3-((3-chloramidopropyl)diméthylammonio)-1-propane sulfonate	j ou d : jour
Chl : Chlorophylle	kDa : kilodalton
CO₂ : Dioxyde de carbone	LHC II : Light harvesting complex II
cpn60 : Chaperonin 60	LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
Ct : Cycle treshold ou Cycle seuil	LiCl : Chlorure de lithium
DH : Dehydrogénase	LSU : Grande sous-unité de la RuBisCO (Large subunit of RuBisCO)
DHAR : Dehydroascorbate reductase	MDAR : Monodehydroascorbate reductase
DMF : Diméthylformamide	MeJA : Méthyl jasmonate
dNTP : mélange équimolaire de désoxyribonucléotides triphosphate	MMP : Métalloprotéase
DTT : Dithiothréitol	MOPS : Acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
E : Efficacité de la PCR	MPP : Mitochondrial processing peptidase
EF-TuB : Elongation factor TuB	Mr : Poids moléculaire
E_N : Excès isotopique	MS ou DW : Matière sèche
ESI : Electrospray source d'ion	

- N₂** : Azote atmosphérique
NADP : Nicotine adénine dinucléotidephosphate
NBT : p-nitro blue tetrazolium chloride
NH₄HCO₃ : Hydrogénocarbonate d'ammonium
NHI : Indice de récolte azoté
NiR : Nitrite réductase
NO : Oxyde nitrique
NR : Nitrate réductase
NRT : Transporteur de nitrate
- O₂** : Oxygène
OPR : 12-oxophytodienoate reductase
- P** : Phosphore
PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PaO : Phéophorbide *a* oxygénase
PAP : Lipid-associated protein (Protéines associées aux lipides)
PAR : Rayonnement photosynthétiquement actif
pb : Paire de bases
PCR : Polymerase chain reaction (ou réaction de polymérisation en chaîne)
PEP : Phosphoénolpyruvate
PGPH : Peptidyl glutamyl peptide hydrolase
pI : Point isoléctrique
PITC : PhenylIsoThioCyanate
PPF : Photosynthetic photon flux
PS I ou II : Photosystème I ou II
PTH : Phenylthiohydantoin
PVDF : Polyvinylidène difluoride
PVPP : Poly(vinylpolypyrrolidone)
- QTL** : Quantitative Trait Loci (Locus de trait quantitatif)
- RCB** : RuBisCO containing bodies (vésicules de dégradation de la RuBisCO)
- ROS** : Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
RT : Transcription reverse
RuBisCO : Ribulose biphosphate carboxylase oxygenase
- SA** : Acide salicylique
- SAG** : Senescence associated gene (Gène associé à la sénescence)
SAM : S-adenosylméthionine
SAVs : Senescence-Associated vacuoles (Vacuoles formées au cours de la sénescence)
SDG : Senescence Down-regulated Genes
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SOD : Superoxyde dismutase
SP : Protéines solubles (Soluble proteins)
SPAD : Soil Plant Analysis Development
SSU : Petite sous-unité de la RuBisCO (Small subunit of RuBisCO)
- TBP** : Tributylphosphine
TBS : Tampon tris salin
TBST : Tampon tris salin et Tween
TCA : Acide trichloroacétique
TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine
TFA : Trifluoroacétique
TI : Inhibiteur de Trypsine (Trypsin Inhibitor)
TIP : Protéines intrinsèques tonoplastiques
T_m : Température de fusion
TPI : Triose Phosphate Isomérase
Tris : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
- UPLC** : Chromatographie Liquide à Ultra Performance
- VPE** : Vacuolar Processing Enzyme
- WSCP** : Water Soluble Chlorophyll binding Protein

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements

Liste des abréviations

CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

CHAPITRE II : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE 5

I. GESTION DE L'AZOTE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU COLZA D'HIVER 5

I.1 L'absorption de l'azote et la fertilisation azotée au cours du développement du colza d'hiver..... 5

I.1.1 Du semis au stade reprise de croissance..... 5

I.1.2 De la reprise de croissance jusqu'au stade fin de montaison..... 6

I.1.3 Du stade floraison jusqu'à la récolte 7

I.2 Assimilation, formes de réserves et mobilisation de l'azote endogène..... 8

I.3 Voies d'amélioration de l'EUA : des premières pistes encourageantes..... 10

II. REMOBILISATION DE L'AZOTE ET SÉNESCENCE FOLIAIRE 15

II.1 Définition et principales étapes du processus de sénescence foliaire 15

II.1.1 Les manifestations de la sénescence au niveau cellulaire..... 15

II.1.2 Les manifestations de la sénescence au sein de chaque organite 17

II.1.3 Les manifestations de la sénescence au niveau moléculaire..... 19

II.2 Modifications du métabolisme azoté associé à la sénescence : un préalable au recyclage de l'azote endogène 20

II.3 Les protéines impliquées dans le processus de protéolyse 22

II.3.1 Les voies de dégradation des protéines..... 22

II.3.2 Les protéases..... 26

III. RÉGULATION DE LA REMOBILISATION DE L'AZOTE ASSOCIÉE À LA SÉNESCENCE FOLIAIRE 30

III.1 Incidence des facteurs environnementaux..... 30

III.2 Le rôle des phytohormones 32

III.3 Le stress oxydatif..... 35

III.4 Action des sucres 37

III.5 Implication des inhibiteurs de protéases 38

III.6 Facteurs de transcription 39

IV. CONCLUSION ET OBJECTIFS DE RECHERCHE..... 40

CHAPITRE III : MATÉRIELS & MÉTHODES 44

I. CONDITIONS DE CULTURE ET PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX 44

I.1 Conditions de culture en milieu contrôlé..... 44

I.2 Protocoles expérimentaux..... 45

I.2.1 Dispositifs expérimentaux mis en place pour l'étude de l'implication d'un inhibiteur de protéases, BnD22, dans la régulation de la sénescence foliaire (Chapitre IV) 45

I.2.2 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude des modifications protéomiques associées au recyclage de l'azote foliaire chez le colza soumis à différents niveaux de fertilisation azoté (Chapitre V) 46

I.2.3 Dispositif expérimental mis en place pour l'étude physiologique et biochimique des phases ultimes du développement d'une feuille de colza (Chapitre VI) 47

II. DÉTERMINATION DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE 47

II.1 Mesure de la biomasse et de la surface foliaire 47

II.2 Mesure de la teneur relative en chlorophylles 48

II.3 Mesure de l'activité photosynthétique..... 48

III. MÉTHODES D'ANALYSES ÉLÉMENTAIRES (AZOTE ET CARBONE) ET BIOCHIMIQUES	49
III.1 Détermination des teneurs carbone (C) et azote (N) total et des flux d'azote remobilisé	49
III.1.1 Dosage du carbone total et de l'azote total et analyse du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	49
III.1.2 Calcul des quantités d'azote total et du ^{15}N	50
III.1.3 Méthodes de calcul des flux azotés	51
III.2 Méthode d'analyses des acides aminés	52
IV. MÉTHODES D'ANALYSES PROTÉOMIQUES	53
IV.1 Méthodes d'analyses quantitatives et qualitatives des protéines foliaires	53
IV.1.1 Extraction et dosage des protéines totales et solubles	53
IV.1.2 Techniques d'électrophorèse mono-dimensionnelle (SDS-PAGE)	54
IV.1.3 Mise au point de technique d'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE)	54
IV.1.3.1 Purification des protéines totales	55
IV.1.3.2 Solubilisation des protéines et première dimension	56
IV.1.3.3 Deuxième dimension (SDS-PAGE)	57
IV.1.4 Analyse des gels	57
IV.1.5 Identification des protéines d'intérêt par ESI-LC MS/MS	58
IV.1.6 Identification des protéines par microséquençage N-terminal des protéines	60
IV.1.7 Transfert sur membrane PVDF (« Western blotting ») et immunodétection	61
IV.1.7.1 Transfert électrophorétique des protéines sur PVDF ("western blotting")	61
IV.1.7.2 Révélation immunologique de la protéine	61
IV.2 Détermination des activités protéolytiques et anti-protéolytiques	62
IV.2.1 Détermination des activités protéolytiques	62
IV.2.1.1 Analyse des activités protéolytiques par azocaséine	62
IV.2.1.1 Analyse des activités protéolytiques sur gel SDS-PAGE	63
IV.2.2 Détermination des activités anti-protéolytiques sur gel SDS-PAGE	63
V. MÉTHODES D'ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES	64
V.1 Extraction des ARNs totaux	64
V.2 Analyse de l'expression des gènes	64
V.2.1 Analyse de l'expression des gènes en PCR semi-quantitative	64
V.2.2 Analyse de l'expression des gènes en PCR quantitative (Q-PCR)	65
V.2.2.1 Principe de la Q-PCR	65
V.2.2.1 Détermination et validation des amorces utilisées en Q-PCR	66
V.2.2.1 Quantification relative de l'expression des gènes cibles	67
V.3 Utilisation de l'indicateur moléculaire de sénescence <i>SAG12/Cab</i>	68
V.3.1 Détermination de la date théorique d'entrée en sénescence	68
V.3.2 Détermination du dernier rang foliaire sénescents et de la vitesse de la progression de la sénescence foliaire	68

CHAPITRE IV : IMPLICATION D'UN INHIBITEUR DE PROTÉASES, BnD22, DANS LA RÉGULATION DE LA SÉNESCENCE FOLIAIRE..... 70

<i>Avant-propos (Article 1)</i>	71
I. N-PROTEIN MOBILISATION ASSOCIATED WITH THE LEAF SENESCENCE PROCESS IN OILSEED RAPE IS CONCOMITANT WITH THE DISAPPEARANCE OF TRYPSIN INHIBITOR ACTIVITY (ARTICLE 1)	72
Abstract	72
I.1 Introduction	72
I.2 Materials and Methods	75
I.2.1 Plant material	75
I.2.2 Application of mineral N deficiency and tissue sampling	75
I.2.3 Determination of total N content	76
I.2.4 Extraction of soluble proteins and detection of trypsin inhibitor activity by SDS-PAGE	76
I.2.5 RNA extraction	77
I.2.6 RT-PCR analysis	77
I.2.7 Determination of temporal and spatial progression of leaf senescence using <i>SAG12/Cab</i> gene expression	78
I.2.8 Statistical analysis of data	79

I.3 Results	79
I.3.1 Leaf dry matter and leaf area (LA).....	79
I.3.2 Changes in chlorophyll and N content in leaves	80
I.3.3 Theoretical date of onset of leaf senescence using molecular indicators.....	80
I.3.4 Kinetics of leaf senescence progression	81
I.3.5 In-gel detection of anti-protease activities in leaf soluble proteins.....	81
I.3.6 Changes in the 19 kDa specific TI activity in relation to changes in leaf soluble protein content in mature or maturing leaves (leaf #6).....	82
I.3.7 Changes in the 19 kDa specific TI activity in relation to changes in leaf soluble protein content in young leaves (leaf #7).....	82
I.3.8 BnD22 gene expression	83
I.4 Discussion.....	83
I.4.1 Analysis of foliar N-mobilization using SAG12/Cab gene expression profiles	83
I.4.2 Leaf senescence progression as compared to specific TI activity and BnD22 gene expression changes	85
 Avant propos (Article 2).....	 89
 II. A PROTEOMIC PROFILING APPROACH TO REVEAL A NOVEL ROLE OF BnD22 (BRASSICA NAPUS DROUGHT 22 KD) / WATER SOLUBLE CHLOROPHYLL BINDING PROTEIN IN YOUNG LEAVES DURING NITROGEN REMOBILIZATION INDUCED BY STRESS CONDITIONS (ARTICLE 2).....	 90
Abstract.....	90
II.1 Introduction	90
II.2 Materials and Methods	93
II.2.1 Plant material	93
II.2.2 Application of treatments (mineral N starvation or MeJA spraying) and tissue sampling	94
II.2.3 Soluble proteins extraction and SDS-PAGE	93
II.2.4 Total proteins extraction	95
II.2.5 Two-Dimensional Electrophoresis (2-DE).....	95
II.2.6 Image analysis of 2-DE gels.....	95
II.2.7 Detection of trypsin inhibitor (TI) activity after SDS-PAGE and 2-DE	96
II.2.8 Immunoblot analysis	96
II.2.9 Protein Identification by ESI-LC MS/MS.....	97
II.2.10 RNA extraction.....	98
II.2.11 RT and Q-PCR conditions.....	98
II.2.12 Statistics	99
II.3 Results	99
II.3.1 Effects of N starvation and MeJA on Brassica napus leaves.....	99
II.3.2 Changes in trypsin inhibitor (TI) activities	100
II.3.3 Detection of TI activity after 2-DE and protein identification	100
II.3.4 Identification of BnD22 after separation of total proteins from laminae by 2-DE	101
II.3.5 Immunodetection of BnD22 and WSCP in young leaves of B. napus using anti-WSCP antibodies from B. oleracea and identification of cross-reacted proteins by ESI-LC MS/MS.....	101
II.3.6 Identification of others proteins highly induced by MeJA.....	102
II.3.7 BnD22 gene expression.....	103
II.4 Discussion	103

CHAPITRE V : MODIFICATIONS PROTÉOMIQUES ASSOCIÉES À LA REMOBILISATION DE L'AZOTE FOLIAIRE CHEZ LE COLZA SOUMIS À DIFFÉRENTS NIVEAUX DE FERTILISATION AZOTÉE..... 110

A combined ¹⁵N tracing / proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated to N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation (Article 3)

Avant propos (Article 3).....	111
Abstract.....	112
I. INTRODUCTION	112

II. MATERIALS AND METHODS	115
II.1 Plant material and ¹⁵ N labelling experiments	115
II.2 Sampling and calculation of N remobilisation using ¹⁵ N tracing	116
II.3 Total proteins extraction	117
II.4 2-DE and image capture	117
II.5 Image analysis of 2-DE	118
II.6 Protein Identification by LC MS/MS	118
II.7 N-terminal amino acid sequence analysis	119
II.8 RNA extraction	120
II.9 RT-PCR analysis	120
II.10 Determination of the theoretical date of senescence	121
II.11 Statistical analysis	122
III. RESULTS	122
III.1 Changes in dry matter and total N in leaves of HN, LN and 0N plants	122
III.2 Comparison of N remobilisation in HN, LN and 0N plants	122
III.3 Indicators of leaf senescence: changes in chlorophyll level, protein content and determination of theoretical date of senescence initiation	123
III.4 Identification of proteins induced during leaf senescence and comparative proteomic study	124
IV. DISCUSSION	126
IV.1 Detoxification	126
IV.2 Energy	128
IV.3 Metabolisms	130
IV.4 Proteins biosynthesis	131
IV.5 Stress-proteins and hormones	132
IV.6 Proteolysis and folding protein	134
IV.7 Integration of physiological and proteomics data reveals the chronology of proteomics events related to N remobilisation associated to leaf senescence	136
V. CONCLUDING REMARKS	138
<u>CHAPITRE VI : ÉTUDES PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DES PHASES ULTIMES DU DÉVELOPPEMENT D'UNE FEUILLE DE COLZA : EFFET D'UNE PRIVATION EN AZOTE</u>	139
Chronology of physiological, biochemical and molecular events involved in the N remobilisation and N recycling associated to leaf senescence in <i>Brassica napus</i>: impact of nitrate starvation (Article 4)	
<i>Avant propos (Article 4)</i>	140
Abstract	141
I. INTRODUCTION	141
II. MATERIALS AND METHODS	144
II.1 Plant material	144
II.2 Application of mineral N starvation and tissue sampling	145
II.3 Determination of total N and C amounts	145
II.4 Net photosynthetic rate	145
II.5 Amino acids analysis	146
II.6 Extraction and quantification of soluble proteins	146
II.7 Protease activity assay	147
II.8 Detection of protease activities by zymogram on gelatin-polyacrylamide gel	147
II.9 RNA extraction	147
II.10 RT and Q-PCR conditions for <i>BnAAP1</i> and <i>BnD22</i> genes	148
II.11 RT-PCR analysis for <i>Cab</i> and <i>SAG12</i> genes	149
II.12 Determination of temporal and spatial progression of leaf senescence using <i>SAG12/Cab</i> gene expressions	150
II.13 Statistics	151
III. RESULTS	151

III.1 Determination of a mature leaf for studying the chronology of physiological, biochemical and molecular events during senescence	151
III.2 Changes in SPAD values and net photosynthetic rates.....	151
III.3 Changes in total C and N amounts.....	152
III.4 Changes in soluble proteins amounts, protease activities and gene expression of <i>BnD22</i>	153
III.5 Changes in amino acids contents and in gene expression of <i>BnAAP1</i> , an amino acid permease	154
III.6 Determination of theoretical date of leaf senescence initiation by <i>SAG12/Cab</i> indicator and Chronology of events associated to N remobilization during senescence.....	154
IV. DISCUSSION.....	155
CHAPITRE VII : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	162
I. IMPLICATION D'UN INHIBITEUR DE PROTÉASES, BnD22, DANS LA GESTION DE L'AZOTE REMOBILISÉ.....	164
I.1 Le maintien de la croissance des jeunes feuilles de colza privé en nitrate est concomitant à l'accumulation de la protéine BnD22, un inhibiteur de protéases.....	164
I.2 Fonctions physiologiques de BnD22 dans les feuilles de colza.....	166
I.3 Perspectives de recherche concernant le rôle de BnD22/WSCP dans la gestion du N remobilisé et conséquences sur l'EUA du colza.....	167
II. RÉGULATION DE LA REMOBILISATION DE L'AZOTE AU COURS DE LA SÉNESCENCE FOLIAIRE	170
II.1 Chronologie des d'évènements physiologiques, moléculaires et protéomiques associés au processus de sénescence foliaire	170
II.1.1 <i>La remobilisation de l'azote avant la date théorique d'entrée en sénescence</i>	171
II.1.2 <i>La remobilisation de l'azote de la date théorique d'entrée en sénescence jusqu'à l'abscision</i>	173
II.2 Perspectives.....	178
II.2.1 <i>Perspectives liées à la caractérisation et la régulation des évènements biochimiques, protéomiques et moléculaires intervenant dans la remobilisation de l'azote foliaire</i>	178
II.2.2 <i>Pistes à envisager pour l'amélioration de l'EUA chez le colza</i>	180
Références bibliographiques	182

CHAPITRE I

Introduction générale

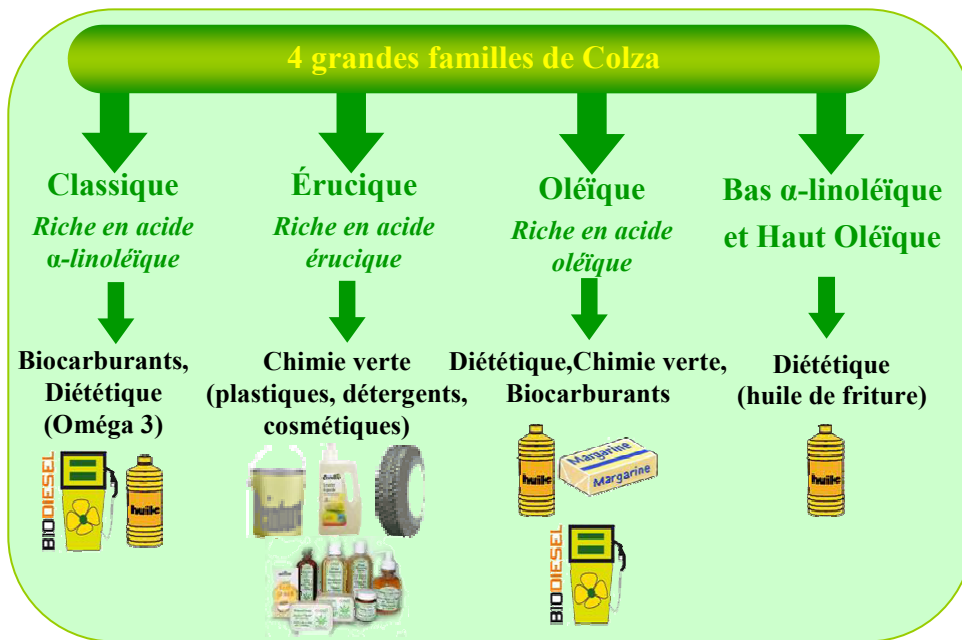


Figure I-1 : Les débouchés agroalimentaires et industriels issus des 4 grandes familles de colza cultivés.

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le colza (*Brassica napus* L.), de l'ordre des Rhoadales, appartient à la famille des Brassicacées (Crucifères). Il est doté d'un double génome puisqu'il est issu du croisement naturel d'un chou (*B. oleracea* L.) et d'une navette (*B. campestris* L.). Il s'agit d'une plante herbacée annuelle pouvant atteindre plus de deux mètres de haut. Deux types de colza sont différenciés, le colza d'hiver et le colza de printemps, qui effectuent respectivement leur cycle de développement en 250-310 jours et 120-150 jours.

Cette oléagineuse est divisée en 4 « familles » de colza présentant des débouchés agro-alimentaires et industriels spécifiques en fonction de leur richesse en certains acides gras (Figure I-1). En effet, les fruits du colza sont des siliques renfermant de petites graines exalbuminées à cotylédons riches en lipides (environ 45%) qui sont utilisées pour l'essentiel à la production d'huile de table (Figure I-1). L'extraction de cette huile fournit un sous-produit, le tourteau de colza, qui est une source de protéines intéressante pour l'alimentation animale. Les dérivés d'huile de colza sont également valorisés dans des usages autres qu'alimentaires, tels que des bio-lubrifiants, des solvants, des produits cosmétiques (Figure I-1), ou des agents protecteurs du bois contre les attaques de champignons et d'insectes (ASAM¹). Actuellement, une des principales applications dans le domaine industriel est le diester, un biocarburant pour moteur diesel. Le gouvernement français a décidé que les niveaux d'incorporation de biocarburants dans le carburant pétrolier classique devaient atteindre 7% en 2010 alors que les accords de Kyoto imposent 5,75%. En 2005, environ 450 000 hectares de colza ont été cultivés pour le diester soit 35% des surfaces de colza cultivé en France. Avec des besoins 2,5 fois plus élevés en 2009, les surfaces de colza dédiées au diester devraient atteindre 1 million d'hectares.

¹ ASAM : Anhydride Succinite d'Alkénoate de Méthyle, dérivé d'huile de colza protégeant le bois des insectes et des champignons récemment mis au point par l'Unité de Chimie agro-industrielle de l'INRA-INPT-ENSIACET (Toulouse).

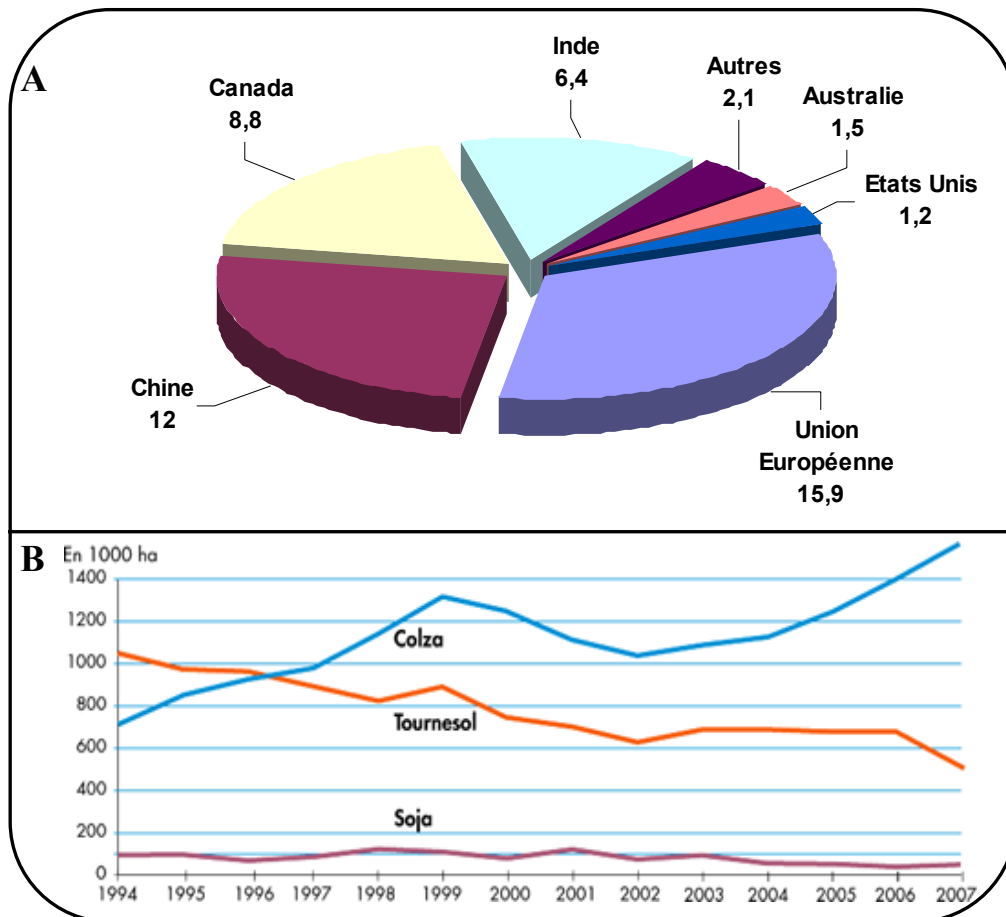


Figure I-2 : (A) Répartition mondiale de la production de graines de colza en 2006/2007 (en millions de tonnes). (B) Evolution des surfaces cultivées en France de plantes oléagineuses (colza, tournesol et soja) depuis 1994. (Source PROLEA-CETIOM).

Le colza est une culture largement répandue dans le monde, principalement dans les zones tempérées fraîches. En 2007, la production mondiale de graines de colza était d'environ 47 millions de tonnes de graines permettant de produire 18 millions de tonnes d'huile et environ 27 millions de tonnes de tourteaux. Les principaux producteurs sont l'Union Européenne, le Canada, les Etats-Unis, l'Australie, la Chine et l'Inde (Figure I-2A). En 2007, l'Union Européenne produisait le tiers du colza mondial soit environ 16 millions de tonnes de graines. En France, la superficie cultivée en colza a doublée entre 1994 et 2007 contrairement aux autres plantes oléagineuses (soja et tournesol) pour lesquelles les superficies de culture ont eu tendance à diminuer (Figure I-2B). Avec 1,4 millions d'hectares en 2006, la production française était de 4,4 millions de tonnes de graines avec des rendements moyens de 29,1 quintaux.ha⁻¹ en moyenne. Depuis ces dix dernières années, le potentiel de rendement a gagné 2,5% par an. Cette augmentation significative des rendements est essentiellement due au progrès génétique (sélection variétale), à l'amélioration des techniques agricoles et des modalités d'apport des intrants (fertilisants et produits phytosanitaires).

Le coût énergétique de la production des engrais azotés, fonction du marché pétrolier, est l'un des postes budgétaires les plus élevés à la charge des agriculteurs. Aujourd'hui, la politique agricole est en pleine mutation et les préoccupations économiques, environnementales sont au cœur des réflexions. L'ajustement de la fertilisation azotée devient un objectif majeur dont le but est de préserver l'environnement et d'accroître la rentabilité des cultures. La recherche de variétés économes en intrants est donc une priorité pour la filière oléagineuse et, dans le cas du colza, la marge de progression dans ce domaine semble importante. D'un point de vue agro-environnemental, on peut reprocher au colza d'être très exigeant en engrais notamment azotés, la préconisation actuelle étant de 140 à 180 kg de N par ha et par an. En effet, malgré ses capacités élevées d'absorption du nitrate, cette plante se caractérise par une faible efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) : seulement 50% de l'azote absorbé par la plante est présent à la récolte dans les graines (Schjoerring *et al.*, 1995). Cette valorisation médiocre de l'élément azote serait essentiellement liée à un mauvais recyclage de l'azote foliaire lors du développement végétatif au cours duquel s'effectue la sénescence « séquentielle ». Ce type de sénescence se caractérise par la redistribution des nutriments (glucides, lipides et protéines) dégradés au sein des feuilles matures (organes source) au profit des tissus en croissance (organes puits). Les travaux portant sur l'étude des relations entre l'absorption de l'azote, sa mise en réserve et son utilisation pour la croissance, réalisés au sein de l'Equipe Azote de l'UMR INRA UCBN 950 EVA de Caen, ont mis en évidence que le

recyclage de l'azote des organes de stockage (mobilisation des réserves azotées) ou des tissus sénescents (mobilisation de l'azote endogène par sénescence) constitue un processus essentiel pour l'utilisation optimale de cet élément par les tissus végétaux récoltés. Des travaux récents (Malagoli *et al.*, 2005a et b ; Tilsner *et al.*, 2005) ont permis de confirmer la faible EUA du colza et de montrer que cette mauvaise valorisation de l'azote était essentiellement liée à un défaut de recyclage de l'azote foliaire. Ainsi, au cours du développement végétatif, le retour d'azote au sol par la chute des feuilles mortes peut atteindre jusqu'à 140 kg N.ha⁻¹.an⁻¹ affectant directement les bilans économique et environnemental de la culture. De plus, il est actuellement acquis que ce défaut de mobilisation de l'azote foliaire pendant la sénescence conditionne également le rendement. Par exemple, la suppression de 50% des feuilles de la rosette effectuée au début de la montaison aboutit à une forte réduction (30%) de la production de siliques comparativement à des colzas ayant conservé l'ensemble des feuilles de la rosette (Noquet *et al.*, 2004).

Face aux enjeux liés à l'amélioration du bilan agro-environnemental de la culture de colza, le principal défi consistera à combiner une réduction des intrants azotés avec un maintien (voire une amélioration) des rendements actuels. Atteindre de tels objectifs nécessitera d'améliorer l'EUA. Dans ce contexte, il apparaît clairement qu'une des voies d'amélioration de l'EUA passe par une optimisation de la remobilisation de l'azote au cours de la sénescence foliaire lors du développement végétatif. Ce travail de thèse avait donc pour ambition de mieux comprendre les mécanismes associés au processus de remobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle chez le colza d'hiver en vue de déterminer des pistes potentielles d'amélioration de l'EUA. Ce programme de recherche doctorale a bénéficié d'une bourse co-financée par le Département Environnement-Agronomie (EA) de l'INRA et la Région Basse-Normandie. Il s'inscrit dans le cadre du champ thématique I du schéma stratégique du Département EA : "Ecophysiologie et conduite des cultures" traitant plus particulièrement de l'Etude de la réponse des plantes aux contraintes du milieu, métabolisme et nutrition minérale. La nutrition et la gestion de l'azote font partie des principaux thèmes de recherche traités par l'UMR INRA UCBN 950 EVA de Caen, avec pour objectif principal l'étude intégrée de l'utilisation de l'azote chez le colza d'hiver.

Après une présentation des caractéristiques physiologiques et agronomiques de la plante étudiée (le colza d'hiver), l'analyse bibliographique (Chapitre II) fera le point sur la gestion de l'azote au cours du cycle ontogénétique du colza, sur les connaissances actuelles concernant

le processus de remobilisation de l'azote et sur les principales perturbations du métabolisme azoté intervenant au cours de la sénescence foliaire, stade ultime du développement de la feuille. Enfin, les données bibliographiques concernant les facteurs de régulation de la sénescence et des processus de recyclage de l'azote qui lui sont associés seront plus précisément abordées. Ceci nous amènera ensuite à étudier le rôle des différents signaux environnementaux et hormonaux sur l'initiation de cette remobilisation de l'azote. Puis les résultats correspondant aux trois chapitres suivants seront exposés sous la forme d'articles scientifiques (cf. ci-dessous). Enfin, une discussion générale sera suivie des perspectives de recherche qui découlent de ce travail.

L'ensemble de ces travaux de thèse s'est traduit par la publication ou la soumission de 4 articles scientifiques présentés dans ce document au niveau des Chapitres IV, V et VI et dont voici la liste:

- **Etienne P., Desclos M., Le Gou L., Gombert J., Bonnefoy J., Maurel K., Le Dily F., Ourry A., Avice J-C.** (2007). Protein mobilization associated to leaf senescence process of oilseed rape is concomitant with the disappearance of a trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology*, **34**, 895-906.
- **Desclos M., Dubousset L., Etienne P., Bonnefoy J., Lecahérec F., Satoh H., Ourry A., Avice J-C.** (2008). A proteomic profiling approach to reveal a novel role of BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa)/Water Soluble Chlorophyll binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology*, **147**, 1830–1844.
- **Desclos M., Etienne P., Coquet L., Cosette P., Bonnefoy J., Segura R., Reze S., Ourry A., Avice J-C.** (2008). A combined ¹⁵N tracing / proteomics study in *Brassica napus* reveals the chronology of proteomics events associated to N remobilisation during leaf senescence induced by nitrate limitation or starvation. *Soumise à Proteomics*.
- **Desclos M., Etienne P., Lecahérec F., Leport L., Bouchereau A., Reze S., Josette Bonnefoy J., Ourry A., Avice J-C.** Chronology of physiological, biochemical and molecular events involved in the N remobilisation and N recycling associated to leaf senescence in *Brassica napus*: impact of nitrate starvation. *Soumise à Plant and Cell Environment*.

CHAPITRE II

Analyse bibliographique

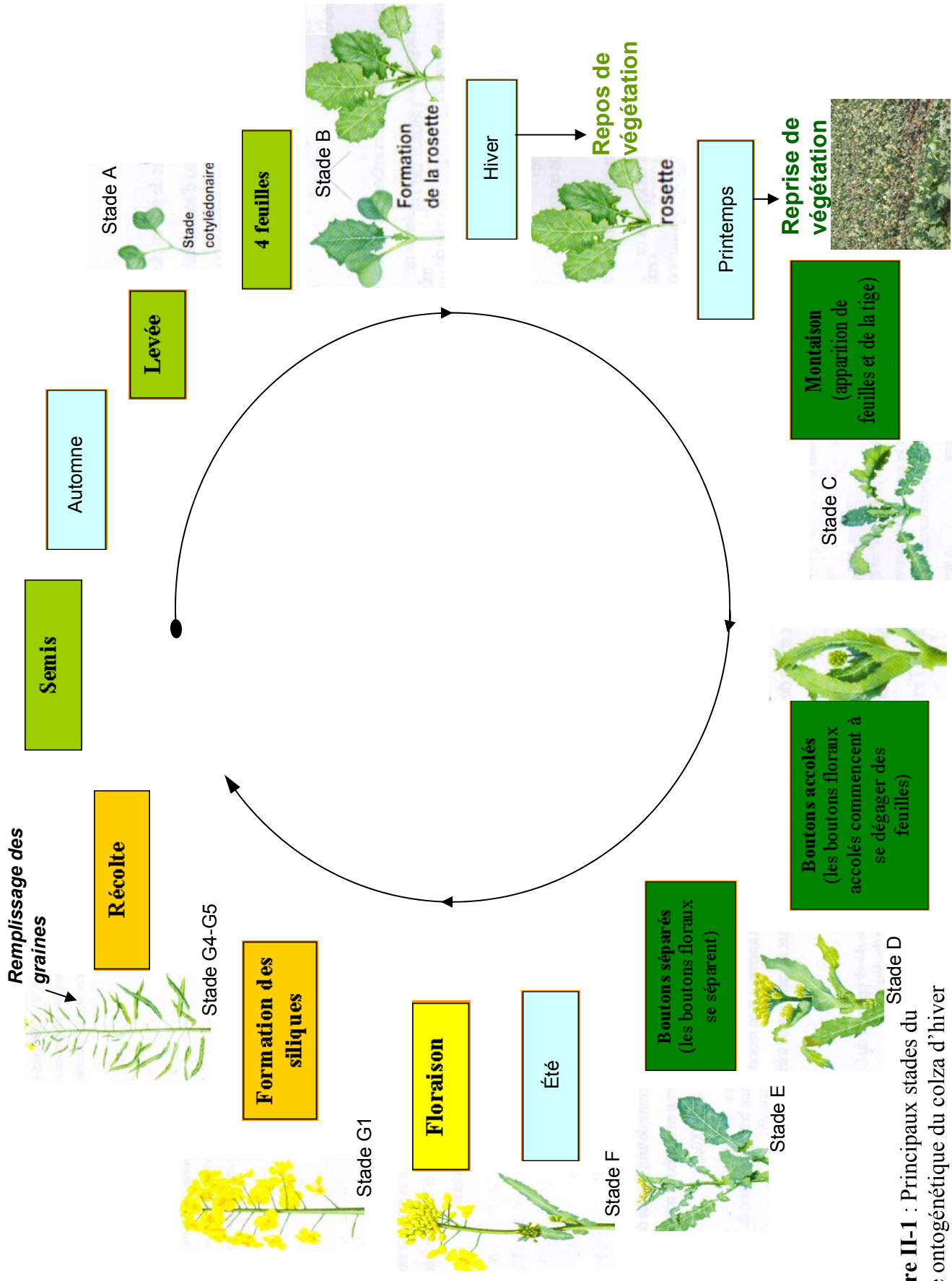


Figure II-1 : Principaux stades du cycle ontogénétique du colza d'hiver (source CETIOM).

CHAPITRE II

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. GESTION DE L'AZOTE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU COLZA D'HIVER

I.1 L'absorption de l'azote et la fertilisation azotée au cours du développement du colza d'hiver

L'azote est un élément essentiel au développement des plantes. Les deux principales sources d'azote présentes dans le sol sont des formes minérales, le nitrate et l'ammonium. Avec des concentrations 10 à 1000 fois plus élevées que l'ammonium, le nitrate est considéré comme la source d'azote minéral majoritaire dans les sols bien aérés. La disponibilité en azote du sol est un facteur important dans le cycle de développement du colza d'hiver lequel est divisé en sept étapes: germination, production de feuilles, extension de la tige (montaison), développement des bourgeons floraux, floraison, développement des siliques et formation des graines (Figure II-1; Sylvester-Bradley et Makepeace, 1984).

I.1.1 Du semis au stade reprise de croissance

Le colza d'hiver est semé fin août – début septembre. Une implantation optimale correspond à 40 à 80 graines par m², soit une quantité de semences comprise entre 2 et 4 kg.ha⁻¹. A la levée, le colza développe d'abord ses deux feuilles cotylédonaire (stade A) puis une vingtaine de feuilles dites « vraies » formant la rosette (stade B ; Figure II-1). Dans le même temps, cette plante élabore un système racinaire en pivot, où elle accumule des réserves organiques qui seront utilisées lors de son développement ultérieur. A la fin de l'automne, la croissance est progressivement ralentie. Le zéro végétatif du colza étant de 5°C, la croissance est presque stoppée pendant la période hivernale au cours de laquelle le colza peut supporter des températures inférieures à -20°C (Merrien et Pouzet, 1988). Le froid est justement un facteur important du cycle de développement de cette plante, et plus spécifiquement, dans l'étape d'initiation florale (vernalisation). La durée minimale de la

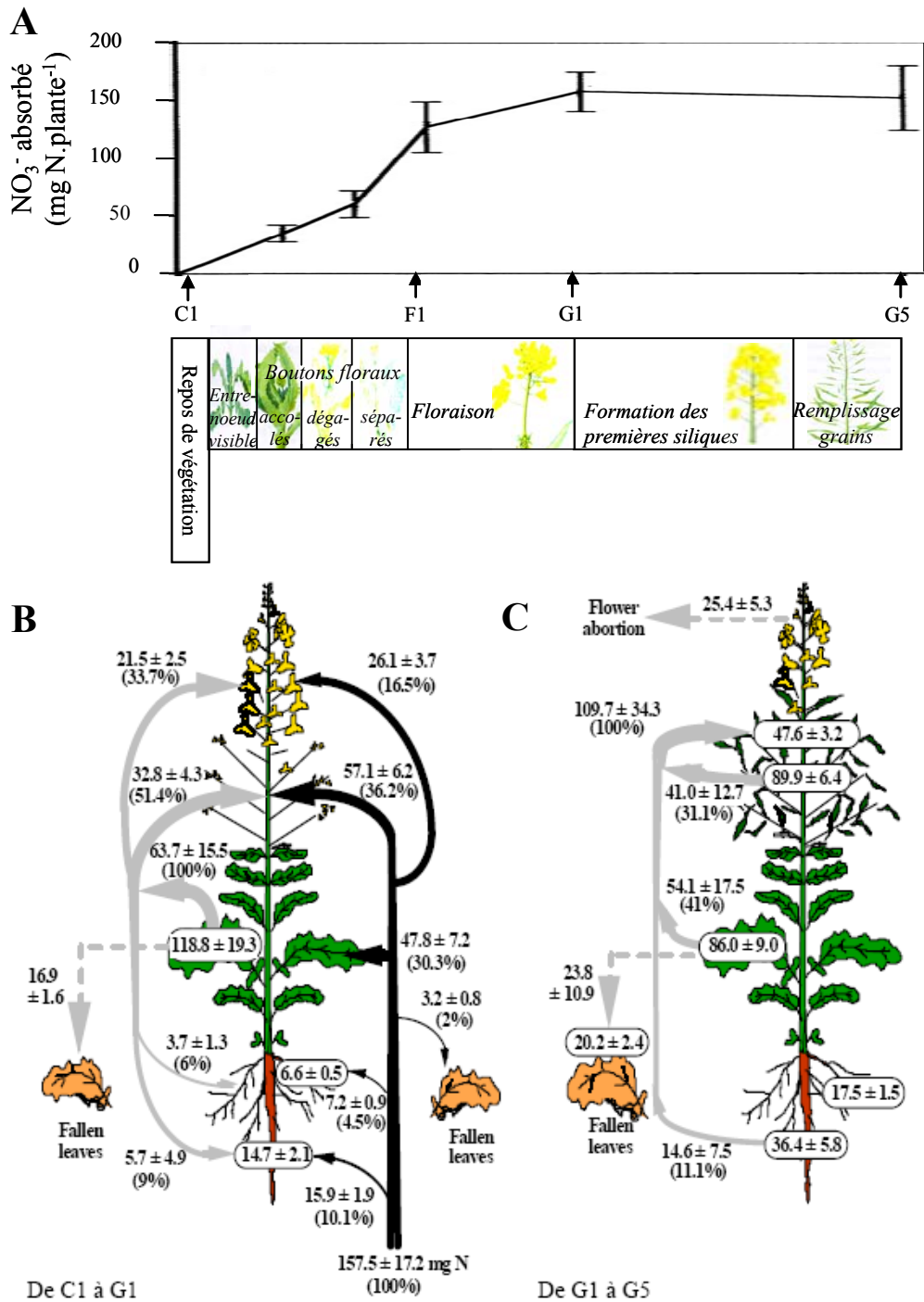


Figure II-2 : Gestion de l'azote au cours du cycle ontogénétique du colza. (A) Evolution de l'absorption cumulée de l'azote minéral (nitrate) exprimé en mg N.plante⁻¹ de la reprise de croissance (C1) jusqu'au stade fin de remplissage des siliques (G5) du colza. L'arrêt de l'absorption est observé du stade début de montaison (G1) jusqu'au stade G5. Les barres verticales indiquent la moyenne ± ES, pour n=6. (B) Bilan au sein de la plante des flux des transferts d'N endogène (flèches de gauche) et exogène (flèches de droite) en mg N. plante⁻¹ entre les stades C1 et G1. (C) Transferts d'N total au sein de la plante (en mg N. plante⁻¹) entre les G1 et G5 au sein de la plante. Pour chaque organe, les chiffres entre parenthèses indiquent la répartition en % de l'azote endogène remobilisé à partir des feuilles (à gauche) ou en % de l'azote issu de l'absorption (à droite). (D'après Rossato *et al.*, 2001)

vernalisation est d'autant plus faible que la température est basse, que l'héméroperiode est longue et que les plantes sont âgées (Leterme, 1988).

Durant cette période automno-hivernale, le colza présente un fort potentiel de stockage de l'azote. Ainsi, la directive 91/676/CEE du 31 décembre 1991 dite directive « nitrate » (transposée en droit français par le décret n°93-1038 du 27 août 1993) interdit l'apport de fertilisants azotés minéraux ou uréiques de synthèse du 1^{er} septembre au 15 janvier en zone vulnérable. Deux raisons invoquées par le Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM) permettent d'expliquer cette restriction :

- l'absorption d'intrants azotés peut conduire à une augmentation de la surface foliaire sans pour autant améliorer le rendement final (Colnenne *et al.*, 1998),
- le faible coefficient d'utilisation de l'azote apporté, en comparaison avec celui des apports de printemps, peut entraîner un lessivage supplémentaire du nitrate durant la période automno-hivernale *via* la chute des feuilles de la rosette encore riches en azote (teneur en azote pouvant atteindre 4,5% de la matière sèche ; Dejoux *et al.*, 2000).

1.1.2 De la reprise de croissance jusqu'au stade fin de montaison

Au retour des températures douces, à la fin de l'hiver, il y a reprise de la croissance et de nouvelles feuilles apparaissent. Cependant, cette reprise de végétation dépend plus de la date du semis que de la température (Tittonel *et al.*, 1988). Cette étape, qui se caractérise par une augmentation importante de la surface foliaire, se prolonge jusqu'au début de la floraison. Parallèlement, la tige commence à s'allonger (montaison), puis émet de nombreuses ramifications. La montaison, qui est corrélée au stade de développement de la fleur, est favorisée par les jours longs. A l'extrémité de la tige principale, les boutons floraux s'épanouissent en grappes, du bas vers le haut des ramifications de la plante, à partir du mois d'avril (Figure II-1).

L'utilisation d'un marquage continu à l'azote $^{15}\text{NO}_3^-$ en conditions contrôlées, a permis de suivre l'absorption cumulée de $^{15}\text{NO}_3^-$ de la reprise de végétation (stade C1) jusqu'à la fin du remplissage des siliques (stade G5) (Figure II-2A ; Rossato *et al.*, 2001). Cette étude montre une forte absorption de l'azote jusqu'au début de floraison (stade G1) indiquant que cette période de croissance est associée à une demande importante de l'élément azote. Une fertilisation azotée de printemps est donc préconisée entre la reprise de végétation et le début de montaison pour compenser les quantités insuffisantes de nitrate du sol et assurer la croissance optimale du colza. Les apports totaux sont en général compris entre 140 à 180 kg de N par ha et par an. L'essentiel de l'azote minéral absorbé est alloué aux parties aériennes

(tige (36%), feuilles (30%) et inflorescences (16,5%)) et au pivot (10% ; Figure II-2B ; Rossato *et al.*, 2001). Cet apport, primordial lors de la période « reprise de végétation-montaison », permet d'atteindre un fort indice foliaire à la floraison. De plus, une quantité non négligeable d'azote endogène est remobilisée des feuilles matures au profit de la tige (51%), des inflorescences (33%) et du pivot (9%).

1.1.3 Du stade floraison jusqu'à la récolte

La floraison dure 4 à 6 semaines et pour un génotype donné, a lieu à une date stable de par sa dépendance au photopériodisme (Leterme, 1988). De plus, elle est influencée par la précocité des cultivars mais peu par la date du semis, bien que les semis les plus tardifs puissent avoir des retards de floraison en raison d'une initiation florale plus tardive (Mendham et Salisbury, 1995). L'initiation florale est variable selon les génotypes et outre le photopériodisme, certains facteurs climatiques interviennent dans ce processus. A titre d'exemple, le gel en début de floraison peut conduire à une augmentation de la durée de floraison.

La fécondation, essentiellement autogame donne naissance à des siliques dont la maturation est acquise en 6 ou 7 semaines. Chacune de ces siliques renferme de petites graines riches en lipides et en protéines. A maturité, le moindre choc peut provoquer la déhiscence de ces organes et la libération des graines. La récolte intervient lorsque le taux d'humidité des graines descend au-dessous de 15%. Les rendements obtenus chez le colza sont en moyenne de 29,1 quintaux.ha⁻¹ et peuvent atteindre jusqu'à 35 quintaux.ha⁻¹.

A la mi-floraison, les besoins en azote sont moindres et les fournitures par le sol plus élevées. La demande en azote du colza pendant la floraison a été déterminée *via* l'utilisation de ¹⁵NO₃⁻ (Rossato *et al.*, 2001). Au début de la formation des siliques (stade G1), la quantité d'azote cumulée atteint un plateau indiquant une faible absorption d'azote jusqu'à la maturation des graines (stade G5 ; Figure II-2A). Certains auteurs expliquent cette diminution de l'absorption d'azote durant la phase de remplissage des siliques, par des conditions particulièrement sèches à cette période (Merrien *et al.*, 1988). Ces résultats suggèrent donc que l'azote présent à l'intérieur des graines n'est pas directement issu de l'absorption. Il semble que la fourniture d'azote nécessaire au remplissage des graines repose pour l'essentiel sur une mobilisation de l'azote endogène, laquelle est associée au processus de sénescence monocarpique qui se manifeste en fin de cycle en touchant l'ensemble des tissus végétatifs. Les siliques (et les graines qu'elles contiennent) deviennent l'unique organe receveur (puits) pour lesquelles 48% de l'azote circulant est alloué ; l'essentiel du recyclage provenant des

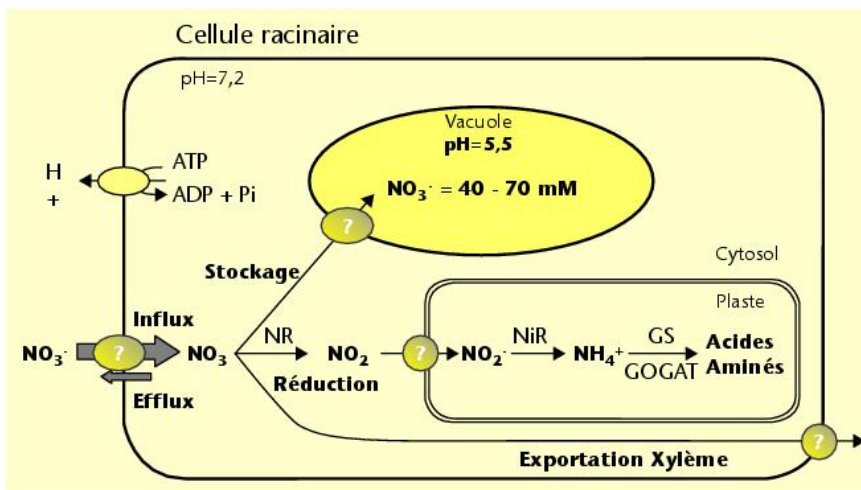
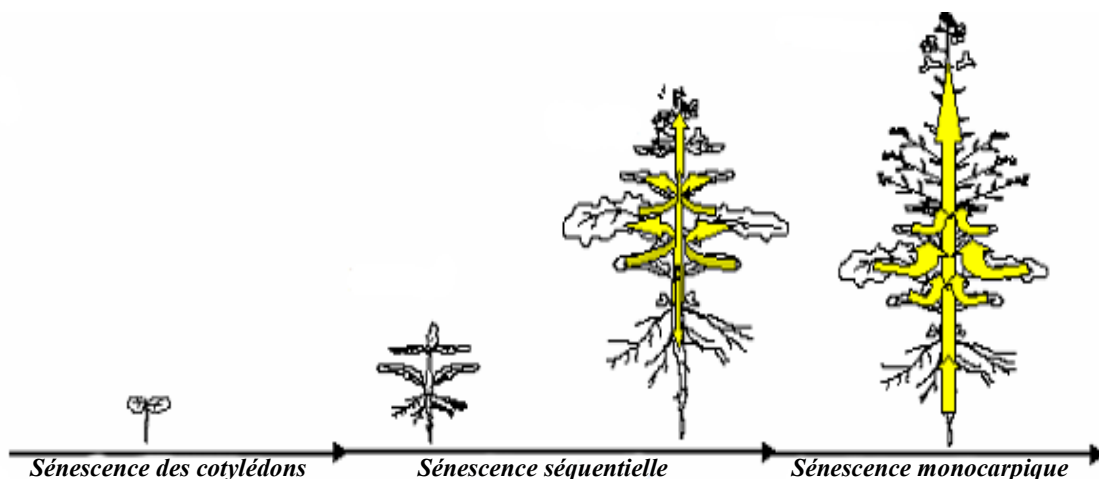


Figure II-3 : Schéma simplifié de l'assimilation de l'azote chez les plantes : absorption racinaire du nitrate, stockage vacuolaire et réduction en nitrite et ammonium, synthèse des acides aminés et exportation ; GOGAT : glutamate synthase ; GS : glutamine synthase ; NiR : nitrite réductase ; NR : nitrate réductase. Sur la membrane plasmique qui entoure la cellule, sont localisés une pompe à protons ($H^+/ATPase$) et un transporteur de nitrate (symport). Un système de transport dit primaire, une $H^+/ATPase$, couple l'hydrolyse de l'ATP à un efflux de protons (création d'un gradient de pH) et à une modification du potentiel électrique de part et d'autre de la membrane plasmique. La dissipation du gradient de protons entraîne le fonctionnement d'un système de transport dit secondaire, symport ou antiport. (D'après Morot-Gaudry *et al.*, 2006).

A



B

Stade de développement du Colza :

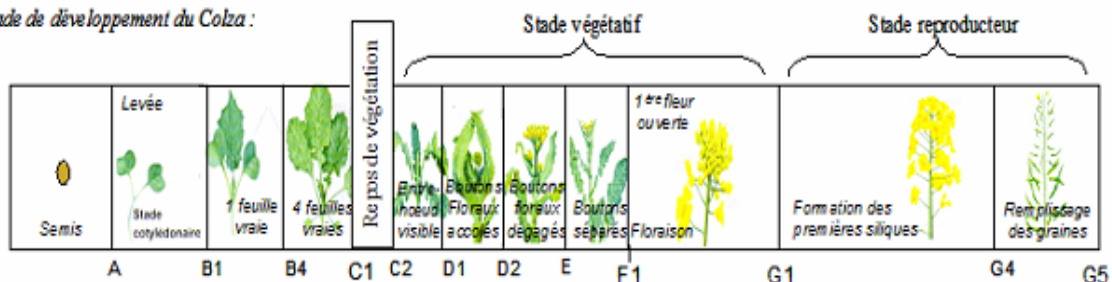


Figure II-4 : Les différents types de sénescence foliaire (sénescence des cotylédons, sénescence séquentielle et monocarpique) au cours des principaux stades de développement du colza. Au cours du stade végétatif, la sénescence foliaire est qualifiée de séquentielle : elle affecte graduellement les feuilles, le long de l'axe de la plante, au fur et à mesure que celles-ci atteignent leur maturité. Au stade reproducteur, la sénescence dite monocarpique se généralise à l'ensemble des organes de la plante (racines, pivot, tige, feuilles, fleurs,...). (D'après Rossato *et al.*, 2001).

feuilles (Figure II-2C ; Rossato *et al.*, 2001) et de la tige (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Dreccer *et al.*, 2000). Les teneurs en azote endogène sont donc cruciales pour le développement des siliques.

I.2 Assimilation, formes de réserves et mobilisation de l'azote endogène au cours du développement du colza d'hiver

Suite à son absorption, le nitrate peut être réduit en ammonium *via* l'intervention de deux enzymes : la nitrate réductase (NR) et la nitrite réductase (NiR) (Figure II-3). L'assimilation de l'ammonium *via* le cycle glutamine synthase / glutamate synthase (GS/GOGAT) conduit à la synthèse d'acides aminés qui seront utilisés pour la synthèse protéique ainsi que d'autres composés azotés. Le nitrate, les acides aminés et certaines protéines peuvent être mis en réserve dans un organite de stockage privilégié, la vacuole. Cette mise en réserve est observée lorsque l'absorption d'azote est supérieure à la demande. De plus, parmi les protéines foliaires, la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO), localisée au niveau du chloroplaste (Matile, 1992), représente jusqu'à 50% des protéines solubles et est stockée au niveau chloroplastique.

A maturité et jusqu'à la fin de leur vie, les feuilles passent du statut de puits (c'est-à-dire un organe qui importe des nutriments) au statut de source (c'est-à-dire un organe exportateur). Il existe donc au sein des feuilles, des processus de remobilisation des composés azotés qui sont fortement associés à la dégradation des réserves protéiques, notamment la RuBisCO. A la fin de son développement, la feuille subit une dégradation coordonnée des constituants cellulaires et une redistribution de ces composés vers les organes en croissance au cours d'un ensemble de processus appelé sénescence. Parmi les principales réserves azotées mobilisables, le pool d'acides aminés libres circulant dans le phloème des tiges constitue une source d'azote facilement accessible (Tilsner *et al.*, 2005). Lorsque la demande en azote est trop importante par rapport à l'azote présent dans le sol, les acides aminés et peptides issus de la dégradation des protéines représentent la principale source de composés azotés.

Chez le colza, la sénescence foliaire s'effectue tout au long du cycle de culture (Buchanan-Wollaston, 1994). En dehors de la sénescence des cotylédons, il est possible de distinguer deux principaux types de sénescence intervenant à des stades de développement différents (Figure II-4) :

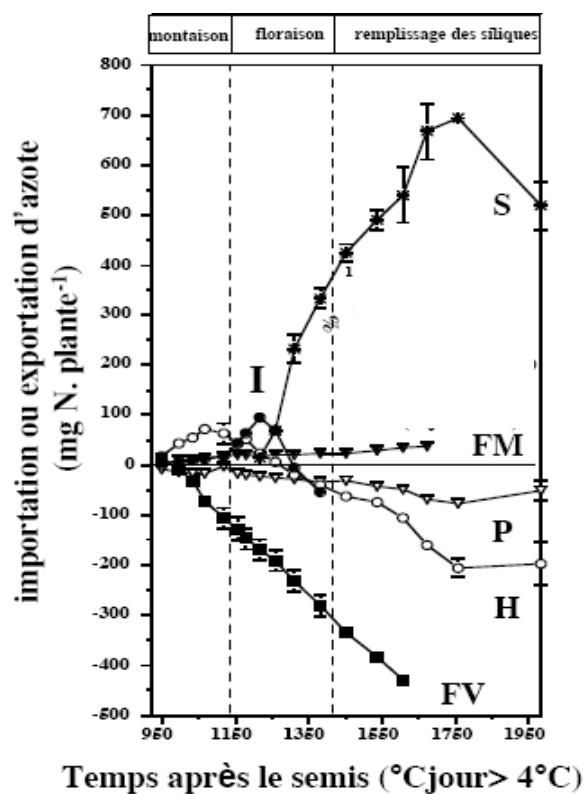


Figure II-5 : Flux d'azote endogène cumulé dans les différents tissus (P: pivot ; H: hampe florale ; FV: feuilles vertes ; FM: feuilles mortes ; S: siliques ; I: inflorescences) chez le colza (*Brassica napus* L. var. Capitol) de la reprise de végétation au stade «maturité des graines». Chaque barre verticale représente la moyenne \pm ES, pour $n=3$. (D'après Malagoli *et al.*, 2005a)

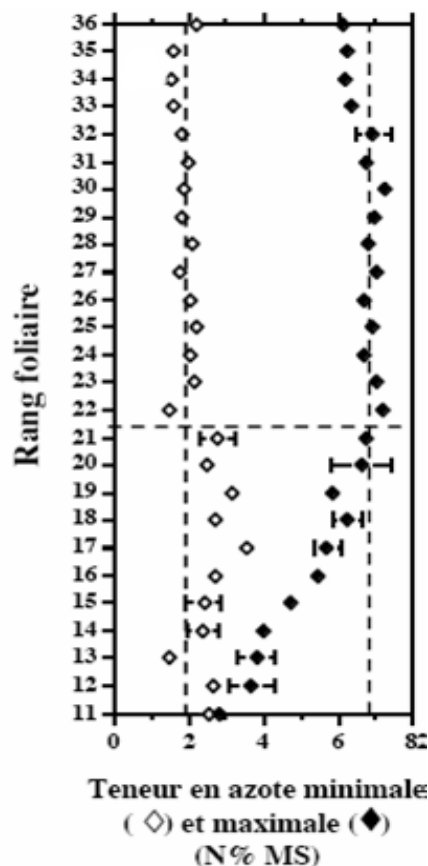


Figure II-6 : Teneurs minimales en azote (en blanc) (azote résiduel dans les feuilles chutées) et teneurs maximales en azote (en noir) en fonction de la position nodale des feuilles : bas de couvert (rangs foliaires 11 à 21) et haut du couvert (rangs foliaires 22 à 36). Les barres horizontales indiquent la moyenne \pm ES, pour $n=3$. Les lignes verticales en pointillés représentent les teneurs en azote moyennes minimale et maximale (D'après Malagoli *et al.*, 2005a)

- De la reprise de végétation (stade C2) jusqu'à la floraison (stade F1), cette sénescence foliaire est qualifiée de « **séquentielle** », c'est-à-dire qu'elle progresse de manière acropète le long de l'axe de la plante, au fur et à mesure que les feuilles atteignent leur maturité (Figure II-4). L'azote issu des feuilles basales sénescentes est alors mobilisé vers les jeunes feuilles et les organes reproducteurs en croissance.
- A la floraison, et plus particulièrement, lors de la formation des graines (stade G1), la sénescence devient **monocarpique** (Figure II-4). Elle s'étend à l'ensemble des organes de la plante (feuilles, pivot et tige) et intervient alors que l'absorption racinaire de nitrate est fortement diminuée. L'azote endogène mobilisé par ce processus de sénescence généralisé devient alors la source d'azote principalement disponible pour le remplissage des graines (Rossato *et al.*, 2001). Ce passage du stade végétatif au stade reproducteur est caractérisé par un transfert des ressources *via* la remobilisation de l'azote des tissus végétatifs vers les organes reproducteurs en développement. La formation des siliques et le remplissage des graines sont ainsi largement dépendants de la mobilisation des réserves (Diepenbrock, 2000).

Les feuilles ainsi que le pivot sont des organes sources pour l'azote endogène du début de la montaison jusqu'au stade bourgeons floraux visibles (Malagoli *et al.*, 2005a). L'azote endogène provenant des feuilles et du pivot est principalement alloué vers la tige (86%) puis vers les inflorescences (14%). Un marquage séquentiel au ^{15}N , effectué tous les 7 jours en condition de plein champ, a également permis de suivre très précisément la chronologie des changements de statut puits/source des divers rangs foliaires. La superposition successive des périodes puits/source de chaque rang foliaire a permis de mettre en évidence l'existence de flux d'azote entre les feuilles localisées dans le bas du couvert et celles situées dans la partie supérieure *via* un compartiment central, la hampe florale (Figure II-5, Malagoli *et al.*, 2005a). En effet, avant le début du remplissage des siliques, l'azote endogène des organes sources (bas du couvert, rangs foliaires 11 à 21) est remobilisé au profit des organes puits en croissance (feuilles de haut du couvert, rangs foliaires 22 à 36 et tige).

Au cours des phases de développement végétatif du colza où se déroulent la sénescence séquentielle, de récents travaux ont montré que certaines feuilles chutent avec une teneur relative en azote supérieure à 2% (Figure II-6 ; Malagoli *et al.*, 2005a). Ainsi, le retour d'azote au sol par la chute des feuilles mortes peut atteindre jusqu'à $140 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$ au cours du développement végétatif aboutissant par voie de conséquence à un bilan économique et environnemental médiocre. De plus, Schjoerring *et al.* (1995) rapportent que seulement

Tableau II-I : Calculs des teneurs en azote dans les graines (en % MS) et des rendements (en t MS.ha⁻¹) en fonction des scénarii testés : S0 : témoin, S1 : chute des rangs foliaires n°11 à 21 avec une teneur en azote résiduel semblables à celle obtenue expérimentalement (Figure I-8) soit égale à 1% ; S2 : chute retardée des rangs foliaires n°11 à 21 (à 1604°C jours) avec une teneur en azote résiduel de 1% ; S3 : chute retardée des rangs foliaires n°11 à 21 (à 1604°C jours) avec une teneur en azote résiduel de 1% dans toutes les feuilles. Les rendements ont été calculés à partir des plantes échantillonnées (8,2 t MS.ha⁻¹) ou à partir de la récolte réalisée sur l'ensemble de la parcelle (3,6 t MS.ha⁻¹). (D'après Malagoli *et al.*, 2005b)

	Teneur en azote (N% MS) (Rendement maintenu constant)		Rendement (t.ha ⁻¹) (teneur maintenue constante)	
	3,6 t.ha ⁻¹	8,2 t.ha ⁻¹	3,18 %	3,18 %
S0	3,18	3,18	3,6	8,7
S1	3,49	3,34	3,95	9,17
S2	3,37	3,28	3,82	9,03
S3	3,64	3,40	4,12	9,34

50% de l'azote apporté par la fertilisation est utilisée par les graines, démontrant ainsi la faible EUA observée chez le colza. Il est actuellement acquis que ce défaut de mobilisation de l'azote foliaire pendant la sénescence séquentielle conditionne également le rendement. Cette faible EUA se traduit par un indice de récolte azoté (IRN ou NHI¹) qui passe de 80 à 70% lorsque les feuilles mortes tombées avant la floraison sont prises en considération (Schjoerring *et al.*, 1995).

L'approche modélisatrice de la répartition de l'azote développée par Malagoli *et al.* (2005b) permet également de tester les scénarii visant à réduire la restitution de l'azote dans l'environnement en augmentant la taille du pool d'azote endogène circulant, afin d'améliorer *in fine* l'IRN (sans modification du rendement) et le rendement grainier (sans changement de la teneur en azote des graines). Parmi les scénarii testés (Tableau II-I), une augmentation significative (+15%) de la teneur en azote dans les graines ou du rendement a été observée suite à une réduction de la teneur résiduelle (scénario 1, S1) des feuilles (égal à 1%) et à un prolongement de leur durée de vie (scénario 3, S3) (Malagoli *et al.*, 2005b). Par ailleurs, Noquet *et al.* (2004) ont montré que la suppression, au début de la montaison, de la moitié des feuilles de la rosette aboutit à une forte réduction (30%) de la production de siliques comparativement à des colzas ayant conservé l'ensemble des feuilles de la rosette.

Ces dernières données révèlent que l'optimisation de l'EUA contribuerait à l'amélioration des rendements. Face aux préoccupations environnementales, il est primordial de développer des colzas caractérisés par une EUA optimale en conditions de bas intrants azotés. Actuellement, un certain nombre de voies d'amélioration de l'EUA sont proposées.

I.3 Voies d'amélioration de l'EUA : des premières pistes encourageantes

Parmi les stratégies mises en œuvre pour améliorer l'EUA, on peut distinguer celles qui consistent à ajuster le niveau de fertilisation nitrique aux besoins de la plante, celles qui reposent sur la sélection variétale ou sur la production de plantes transgéniques modifiées au niveau du métabolisme de l'azote :

¹ NHI : Nitrogen Harvest Index (Indice de récolte azotée) : rapport entre la quantité d'azote présent dans les graines et la quantité d'azote de la plante entière

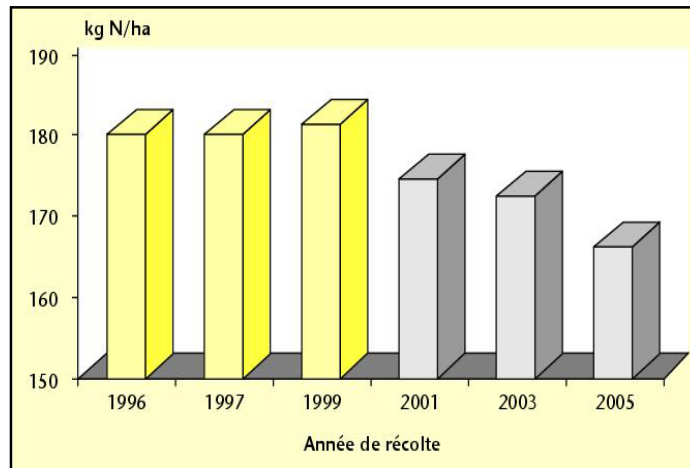


Figure II-7 : Dose moyenne d'engrais azotés apportés sur une culture de colza de 1996 à 2005 (France, source CETIOM).

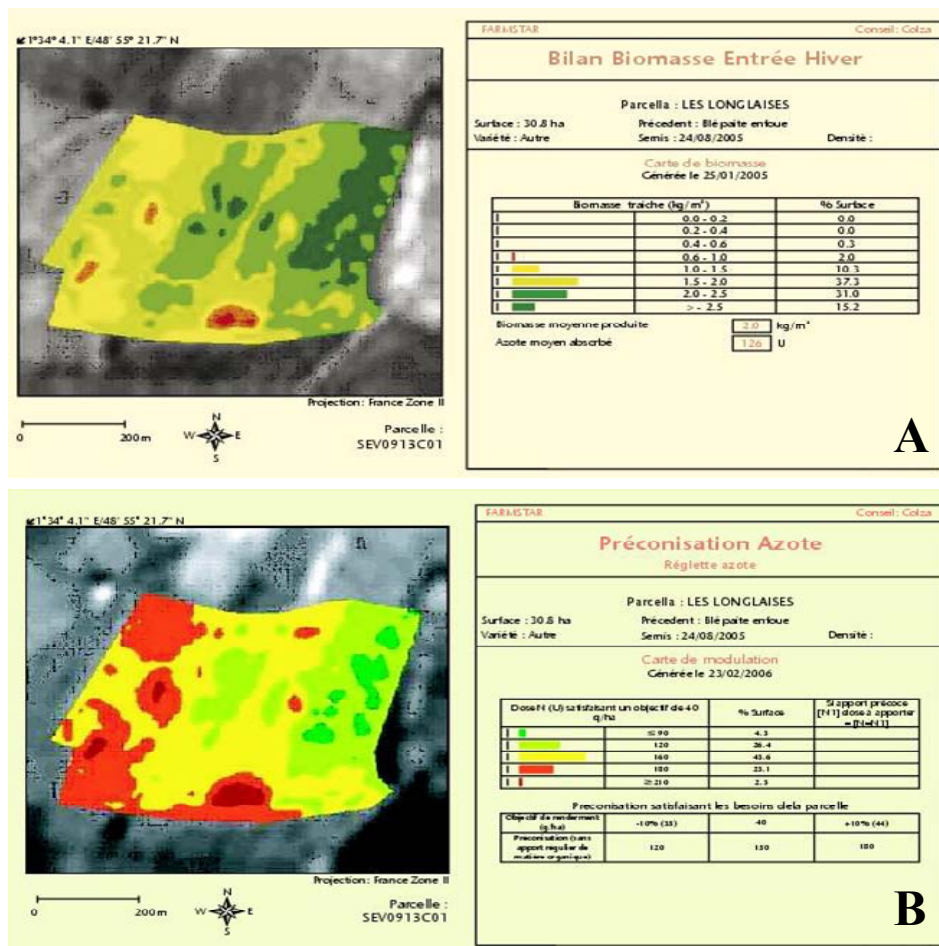


Figure II-8 : Estimation de la dose d'engrais azoté à apporter en utilisant le système FarmStar. (A) Cartographie de la biomasse d'une parcelle de colza à l'entrée de l'hiver, (B) Carte de préconisation spatialisée des apports en azote. La carte de préconisation fournie, illustre, par zone de couleur la dose à apporter en fonction du rendement potentiel moyen de la parcelle (Source ARVALIS).

- ***Améliorer l'EUA par un ajustement de la fertilisation azotée :***

L'apport en fertilisants azotés a diminué d'environ 10% entre 1996 et 2005 (Figure II-7). De nombreux essais agronomiques ont été réalisés par le CETIOM dans le but d'optimiser les pratiques culturales. En semant tôt et en raisonnant la fertilisation minérale azotée au printemps, les pertes en nitrate sont limitées et les coûts de production sont réduits. En effet, un semis précoce, dès le mois d'août, donne au colza le temps de prélever l'azote disponible dans le sol à l'automne avant l'arrêt de croissance provoquée par le froid. Le colza ne nécessite donc pas d'apports azotés à l'automne. En zone vulnérable, la directive nitrate interdit l'apport de fertilisants azotés du 1^{er} septembre au 15 janvier. En revanche, un apport maîtrisé d'engrais azoté est réalisé au printemps grâce à la « Réglette azote colza » mise au point par le CETIOM. D'utilisation simple, la « Réglette azote colza » permet d'estimer la quantité d'azote à apporter à partir de la pesée de plantes coupées au ras du sol en fin d'hiver sur quelques placettes de 1 m² avant la date du premier apport d'azote. L'azote absorbé par le colza est estimé à 65 fois la masse de colza obtenue. Ainsi, à partir de la masse moyenne obtenue et de la « Réglette azote colza », on obtient directement la dose à apporter. Si la dose d'azote à épandre est trop importante, l'apport est fractionné pour éviter les pertes par lessivage.

Récemment, l'utilisation des images satellites (produit FarmStar développé par EADS-ASTRIUM et ARVALIS en collaboration avec le CETIOM) complète cette gamme d'outils qui permettent de déterminer la fertilisation azotée optimale à apporter aux cultures. Concrètement, les exploitants agricoles fournissent les informations nécessaires au suivi des parcelles (variétés, date de semis, profondeur du sol, irrigation,...) à partir desquelles ASTRIUM constitue une « base de données parcelle ». Ces bases de données permettent à Spot Image d'optimiser la programmation des satellites, la validation et l'orthorectification des images Spot. La programmation des 3 satellites composant la constellation Spot conduit ensuite à un criblage des parcelles sur de grands espaces, aux stades et aux dates de culture choisis. Les modèles agronomiques, dont certains ont été développés par le CETIOM, sont utilisés pour traduire en conseils simples les cartes de réflectance (fraction d'énergie lumineuse réfléchiée par les végétaux) fournies par les satellites (Figure II-8A). ASTRIUM élabore alors les cartes de bilan, préconisation et conseils rendant possible la modulation de l'apport d'azote par grandes zones homogènes à l'échelle de la parcelle (Figure II-8B). La dose préconisée par le système FarmStar montre un écart moyen de 35 à 50 unités par rapport à la réglette (source CETIOM).

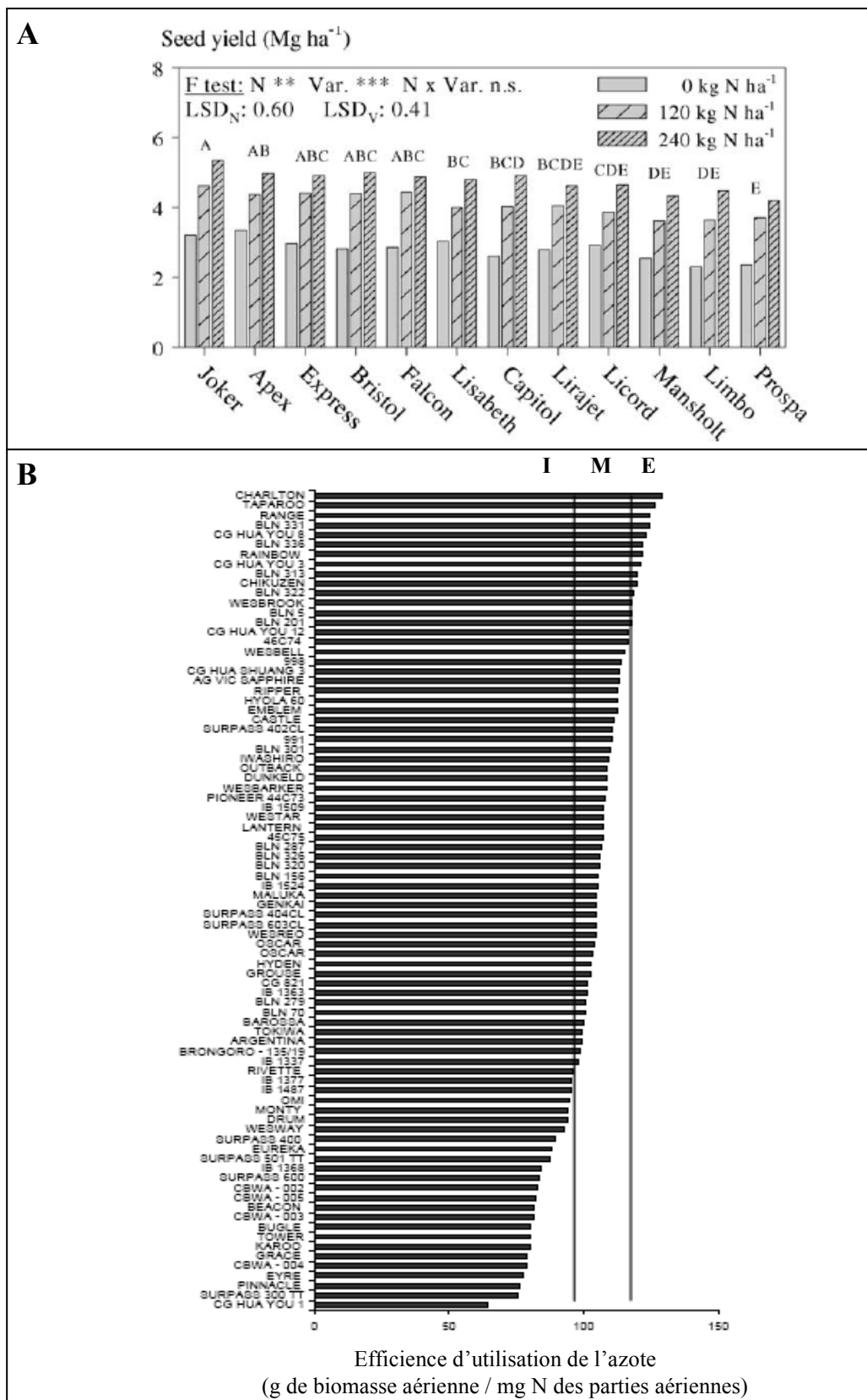


Figure II-9 : (A) Rendement en graines (Mg ha^{-1}) de 12 variétés de cultivars de colzas en fonction de trois niveaux de fertilisation azotée (0, 120, 240 kg N ha^{-1}) (d'après Rathke *et al.*, 2006). (B) Efficacité d'utilisation de l'azote de 84 génotypes canola âgés de 38 jours (stade végétatif) et cultivés en conditions limitantes en azote (16 mg d'azote par kg de sol). L'efficacité d'utilisation de l'azote est représentée par la quantité de biomasse aérienne produite par mg d'azote accumulé dans les parties aériennes. Les génotypes sont classés selon leur niveaux d'efficacité : E pour bonne efficacité, M pour efficacité modérée et I pour mauvaise efficacité. (D'après Balint *et al.*, 2008).

- **Améliorer l'EUA par la sélection variétale :**

Pendant des décennies, les variétés de colza ont été sélectionnées en présence d'importantes quantités d'engrais azoté. La tendance des programmes de sélection récents ou en cours vise à obtenir des variétés se satisfaisant d'une plus faible fertilisation azotée. En Allemagne, une série d'études a été conduite afin de comparer les performances en terme d'EUA de plusieurs variétés de colza placées en conditions optimales ou restreinte d'apport en azote minéral (Rathke *et al.*, 2006). Ces travaux ont montré qu'il existait une forte variabilité de l'EUA permettant d'identifier des variétés de colza à fort EUA (ex : Joker) ou faible EUA (ex : Capitol) (Figure II-9A). En revanche, pour chacune des variétés, les rendements obtenus en situation de privation ou carence en azote, sont inférieurs à ceux obtenus en condition de fort azote minéral (Figure II-9A ; Rathke *et al.*, 2006). En effet, la forte diminution de la fertilisation azotée conduit à une réduction de la biomasse sèche et du rendement chez des variétés caractérisées par une EUA élevée ou faible en conditions de fortes fertilisations azotées (Kamh *et al.*, 2005 ; Svecnjak et Rengel, 2006).

D'autres travaux ont permis de cribler des génotypes de colza sur leur performance en terme d'EUA dès le stade végétatif (Schulte auf'm Erley *et al.*, 2007). A titre d'exemple, l'EUA a été évaluée sur 84 génotypes de canola en mesurant la quantité de biomasse aérienne produite par mg d'azote accumulé dans les parties aériennes au stade végétatif (rosette) sur milieu pauvre en azote (Figure II-9B, Balint *et al.*, 2008). Cette étude a permis de sélectionner 8 génotypes de canola (Charlton, Taparoo, Range, BLN 331, CG HUA YOU 8, BLN 313, Chikuzen) présentant une forte EUA. Ce premier criblage a été réalisé en vue de faciliter l'identification des variétés les plus performantes en conditions limitantes en N dans le but d'évaluer, par la suite, leur rendement en graines. En France, certains programmes de recherche nationaux ANR-Génoplante², axés sur l'étude du comportement de variétés de colza en matière d'absorption/remobilisation de l'azote en présence de faibles niveaux de fertilisation, sont en cours de réalisation et visent à caractériser les déterminants physiologiques, métaboliques, protéomiques et génétiques de l'EUA.

² Projet Arcole (2006-2007) : Efficacité de la nutrition azotée de colza au printemps : Identification de cibles de sélection ; et projet Genergy (2008-2011) : Improvement of the oil yield of the rapeseed crop in the context of bio fuel production.

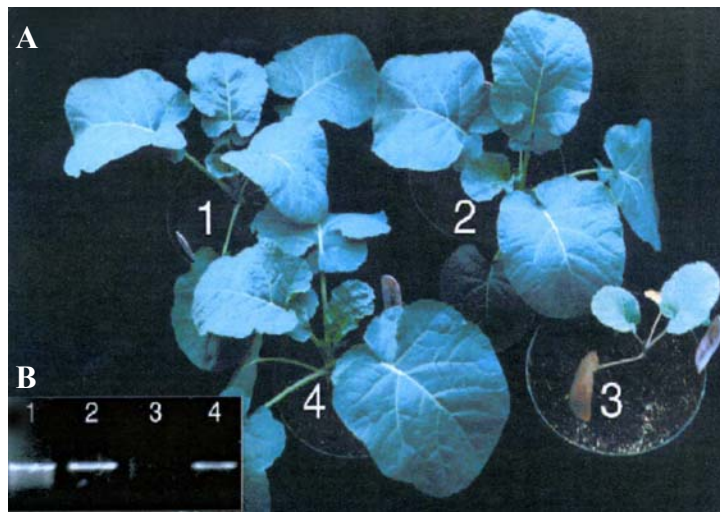


Figure II-10 : Colza transgénique surexprimant l'Alanine Amino-Transférase (*AlaAT*) via l'introduction d'un ADNc de l'AlaAT de l'orge sous le contrôle d'un promoteur spécifique des racines (*btg26*). (A) Les plantes numérotées 1, 2 et 4 possèdent le transgène contrairement à la plante numéro 3. (B) Expression du gène *AlaAT* dans les plantes 1, 2, 3 et 4 (par PCR semi-quantitative) en utilisant des amorces spécifiques d'*AlaAT* de l'orge. (D'après Good *et al.*, 2007).

- **Obtention de plantes transgéniques à forte EUA :**

L'amélioration de l'EUA peut être réalisée en régulant le métabolisme azoté *via* la modification de l'expression de certains gènes impliqués dans les voies de réduction et d'assimilation de l'azote.

Ainsi, des études se sont orientées vers l'amélioration de la réduction ou de l'assimilation du nitrate. En effet, les premières études concernant l'amélioration de l'EUA se sont focalisées sur la modification de l'expression des gènes impliqués dans la réduction du nitrate. Chez *Nicotiana plumbagnifolia*, *Arabidopsis thaliana* et *Solanum tuberosum*, il a été montré que l'augmentation de l'absorption d'azote, *via* la sur-expression de la nitrate réductase (NR) ou de la nitrite réductase (NiR), n'avait aucune conséquence sur le rendement ou la croissance des plantes (Quilleré *et al.*, 1994; Crété *et al.*, 1997; Djennane *et al.*, 2002). L'augmentation des transcrits des gènes codant la NR et la NiR chez ces plantes transgéniques, n'était pas accompagnée d'une induction des activités NR ou NiR ainsi que des teneurs en protéines, suggérant une régulation post-transcriptionnelle. Les enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote telles que la glutamine synthase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT), se sont montrées de meilleures candidates pour la recherche de voies d'amélioration de l'EUA (Hirel *et al.*, 1997; Chichkova *et al.*, 2001; Habash *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Yamaya *et al.*, 2002). Certaines études ont révélé une corrélation entre une activité GS importante, une augmentation de la croissance et du rendement (Hirel *et al.*, 1997; Habash *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002). Chez *Lotus corniculatus*, la sur-expression de la GS1 (glutamine synthase cytosolique) conduit à de fortes teneurs en acides aminés et une floraison précoce (Vincent *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que l'azote est plus fortement remobilisé chez ces plantes transgéniques. Ces données sont en accord avec des études montrant une induction de l'activité GS cytosolique au cours de la sénescence foliaire chez plusieurs plantes (Feller et Fischer, 1994).

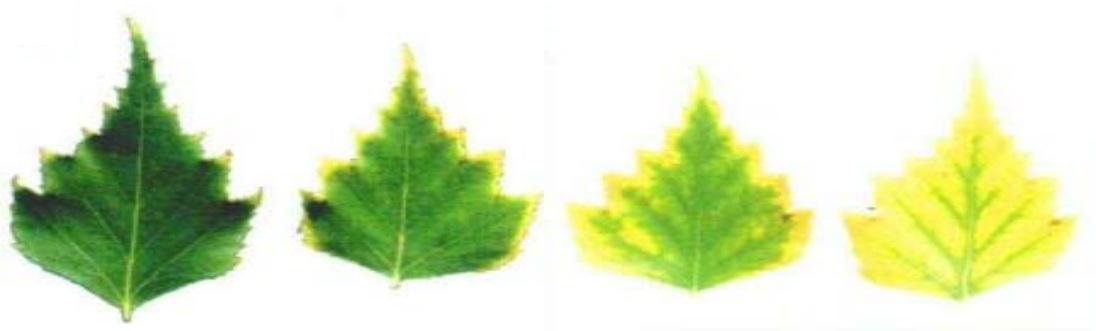
Plus récemment, des colzas surexprimant l'alanine aminotransférase (*AlaAT*), enzyme impliquée dans le métabolisme azoté (synthèse d'alanine), *via* l'introduction de l'ADNc de l'*AlaAT* de l'orge sous le contrôle d'un promoteur du colza (canola) spécifique des racines (*btg26*), ont été réalisées dans le but d'augmenter l'influx de nitrate (Figure II-10 ; Good *et al.*, 2007). Ces plantes transgéniques cultivées sous de faibles apports en azote, présentent des rendements en biomasse et en graines similaires aux plantes sauvages cultivées sous de forts intrants azotés. La culture de ces plantes conduirait à diminuer de 40% l'application de fertilisants azotés sans diminuer le rendement. Bien que des techniques du génie génétique

aient permis l'obtention de colzas génétiquement modifiés dans certains pays tels que le Canada, il est interdit de commercialiser ces colzas en France, compte tenu du moratoire sur les plantes génétiquement modifiées. Toutefois, ces résultats encourageants offrent des pistes dans la recherche de variétés performantes et démontrent qu'une modification de l'expression de certaines enzymes intervenant dans le métabolisme de l'azote peut conduire à une amélioration significative de l'EUA.

Chez une population de 420 lignées recombinantes issues du croisement entre les écotypes sauvages parentaux d'*Arabidopsis*, Bay-0 et Shahdara, la colocalisation de QTL (Quantitative Trait Loci) de sénescence et de QTL d'EUA (teneurs en azote total, concentrations en acide aminés) a permis de montrer que les lignées les plus sénescentes sont celles qui ont la plus petite biomasse et les plus fortes teneurs en azote et en acides aminés (Loudet *et al.*, 2002). La vitesse de développement foliaire joue sans doute un rôle majeur dans l'EUA. Il a été montré que des lignées d'*Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2005) et de maïs (Martin *et al.*, 2005), présentant une sénescence retardée, remobilisaient mieux leur azote. Plus récemment, *via* la caractérisation de QTL d'EUA, de rendement, de remobilisation de l'azote et d'absorption de l'azote, Coque *et al.* (2008) ont suggéré que les phénotypes caractérisés par une sénescence foliaire plus tardive, auraient des capacités d'absorption de l'azote, et des rendements grainiers augmentés.

Dans l'objectif d'améliorer l'EUA, l'ensemble des exemples rapportés ci-dessous montrent que la compréhension des mécanismes impliqués dans la mobilisation de l'azote durant le processus de sénescence foliaire est un préalable important. Ces dernières années, plusieurs études réalisées notamment chez *Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2005, 2008) ont permis d'accéder à une meilleure connaissance des mécanismes de remobilisation de l'azote associés à la sénescence foliaire. Ce pré-requis est nécessaire à l'obtention de colza moins exigeant en azote c'est-à-dire capable de mieux gérer l'azote préalablement assimilé (azote endogène). Le chapitre suivant permettra de faire le bilan des connaissances sur la remobilisation de l'azote au cours de la phase ultime de la vie d'une feuille.

A



B

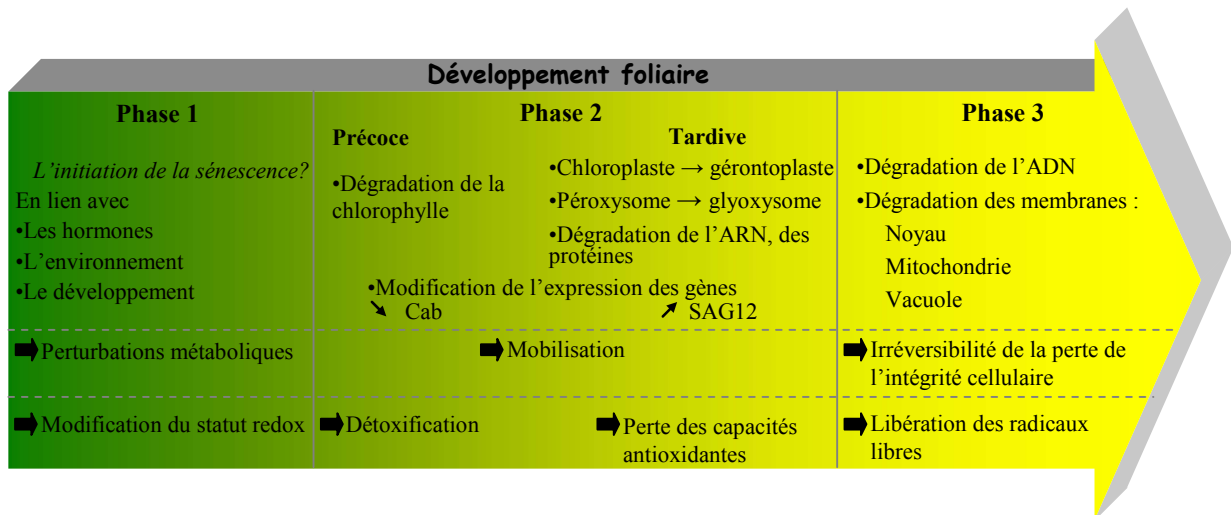


Figure II-11 : (A) Progression de la sénescence au niveau d'une feuille. Les tissus proches des nervures sont touchés plus tardivement que les autres (d'après Gan et Amasino, 1997). (B) Différentes phases de la sénescence foliaire et leurs caractéristiques (d'après Zimmermann et Zentgraf, 2005).

II. REMOBILISATION DE L'AZOTE ET SÉNESCENCE FOLIAIRE

II. 1 Définition et principales étapes du processus de sénescence foliaire

La sénescence est un processus génétiquement contrôlé, résultant de la succession d'évènements biochimiques et physiologiques coordonnés au niveau cellulaire et tissulaire qui conduisent à la mort de la plante ou d'un organe de la plante. Différents types de sénescence sont distingués : foliaire, florale, associée aux fruits. Dans le cadre de cette thèse, l'analyse bibliographique qui va suivre sera centrée sur la sénescence foliaire qui marque l'étape ultime du développement de la feuille.

Au cours de la sénescence, les feuilles s'engagent dans un processus de dégradation massive de leurs macromolécules (lipides, glucides, acides nucléiques, protéines). Les éléments issus de ces dégradations (C, N, P...) sont ensuite redistribués (phénomène qualifié de remobilisation) vers les organes en croissance (jeunes feuilles, graines) (Gan et Amasino, 1997). Dans le cas des composés azotés, il est possible de distinguer 2 types de remobilisation : (i) la remobilisation des composés N de réserves facilement mobilisables (tels le nitrate, les acides aminés, les protéines solubles cytosoliques et vacuolaires) et (ii) le recyclage du N correspondant à la remobilisation des composés N difficilement mobilisables, car nécessitant une dégradation préalable des structures cellulaires.

Au niveau macroscopique, la sénescence foliaire se caractérise par le jaunissement (résultant de la dégradation des chlorophylles) et aboutit au dessèchement complet et au final à l'abscission de la feuille. De profondes modifications sont observées au niveau tissulaire, cellulaire, métabolique et génétique (Smart, 1994). Les cellules du mésophylle sont les premières touchées par ce processus alors que les tissus vasculaires sont touchés plus tardivement (Figure II-11A ; Gan et Amasino, 1997). En effet, les tissus proches des nervures seraient préservés dans le but d'assurer le transport des éléments issus de la dégradation.

II.1.1 Les manifestations de la sénescence au niveau cellulaire

Au niveau cellulaire, les phénomènes de sénescence se manifestent dans un ordre très précis. Les différentes phases du processus de sénescence foliaire et leurs caractéristiques sont résumées dans la Figure II-11B (Zimmermann et Zentgraf, 2005) :

- **Phase 1** : La phase d'initiation de la sénescence peut être modulée par différents facteurs externes (nutrition, lumière, sécheresse) et internes (balance hormonale) qui

sont détaillés dans les chapitres III.1 et III.2 de l'analyse bibliographique. Ces conditions physiologiques peuvent conduire à des variations du statut redox *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

- **Phase 2** : La dégradation des chlorophylles constitue le premier symptôme visuel de sénescence. Les chloroplastes et les peroxysomes subissent des modifications structurales et fonctionnelles. La dégradation des membranes thylakoïdiennes apparaît à des stades précoces de la sénescence foliaire alors que l'enveloppe plastidiale se désintègre plus tardivement. L'abondance des membranes thylakoïdiennes permet de constituer une source importante de carbone *via* la production de glucides à partir d'acides gras (Lee, 2000). La dégradation des protéines et des ARN constitue une source importante d'azote et de phosphore mobilisables. Cette phase est caractérisée par l'induction ou la répression de l'expression de certains gènes (cf. § II.1.3). Il est également important de noter que la dégradation des chlorophylles entraîne une augmentation des ROS capable de provoquer d'importantes perturbations métaboliques (Mittler *et al.*, 2004). La réponse des cellules au stress oxydant est fonction de la teneur en ROS : une faible teneur permet la mise en place de mécanismes de résistance (intervention d'antioxydants, cf. § III.3) alors qu'une forte teneur entraîne un stress oxydatif (Vranova *et al.*, 2002). Chez le maïs, il a été montré que l'activité des enzymes de détoxification des ROS augmentent puis diminuent à des stades plus avancés de la sénescence (Prochazkova *et al.*, 2001). Ces ROS sont de puissants oxydants responsables de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, lipides,...) qui peuvent affecter considérablement les mécanismes cellulaires. La présence accrue de ces composés toxiques au cours de la sénescence suggère que le stress oxydatif participe également à la dégradation massive des protéines (Palma *et al.*, 2002).

- **Phase 3** : Tout comme l'ADN, les organites tels que la mitochondrie et le noyau sont dégradés tardivement. A des stades ultimes, la perte de l'intégrité membranaire apparaît au niveau des mitochondries, du noyau et des vacuoles. Les membranes sont soumises à de nombreuses modifications incluant la perte des phospholipides et des acides gras ainsi que la diminution du ratio stérols/acides gras et de la teneur en acides gras insaturés (Paliyarth et Droillard, 1992). La dégradation des composés membranaires conduit à une augmentation de la perméabilité, à une perte du gradient ionique ainsi

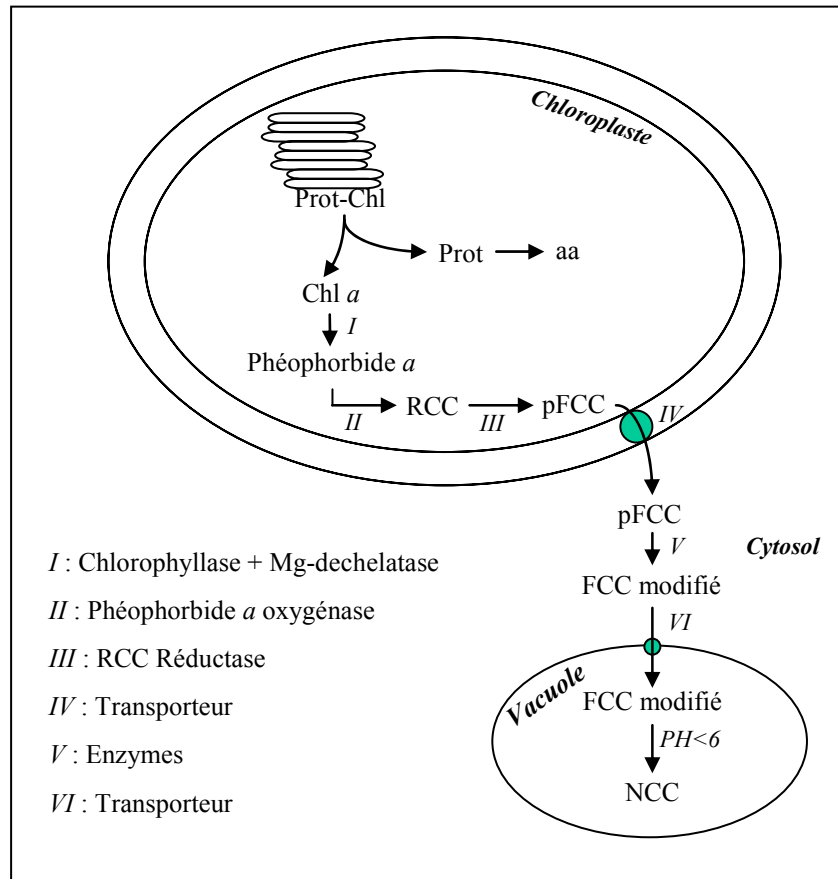


Figure II-12 : Schéma de la voie de dégradation de la chlorophylle *a*. Prot : protéine ; aa : acides aminés ; Chl *a* : chlorophylle *a* ; RCC : Red Chlorophyll Catabolite (catabolite de la chlorophylle *a* émettant une longueur d'onde rouge) ; pFCC : primary Fluorescent Chlorophyll Catabolite (catabolite primaire fluorescent de la chlorophylle *a*) ; FCC : Fluorescent Chlorophyll Catabolite (catabolite fluorescent de la chlorophylle *a*) ; NCC : Non fluorescent Chlorophyll Catabolite (catabolite non fluorescent de la chlorophylle *a*). (Modifié d'après Hortensteiner et Feller, 2002).

qu'à la diminution de l'activité de certaines protéines membranaires telles que les pompes à ions. Les ROS, en fortes quantités, contribuent à ces détériorations. A ce stade, l'irréversibilité du processus de sénescence conduit à la mort cellulaire.

II.1.2 Les manifestations de la sénescence au sein de chaque organe

Le premier organe touché est le **chloroplaste**. Désigné par le terme **gérontoplaste**, les chloroplastes sénescents sont caractérisés par un nombre restreint de thylakoïdes (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999a). D'un point de vue physiologique, une réduction de la capacité photosynthétique se traduisant par une baisse de fonctionnement du transport d'électrons des photosystèmes I et II (PSI, PSII) a été observée avant même que les pigments chlorophylliens soient dégradés (Stressman *et al.*, 2002). Ce déclin de la capacité de transfert des électrons entraîne une réduction de la production de NADPH, H⁺ et d'ATP au cours de la phase lumineuse de la photosynthèse. Par voie de conséquence, ces événements provoquent une diminution de l'assimilation de CO₂ observée chez *Arabidopsis* au début de la sénescence foliaire (Stressman *et al.*, 2002). Ainsi, l'énergie lumineuse n'est plus utilisée par les feuilles sénescents pour la photosynthèse mais est restituée à la plante sous forme d'excès d'énergie d'excitation. Cet excès énergétique conduit à la formation de ROS dans le chloroplaste. La formation de zéaxanthine et d'anthéaxanthine peut également jouer un rôle important dans la dissipation de l'excès d'énergie d'excitation ; et par conséquent dans la protection de l'appareil photosynthétique. Lu *et al.* (2003) ont montré que le cycle des xanthophylles était activé dans les feuilles sénescents de blé au moment de l'arrêt de l'assimilation du CO₂. Par ailleurs, la néosynthèse de pigments de couleur rougeâtre, les anthocyanes, lors de la sénescence foliaire permet également de limiter la photo-oxydation des photosystèmes par les ultraviolets. Un lien entre l'accumulation d'anthocyanes et la chute des contenus en azote a pu être établi lors de la sénescence foliaire (Lee *et al.*, 2003). En effet, la structure biochimique de ces molécules leur confère des propriétés physico-chimiques leur permettant de dissiper l'énergie non utilisée pour la photosynthèse (Hoch *et al.*, 2003).

Les gérontoplastes sont le siège de la dégradation de certains pigments dont les chlorophylles *a* et *b*. L'enzyme régulatrice de la dégradation de la chlorophylle lors de la sénescence est la phéophorbide *a* oxygénase (PaO ; Figure II-12). Spécifiquement induite dans les feuilles sénescents d'*Arabidopsis*, la PaO est la seule enzyme de la voie de dégradation des chlorophylles dont l'activité, la teneur ainsi que l'expression génique augmentent lors de la sénescence (Hörtensteiner *et al.*, 1995 ; Pružinská *et al.*, 2005).

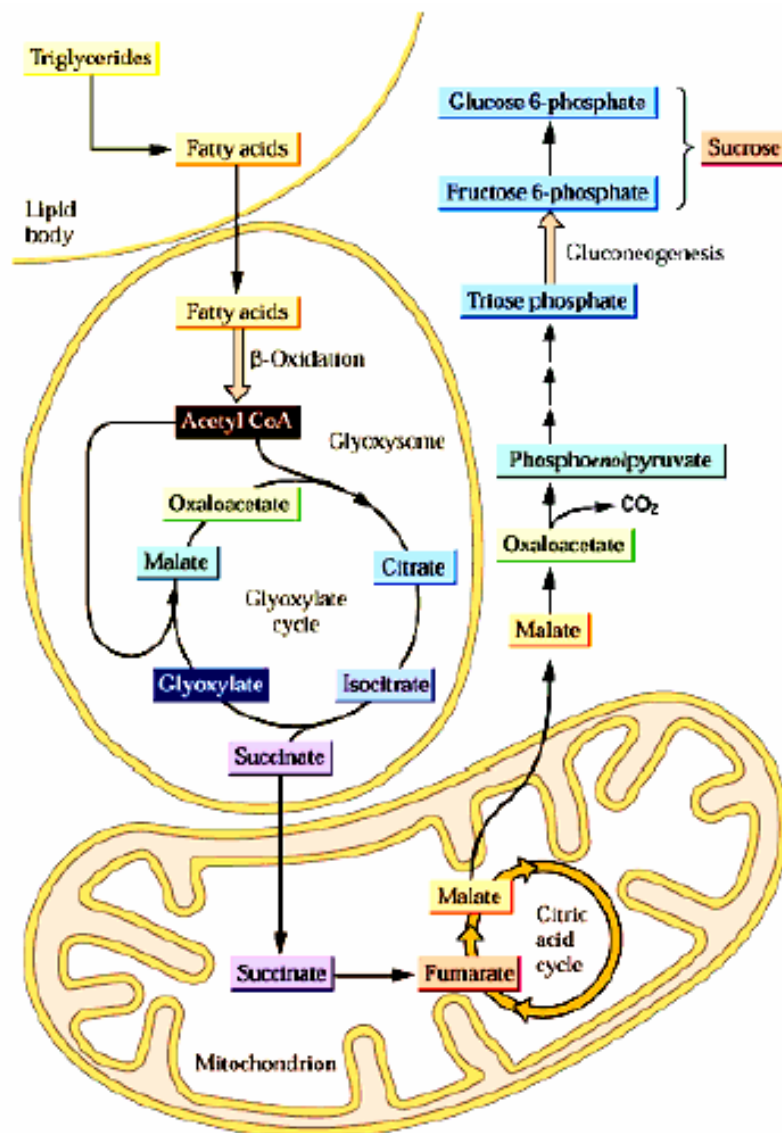


Figure II-13 : Schéma de la voie métabolique permettant la production de saccharose (sucrose) à partir des lipides. Lipid body : Corps lipidique ; Fatty acid : Acides gras ; Citric acid cycle : Cycle de l'acide citrique ou Cycle de Krebs ; Mitochondrion : Mitochondrie ; Gluconeogenesis : Gluconéogénèse.

Plusieurs mutants caractérisés par une coloration verte persistante (*stay-green*) révèlent une activité PaO réduite (Bachmann *et al.*, 1994 ; Thomas *et al.*, 1996 ; Fang *et al.*, 1998 ; Jiang *et al.*, 2007). Récemment, Ren *et al.* 2007 ont montré qu'une protéine chloroplastique nommée NYE1, pouvait jouer un rôle dans la régulation de la dégradation des chlorophylles en modulant l'expression de l'activité PaO. De plus, des protéines nommées Sgr seraient impliquées dans la dissociation des complexes chlorophylle-protéine du PSII, facilitant ainsi l'accessibilité des chlorophylles aux chlorophyllases (Park *et al.*, 2007). Par ailleurs, il existe aussi des mécanismes de protection des chlorophylles *via* l'intervention de protéines nommées « Water Soluble Chlorophyll binding Protein » (WSCP) (Horigome *et al.*, 2007). Grâce à la formation de complexes avec des WSCPs, les chlorophylles seraient protégées de la photo-oxydation retardant ainsi l'apparition des ROS produits *via* la dégradation des chlorophylles.

Les gérontoplastes sont également caractérisés par une accumulation de vésicules lipidiques appelées plastoglobules dans lesquels s'accumulent des triacylglycérols (Zavaleta-Mancera *et al.*, 1999a ; Kaup *et al.*, 2002). La dégradation de ces lipides constitue une source importante de carbone *via* la production de glucides à partir d'acides gras. Ce sont les lipases qui hydrolysent spécifiquement et réversiblement les triacylglycérides en acides gras et glycérol. Ce processus est suivi d'une dégradation (β -oxydation) conduisant à la transformation des acides gras en acétyl-CoA qui alimente ensuite le cycle glyoxylate réalisé au niveau du peroxydosome.

La transition fonctionnelle du **peroxydosome** en **glyoxydosome** est une étape importante de la sénescence caractérisée par une augmentation du niveau d'expression de l'activité des enzymes impliquées dans le cycle glyoxylate (Figure II-13). L'implication de ce cycle a été mise en évidence par l'induction de deux gènes codant chacun une enzyme de cette voie : la malate synthase et l'isocitrate lyase, au cours de la sénescence de feuilles d'orge, de riz, de betterave et de courge (De Bellis *et al.*, 1990). Le cycle glyoxylate transforme ensuite l'acétyl-CoA en citrate, oxaloacétate et succinate. Le succinate est ensuite acheminé vers la mitochondrie et alimente le cycle de Krebs permettant ainsi la production de malate. Le malate est ensuite véhiculé vers le cytosol, *via* des « navettes malate », pour la production de phosphoénolpyruvate (PEP), point de départ de la gluconéogenèse pour formation des glucides (Figure II-13).

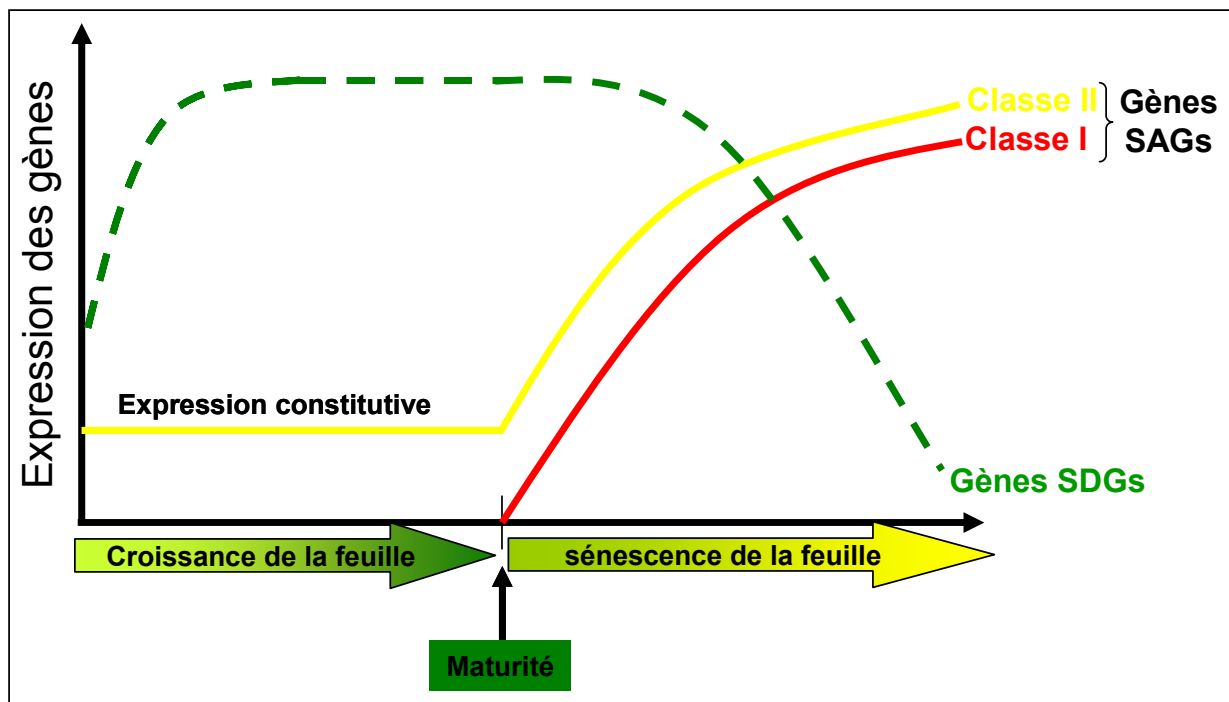


Figure II-14 : Schéma de l'expression différentielle des gènes *SAGs* et *SDGs* durant le développement de la feuille. *SDGs* : *Senescence Down-regulated Genes*. *SAGs* : *Senescence Associated Genes*. Les *SAGs* se décomposent en deux classes : classe I et classe II. (D'après Gan et Amasino, 1997).

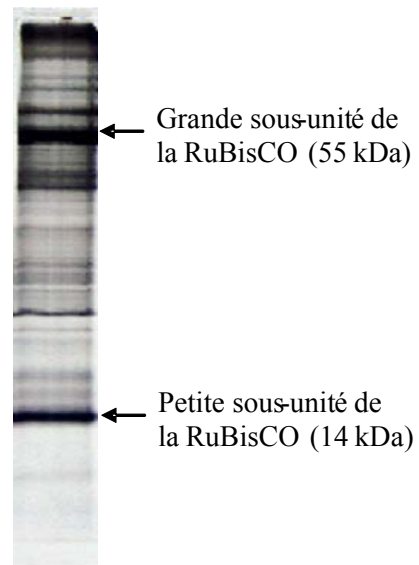
Les **mitochondries**, essentielles pour la production de l'énergie requise pour le fonctionnement du métabolisme énergétique au cours de la sénescence, sont naturellement les derniers organites affectés (Quirino *et al.*, 2000; del Rio *et al.*, 2003 ; Yoshida, 2003). Les mitochondries sont fonctionnelles jusqu'à des stades tardifs de la sénescence (Figure II-11B). Le maintien des capacités respiratoires est important dans le processus de sénescence foliaire et la production d'ATP nécessite un fort approvisionnement en métabolites tels que glucose et acides gras. Les produits issus de la glycolyse et de la β -oxydation sont alors repris au niveau de la mitochondrie et sont convertis en NADH,H^+ et FADH_2 au niveau du cycle de Krebs pour alimenter la chaîne respiratoire aboutissant à la production d'ATP (Figure II-13). Des études menées sur des mitochondries issues de protoplastes de feuilles sénescentes de pois, ont montré que ces organites conservaient un potentiel membranaire élevé jusqu'aux stades avancés de sénescence (Simeonova *et al.*, 2004 ; Keech *et al.*, 2007). En revanche, à des stades ultimes, la diminution du potentiel membranaire traduit la perte de l'intégrité membranaire de l'enveloppe mitochondriale et par conséquent la dégénérescence des mitochondries. A ce stade, on ne parle plus de sénescence mais d'apoptose.

II.1.3 Les manifestations de la sénescence au niveau moléculaire

Le processus de sénescence foliaire est associé à de profondes modifications de l'expression des gènes du génome nucléaire. Le **noyau**, requis pour la transcription des gènes nécessaires à l'exécution de la sénescence (par exemple ceux codant des protéases, des RNases, des glutamines synthétases...), est un des derniers constituants cellulaires à être dégradé. Les ARN sont rapidement dégradés alors que l'ADN nucléaire reste intact. Plusieurs méthodes de criblage ont été utilisées afin d'identifier les gènes activés ou réprimés au cours de la sénescence. En effet, la création d'une banque d'ADNc issue de feuilles sénescentes d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'isoler 2491 gènes induits (Guo *et al.*, 2004). Toutefois, un système de classification basé sur l'expression différentielle des gènes au cours de la sénescence a été élaboré (Buchanan-Wollaston, 1997). Parmi ces groupes, il existe les *Senescence Down-regulated Genes (SDGs)* qui se caractérisent par une diminution d'expression au fur et à mesure que la sénescence progresse (Figure II-14). Parallèlement, certains gènes appelés *Senescence Associated Genes (SAGs)* induits pendant le processus de sénescence, sont répartis en deux classes (Figure II-14) :

- *SAGs* de la classe 1 regroupant les gènes qui ne sont exprimés qu'au cours de la sénescence.
- *SAGs* de la classe 2 réunissant les gènes dont les transcrits sont détectables dès les

Figure II-15 : Profil d'électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) sur gel d'acrylamide 15% en conditions dénaturantes d'une feuille de colza (cv. Capitol) soumis à une carence azotée de deux jours.



premiers stades du développement (expression constitutive) et augmentent lors de la sénescence (Gan et Amasino, 1997).

La majorité des gènes *SAGs* codent des hydrolases telles que des RNAses, des DNAses, des protéases (ex : *SAG12*, une protéase à cystéine), ou des phospholipases (ex : *SAG 101*) permettant la dégradation des macromolécules. D'autres gènes codent des facteurs de transcription potentiellement impliqués dans les cascades de signalisation de la mise en place de la sénescence (ex : WRKY 6). Cependant, la fonction d'une grande proportion de ces gènes (31%) n'a pas encore été étudiée (Guo *et al.*, 2004).

L'ensemble des connaissances actuelles montre que le processus physiologique de sénescence se caractérise par une dégradation coordonnée des organites et constituants cellulaires faisant intervenir de nombreux gènes. Les modifications du métabolisme azoté associées à ce processus de sénescence sont orientées vers une remobilisation massive de l'azote des organes source vers les organes puits. Les principaux changements du métabolisme azoté au cours de la sénescence foliaire sont rappelés dans le chapitre suivant.

II.2 Modifications du métabolisme azoté associées à la sénescence : un préalable au recyclage de l'azote endogène

Etant donné que le nitrate et les acides aminés sont peu accumulés dans les feuilles de colza, les protéines constituent la principale source d'azote au cours du processus de remobilisation liée à la sénescence. Au cours de la sénescence foliaire, les protéines chloroplastidiales sont rapidement et fortement hydrolysées. Parmi celles-ci, la RuBisCO, constituée de 8 grandes sous-unités catalytiques de 56 kDa (LSU) et de 8 petites sous-unités régulatrices de 14 kDa (SSU) (Figure II-15), est celle qui a suscité le plus grand intérêt (Hörtensteiner et Feller, 2002). Son abondance (jusqu'à 50% des protéines solubles totales) ainsi que son activité fixatrice de CO₂ diminuent durant la sénescence foliaire (Jiang *et al.*, 1993 ; Gosh *et al.*, 2001). La protéolyse de ce complexe enzymatique, conduit à la libération des deux sous-unités (LSU et SSU), elles-mêmes dégradées par la suite. Il a été montré que la dégradation de la grande sous-unité (LSU) semble plus rapide que celle de la petite sous-unité (SSU) chez des feuilles d'orge et de *Vigna unguiculata* (Humbeck *et al.*, 1996 ; Srivalli *et al.*, 2001). Il se pourrait donc que la petite sous-unité soit une protéine plus stable durant la sénescence. Toutefois cette dégradation diffère d'une plante à l'autre. A titre d'exemple, les

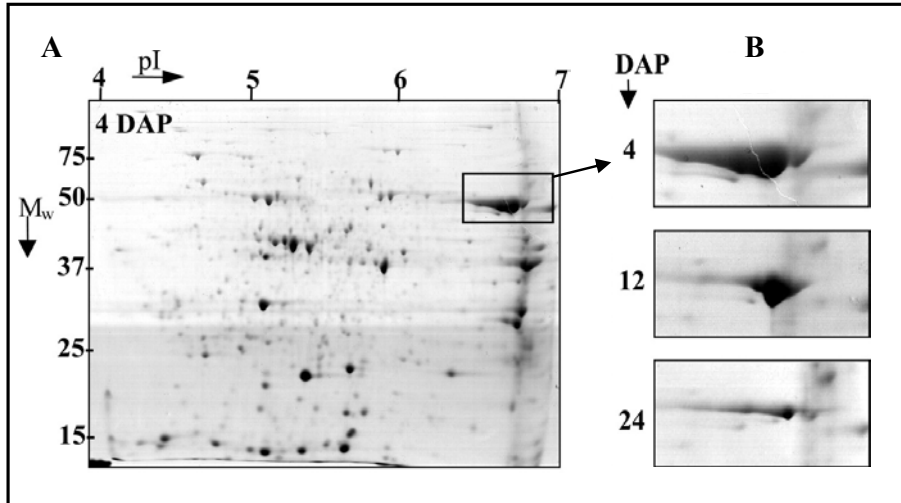


Figure II-16 : Dégradation de la grande sous-unité de la RuBisCO au cours de la sénescence foliaire. (A) Profil d'électrophorèse bidimensionnelle après coloration au bleu de Coomassie de feuille de pois 4 jours après pollinisation. (B) Agrandissement de la zone d'intérêt du gel A correspondant au spot de la grande sous-unité de la RuBisCO à 4, 12 et 24 jours après pollinisation. **M_w**: Masse moléculaire (en kDa); **pI**: Point isoélectrique. (D'après Schiltz *et al.*, 2004)

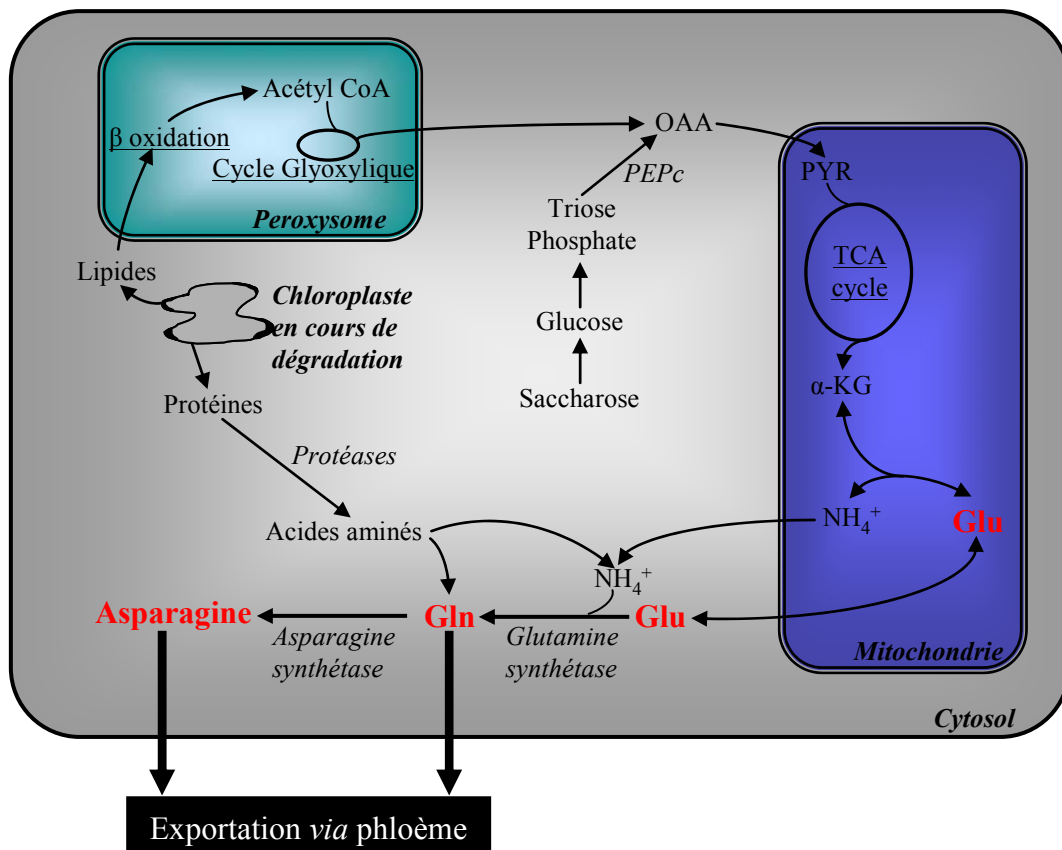


Figure II-17 : Schéma des voies métaboliques probablement impliquées dans la mobilisation des protéines consécutivement à leur dégradation (d'après Masclaux *et al.*, 2001). α -KG : α -cétoglutarate ; Glu : Glutamate ; Gln : Glutamine ; OAA : Oxaloacétate ; PEPc : Phosphoenolpyruvate carboxylase ; PYR : Pyruvate ; TCA cycle : Cycle de Krebs.

protéines LSU et SSU sont dégradées en même temps chez des feuilles sénescentes de soja (Jiang *et al.*, 1993).

Actuellement, certaines études renseignent sur la protéolyse des protéines des photosystèmes (PSI et PSII), localisées au niveau de la membrane des thylakoïdes. Tout comme la RuBisCO, les apoprotéines majeures de l'antenne collectrice des photons du PSII (nommée LHC II pour « Light Harvesting Complex II »), constituent une source d'azote intéressante au cours de la remobilisation de l'azote associée à la sénescence foliaire (Matile, 1992). Le rôle du LHC II est de collecter l'énergie lumineuse et de la transférer, sous forme d'énergie d'excitation, au centre réactionnel du PSII (Allen et Forsberg, 2001). Le trimère LHCII est constitué d'apoprotéines nommées Lhcb1-3, dont la dégradation a été étudiée au cours la sénescence foliaire (Jackowski *et al.*, 2001 ; Labate *et al.*, 2004 ; Zelisko et Jackowski, 2004). La dégradation massive de la RuBisCO et du PSII a également été montrée par des études protéomiques de la sénescence foliaire réalisées chez le trèfle (Wilson *et al.*, 2002) et le pois (Figure II-16 ; Schiltz *et al.*, 2004).

La dégradation des protéines entraîne la libération d'acides aminés qui sont ensuite exportés vers les tissus conducteurs. La glutamine et l'asparagine sont les principaux acides aminés véhiculés par les vaisseaux du phloème (Feller et Fisher, 1994). Les acides aminés issus de la dégradation des protéines sont métabolisés en glutamate et en ammonium *via* des réactions de transamination et de déamination (Figure II-17 ; Buchanan-Wollaston, 1997 ; Masclaux *et al.*, 2001). Le glutamate peut ensuite être converti *via* la glutamine synthétase (GS) en glutamine afin d'être exporté vers les organes en croissance. Le glutamate peut également être transformé en α -cétoglutarate, *via* la glutamate déshydrogénase (GDH) afin de servir de squelette carboné pour la synthèse de sucres. Plusieurs études ont mis en évidence l'augmentation des gènes codant des GS cytosoliques ainsi qu'une induction de l'activité et de l'abondance de ces enzymes pendant la sénescence foliaire (Kamachi *et al.*, 1991 ; Pérez-Rodriguez et Valpuesta, 1996 ; Teixeira *et al.*, 2005). Chez le tabac, il a été montré que la GS1 cytosolique et la GDH mitochondriale étaient induites au cours du vieillissement des feuilles (Masclaux *et al.*, 2000). En effet, chez des tissus sénescents, la protéine GS1 est présente au niveau du mésophylle et des cellules compagnes (Brugière *et al.*, 2000). Récemment, Li *et al.* (2006) ont montré que l'induction de cette enzyme était associée à celle d'une protéine kinase dont elle est le substrat. Ces données suggèrent la possibilité d'une régulation de la mobilisation azotée *via* un processus de phosphorylation des enzymes du

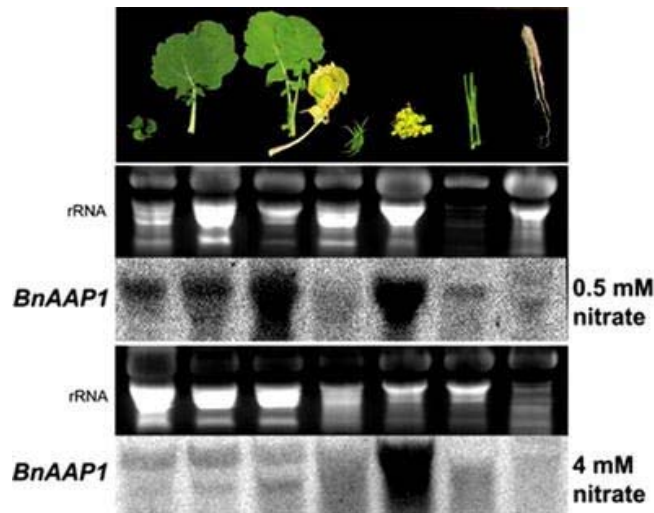


Figure II-18 : Northern blot représentant l'expression de *BnAAP1* (gène codant un transporteur d'acides aminés) chez le colza. Après germination et vernalisation, les plantes ont été cultivées sur 0,5 mM ou 4 mM de nitrate. La carence en nitrate (0,5 mM) permet d'accélérer le déclenchement de la sénescence foliaire. Chaque piste contient 30 µg d'ARN séparés sur gel d'agarose 1,5%, transférés sur membrane de nylon puis hybridés avec une sonde marquée au ^{32}P dirigée contre *BnAAP1*. Les ARNr révélés au bromure d'éthidium servent de contrôle de charge. (D'après Tilsner *et al.*, 2005).

métabolisme de l'azote. En effet, chez *Brassica napus*, il a été montré que l'isoforme GS1, la seule forme cytosolique induite lors de la sénescence foliaire, est activée et protégée de la dégradation par phosphorylation (Finneman et Schjoerring, 2000). De plus, des gènes codant l'asparagine synthétase, l'enzyme à l'origine de la synthèse d'asparagine, sont induits au cours de la sénescence (Herrera-Rodriguez *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent une orientation du métabolisme de l'azote vers les voies de synthèse des acides aminés préférentiellement mobilisables (glutamine et asparagine) au cours de la sénescence.

Peu d'études renseignent sur le chargement phloémique des acides aminés lors du processus de sénescence foliaire (van der Graff *et al.*, 2006), une méconnaissance essentiellement liée au manque d'informations sur les transporteurs d'acides aminés incriminés. Tilsner *et al.* (2005) ont montré une forte accumulation de transcrits codant des transporteurs d'acides aminés BnAAP1 chez des feuilles matures de colza dont la sénescence a été accélérée par une carence azotée (Figure II-18). Chez ces feuilles matures, les teneurs en acides aminés sont identiques à celles observées chez les plantes correctement alimentées en azote. Tilsner *et al.* (2005) concluent que le chargement des acides aminés du phloème n'est pas le facteur limitant de la remobilisation de l'azote dans les feuilles de colza.

D'après ces travaux, il apparaît que le défaut de mobilisation de l'azote au cours de la sénescence serait majoritairement lié à une dégradation incomplète des protéines foliaires et non à une limitation du chargement phloémique des acides aminés issus de cette dégradation. Ces résultats soulèvent un certain nombre d'interrogations quant aux mécanismes intervenant dans la dégradation des protéines foliaires, source importante d'azote, lors de la remobilisation de cet élément.

II.3 Les protéines impliquées dans les processus de protéolyse

II.3.1 Les voies de dégradation des protéines

La dégradation des protéines dans les plantes est un processus complexe impliquant une multitude de voies protéolytiques localisées dans un ou plusieurs compartiments cellulaires. Parmi ces voies, le système ubiquitine-protéasome au niveau du cytoplasme et du noyau, et la protéolyse s'effectuant au niveau vacuolaire sont plus particulièrement étudiés.

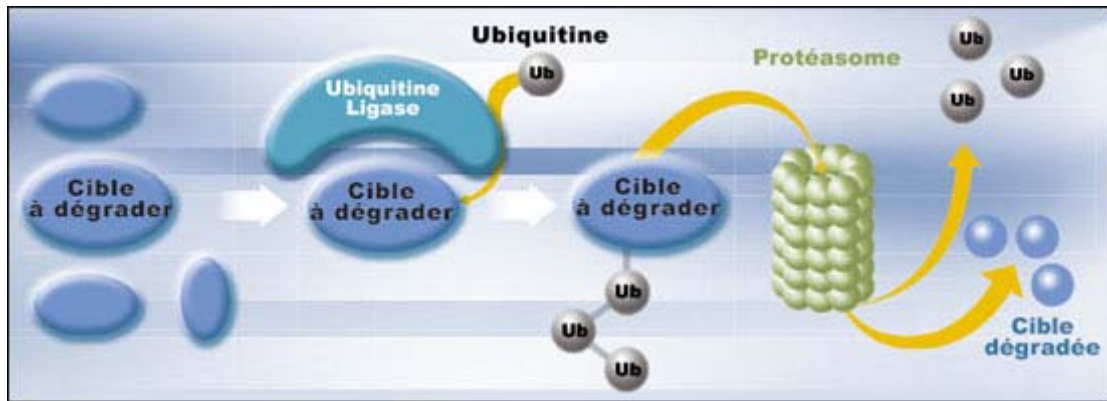


Figure II-19 : Voie ubiquitine-protéasome. L'ubiquitination est la formation d'une chaîne d'ubiquitine sur la protéine (« cible à dégrader » sur le schéma) destinée à être dégradée par le protéasome. Les ligases sont les enzymes qui réalisent la liaison entre l'ubiquitine et la protéine cible. Les protéines cibles ainsi ubiquitinées sont reconnues par le protéasome. Une fois la protéine cible dégradée, les chaînes d'ubiquitine sont ensuite clivées et peuvent à nouveau se lier à d'autres cibles. (D'après Etienne, 2001)

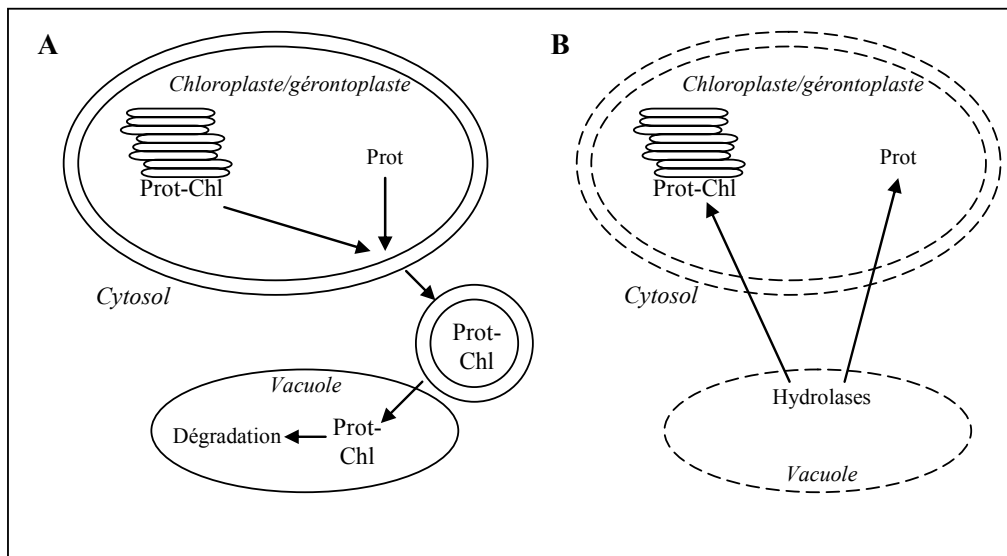


Figure II-20 : Schéma des voies de dégradation des protéines chloroplastidiales. (A) Modèle hypothétique impliquant la formation de vésicules chloroplastidiales. (B) Désintégration des membranes permettant la libération et l'action des hydrolases vacuolaires au niveau du chloroplaste. Prot-Chl : Protéine-Chlorophylle ; Prot : Protéine. (Modifié d'après Hortensteiner et Feller, 2002).

Le système **ubiquitine-protéasome** est la voie principale d'hydrolyse protéique qui serait spécialisée dans la dégradation des protéines instables, comme les protéines régulatrices dont les niveaux d'expression doivent être contrôlés en fonction des besoins de la cellule. Cette voie est impliquée dans divers processus cellulaires tels que la différenciation cellulaire (Fukuda, 2000), le cycle cellulaire (Smith *et al.*, 1997) ou encore les mécanismes de défense des cellules végétales en réponse à une attaque par un agent pathogène (Etienne *et al.*, 2000).

Cette protéolyse est réalisée en deux étapes successives. Dans un premier temps, les protéines devant être dégradées sont sélectionnées par des enzymes spécifiques, les ubiquitines ligases, qui les marquent en leur ajoutant une « étiquette » caractéristique, constituée d'une chaîne de polyubiquitine (Figure II-19). Dans un second temps, les protéines étiquetées sont reconnues et spécifiquement dégradées par le protéasome 26S. Le protéasome est un vaste complexe protéique de plus de 700 kDa, regroupant trois activités protéolytiques (chymotrypsine-like, trypsine-like et peptidylglutamyl-peptide hydrolase), qui hydrolyse les protéines ubiquitinées en petits peptides. La présence de cette voie protéolytique au cours de la sénescence est suspectée par le fait que certains gènes codant des protéines du système ubiquitine protéasome 26S ont un niveau d'expression qui augmente au cours de la sénescence (Park *et al.*, 1998 ; Gepstein *et al.*, 2003). De plus, des travaux sur des pommes de terre exprimant le gène de la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur du gène de l'ubiquitine, ont permis de montrer une régulation transcriptionnelle de l'ubiquitine au cours de la sénescence. En effet, l'expression de ce gène marqueur est cinq à dix fois plus élevée dans les feuilles sénescents comparativement aux feuilles jeunes (Garbarino *et al.*, 1995). Par ailleurs, chez le tabac, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène, un ROS accumulé au cours de la sénescence et des mécanismes de défense, augmentait l'expression foliaire du gène et de la protéine TCI7 correspondant à la sous-unité β 1 du protéasome 26S (Etienne *et al.*, 2000).

Les **vacuoles** sont des compartiments cellulaires au pH acide réunissant un grand nombre d'enzymes lytiques. Plusieurs dizaines d'endo et d'exopeptidases ont été caractérisées au sein de ces organites et interviendraient fortement dans la dégradation des protéines chloroplastidiales. Cependant, on peut se demander par quel(s) mécanisme(s) les enzymes vacuolaires dégradent les constituants du chloroplaste ? Plusieurs hypothèses ont été émises :

- (i) la perte de l'intégrité membranaire de l'enveloppe plastidiale et du tonoplaste permettrait la libération d'enzymes vacuolaires véhiculées vers le chloroplaste (Figure II-20A),

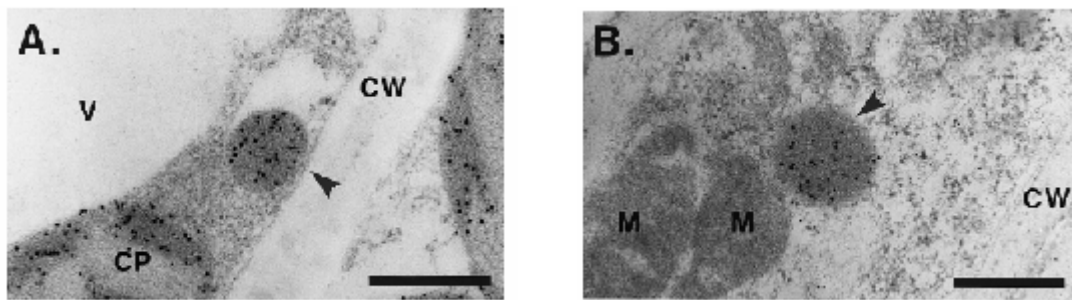


Figure II-21 : Immunolocalisation de la grande (A) et de la petite (B) sous-unité de la RuBisCO dans des RCBs (RuBisCO Containing Bodies) de feuilles de blé sénescents. Barres = 0,5 µm. CP : Chloroplaste, CW : Paroi, M : Mitochondrie, V : Vacuole. (D'après Chiba *et al.*, 2003).

- (ii) la formation de vésicules (à partir du chloroplaste) contenant des protéines chloroplastidiales seraient transportées vers la vacuole pour y être dégradées (Figure II-20B).

Par exemple, chez le blé, de récentes études ont mis en évidence l'existence de nouvelles vésicules appelées RuBisCO Containing Bodies (RCBs) au sein du cytoplasme des cellules de feuilles sénescences (Chiba *et al.*, 2003). Il semblerait que le contenu de ces nouveaux organites ne soit pas déterminé avec exactitude ; toutefois des fragments de RuBisCO ont été détectés (Figure II-21). Ces vésicules contiendraient une autre protéine du stroma, la glutamine synthétase chloroplastique. La composition de la membrane des RCBs suggère que ces vésicules sont d'origine plastidiale. Cette découverte pose de nouvelles questions sur le(s) processus de dégradation de la RuBisCO et des protéines plastidiales de manière générale. Chiba *et al.* (2003) ont suggéré que ces vésicules étaient des autophagosomes impliqués dans l'autophagie³. Chez *Arabidopsis thaliana*, neuf gènes homologues du gène *AUT7* (*APG8*) de levure, gènes impliqués dans l'autophagie, ont été identifiés. Des mutants d'insertion T-DNA affectés dans l'expression de gènes *AtAPG7*, *AtAPG9* et *AtAPG18a* (*APG*=*autophagosome*), développent une floraison et une sénescence précoce (Hanaoka *et al.*, 2002 ; Doelling *et al.*, 2002 ; Xiong *et al.*, 2005). De plus, ces mutants présentent une réduction du nombre de graines et une longévité réduite en conditions limitantes en azote et en carbone. Les auteurs suggèrent que ces caractéristiques sont probablement dues à une mauvaise efficacité d'utilisation de l'azote organique.

Récemment, il a été montré que la RuBisCO et les autres protéines du stroma pouvaient être mobilisées vers les vacuoles grâce au processus d'autophagie sans que cela se manifeste par une dégradation des chloroplastes (Ishida *et al.*, 2008). Il est important de noter qu'à l'intérieur d'une cellule coexistent différents types de vacuoles lytiques identifiées grâce à leur contenu et leur composition tonoplastique (Jauh *et al.*, 1999). Ainsi, de petites vacuoles localisées à la périphérie des protoplastes de cellules du mésophylle d'*Arabidopsis* et de blé ont été spécifiquement identifiées chez des feuilles sénescences (Otegui *et al.*, 2005 ; Martinez *et al.*, 2007). Ces vacuoles, appelées Senescence-Associated Vacuoles (SAVs), sont caractérisées par un pH très acide ainsi qu'une absence d'aquaporines de type « protéines intrinsèques tonoplastiques » (γ -TIP) comparativement aux vacuoles centrales (Otegui *et al.*, 2005). Une activité protéase à cystéine de type SAG12 a été décelée dans ces compartiments

³L'autophagie consiste à la séquestration et à la dégradation de constituants cellulaires dans des vésicules autophagiques nommées autophagosomes.

émergeants. La présence de la protéine SAG12 fusionnée à la GFP a permis de montrer l'accumulation de cette protéase au sein de ces SAVs. Même si l'absence de γ -TIP au niveau du tonoplaste exclut l'hypothèse selon laquelle ces SAVs seraient issues de la fragmentation des vacuoles centrales, l'origine de ces organites reste inconnue.

Une question fondamentale reste à élucider : comment les différents systèmes protéolytiques reconnaissent les protéines à dégrader et à quelle vitesse ? En l'absence de système de reconnaissance, on pourrait imaginer une protéolyse continue incontrôlable. Cependant, les premières phases de la sénescence étant réalisées de façon coordonnée en touchant précocement certains constituants et d'autres plus tardivement, il est clair qu'il existe un (des) mécanisme(s) de ciblage des protéines permettant de désigner à tel ou tel système protéolytique celles qui doivent être dégradées. Ce ciblage pourrait être fonction du poids moléculaire, du degré de glycolysation, du point isoélectrique. D'autres systèmes plus spécifiques commencent à être identifiés ou suspectés:

- la présence d'une séquence spécifique d'acides aminés en N terminal serait déterminante dans le déclenchement de la protéolyse. A titre d'exemple, il a été montré que certaines ligases, intervenant dans l'ubiquitination, sont capables de reconnaître spécifiquement un motif consensus de 9 acides aminés (RxxLxxIxxN), appelé « boîte de destruction », présent au niveau de l'extrémité N terminale (Genschik *et al.*, 1998).
- la dissociation des complexes pigments-protéine issus de la dégradation des chlorophylles pourrait être un signal de protéolyse.
- la modification de conformation des protéines suite à une oxydation par les ROS peut être à l'origine d'une reconnaissance sélective et préférentielle de ces protéines par les enzymes protéolytiques. De nombreuses enzymes chloroplastidiales comme la GS ou la RuBisCO sont oxydées puis dégradées, du moins partiellement sous l'action des ROS (Ortega *et al.*, 1999 ; Ishida *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 2002). Des études réalisées *in vitro* chez le blé et le pois, supposent que la dégradation de la grande sous-unité de la RuBisCO en présence de ROS conduit à la formation de deux polypeptides de 37 et 16 kDa (Ishida *et al.*, 1997). La protéolyse de l'enzyme majeure du chloroplaste serait due à la fixation des ROS sur les groupements carbonyle de la protéine. Cette action rendrait la protéine plus sensible à sa dégradation par les protéases (Yamauchi *et al.*, 2002).
- la présence de « séquence signal » issue de la séquence primaire de la protéine

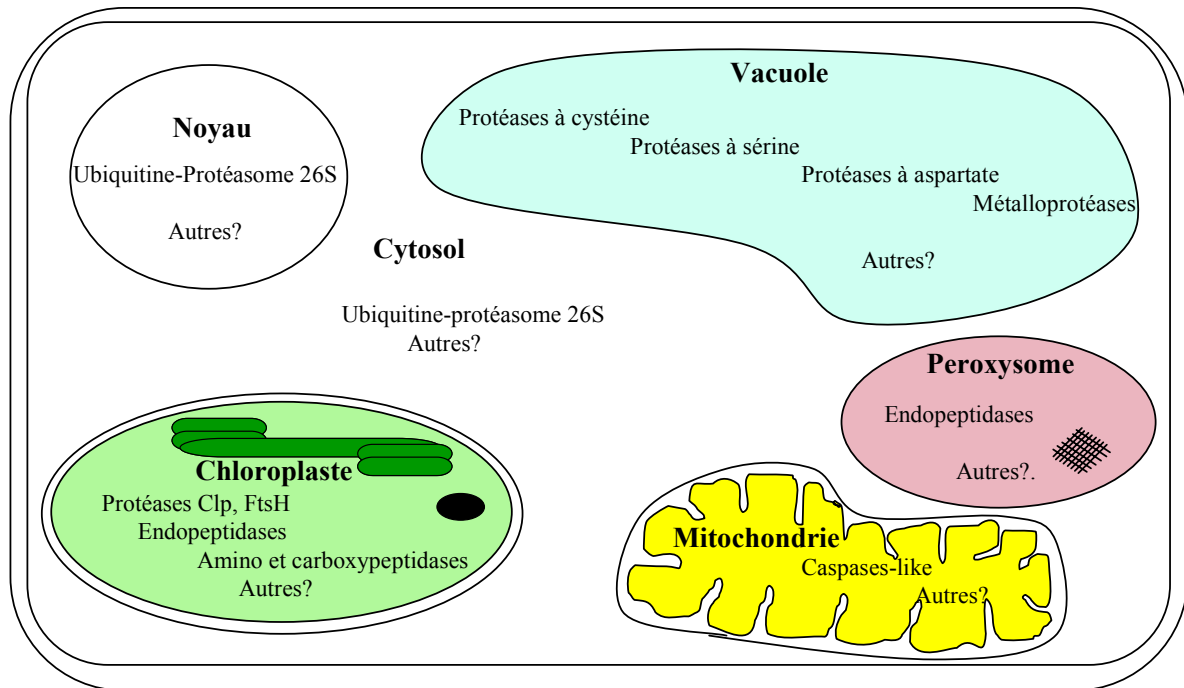


Figure II-22 : Schéma de la compartimentation subcellulaire de diverses protéases potentiellement impliquées dans la sénescence d'une cellule végétale foliaire.

commence à être décelée chez les animaux (Massey *et al.*, 2006). Ces séquences pourraient être accessibles suite à un changement de conformation des protéines et serviraient de signal pour la dégradation.

Malgré les données existantes, le(s) signal(aux) de « départ » de la dégradation des protéines reste(nt) encore énigmatique(s). La vacuole semble jouer un rôle important dans le processus de sénescence foliaire. Par exemple, plusieurs activités protéolytiques de protéases à cystéine, présentes à 36, 39, 42 et 46 kDa, ont été détectées à pH 4 au sein de vacuoles de feuilles sénescents de blé (Martinez *et al.*, 2007). L'identification des protéines impliquées dans les mécanismes de protéolyse est importante pour la compréhension des processus de mobilisation de l'azote. On peut ainsi se demander quelles sont les protéases spécifiquement impliquées dans ce processus de sénescence ?

II.3.2 Les protéases

Les enzymes hydrolysant les liaisons peptidiques sont appelées peptidases, protéases ou protéinases. Les protéases sont réparties dans l'ensemble de la cellule (Figure II-22) et la classification de ces protéines est basée sur le site d'hydrolyse des liaisons peptidiques. Ainsi, les endopeptidases, par une dégradation à l'intérieur de la chaîne, se distinguent des exopeptidases capables d'hydrolyser les liaisons peptidiques situées aux extrémités du polypeptide.

Parmi les exopeptidases, il existe les aminopeptidases et les carboxypeptidases dont les cibles sont respectivement le premier acide aminé des extrémités N-terminale et C-terminale des chaînes polypeptidiques. Les activités aminopeptidases mesurées dans les feuilles de *Hordeum vulgare* (Thayer *et al.*, 1988) et de *Cyperus rotundus* (Fisher *et al.*, 1998) diminuent en début de sénescence. Les carboxypeptidases, localisées au niveau vacuolaire, présentent la même régulation puisque leur activité diminue chez des feuilles sénescents ayant perdue 90% de leurs chlorophylles (Fisher *et al.*, 1998). Les amino et carboxypeptidases seraient donc faiblement impliquées dans la protéolyse associée à la sénescence.

Les endopeptidases sont classées selon la nature de l'acide aminé du site actif. Ainsi, on distingue **les protéases à cystéine** (EC 3.4.22), **à sérine** (EC 3.4.21), **à aspartate** (EC 3.4.23), et **à thréonine** (EC 3.4.25). Les **métalloprotéases** (EC 3.4.24) sont également inclus dans la famille des endopeptidases avec comme particularité la présence d'un cation

Tableau II-II : Principales familles d'endoprotéases induites pendant la sénescence.

Classe	Organisme	Nom de la protéase	Références bibliographiques
Protéases à cystéine	<i>Arabidopsis thaliana</i>	SAG2	Hensel <i>et al.</i> , 1993
		SAG12	Lohman <i>et al.</i> , 1994 ; Guo <i>et al.</i> , 2004 ; Otegui <i>et al.</i> , 2005
		RD21	Guo <i>et al.</i> , 2004 ;
	<i>Brassica napus</i>	RD19	Guo <i>et al.</i> , 2004
		AALP	Guo <i>et al.</i> , 2004
		Cathepsin B	Guo <i>et al.</i> , 2004
		BnSAG12-1	Noh et Amasino, 1999
		BnSAG12-2	Noh et Amasino, 1999
	<i>Hordeum vulgare</i>	BnSAG2	Noh et Amasino, 1999
		caspase	Korthout <i>et al.</i> , 2000
	<i>Ipomoea batatas</i>	SPG31	Huang <i>et al.</i> , 2001 ; Chen <i>et al.</i> , 2002
		SPAE	Chen <i>et al.</i> , 2004
<i>Lolium multiflorum</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	SPC3	Chen <i>et al.</i> , 2006	
	seel	Li <i>et al.</i> , 2000	
	NTCP-23	Ueda <i>et al.</i> , 2000	
	SENU2	Drake <i>et al.</i> , 1996	
		SENU3	Drake <i>et al.</i> , 1996
Clp	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sous-unité C	Guo <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pisum sativum</i>	sous-unité C	Schiltz <i>et al.</i> , 2004
Métalloprotéases	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FtsH6	Zelisko <i>et al.</i> , 2005
		FtsH	Guo <i>et al.</i> , 2004
	<i>Cucumis sativus</i> <i>Pisum sativum</i>	At2-MMP	Golldack <i>et al.</i> , 2002
		Cs1-MMP	Delorme <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pisum sativum</i>	FtsH	Schiltz <i>et al.</i> , 2004
Protéases à aspartate	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CDN41	Murakami <i>et al.</i> , 2000 ; Kato <i>et al.</i> , 2004 ; Diaz <i>et al.</i> , 2008

métallique, en général un atome de zinc, au niveau du site catalytique. L'analyse transcriptomique réalisée par Guo *et al.* (2004), a révélé l'induction de l'expression de 8 gènes codant des protéases à cystéine, 2 gènes codant des protéases à aspartate, 2 gènes codant des protéases à sérine et 1 gène codant une métalloprotéase, chez des feuilles sénescences d'*Arabidopsis*. Le Tableau II-II réunit l'ensemble des protéases induites au cours de la sénescence foliaire et révèle que de nombreuses endoprotéases interviennent potentiellement dans ce phénomène. L'état des connaissances sur les principales protéases intervenant dans le phénomène de sénescence est précisé dans les paragraphes suivants.

Localisées au niveau vacuolaire, les **protéases à cystéine** représentent le groupe d'enzymes le plus étudié (Srivalli *et al.*, 2001 ; Martinez *et al.*, 2007). L'activité de ces protéases au sein de tissus sénescents de *Brassica oleracea* représente jusqu'à 44% de l'activité protéasique globale (Coupe *et al.*, 2003). La majorité des protéines foliaires, et principalement la RuBisCO étant rapidement dégradées et mobilisées durant le processus de sénescence foliaire, l'intervention des protéases à cystéine vacuolaires est fortement suspectée dans la dégradation de cette cible privilégiée. L'incubation de la RuBisCO, en présence de vacuoles lytiques, a mis en évidence le rôle des vacuoles dans son hydrolyse *in vitro* (Bhalla et Dalling, 1986). Récemment, l'utilisation d'inhibiteurs et d'anticorps dirigés contre les protéines à cystéine a également confirmé la présence de ces protéases lors de cette protéolyse associée à la sénescence (Thoenen et Herrmann, 2007).

Par ailleurs, chez la tomate, des études moléculaires ont révélé une augmentation des taux de transcrits des gènes *SENU2* et *SENU3* codant des protéases à cystéine durant la sénescence foliaire (Drake *et al.*, 1996). Par la suite, ces données ont été confirmées chez d'autres plantes telles qu'*Arabidopsis thaliana* avec *SAG2*, *SAG12* et *RD21* (Hensel *et al.*, 1993 ; Lohman *et al.*, 1994 ; Yamada *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2004), le colza avec *BnSAG12-1*, *BnSAG12-2* et *BnSAG2* (Noh et Amasino, 1999), le ray-grass avec *Seel* (Li *et al.*, 2000), le tabac avec *NTCP-23* (Ueda *et al.*, 2000) et la pomme de terre avec *SPG31*, *SPEA* et *SPCP3* (Huang *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2002 ; 2004 ; 2006). Les études menées chez la pomme de terre ont révélé que les gènes *SPG31*, *SPAE* et *SPC3* codaient des précurseurs de protéases à cystéine vacuolaires ayant besoin de plusieurs étapes de maturation avant d'être transférés dans la vacuole. En effet, des protéases à cystéine appartenant au sous-groupe des « Vacuolar Processing Enzyme » (VPE) interviennent dans la maturation des protéines vacuolaires. Kinoshita *et al.* (1999) ont montré que le taux d'ARNm des gènes α -VPE et γ -VPE augmentait au cours de la sénescence foliaire parallèlement à celui de *SAG2*. Le rôle de ces

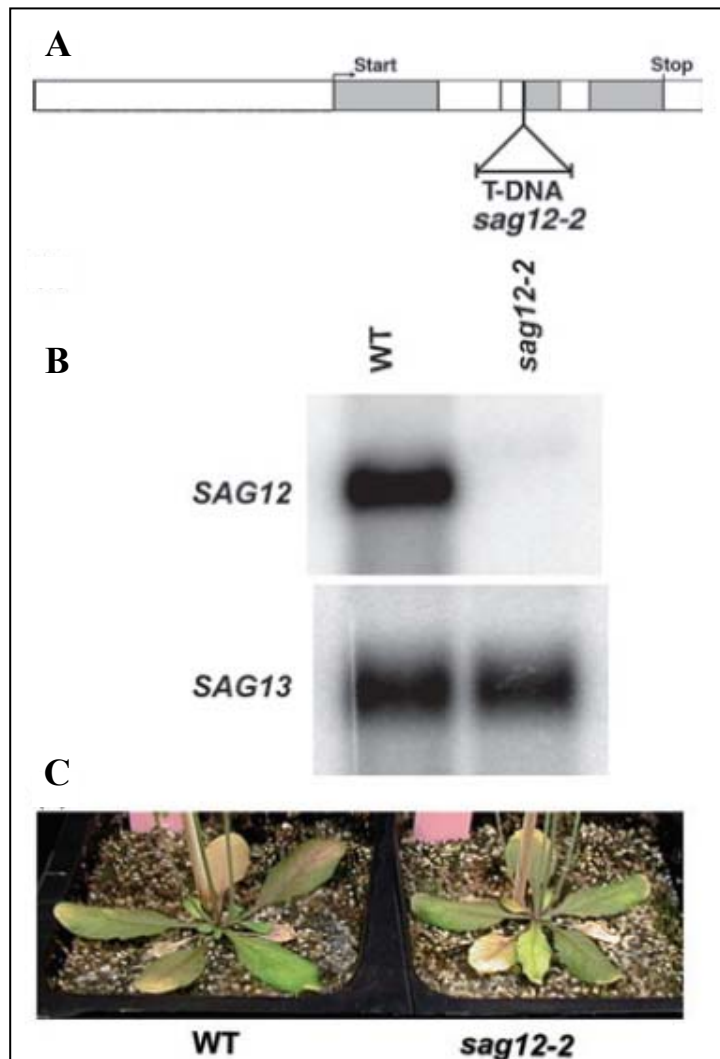


Figure II-23 : Mutants knockout lignée *sag12-2* (A) Schéma de la mutation d'insertion T-DNA au niveau du second exon du gène *SAG12* chez des plantes d'*Arabidopsis*. Les rectangles gris indiquent les exons alors que les rectangles blancs correspondent aux introns et aux régions 5' et 3' non transcrites. (B) Expression des gènes *SAG12* et *SAG13* chez les plantes sauvages (WT) et chez les plantes mutées (*sag12-2*). Les ARN ont été extraits à partir de feuilles sénescentes d'*Arabidopsis*. Le gène *SAG13* est utilisé comme gène de référence. Les plantes mutées n'expriment plus le gène *SAG12*. (C) Photos de plante sauvage (à gauche) et de plante mutée (à droite) qui présentent une croissance et une sénescence foliaire identiques. (D'après Otegui *et al.*, 2005)

protéines serait de réaliser la maturation des protéases à cystéine telles que celles codées par *SPG31*, *SPEA* ou *RD21*, nouvellement transférées dans la vacuole.

Cependant, il est important de rappeler que les analyses transcriptomiques ne conduisent qu'à émettre des hypothèses concernant le rôle des protéines correspondantes dans le déroulement de la sénescence. L'analyse fonctionnelle de ces protéines doit le plus souvent être conduite en utilisant des mutants afin de confirmer leur implication dans le processus de sénescence. Pour illustrer ce point, on peut citer l'exemple d'une étude réalisée chez *Arabidopsis* sur des mutants knock-out du gène *SAG12*, un gène codant une protéase à cystéine fortement induit au cours de la sénescence. Ces mutants *sag12* présentent une croissance et une sénescence identiques à celles observées chez des plantes de type sauvage (Figure II-23 ; Otegui *et al.*, 2005). Ce résultat minimise le rôle fonctionnel de la protéase à cystéine codée par le gène *SAG12* et suggère que d'autres protéases peuvent compenser l'absence de *SAG12* chez les mutants knock-out.

Alors que chez les animaux, les fonctions protéolytiques sont principalement attribuées aux **caspases** (une classe des protéases à cystéine), il semble qu'il n'existe pas de gènes présentant d'homologie de séquences avec les caspases dans les génomes végétaux. Cependant, cela n'exclut pas la présence d'homologues de fonction. En effet, certaines études ont rapporté la détection d'activités *caspase-like proteinases* au niveau mitochondrial chez les végétaux *via* l'utilisation d'agents chimiques ou d'inhibiteurs spécifiques des caspases animales (Lam et del Pozo, 2000 ; Korthout *et al.*, 2000 ; van der Hoorn et Jones, 2004). Ces données doivent être interprétées avec précaution du fait de la non-spécificité potentielle de certains inhibiteurs tels que les fluoro- ou chlorométhylkétones capables également d'inhiber des protéases à cystéine de type papaïne (van der Hoorn et Jones, 2004). Toutefois, des activités de type caspase, présentes dans des extraits cellulaires d'orge, ont été inhibées spécifiquement par des inhibiteurs de caspase 3 humaine mais pas par des inhibiteurs de protéases à cystéine (Korthout *et al.*, 2000). La présence de caspases chez les végétaux et leurs implications dans la protéolyse associée à la sénescence restent encore à démontrer de manière irréfutable.

Des études récentes menées chez *Arabidopsis* ont permis d'identifier l'implication d'une **Zn-métalloprotéase** ATP-dépendante nommée AtFtsH6 dans la dégradation de l'apoprotéine Lhcb3, présente au niveau de LHC II du PSII, lors du processus de sénescence (Zelisko *et al.*, 2005). Il faut signaler que ces données ne prouvent pas directement que LHC II est le substrat de FtsH6. En effet, une autre hypothèse est possible : la dégradation de LHCb3 peut être

réalisée par une protéase qui serait elle-même activée par FtsH6. L'induction d'une FtsH au cours de la sénescence, a également été montrée chez des feuilles de pois (Schiltz *et al.*, 2004). De plus, Nieri *et al.* (1998) ont identifié et purifié une métalloprotéase chez des feuilles sénescences de luzerne. L'incubation de cette enzyme en présence de RuBisCO a entraîné une dégradation de la LSU. L'intervention de ce type de protéase dans la protéolyse de la RuBisCO au cours du processus de sénescence peut ainsi être suspectée. Certaines études ont montré que des métalloprotéases impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la paroi squelettique pouvaient intervenir dans la sénescence foliaire. Chez des feuilles d'un mutant d'insertion T-DNA (*at2-mmp-1*) d'*Arabidopsis*, affecté dans l'expression d'un gène codant une métalloprotéase At2-MMP, la dégradation des chlorophylles et la sénescence foliaire sont plus précoces que chez les plantes sauvages, suggérant un rôle de la métalloprotéase At2-MMP dans le processus de sénescence (Golldack *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que le gène *Cs1-MMP*, codant une métalloprotéase, était également induit au cours de la sénescence de feuilles de concombre (Delorme *et al.*, 2000).

Une protéine chloroplastidiale appartenant à la famille **des protéases à aspartate**, nommée CND41, possède un niveau d'expression qui augmente au cours de la sénescence (Murakami *et al.*, 2000). Des plantes ayant une construction « antisens » *cnd41* se caractérisent par une sénescence plus tardive, ainsi que des teneurs constantes en protéines et en RuBisCO par rapport aux plantes sauvages. Des analyses complémentaires *in vitro* montrent que la RuBisCO peut être un substrat potentiel de CND41 (Kato *et al.*, 2004). Plus récemment, Diaz *et al.* (2008) ont montré que l'accumulation de cette protéase était corrélée à une diminution de la RuBisCO, suggérant un rôle important de cette protéase dans la remobilisation de l'azote protéique foliaire.

La famille des **Clp** est l'une des plus importantes catégories de protéases présentes dans le chloroplaste. Ces protéases sont constituées de deux sous-unités : la sous-unité Clp P de 21 kDa contenant une triade catalytique identique à celle des protéases à sérine et la sous-unité Clp C de 92 kDa (Adam et Clarke, 2002). Elles semblent être impliquées dans la dégradation des protéines du complexe cytochrome *b₆f*. Un gène appelé *ERD1*, structurellement similaire à celui codant la sous-unité Clp C, a été identifié chez *A. thaliana* (Nakabayashi *et al.*, 1999). L'augmentation de l'expression du gène *ERD1* lors de la sénescence ainsi que sa localisation cellulaire suppose une implication de cette protéine dans la dégradation des protéines chloroplastidiales (Guo *et al.*, 2004). Une analyse protéomique de la sénescence foliaire chez

le pois a montré l'augmentation de la sous-unité Clp C au cours de ce processus (Schiltz *et al.*, 2004), confirmant l'importance de cette sous-unité dans les mécanismes de protéolyse foliaire.

L'analyse bibliographique réalisée sur les protéases, même si elle n'est pas exhaustive, révèle que les protéases de par leur spécificité d'action ont donc un rôle central dans la remobilisation de l'azote protéique lors de la sénescence foliaire. Au même titre que les connaissances sur l'intervention des protéases restent incomplètes, les facteurs et mécanismes impliqués dans la régulation de ces protéases, et plus globalement dans la régulation de la mobilisation de l'azote protéique associé à la sénescence, sont encore mal connus à ce jour.

III. RÉGULATION DE LA REMOBILISATION DE L'AZOTE ASSOCIÉE A LA SÉNESCENCE FOLIAIRE

III.1 Incidence des facteurs environnementaux

De nombreux facteurs environnementaux sont capables de moduler l'initiation et la progression de la sénescence foliaire (Buchanan-Wollaston, 1994; Weaver *et al.*, 1998; Noh et Amasino 1999; He et Gan 2002; Yoshida, 2003).

La **lumière** est un facteur environnemental important à différents stades du développement de la plante, et particulièrement au cours de la sénescence. La **photopériode**, la **qualité du rayonnement** ainsi que l'**intensité lumineuse** sont des facteurs clés de la régulation de la sénescence (Noodén *et al.*, 1996 ; Rousseaux *et al.*, 2000 ; Prochazkova et Wilhelmova, 2004). L'obscurité a longtemps été considérée comme un facteur inducteur de la sénescence. En effet, une feuille d'*Arabidopsis* isolée et placée à l'obscurité entre en sénescence très rapidement (Weaver et Amasino, 2001). Toutefois, lorsque cette contrainte est appliquée sur des plantes entières d'*Arabidopsis*, les feuilles présentent une sénescence retardée (Weaver et Amasino, 2001). En fait, dans le cas de feuilles isolées placées à l'obscurité, la sénescence est accélérée car la feuille n'est plus sous l'influence de cytokinines (connu pour retarder la sénescence, voir § III.2) dont la synthèse se situe au niveau racinaire.

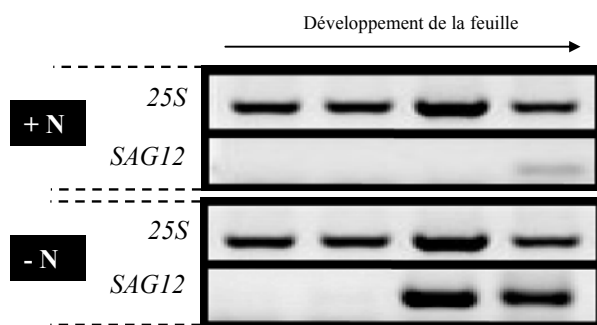


Figure II-24 : Analyse de l'expression génique de *SAG12* par RT-PCR, chez une feuille mature de *Brassica napus* privé (-N) ou non en azote (+N). L'expression de l'ARNr 25S est utilisée en tant que référence. (D'après Gombert *et al.*, 2006)

La photopériode intervient également dans le contrôle de la sénescence en l'accéléralant en « jours longs » et en la retardant en « jours courts » (Noodén *et al.*, 1996). De plus, des feuilles d'haricot soumises à une exposition continue à de fortes intensités lumineuses conduit à l'apparition de symptômes liés à la sénescence tels que la chute des chlorophylles et des capacités photosynthétiques (Prochazkova et Wilhelmova, 2004). Bien que la quantité de lumière soit importante dans la mobilisation de l'azote, la qualité du rayonnement joue également un rôle. En effet, il a été montré que l'induction de la sénescence des feuilles du bas du couvert d'une culture dense de tournesol était due à un plus faible ratio entre la lumière rouge (R, $\lambda=665\text{nm}$) et le rouge lointain (FR, $\lambda=735\text{nm}$) (Rousseaux *et al.*, 2000). Même si de nombreuses études montrent que l'intensité lumineuse, la durée et la qualité de l'irradiation agissent sur la sénescence foliaire, il semblerait que la lumière régule indirectement la sénescence foliaire notamment *via* son action sur l'activité photosynthétique et la modification du ratio C/N (Paul et Driscoll, 1997 ; Pourtau *et al.*, 2006 ; Wingler *et al.*, 2006). L'incidence de la variation du ratio C/N sur les processus de remobilisation de l'azote survenant au cours de la sénescence foliaire sera plus particulièrement traitée dans le chapitre III.4.

Parmi les **stress nutritionnels** pouvant moduler la progression de la sénescence, la carence de l'élément azote ainsi que le déficit hydrique sont les plus couramment étudiés. Une carence en azote conduit à une forte réduction de la croissance de la plante, à des feuilles de plus en plus petites et, à un jaunissement rapide des feuilles les plus âgées qui se traduit par une accéléralation de la progression de la sénescence foliaire (Wingler *et al.*, 2004 ; Gombert *et al.*, 2006). La privation en azote conduit également à une dégradation plus massive des chlorophylles et des protéines de feuilles de colza (Tilsner *et al.*, 2005 ; Gombert *et al.*, 2006). Le gène *SAG12*, codant une protéase à cystéine, est induit plus précocement chez des feuilles matures de colza privés en azote comparativement à des plantes témoins bien alimentées en azote (Figure II-24 ; Gombert *et al.*, 2006). Des feuilles d'*Arabidopsis* cultivés sur de faibles niveaux d'azote minéral présentent également une plus forte accumulation en sucres que des plantes cultivées sur un niveau élevé d'azote (Pourtau *et al.*, 2004). Ainsi, la carence azotée conduirait à une plus forte accumulation en sucres en diminuant la demande de squelettes carbonés pour les synthèses d'acides aminés et de protéines (Wingler *et al.*, 2006). Par voie de conséquence, une déficience en azote provoque une augmentation du ratio C/N, lequel ratio joue un rôle important dans la régulation de la sénescence (voir § III.4).

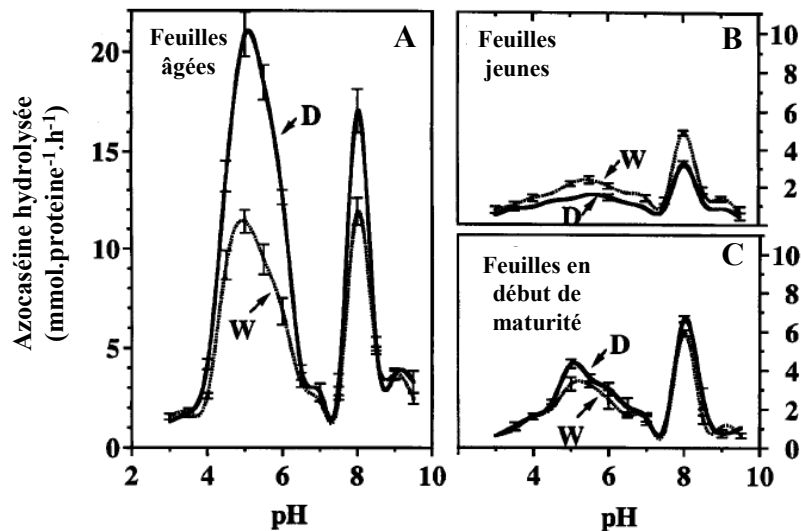


Figure II-25 : Evolution des activités protéolytiques en fonction du pH au sein de feuilles de *Brassica napus* à différents stades de développement foliaire (A : Feuilles âgées ; B : Feuilles jeunes ; C : Feuilles en début de maturité), chez des plantes bien alimentées en eau (W) et chez des plantes soumises à un déficit hydrique (D). (D'après Ilami *et al.*, 1997)

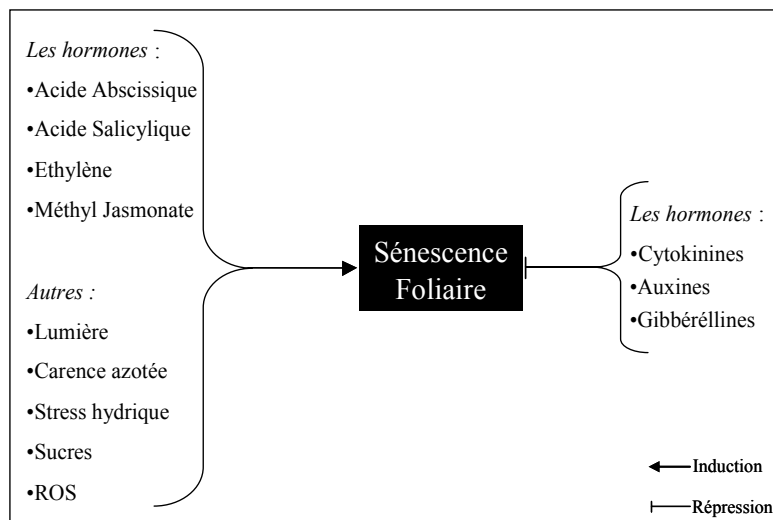


Figure II-26: Schéma bilan des facteurs de régulations du processus de sénescence foliaire.

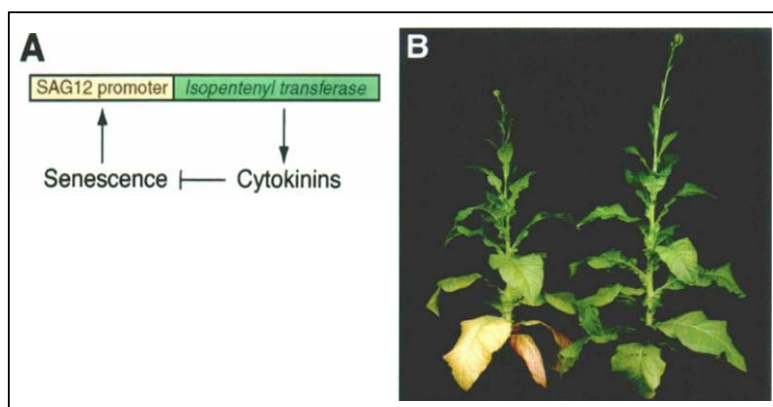


Figure II-27 : Sénescence foliaire retardée chez des plants de tabac transgénique dont la production de cytokinines est régulée. (A) Sur-expression de l'isopentenyltransférase (IPT), une enzyme clé de la synthèse de cytokinines, sous le contrôle du promoteur du gène *SAG12*. (B) Plante sauvage (à gauche) et plante transgénique (à droite). La transformation génique entraîne un retard de sénescence dû à l'effet répressif des cytokinines sur la sénescence foliaire. (D'après Gan et Amasino, 1995).

La sécheresse accélère également la sénescence foliaire. L'effet d'un stress hydrique sur les phénomènes de sénescence foliaire a été étudié chez de nombreuses espèces telles que le colza (Reviron *et al.*, 1992), le pois (Pic *et al.*, 2002) ou le blé (Yang *et al.*, 2003). Chez des feuilles sénescents de colza, les activités protéolytiques sont stimulées en réponse à un déficit hydrique (Figure II-25 ; Ilami *et al.*, 1997). En effet, chez le pois et chez *Arabidopsis thaliana* (Guerrero *et al.*, 1990 ; Koizumi *et al.*, 1993), les niveaux de transcrits de gènes codant des protéases augmentent en fonction de l'intensité de déshydratation. Les données bibliographiques citées ci-dessus montrent que diverses contraintes environnementales peuvent moduler les processus de sénescence foliaire. Les effets retardateur ou accélérateur de la sénescence provoqués par certains facteurs de l'environnement font le plus souvent intervenir des phytohormones. En effet, de nombreuses études ont montré que les phytohormones pouvaient être impliquées dans la régulation des processus associés à la sénescence (Figure II-11B).

III.2 Le rôle des phytohormones

Les phytohormones sont des composés naturels capables de réguler la croissance, le développement des organes végétaux, ainsi que les processus physiologiques, métaboliques et moléculaires associés (Figure II-26). Les mécanismes de sénescence sont tout particulièrement sous la dépendance de certaines phytohormones.

Les cytokinines peuvent réguler la progression de la sénescence foliaire. Ainsi, chez de nombreuses espèces, un traitement exogène par ce type de phytohormone ou la sur-expression d'une enzyme clé de la synthèse de cytokinines (l'isopentenyltransférase : IPT) sous le contrôle de promoteurs inductibles au cours de la sénescence (*SAG12* ou *SARK*) retarde l'apparition des symptômes liés à la sénescence foliaire (Figure II-27 ; Gan et Amasino, 1995 ; Rivero *et al.*, 2007 ; Sykorrova *et al.*, 2008). Chez le blé, Sykorrova *et al.* (2008) ont montré que cette évolution de la teneur en cytokinines était également accompagnée d'une augmentation de l'influx en nitrate et de l'activité Nitrate Réductase, sans pour autant affecter le rendement en grain des plantes transgéniques. Par ailleurs, le retard de sénescence observé chez ces plantes leur confère une meilleure résistance à la sécheresse (Rivero *et al.*, 2007 ; voir § III.1). Des études ont également été réalisées chez des plantes d'*Arabidopsis* sur-exprimant le gène de la Farnesyl diPhosphate Synthase (FPS), une enzyme intervenant dans la

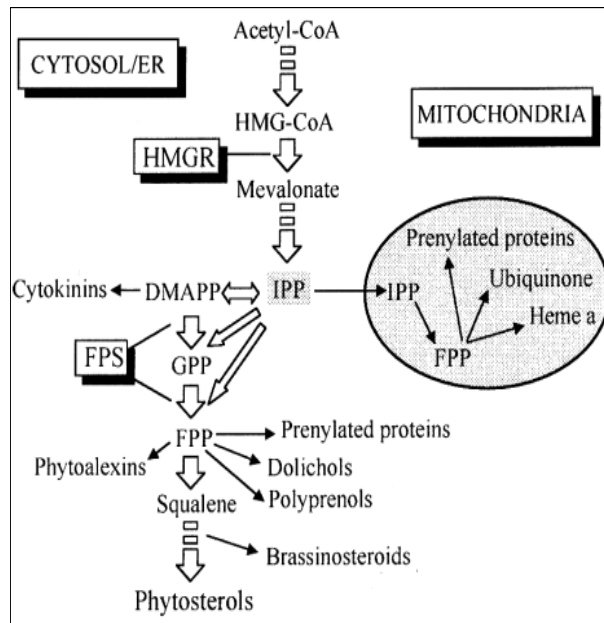


Figure II-28 : Schéma simplifié de la synthèse des isoprènes *via* la voie de l'acide mévalonique au niveau du cytosol/réticulum endoplasmique (ER) et de la mitochondrie (mitochondria). DMAPP : diméthylallyl diphosphate ; FFP : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme a reductase ; FPS : Farnesyl diphosphate synthase ; IPP : Isopentenyl diphosphate ; GPP : Geranyl diphosphate. Le DMAPP et l'IPP sont les substrats conduisant à la synthèse de cytokinines. (D'après Masferrer *et al.*, 2002).

voie de synthèse de l'acide mévalonique (Masferrer *et al.*, 2002 ; Figure II-28). La surexpression de cette enzyme conduit à la diminution des substrats nécessaires à la biosynthèse de cytokinines (IPP⁴ et DMAPP⁵), et par conséquent à la réduction de leurs teneurs. Ces modifications provoquent une apparition précoce des symptômes associés à la sénescence et une induction rapide de l'expression du gène *SAG12*, confirmant ainsi le rôle clé des cytokinines dans le phénomène de sénescence et de mobilisation de l'azote protéique.

L'auxine et les gibbérellines sont également capables de retarder l'initiation de la sénescence foliaire (Noodén *et al.*, 1979 ; Kappers *et al.*, 1998). L'application exogène d'auxine sur feuilles détachées d'*Arabidopsis* diminue l'expression du gène *SAG12* (Noh et Amasino, 1999). Chez des feuilles de *Alstroemeria hybrida*, les teneurs endogènes en gibbérellines diminuent avant le début de sénescence (Kappers *et al.*, 1998).

Outre ses effets sur la croissance, le mûrissement des fruits, et la sénescence florale (Wang *et al.*, 2002 ; Pierik *et al.*, 2006 ; van Doorn et Woltering, 2008), **l'éthylène** est capable de moduler la progression de la sénescence foliaire. Chez certaines espèces, l'application exogène d'éthylène déclenche les processus associés à la sénescence tels que la dégradation des chlorophylles et des protéines (Mattoo et Aharoni, 1988). Récemment, il a été montré que les transcrits des gènes codant l'ACC⁶ synthase et l'ACC oxydase, des enzymes impliquées dans la synthèse de l'éthylène, étaient induits chez des feuilles sénescentes d'*Arabidopsis* (van der Graaff *et al.*, 2006). Chez des plants de tomates, l'introduction d'une construction antisens inhibant l'ACC oxydase, retarde la sénescence foliaire (Picton *et al.*, 1993). Un résultat similaire est également obtenu chez des mutants (*etr1*) d'*Arabidopsis* possédant une insensibilité à l'éthylène liée au faible niveau d'expression de gènes impliqués dans la voie de synthèse de l'éthylène (Grbic et Bleeker, 1995). Cependant chez ces plantes, la sénescence se poursuit normalement une fois qu'elle a débuté. Ces résultats indiquent que la présence d'éthylène accélère le processus de sénescence mais que cette phytohormone n'est pas indispensable à son initiation.

L'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique (SA) et le méthyl jasmonate (MeJA), accélèrent la sénescence foliaire (Ray *et al.*, 1993 ; Morris *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 2002). Une

⁴IPP : Isopentenyl diphosphate

⁵DMAPP : dimethylallyl diphosphate

⁶ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique.

étude chez le maïs a montré que les feuilles de cultivars présentant une sénescence tardive (c'est-à-dire un phénotype « stay-green ») possédaient des teneurs endogènes en ABA faibles comparativement aux feuilles de cultivars caractérisés par une sénescence précoce (He *et al.*, 2005). L'ABA accélère la sénescence *via* l'inhibition de la biosynthèse des chlorophylles concomitante à l'induction de la dégradation des chlorophylles. Cette phytohormone est une molécule-signal synthétisée par les racines en réponse à un déficit hydrique, puis véhiculée jusqu'aux feuilles par le phloème. Le déclenchement d'une sénescence précoce en situation de stress hydrique (cf. § III.1) pourrait donc s'expliquer par l'intervention de l'ABA (Yang *et al.*, 2003).

Le SA est un composé phénolique également connu en tant que molécule-signal lors de certains stress (Glazebrook, 1999). Des mutants *nahG*, *pad4* et *npr1* d'*Arabidopsis*, déficients dans la voie de signalisation du SA, sont caractérisés par une altération de l'expression de certains gènes *SAGs* (Morris *et al.*, 2000). A titre d'exemple, l'expression d'un gène codant la glutamine synthétase (Leaf Senescence Clone 460) et d'un gène codant une protéase vacuolaire (Leaf Senescence Clone 326) sont diminuées chez les plantes mutées, suggérant un rôle du SA dans le contrôle de l'expression des gènes *SAGs* (Morris *et al.*, 2000).

Lors de la sénescence foliaire, le MeJA entraîne également l'induction de certains gènes dont celui de la chlorophyllase, une enzyme de dégradation de la chlorophylle (Tsuchiya *et al.*, 1999). Chez *Arabidopsis*, les teneurs en MeJA ainsi que l'expression des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de cette phytohormone augmentent durant la sénescence foliaire (He *et al.*, 2002). De plus, chez le colza, Rossato *et al.* (2002b) ont émis l'hypothèse que la forte diminution de l'absorption de l'azote, observée à la floraison, serait corrélée à la synthèse de MeJA, par les boutons floraux et/ou les organes sénescents. Par exemple, il a été montré qu'une application foliaire ou un apport exogène dans la solution nutritive de cette phytohormone conduit rapidement à une diminution de l'absorption de nitrate (90 % en 4 jours) tout en accélérant la sénescence et la mobilisation de l'azote dans les feuilles âgées et matures du colza (Rossato *et al.*, 2002b).

Au travers des exemples rapportés ci-dessus, il apparaît très clairement que les phytohormones ont une action centrale sur la régulation du déclenchement et de la progression de la sénescence en agissant à de nombreux niveaux (physiologique, métabolique et moléculaire). Cependant, il est primordial de rappeler que l'action pléiotropique, antagoniste ou synergique de chacune d'entre elles, résulte des équilibres (ou balances) qui

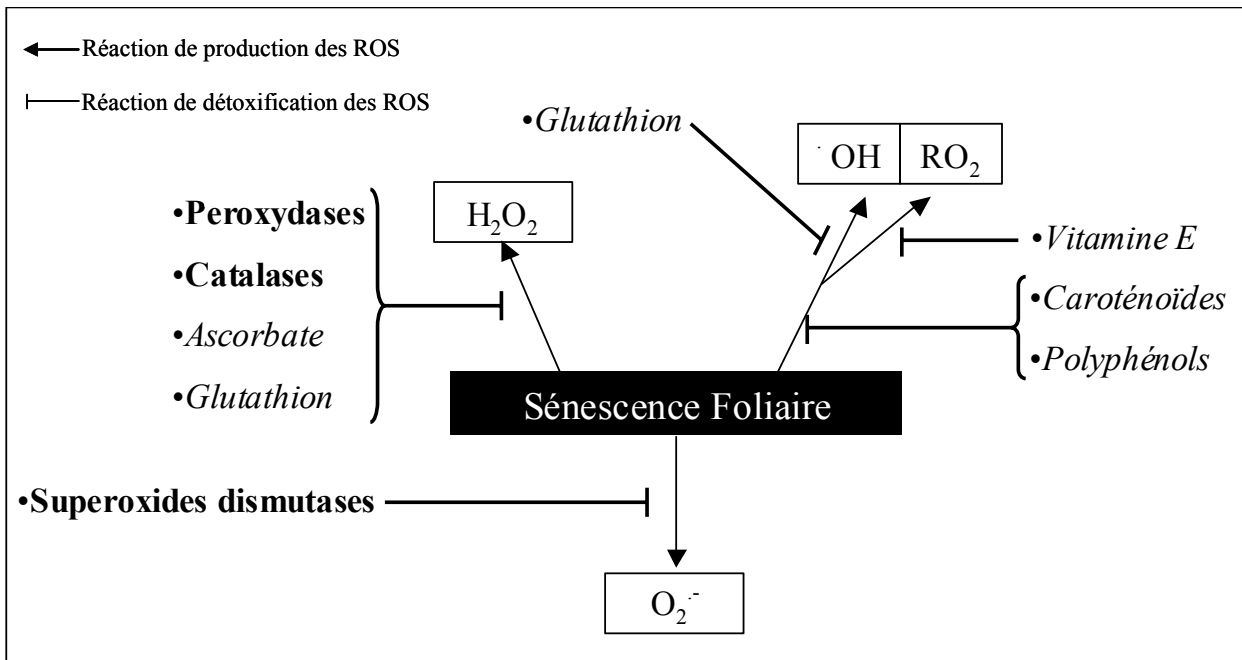


Figure II-29 : Schéma des molécules antioxydantes impliquées (en italique) dans la protection aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des enzymes de détoxification (en gras) des ROS durant la sénescence foliaire. H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; O₂^{•-} : radical superoxyde ; [•]OH : radical hydroxyle ; RO₂ : radical peroxyde.

s'établissent entre ces phytohormones. Ces balances hormonales rendent la compréhension de leur rôle, notamment au niveau de la régulation de la sénescence, particulièrement complexe.

III.3 Le stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important dans les processus de mobilisation des constituants cellulaires observés au cours de la sénescence foliaire. Si l'on se réfère aux différentes phases de la sénescence foliaire (Figure II-11B ; § II.1), il survient un stress oxydatif lorsque la production de ROS dépasse la capacité cellulaire à les détoxifier. Considérées comme des sous-produits du métabolisme cellulaire, les ROS sont formés au cours de la photorespiration, l'oxydation des lipides, la production de NADPH, H^+ ou de xanthine. Les ROS comprennent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les peroxydes (RO_2) et des radicaux libres tels que les superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et les hydroxyles ($\cdot OH$) (Figure II-29 ; Mittler *et al.*, 2004). Dans les tissus sénescents, l'augmentation des teneurs en radicaux libres est provoquée d'une part, par la production accrue de ces composés et, d'autre part, par la chute de production de molécules antioxydantes et des activités enzymatiques de détoxification. En effet, les ROS sont de puissants oxydants responsables de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, lipides,...) et peuvent affecter considérablement le métabolisme cellulaire. La présence accrue de ces composés toxiques au cours de la sénescence suggère que le stress oxydatif participe également à la dégradation massive des protéines (Palma *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'expression de certains gènes *SAGs* est induite lors de teneurs cellulaires élevées en ROS (Navbpour *et al.*, 2003), suggérant un rôle de certains ROS dans la régulation transcriptionnelle de gènes clés de la remobilisation de l'azote au cours de la sénescence.

L'ensemble des dommages radicalaires semble pouvoir être limité par l'action de molécules dites antioxydantes ou de systèmes enzymatiques de détoxification (Figure II-29). Les molécules antioxydantes ont pour rôle d'empêcher les ROS d'atteindre leurs cibles biologiques, d'où leur fonction de protecteur chimique qui peut indirectement moduler les processus de sénescence foliaire. Parmi les molécules antioxydantes, on trouve le glutathion, l'ascorbate, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols (Figure II-29). Chez le pois, le glutathion augmenterait d'un facteur 40 dans le peroxysome lors du vieillissement des feuilles (Jimenez *et al.*, 1998).

La catalase, les peroxydases, les glutathion-S-transférases, les superoxydes dismutases sont des enzymes clés de détoxification des ROS (Figure II-29). La catalase, localisée au niveau du peroxydosome, est l'enzyme la plus impliquée dans le processus de détoxification du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Foyer et Noctor, 2000). Dans les tissus sénescents de pois, l'activité de cette enzyme et les teneurs en ascorbate chutent de manière importante, favorisant l'accumulation des ROS (Pastori et del Rio, 1997). Les peroxydases d'ascorbate (APX), dont plusieurs isoformes sont présentes au sein de différents compartiments cellulaires, sont également des enzymes de détoxification à forte affinité pour l'H₂O₂. Ainsi, l'action de ces enzymes n'est possible qu'en présence de faibles concentrations en substrat. Chez des feuilles sénescents d'*Arabidopsis thaliana*, Ye *et al.* (2000) ont montré qu'il existait une corrélation entre l'augmentation des teneurs en H₂O₂ et la diminution des activités des APX. Chez *Arabidopsis thaliana*, deux gènes codant une isoforme microsomale et une isoforme chloroplastidiale d'APX voient leur expression diminuer dès l'entrée en sénescence de la feuille (Panchuk *et al.*, 2005), suggérant une régulation transcriptionnelle de ces gènes au cours de la sénescence.

La manganèse superoxyde dismutase (Mn-SOD) est majoritairement localisée au niveau des mitochondries et des peroxydosomes (del Rio *et al.*, 2003). Ces enzymes sont impliquées dans la détoxification du superoxyde. Les transcrits ainsi que les teneurs en Mn-SOD augmentent chez des feuilles sénescents de pois (del Rio *et al.*, 2003). Ces modifications sont essentiellement dues à une induction de l'expression de la Mn-SOD mitochondriale. D'autres études ont montré que l'activité de cette enzyme était également plus élevée que celle des Cu/Zn-SOD et Fe-SOD, localisées respectivement au niveau du chloroplaste et du cytosol (Palma *et al.*, 2001). Ces données permettent de comprendre du moins partiellement comment les mitochondries résistent aussi longtemps à la progression de la sénescence. De plus, Guo et Crawford (2005) ont montré que l'oxyde nitrique (NO), produit par la NO synthase (NOS), peut également jouer un rôle dans la protection des mitochondries contre les ROS (Guo et Crawford, 2005). L'absence d'activité NOS chez des mutants d'*Arabidopsis nos1* conduit à une initiation de la sénescence plus précoce ainsi qu'à une augmentation des teneurs en peroxyde d'hydrogène, en anion superoxyde, et en protéines oxydées (comparativement aux plantes sauvages). La protection conférée par le NO pourrait provenir d'un effet antioxydant dû à l'augmentation de la catalase, de la SOD, de la glutathion S-transférase (Polverari *et al.*, 2003 ; Palmieri *et al.*, 2008). Le NO est vraisemblablement un modulateur de la sénescence bien que d'autres études soient nécessaires pour clarifier son mode d'action.

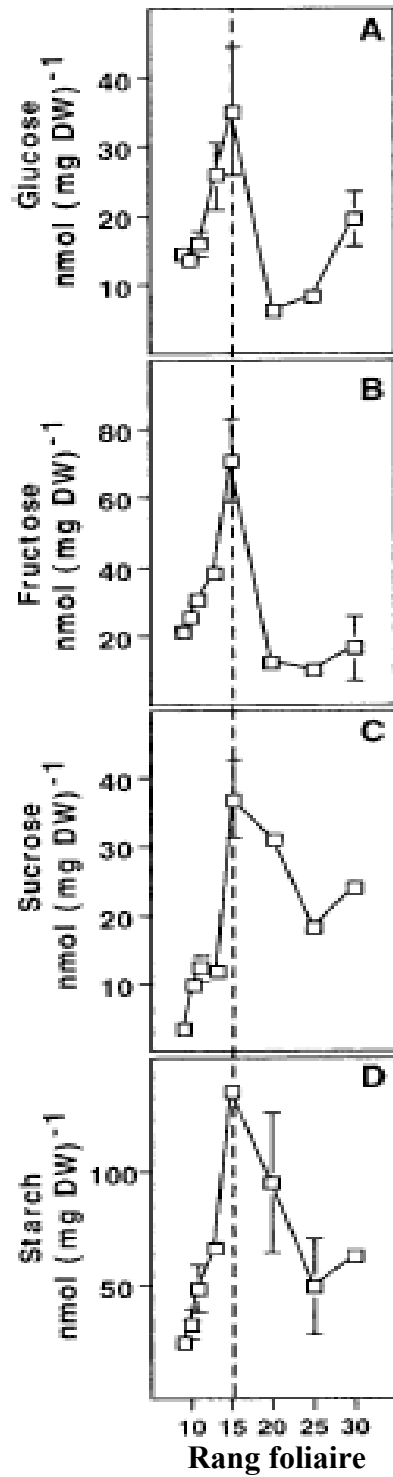


Figure II-30 : Evolution des teneurs en sucres (A : Glucose ; B : Fructose ; C : Saccharose ; D : Amidon) en fonction des rangs foliaires de plants de tabac. Plus le numéro du rang est élevé, plus la feuille est jeune. Les barres verticales indiquent \pm l'erreur standard de la moyenne pour $n=4$. La ligne en pointillés indique les valeurs mesurées au rang foliaire n°15. (D'après Masclaux *et al.*, 2000).

L'ensemble des données acquises sur le NO et les antioxydants montre l'importance des ces composés dans la régulation de la sénescence foliaire. Leur rôle est crucial dans le contrôle des dommages oxydatifs au niveau moléculaire (protéines, ADN, lipides,..) pouvant affecter considérablement le métabolisme cellulaire.

III.4 Action des sucres et ratio C/N

Les effets des sucres sur la sénescence foliaire sont très complexes. Les teneurs endogènes en sucres solubles, principalement glucose et fructose, augmentent durant la sénescence foliaire chez de nombreuses espèces (soja, maïs, tabac, *Arabidopsis*, ricin, orge ; Noodén *et al.*, 1997 ; Wingler *et al.*, 1998 ; Masclaux *et al.*, 2000 ; Stressman *et al.*, 2002 ; Jongebloed *et al.*, 2004 ; Parrot *et al.*, 2005). Des études physiologiques ont montré une accumulation de sucres (glucose, fructose, saccharose, amidon) dans les feuilles de tabac au début de la sénescence (Figure II-30 ; Masclaux *et al.*, 2000 ; Diaz *et al.*, 2005). L'application exogène de sucres (glucose) induit la sénescence (Wingler *et al.*, 2004). Ces composés carbonés induisent les gènes *SAGs* précoces et répriment les gènes *SAGs* tardifs chez le tabac (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2005). Certains auteurs suggèrent que les hexoses induisent le processus de sénescence *via* le senseur hexokinase. Moore *et al.* (2003) ont montré un retard de sénescence chez des plantes d'*Arabidopsis* mutées au niveau du gène codant l'hexokinase 1. La surexpression de ce même gène chez la tomate réduit l'activité photosynthétique et induit la sénescence (Dai *et al.*, 1999). Ces résultats sont en faveur d'une implication de l'hexokinase dans la voie de signalisation de la sénescence.

Dans certains processus de régulation, la forte présence d'hexoses conduit à inhiber la machinerie photosynthétique. Cette hypothèse est transposable au cas de la sénescence foliaire. Toutefois, dans la mesure où les capacités photosynthétiques sont fortement altérées dès le début de la sénescence, de nombreuses questions se posent quant à l'origine de l'augmentation cellulaire des composés glucidiques qui lui est associée. La dégradation de l'amidon ainsi que la gluconéogénèse issue de la dégradation des lipides, *via* le cycle du glyoxylate (voir § II.1), font partie des hypothèses. Toutefois, ces voies ne sont pas suffisantes pour expliquer une accumulation d'hexoses si importante. Une autre explication a été apportée au travers de l'étude de la surexpression d'une invertase extracellulaire, enzyme impliquée dans la dégradation du saccharose en glucose et fructose (Balibrea *et al.*, 2004). Les plantes sur-exprimant cette enzyme, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la sénescence, présentent des teneurs fortes en glucose comparativement aux plantes sauvages

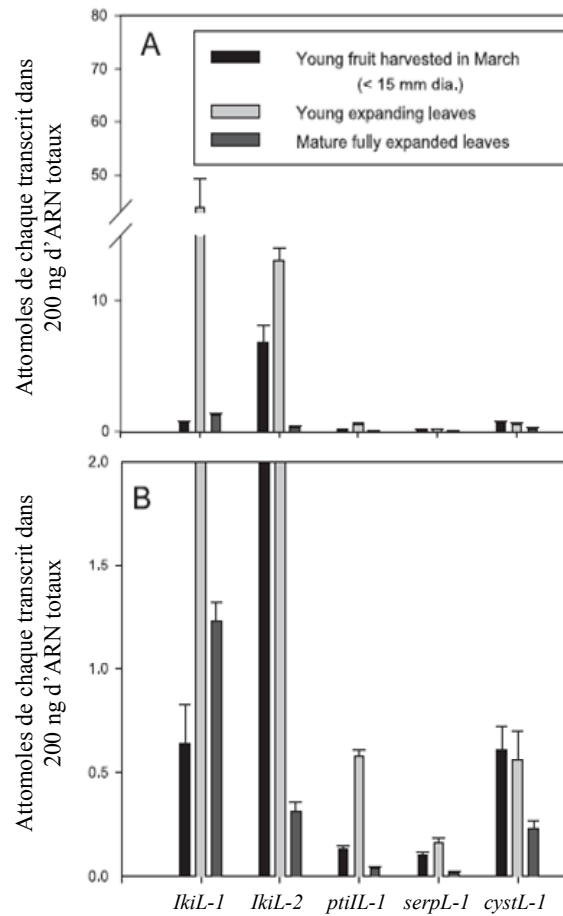


Figure II-31 : Quantification par PCR en temps réel de gènes codant des inhibiteurs de protéases dans les fruits et dans les feuilles de *Citrus paradisi*. Les gènes *IkiL-1* et *IkiL-2* codent des inhibiteurs de protéases de type Kunitz, le gène *serpL1* code un inhibiteur de protéases à sérine, le gène *ptiiL-1* code un inhibiteur de protéase de la famille des « Potato inhibitor I » et le gène *cystL-1* code un inhibiteur de protéases à cystéine de type cystatine. Les graphiques **A** et **B** représentent les mêmes données mais selon des échelles différentes pour l'axe des ordonnées. Young fruit harvested in March (< 15 mm dia.): Jeunes fruits récoltés en mars de diamètre inférieur à 15 mm. Young expanding leaves : Jeunes feuilles en croissance. Mature fully expanded leaves : Feuilles matures. (D'après Shatters *et al.*, 2004)

(Balibrea *et al.*, 2004). Le saccharose étant l'unique forme de transport des sucres par le phloème, son hydrolyse par les invertases extracellulaires empêche son chargement et son transport *via* le phloème vers les organes puits et expliquerait cette accumulation de fructose et glucose.

Certains auteurs ont orienté leurs études sur le ratio C/N durant le processus de mobilisation de l'azote associée à la sénescence. Comme rapporté dans la partie III.1, une carence en azote a un effet inducteur de la sénescence. Il a été montré que la sénescence de feuilles d'*Arabidopsis* était plus fortement induite lors d'une faible alimentation azotée conjuguée à un apport en glucose de 2% (Pourtau *et al.*, 2004). Cependant, cette carence en azote minéral pourrait, par exemple, provoquer une accumulation de sucres en diminuant la demande en squelette carboné pour la synthèse d'acides aminés et de protéines. De tels changements métaboliques du ratio C/N ont une répercussion sur l'expression de nombreux gènes. Par exemple, Pourtau *et al.* (2006) ont montré l'induction de gènes codant la glutamine synthétase cytosolique (*GLN1-4*) ainsi qu'un transporteur de nitrate (*AtNRT2-1*) chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* cultivées sur un milieu nutritif supplémenté en sucres.

III.5 L'implication des inhibiteurs de protéases

Certaines études ont montré que la présence d'inhibiteurs de protéases pourrait réguler ou retarder la sénescence foliaire et florale (Feller, 1986 ; Sugawara *et al.*, 2002 ; Sin et Chye 2004). A titre d'exemple, chez *Dianthus caryophyllus* L. des inhibiteurs de protéases à cystéine (DC-CPI) pourraient agir en tant que répresseur de la sénescence florale (Sugawara *et al.*, 2002). De plus, des gènes codant des inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz (IkiL-1 et IkiL-2) sont exprimés de manière significative chez de jeunes feuilles alors que leurs niveaux de transcription diminuent fortement dans les feuilles plus matures (Figure II-31 ; Shatters *et al.*, 2004).

Chez des feuilles de colza soumis à un stress hydrique (connu pour accélérer la sénescence foliaire), une protéine BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa), ayant une forte homologie avec des inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz est accumulée dans les jeunes feuilles présentant une faible activité protéolytique (Reviron *et al.*, 1992 ; Ilami *et al.*, 1997). Les auteurs suggèrent un rôle de cet inhibiteur de protéases dans le contrôle de la protéolyse chez les plantes adaptées à la sécheresse, retardant ainsi la sénescence foliaire. De plus, il a été montré que la surexpression de la cystatine, un inhibiteur de protéases à cystéine, était

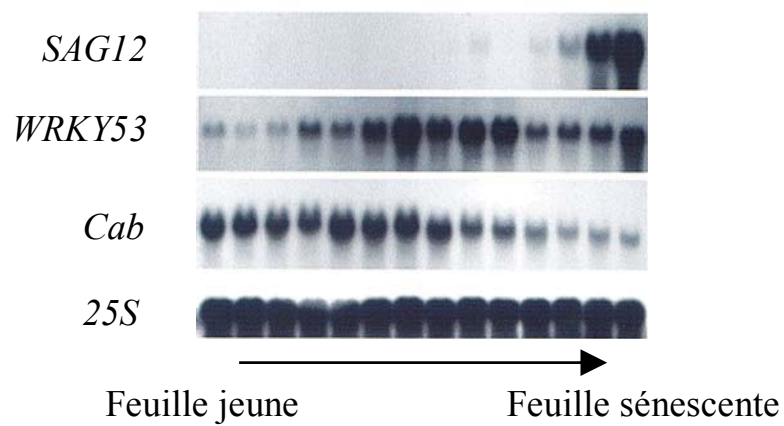


Figure II-32 : Analyse de l'expression génique de *WRKY53* (gène codant un facteur de transcription) chez des plants d'*Arabidopsis thaliana*. Les niveaux d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* peuvent être considérés comme indicateur moléculaire de l'état d'avancement de la sénescence foliaire (Gombert *et al.*, 2006). L'ARNr 25S est utilisée comme référence. (D'après Hinderhofer et Zentgraf, 2001).

capable de stopper la mort cellulaire de cellule de soja (Solomon *et al.*, 1999). Plus récemment, Diop *et al.* (2004) ont montré une corrélation entre les teneurs en protéines, le niveau de transcrits du gène codant la cystatine et le degré de tolérance à un déficit hydrique chez des feuilles de *Vigna unguiculata*. Ainsi, les inhibiteurs de protéases semblent donc capables de contrôler la protéolyse foliaire en empêchant ou retardant probablement l'action de certaines protéases. Chez des feuilles de pomme de terre, un gène codant un inhibiteur de protéase à cystéine, SPC15, est induit durant la sénescence foliaire en même tant que les gènes codant des protéases à cystéine, SPG31 et SPC20 (Huang *et al.*, 2001).

Il est probable que le ratio « inhibiteurs de protéases/protéases » joue un rôle important dans l'initiation et la progression de la sénescence foliaire. En modulant l'activité de certaines protéases, les inhibiteurs de protéases pourraient donc être impliqués dans la régulation de la remobilisation de l'azote protéique foliaire.

III.6 Facteurs de transcription

Comme rappelé dans la partie II.1, la sénescence foliaire s'accompagne de profondes modifications de l'expression de certains gènes tels que les gènes *SAGs*, confirmant l'existence d'une régulation transcriptionnelle importante au cours du processus de sénescence. Certaines de ces régulations présentes à l'échelle moléculaire impliquent des facteurs de transcription.

Un grand nombre de facteurs de transcription tels que WRKY, bZIP ou NAC sont induits au cours du processus de sénescence (Yang *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2004 ; Guo et Gan, 2006 ; Yoon *et al.*, 2007). Actuellement la famille des WRKY, des protéines à doigt de zinc, est la plus étudiée dans le cadre de la sénescence foliaire. Le facteur WRKY53 est fortement induit chez des feuilles sénescentes d'*Arabidopsis thaliana* alors que l'expression de WRKY6 est plus faible (Hinderhofer et Zentgraf, 2001 ; Robatzek et Somssich, 2002). L'augmentation des transcrits de *WRKY53* survient bien avant l'induction de *SAG12* et la répression de *Cab*, suggérant un rôle de ce facteur de transcription dans la régulation des premières phases de la sénescence foliaire (Figure II-32 ; Hinderhofer et Zentgraf, 2001). La surexpression de ce même facteur entraîne une augmentation des transcrits du gène *SAG12* (Miao *et al.*, 2004). Ainsi, grâce à sa fixation sur des séquences cis-régulatrices différentes, la protéine WRKY53 peut être considérée comme un élément trans-régulateur capable d'induire ou de réprimer des gènes au cours du processus de sénescence (Robatzek et Somssich, 2002). De plus, Miao *et*

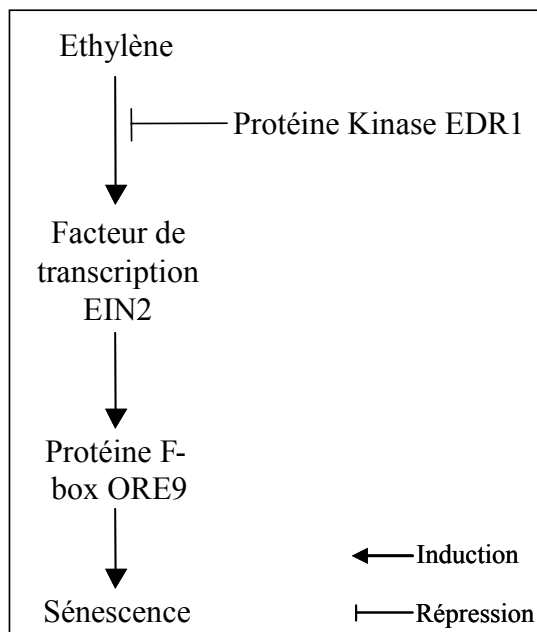


Figure II-33 : Schéma représentant le rôle de la protéine kinase EDR1 et des facteurs de transcription dans la voie de signalisation de l'induction de la sénescence par l'éthylène.

al. (2004) ont montré que WRKY53 était également induit par l'H₂O₂ et que ce facteur de transcription aurait pour cible les gènes codant la catalase (Miao *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que WRKY53 joue un rôle dans la réponse au stress oxydatif au cours de la sénescence et que l'H₂O₂ agit comme une molécule signal. Il semblerait qu'une protéine kinase (MEKK1) régule la protéine WRKY53 en se liant à son promoteur ou en la phosphorylant (Miao *et al.*, 2007). De plus, Tang *et al.* (2005) ont montré à l'aide de mutants d'*Arabidopsis thaliana* que le gène *EDR1*, codant une protéine kinase, permettait de réguler la sénescence en inhibant l'expression du facteur de transcription EIN2 lui-même induit par l'éthylène (Figure II-33). Il a également été montré que des phytohormones (MeJA/SA) pouvaient réguler l'expression de ces facteurs de transcription pendant la sénescence (Miao et Zentgraf, 2007).

IV. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'analyse bibliographique révèle que l'amélioration de l'EUA du colza passera par une meilleure compréhension des mécanismes de remobilisation de l'azote associés à la sénescence foliaire. Cette sénescence foliaire se caractérise par de nombreuses modifications physiologiques conduisant au jaunissement des feuilles, à la réduction de la capacité photosynthétique, à la diminution du contenu en azote, à l'induction de la protéolyse, à la diminution de la teneur en chlorophylles... Malgré ces connaissances, il apparaît que la chronologie et l'amplitude de ces événements restent largement méconnues chez le colza. De plus, sachant que de nombreux facteurs environnementaux et endogènes interviennent dans la régulation de l'initiation de ce processus, il n'existe pas d'informations claires permettant de vérifier si la chronologie des événements est toujours identique quel que soit le facteur déclenchant la sénescence.

La compréhension de la sénescence foliaire repose essentiellement sur des données faisant appel aux études transcriptomiques. Ces données scientifiques fournissent des renseignements précieux pour la compréhension de ce processus, mais elles semblent insuffisantes compte tenu de la difficulté à identifier la fonction de nombreux gènes (Guo *et al.*, 2004). Elles ne peuvent conduire qu'à émettre des hypothèses sur les protéines codées par les gènes d'intérêt. Comme nous l'avons vu tout au long de cette analyse bibliographique, les changements associés à la sénescence foliaire sont également liés à des régulations post-transcriptionnelles

et traductionnelles. Des analyses du protéome contribuent à approfondir les connaissances acquises ces dernières années. Ces études du « protéome de la sénescence » sont d'autant plus importantes quand on sait que de nombreuses protéines telles que (i) les protéases et inhibiteurs de protéases, (ii) les enzymes du métabolisme azoté et (iii) les enzymes de détoxification des ROS jouent un rôle important dans le processus de sénescence, et plus particulièrement dans sa régulation.

Par ailleurs, les diverses études citées tout au long de cette analyse bibliographique n'utilisent pas les mêmes critères de référence pour comparer les états de sénescence. Le taux de chlorophylles est souvent utilisé pour déterminer le niveau de sénescence des feuilles, mais la chute du niveau de chlorophylles est souvent un critère qui rend compte d'un état de sénescence assez avancé. Chez certaines de ces études, plusieurs rangs foliaires sont regroupés en fonction de leur taux de chlorophylles. Dans la mesure où les feuilles regroupées ne sont pas au même niveau de progression de la sénescence, ce type d'étude n'est pas satisfaisant pour étudier avec rigueur les événements qui se manifestent au cours de la sénescence foliaire. Selon Gombert *et al.* (2006), la quantité de protéines solubles par feuille s'avère être un meilleur indicateur de la sénescence foliaire que les teneurs en chlorophylles ou en azote total, mais ne constitue pas un indicateur précis en condition de carence azotée. Par contre, les gènes *SAG12* (gène *SAG* codant une protéase à cystéine) et *Cab* (gène *SDG* codant une protéine de liaison aux chlorophylles *a* et *b*) se sont révélés d'excellents indicateurs de sénescence foliaire chez *Brassica napus* dans des conditions limitantes ou non en azote (Gombert *et al.*, 2006). En effet, la diminution de l'expression du gène *Cab* concomitante à l'induction de l'expression du gène *SAG12* permet de déterminer une date théorique d'initiation de la sénescence foliaire correspondant à la transition puits/source pour l'azote. Cette méthode facilite l'étude de la mobilisation de l'azote foliaire puisqu'elle permet d'identifier la position nodale théorique du rang foliaire en transition puits/source. L'ensemble des études conduites au cours de cette thèse repose donc sur l'utilisation de ces indicateurs moléculaires et de flux d'azote remobilisé (détermination par marquage isotopique à l'azote 15) pour une caractérisation plus précise de l'état d'avancement de la sénescence foliaire et des taux de remobilisation de l'azote foliaire.

Les données bibliographiques actuelles suggèrent que la faible EUA constatée chez le colza serait essentiellement liée à un défaut de mobilisation de l'azote protéique (dégradation incomplète des protéines foliaires) et non à une limitation du chargement phloémique des

acides aminés issus de cette dégradation (Tilsner *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats nous a conduit à orienter nos travaux de recherche sur l'étude des mécanismes cellulaires associés à la dégradation des protéines foliaires.

L'objectif général de ce projet de thèse est de réaliser une étude fonctionnelle du processus de mobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle chez le colza d'hiver en vue de déterminer des pistes potentielles d'amélioration de l'EUA. Ce projet est organisé autour de trois hypothèses qui s'appuient sur les connaissances recensées dans cette analyse bibliographique et que nous avons tenté de valider. Comme précisé ci-dessous, chacun des Chapitres résultats (IV, V et VI) répond à un objectif de recherche défini sur la base d'un postulat et repose sur un dispositif expérimental et une méthodologie adaptés à la problématique:

- **Chapitre IV :**

Hypothèse : Des inhibiteurs de protéases pourraient réguler les processus de mobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle.

Objectif : Déterminer les activités anti-protéasiques et identifier les inhibiteurs de protéases susceptibles d'intervenir dans la régulation des mécanismes de la sénescence foliaire.

Méthodologie : Pour cela, les activités anti-protéasiques ont été analysées sur zymogrammes chez des feuilles présentant des niveaux de sénescence contrastés *via* l'application d'une privation en azote minéral ou de Methyl jasmonate (MeJA), deux traitements qui conduisent à une accélération de la sénescence foliaire. L'identification des inhibiteurs de protéases impliqués dans la régulation du processus de mobilisation de l'azote a été réalisée *via* une approche protéomique ciblée.

- **Chapitre V :**

Hypothèse : Des protéines spécifiquement induites au cours de la sénescence foliaire telles que des systèmes protéolytiques pourraient réguler la protéolyse lors du processus de sénescence foliaire séquentielle.

Objectif : Identifier les protéines intervenant dans les processus de remobilisation de l'azote durant la sénescence foliaire.

Méthodologie : Au préalable, les vitesses de mobilisation de l'azote mesurées *via* l'utilisation du traceur ^{15}N d'une part, et les profils d'expression des gènes *SAG12/Cab* au sein de chaque rang foliaire d'autre part, ont permis d'identifier un rang foliaire présentant

des niveaux de sénescence contrastés (obtenus *via* l'application de trois niveaux de fertilisation azotée). Une étude protéomique globale de cette feuille présentant des niveaux de progression de la sénescence plus au moins avancés a été réalisée.

- **Chapitre VI :**

Hypothèse : Les processus de remobilisation de l'azote associés à la sénescence foliaire sont régis par une série d'événements métaboliques, moléculaires et biochimiques. Malgré une initiation de la sénescence plus précoce, la chronologie de ces événements est identique chez des plantes soumises à une privation en azote.

Objectif : Définir la chronologie et la séquence d'événements physiologiques, biochimiques et moléculaires, correspondant à des stades clés de la mobilisation de l'azote foliaire au cours de la sénescence séquentielle et vérifier l'impact d'une privation en azote minéral sur ces événements.

Méthodologie : L'évolution des différentes fractions azotées et carbonées, de la photosynthèse, des activités protéolytiques, de l'expression de certains gènes associés à la sénescence et à la remobilisation de composés azotés, est suivie tout au long de la vie d'un rang foliaire donné. Cette étude est réalisée chez des feuilles matures de colzas privés ou non en azote.

Ces trois chapitres de résultats sont présentés sous forme de 4 articles. Un chapitre sera consacré à la description des expérimentations et des méthodes d'analyses utilisées pour réaliser l'ensemble de ces études. Pour conclure, la partie résultats (Chapitres IV, V et VI) sera suivie d'une discussion générale (Chapitre VII) tout en proposant quelques perspectives à ces travaux.

CHAPITRE III

Matériels & Méthodes

Tableau III-I : Composition de la solution nutritive utilisée pour la culture sur attapulgite, perlite ou perlite/vermiculite du colza (*Brassica napus* L., variété Capitol).

Macroéléments	mM	Microéléments	μM
CaCl ₂	3	H ₃ BO ₃	14
KNO ₃	1-3	MnSO ₄	5
K ₂ SO ₄	1	ZnSO ₄	3
MgSO ₄	0,5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,7
KH ₂ PO ₄	0,4	CuSO ₄	0,7
Fe-Na-EDTA	0,2	CoCl ₂	0,1
K ₂ HPO ₄	0,15		



Figure III-1 : Repiquage des plants de colza possédant deux à trois vraies feuilles sur le substrat perlite-vermiculite (1/1), à raison d'une plante par pot.

CHAPITRE III

MATÉRIELS & MÉTHODES

I. CONDITIONS DE CULTURE ET PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

La variété de colza oléagineux utilisée pour les différentes expérimentations en conditions contrôlées est la variété Capitot (*Brassica napus* L.). Ce colza d'hiver est une lignée pure connue comme étant précoce à la reprise de végétation (Février) et mi-tardive à floraison et à maturité. Les rendements, en général très bons, sont de l'ordre de 30 quintaux par hectare (Source CETIOM). Le choix du modèle d'étude s'est porté sur Capitot en raison des nombreuses études réalisées par l'équipe Azote de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA sur ce génotype que ce soit sur ses capacités d'absorption ou ses processus d'allocation et de remobilisation de l'azote en conditions de plein champ, en serre ou phytotron (Rossato *et al.*, 2001 ; Noquet *et al.*, 2004 ; Malagoli *et al.*, 2004, 2005a,b).

I.1 Conditions de culture en milieu contrôlé

Les semences de colza (variété Capitot) sont stérilisées en surface avec de l'éthanol à 80% pendant 30 secondes, puis à l'hypochlorite de sodium à 20% (v/v) pendant 20 minutes. Elles sont ensuite rincées abondamment (10 fois) à l'eau déminéralisée avant d'être mises à germer sur un substrat synthétique (mousse de synthèse, Oasis growing pinpot, Agrimedia). Le semis est arrosé quotidiennement avec une solution nutritive (composition indiquée au sein du Tableau III-I) à 1 mM de KNO₃. Lorsque les deux premières feuilles vraies apparaissent (environ 15 jours après le semis), les plantes sont repiquées, à raison de 2 plantes par pot de 4L, sur de la perlite pour l'expérimentation du Chapitre IV-I. Une plante par pot de 2L est repiquée sur de l'attapulгите pour les expérimentations des Chapitres IV-II et V, ou d'un mélange de perlite-vermiculite (1/1) pour l'expérimentation du Chapitre VI (Figure III-1).

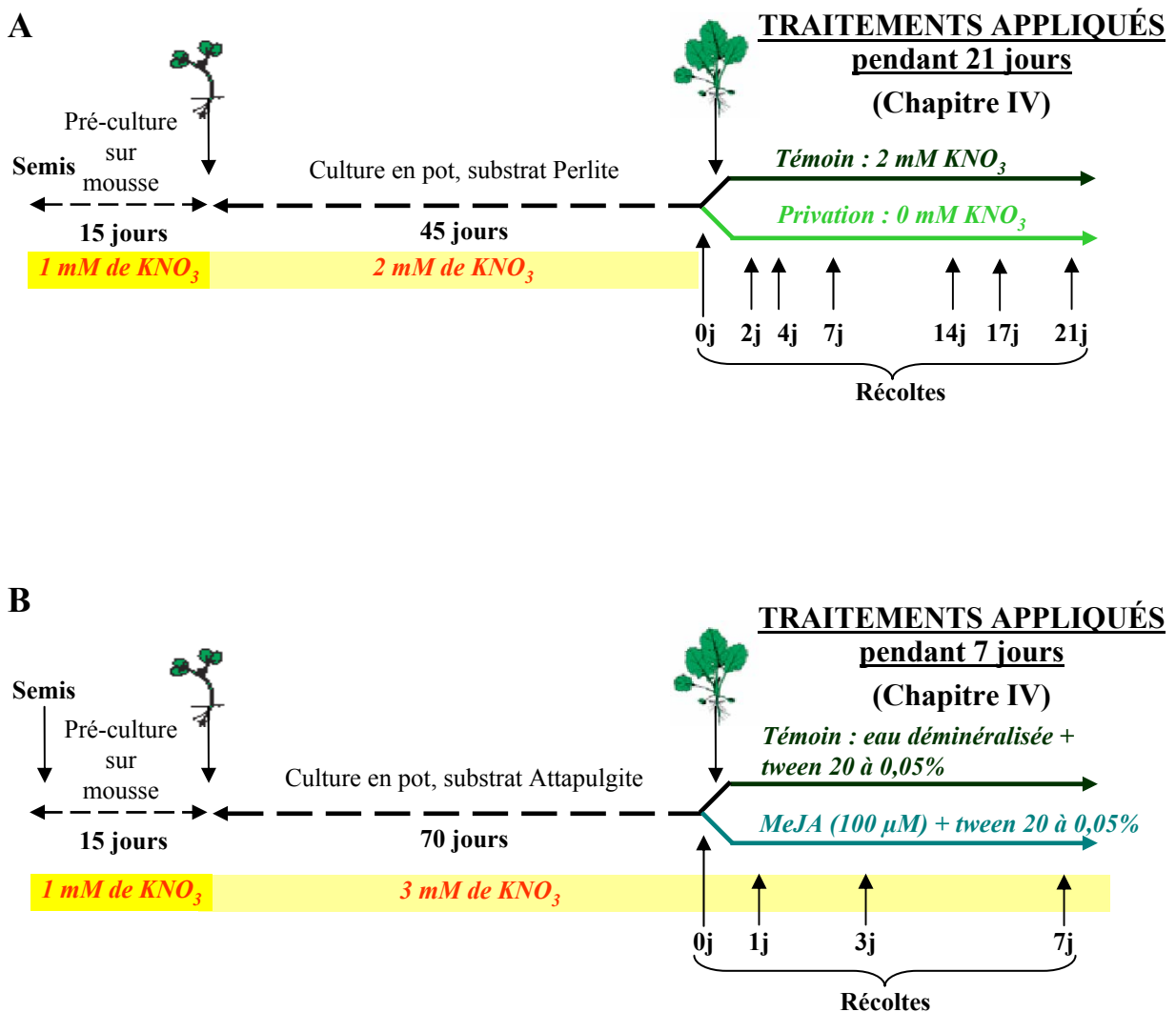


Figure III-2 : Représentations schématiques des dispositifs expérimentaux mis en place pour l'étude de l'implication d'un inhibiteur de protéases, BnD22, dans la régulation de la sénescence foliaire. **(A)** Après 60 jours de culture en conditions contrôlées, les plantes sont soumises à deux niveaux de fertilisation azotée (0 et 2 mM). La date 0j marque le début des différents traitements. Les plantes sont récoltées après 2 (2j), 4 (4j), 7 (7j), 14 (14j), 17 (17j) et 21 (21j) jours de traitement. **(B)** Après 85 jours de culture en conditions contrôlées, les plantes sont pulvérisées ou non avec une solution de méthyl jasmonate (MeJA). La date 0j marque le début des traitements. Les plantes sont récoltées après 1 (1j), 3 (3j), 7 (7j) jours de traitement.

L'arrosage automatique permet de distribuer 50 mL de solution nutritive par jour (Tableau III-I) à 3 mM de KNO_3 . Ces plantes sont cultivées en serre où elles reçoivent un éclairage artificiel dispensé par des tubes Néon (Philips TLD 36W ; valeurs moyennes du PAR (Photosynthetic Active Radiation) obtenu à 15 cm au-dessus du collet : 200-250 $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) pour les expérimentations des Chapitres IV et V ou des lampes à sodium haute pression (Philips MASTER GreenPower T400W ; valeur moyenne du PAR à 15 cm au-dessus du collet : 280 $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) pour l'expérimentation du Chapitre VI. Les températures, diurnes et nocturnes, sont respectivement de 20 et 18°C. Les traitements (carence ou privation en azote, pulvérisation de méthyl jasmonate) débutent lorsque les plantes sont au stade rosette et les feuilles sont numérotées en fonction de leur ordre d'apparition. Les valeurs moyennes de températures sont calculées pour chaque jour puis cumulées afin de déterminer, en degrés jours cumulé (temps thermique), l'âge des feuilles. Le zéro végétatif du colza étant de 5°C, le temps thermique est calculé en intégrant cette température minimale de croissance (temps thermique, base 5).

I.2 Protocoles expérimentaux

1.2.1 Dispositifs expérimentaux pour l'étude de l'implication d'un inhibiteur de protéases, BnD22, dans la régulation de la sénescence foliaire (Chapitre IV)

Un premier dispositif expérimental a consisté à comparer deux niveaux de fertilisation azotée appliqués au stade rosette. Les traitements débutent 60 jours après le semis. Un lot de plantes témoins est récolté à la mise en place des traitements ($t = 0j$, Figure III-2A). Les autres plantes sont divisées en deux lots correspondant aux deux niveaux de fertilisation azotée. Les plantes témoins reçoivent une nutrition azotée non limitante, assurée par l'apport quotidien de 50 mL de solution nutritive (composition Tableau III-I) à 2 mM de KNO_3 . Les plantes privées en azote reçoivent les mêmes volumes de solution nutritive dépourvue de KNO_3 (Privation ; Figure III-2A). Les plantes sont récoltées au Jour 0 et après 2, 4, 7, 14, 17 et 21 jours de traitement. Pour chaque temps de récolte, 3 répétitions par traitement sont réalisées (chaque répétition correspond à une plante).

Un deuxième dispositif expérimental a été mis en place afin d'étudier les effets du méthyl jasmonate (MeJA), une phytohormone connue pour induire la sénescence (cf. § III.II). L'application des traitements débute 85 jours après le semis. Un lot de plantes témoins est

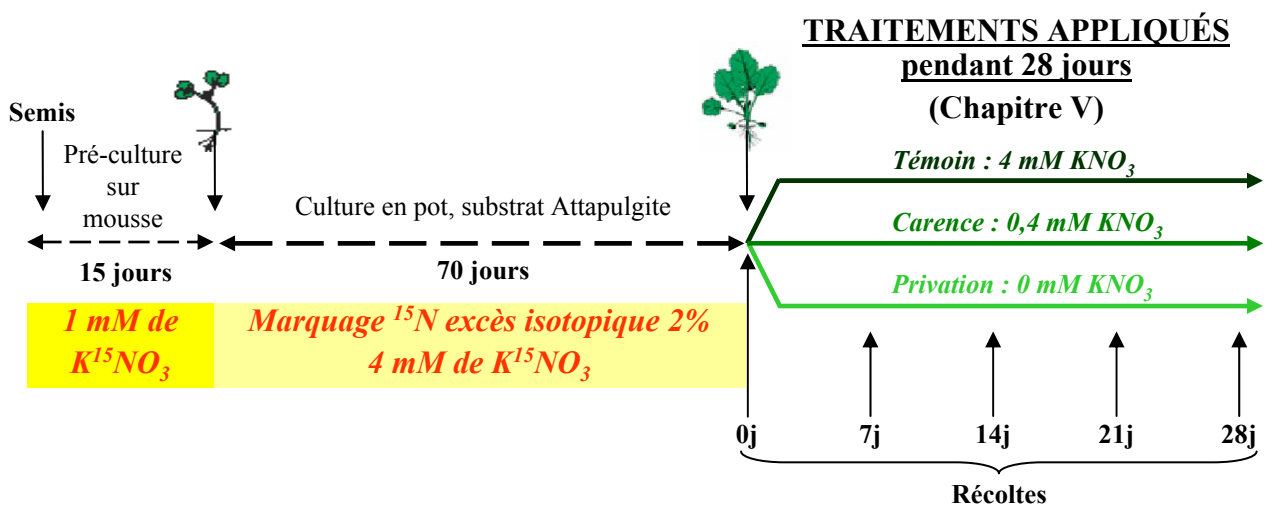


Figure III-3 : Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude des modifications protéomiques associées au recyclage de l'azote foliaire chez le colza soumis à différents niveaux de fertilisation azotée. Après une période de culture en conditions contrôlées (85 jours après le semis) en présence de 4 mM de nitrate marqué au ^{15}N , 3 lots de plantes sont soumises à trois niveaux de fertilisation azotée (0, 0,4 et 4 mM de nitrate non marqué). La date 0j marque le début des différents traitements. Les plantes sont récoltées après 7 (7j), 14 (14j), 21 (21j) et 28 jours (28j) de traitement.

récolté à la mise en place des traitements ($t = 0j$, Figure III-2B). Les autres plantes sont divisées en deux lots correspondant aux plantes témoins et aux plantes traitées au MeJA. Les plantes témoins sont pulvérisées au niveau foliaire avec 12,5 mL d'eau déminéralisée contenant du tween 20 à 0,05% (un agent mouillant). Un volume de 12,5 mL d'une solution de tween 20 à 0,05% contenant du MeJA à 100 μM est pulvérisé sur les feuilles du deuxième lot de plantes (Figure III-2B). La dose de MeJA utilisée correspond à une concentration optimale déterminée lors d'études précédemment menées au laboratoire sur la variété Capitol (Rossato *et al.*, 2002a).

Les feuilles sont récoltées au Jour 0 et après 1, 3 et 7 jours de traitements. Pour chaque temps de récolte, 3 répétitions sont réalisées par traitement (chaque répétition correspond à une plante).

1.2.2 Dispositif expérimental pour l'étude des modifications protéomiques associées au recyclage de l'azote foliaire chez le colza soumis à différents niveaux de fertilisation azotée (Chapitre V)

Afin d'étudier les transferts d'azote au sein des plantes pendant les périodes de carence et de privation en azote, une période de marquage à l'azote ^{15}N suivie d'une période dite « de chasse » est réalisée.

Les plantes utilisées pour cette expérimentation sont cultivées, du semis jusqu'à l'application des traitements, en présence d'une source d'azote minéral (NO_3^-) marquée au ^{15}N (2% d'excès isotopique) apportée sous forme de nitrate de potassium (K^{15}NO_3) directement dans la solution nutritive. Cette longue période de marquage (85 jours) permet à l'ensemble des réserves azotées d'être marqué au ^{15}N de façon très homogène.

L'application des traitements débute 85 jours après le semis (Figure III-3). A cette date ($t = 0j$), le marquage ^{15}N est stoppé, marquant le début de la période de chasse. Quotidiennement, un lot de plantes témoins reçoit 50 mL d'une solution nutritive à 4 mM de KNO_3 , un lot de plantes carencées en azote reçoit 50 mL d'une solution nutritive à 0,4 mM de KNO_3 , et un lot de plantes privées en azote est alimenté avec 50 mL de solution nutritive dépourvue de KNO_3 . Les plantes sont récoltées au Jour 0 et après 7, 14, 21 et 28 jours de traitement. Pour chaque temps de récolte, 3 répétitions sont réalisées par traitement (chaque répétition correspond à une plante).

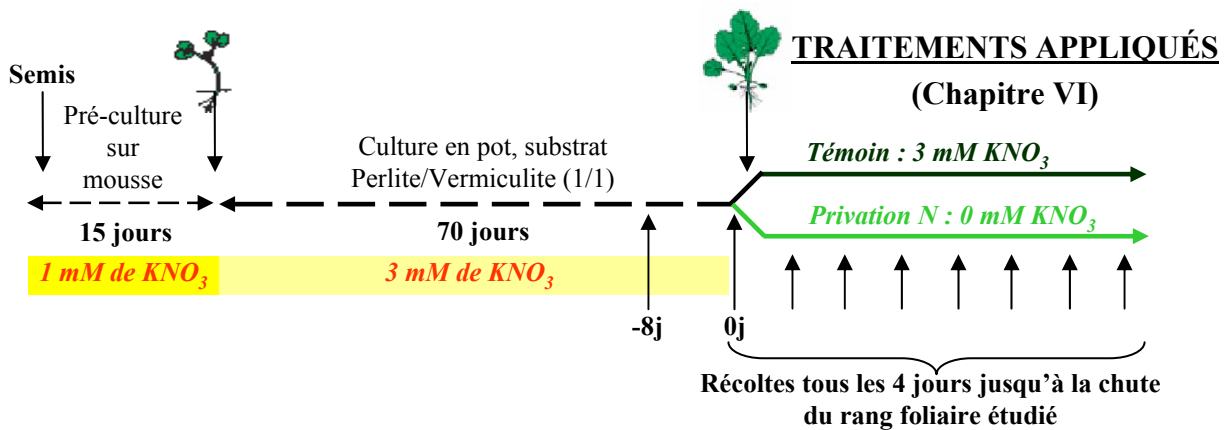


Figure III-4 : Représentation schématique du dispositif expérimental mis en place pour l'étude physiologique et biochimique des phases ultimes du développement d'une feuille de colza. Après 85 jours de culture en conditions contrôlées, deux lots de plantes sont soumis à deux niveaux de fertilisation azotée (0 et 3 mM). La date 0j marque le début des traitements. Une récolte est réalisée 8 jours avant l'application des traitements. Les plantes sont récoltées tous les 4 jours jusqu'à la chute du rang foliaire étudié.

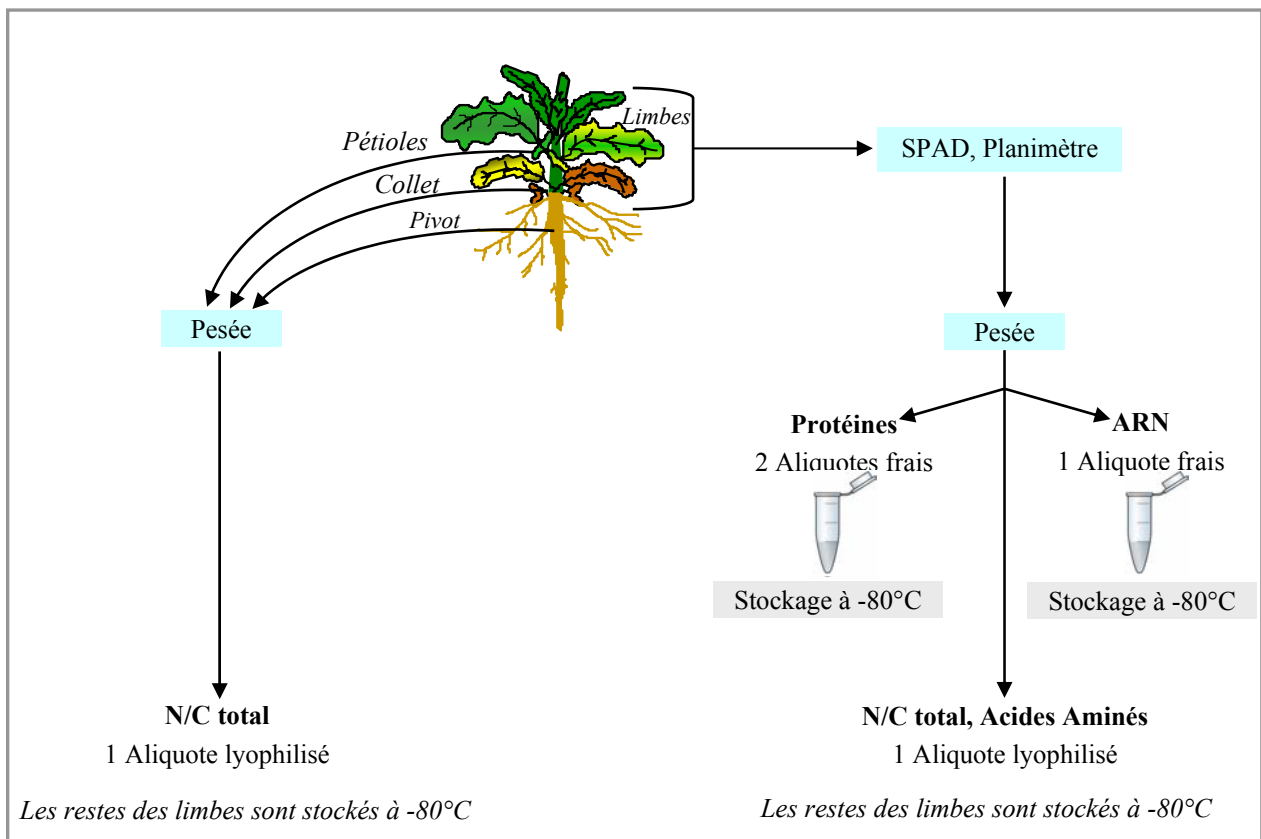


Figure III-5 : Schéma récapitulatif du protocole employé lors des récoltes. Des aliquotes stockés à -80°C sont préparés pour réaliser les extractions et les dosages des protéines et des ARNs totaux. Un aliquote est également préparé pour être lyophilisé, pesé (détermination de la matière sèche), broyé puis utilisé pour les analyses C/N total, l'extraction et le dosage des acides aminés.

1.2.3 Dispositif expérimental pour l'étude physiologique et biochimique des phases ultimes du développement d'une feuille de colza (Chapitre VI)

L'expérimentation a consisté à suivre le développement d'un rang foliaire (#13), de sa maturité à sa chute chez des plantes privées ou non en azote. Un lot de plantes est récolté 8 jours ($t = -8j$) avant l'application des traitements, lorsque le rang foliaire étudié (#13) est en pleine expansion (Figure III-4). L'application des traitements débute 85 jours après le semis. Un lot de plantes témoins est récolté à la mise en place des traitements ($t = 0j$). Les autres plantes sont divisées en deux lots correspondant aux deux niveaux de fertilisation azotée. Les plantes témoins reçoivent une nutrition azotée non limitante, assurée par l'apport quotidien de 50 mL de solution nutritive (composition Tableau III-I) à 3 mM de KNO_3 . Les plantes privées en azote reçoivent les mêmes volumes de solution nutritive dépourvue de KNO_3 (Figure III-4). Les plantes sont récoltées tous les 4 jours pendant 28 jours de traitement. Pour chaque temps de récolte, 3 répétitions sont réalisées par traitement (chaque répétition correspond à une plante).

II. MESURES DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE

II.1 Mesure de la biomasse et de la surface foliaire

A chaque récolte et pour chaque traitement, trois plantes (1 plante = 1 répétition biologique) sont séparées en collet, pivot, limbes, pétioles (Figure III-5). Après séparation du limbe et du pétiole, la surface du limbe est déterminée par un planimètre LI-COR 300 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). Les limbes sont ensuite pesés à l'état frais puis quatre aliquotes sont réalisés : deux aliquotes pour l'extraction des protéines, un aliquote pour l'extraction des ARNs totaux et 1 aliquote pour les analyses C/N total, l'extraction et le dosage des acides aminés. Les trois premiers aliquotes cités sont immédiatement plongés dans l'azote liquide et stockés à $-80^{\circ}C$. Le dernier aliquote est préparé pour être lyophilisé, pesé (matière sèche), broyé et conservé à $-20^{\circ}C$. Le reste des limbes est stocké à $-80^{\circ}C$.

Le collet, le pivot, les pétioles sont pesés à l'état frais puis un aliquote est réalisé pour les analyses C/N total. Cet aliquote est ensuite lyophilisé, pesé (matière sèche), broyé et conservé à $-20^{\circ}C$. Le reste de ces organes est stocké à $-80^{\circ}C$.



Figure III-6 : SPAD (Soil Plant Analysis Development) (Minolta), appareil permettant de mesurer les teneurs relatives en chlorophylles. Deux faisceaux (rouge et infrarouge) sont émis par la pince qui séquestre la feuille. Les faisceaux traversent la feuille et sont captés par la cellule réceptrice. L'énergie photonique est convertie en signal numérique. Le ratio des intensités de lumière rouge (650 nm, absorbée partiellement par les chlorophylles) et infrarouge (>800 nm, non absorbée) permet de définir une teneur relative en chlorophylles (unité SPAD).

II.2 Mesure de la teneur relative en chlorophylles

Le système « Soil Plant Analysis Development » SPAD modèle 502 (Minolta, Japon) permet d'estimer la teneur relative en chlorophylles des feuilles (Rossato *et al.*, 2001 ; Monje et Bugbee, 1992). Ce système possède une fenêtre par laquelle est émise une lumière rouge et infrarouge. Celle-ci, après être passée au travers de la feuille, est captée par un récepteur qui la convertit en un signal électrique analogique. Après amplification et conversion analogique / numérique de ce signal, la valeur SPAD est calculée par le microprocesseur (Figure III-6). Le ratio des intensités lumière rouge (650 nm, partiellement absorbée par les chlorophylles) et lumière infrarouge (>800 nm, non absorbée) permet de déterminer la teneur relative en chlorophylles exprimée en unité arbitraire (ou unité SPAD). Les valeurs SPAD obtenues sont proportionnelles à la teneur en chlorophylles de la feuille. Cette méthode a pour avantage d'être rapide, fiable et non destructive (Manetas *et al.*, 1998) et a été utilisée avec succès sur les feuilles de colza dans de nombreuses études antérieures (Rossato *et al.*, 2001).

II.3 Mesure de l'activité photosynthétique

L'activité photosynthétique est mesurée grâce à un analyseur de photosynthèse LI-6400 (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA). Cet appareil piloté par une interface logicielle mesure et enregistre 48 variables liées aux teneurs en CO₂ et H₂O, aux températures et aux intensités lumineuses. Le LI-6400 se compose de 2 parties :

- la console qui assure le pilotage de l'appareil, la régulation en gaz et la gestion des données.
- la chambre de mesure, c'est à dire la pince où l'on insère la feuille à analyser. Elle comporte les unités de mesure infrarouge d'O₂ et d'H₂O, ainsi que les modules permettant de modifier la température, l'humidité et l'éclairage.

La majeure partie des variables est calculée sur la base de la mesure différentielle du CO₂ et de la vapeur d'eau contenus dans un flux d'air avant et après mise en contact avec une portion de limbe foliaire. Les capteurs de mesure sont deux IRGA (Infra Red Gas Analyser) affectés l'un à l'air de référence, l'autre à l'air soumis à l'échantillon.

Le rayonnement PAR à l'intérieur et à l'extérieur de la chambre, la température ambiante du bloc de mesure et de la feuille, et la vitesse du flux d'air, sont mesurés simultanément. A la suite de nombreux tests, le rayonnement PAR à l'intérieur de la chambre a été fixé à 1000 $\mu\text{moles de photons}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (température du bloc à 23°C).



Figure III-7 : Spectromètre de masse de type IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometer de marque Isoprime, GV Instrument, Manchester, Royaume-Uni) couplé à un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) utilisé pour déterminer les teneurs en N et C, et le niveau de marquage en ^{15}N dans les différents tissus de colza.

Le Li-6400 est utilisé selon la procédure décrite par Beauclair et Jacquet (2003). Lors de l'analyse, la concentration en CO₂ est maintenue à un niveau constant en prélevant l'air à l'extérieur de la serre. Cette valeur reste très stable au cours des mesures et se situe aux environs de 400 ppm. Les mesures ont été effectuées entre 10 h et 16 h. Pour chaque condition, les mesures ont été effectuées sur 3 séries de feuilles sélectionnées sur 3 pots différents. Les mesures d'activité photosynthétique sont réalisées dans l'étude physiologique et biochimique des phases ultimes du développement d'une feuille de colza présentée dans le chapitre VI. Compte tenu de la durée de l'analyse, les mesures n'ont pas été réalisées les jours de récolte mais à des temps intermédiaires, c'est-à-dire après 2, 5, 7, 11, 13, 18 et 22 jours de traitement.

III. MÉTHODES D'ANALYSES ÉLÉMENTAIRES (AZOTE ET CARBONE) ET BIOCHIMIQUES

III.1 Détermination des teneurs en carbone (C) et en azote (N) total et des flux d'azote remobilisé

III.1.1 Dosage du carbone total, de l'azote total et analyse du rapport isotopique ¹⁵N/¹⁴N

Le système utilisé pour les analyses isotopiques comprend un spectromètre de masse de type Isotope Ratio Mass Spectrometer, (IRMS ; Figure III-7) de marque Isoprime (GV Instrument, Manchester, Royaume-Uni) couplé à un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Eurovector, Milan, Italie) permettant de mesurer le rapport ¹⁵N/¹⁴N.

Les échantillons végétaux sous forme de poudre sèche très finement broyée, sont pesés dans des nacelles d'aluminium de 4 mm de diamètre et de 6 mm de hauteur de façon à injecter environ 50 µg d'azote dans le spectromètre de masse isotopique. Les échantillons ainsi conditionnés sont disposés dans l'injecteur de l'analyseur élémentaire en tête de la colonne d'oxydation. Leur injection dans la colonne d'oxydation est réalisée dans un flux d'hélium en légère surpression, ce qui évite toute contamination par le gaz carbonique et l'azote moléculaire de l'air. La combustion des échantillons a lieu en tête de la colonne d'oxydation (constituée d'oxyde de chromium et d'oxyde de cobalt et argent à une température de 1000°C). Une élévation de température (1600°C) assurée par un apport d'oxygène conduit à une combustion totale des échantillons. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon se

trouve donc sous forme de N₂, CO₂, H₂O et d'oxydes d'azote. La réduction de ces derniers en N₂ et CO₂ est alors assurée par un passage sur une colonne de cuivre métallique à 600°C (colonne de réduction). Le piégeage de l'eau et du CO₂, s'il s'agit d'une analyse de N₂ seule, est réalisé par passages successifs sur deux colonnes contenant respectivement du perchlorate de magnésium et du « carbosorb » (PDZ Europa Scientific). S'il s'agit d'une analyse de N₂ et CO₂, le CO₂ est dilué dans un plus grand volume d'hélium afin d'obtenir un signal de même intensité que le N₂. Le N₂ et le CO₂ sont ensuite séparés sur une colonne de chromatographie en phase gazeuse maintenue à 45°C avant injection dans le spectromètre de masse isotopique.

Les gaz N₂ et CO₂ sont d'abord ionisés au niveau de la source, situé à l'entrée du spectromètre de masse. Les ions positifs alors formés sont accélérés dans une chambre électrique puis déviés dans un champ électromagnétique. Leur angle de déviation est directement affecté par le rapport de leur masse (m) sur leur charge (z). Toutes les molécules de N₂ ou de CO₂ ionisées étant de même charge, leur angle de déviation dépend uniquement de leur masse. Ainsi, la déviation de l'azote moléculaire de masse 28 (¹⁴N¹⁴N) sera plus importante que celle de masse 29 (¹⁴N¹⁵N), elle-même plus importante que celle de l'azote de masse 30 (¹⁵N¹⁵N). La déviation des molécules de CO₂ sera elle aussi proportionnelle à leur masse (masses 44, 45, 46). Les ions sont ensuite collectés sur trois détecteurs. Les signaux qui en résultent sont ensuite amplifiés puis transmis à un système informatique chargé notamment du traitement des données. La quantification de l'azote est réalisée en faisant la somme des signaux obtenus à partir des masses 28 (¹⁴N¹⁴N), 29 (¹⁴N¹⁵N) et 30 (¹⁵N¹⁵N). L'abondance isotopique en ¹⁵N est alors calculée par l'intermédiaire du rapport des signaux 29/28 pour de faibles excès isotopiques et 30/29 pour des excès isotopiques élevés.

III.1.2 Calcul des quantités d'azote total et de ¹⁵N

Pour l'azote de masse 15, l'abondance (A_N) est directement donnée par le spectromètre de masse. Elle correspond donc à :

$$A_N = \left(\frac{{}^{15}\text{N} \times 100}{{}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N}} \right)$$

avec ¹⁵N = quantité d'azote 15

¹⁴N = quantité d'azote 14

L'excès isotopique (E_N) est la différence entre l'abondance isotopique d'un échantillon et celle d'une référence. Pour l'azote, l'abondance de référence est celle de l'air, soit 0,3663% ± 0,0004 (Junk et Svec, 1958).

Par conséquent, $E_N (\%) = A_N (\%) - 0,3663$

Pour un organe donné, la quantité d'azote total qN_{tot} en mg par plante est donnée par :

$$qN_{tot} = (\% N \times MS) / 100$$

avec % N = pourcentage d'azote dans la matière sèche

MS = matière sèche d'un organe exprimée en mg par plante

III.1.3 Méthodes de calcul des flux d'azote remobilisé

La méthode de calcul des flux est celle utilisée précédemment par Avice *et al.* (1996). Le calcul des excès isotopiques ^{15}N décrit précédemment (cf. § III.1.2) permet de déterminer les quantités de ^{15}N dans les différents organes à chaque date de récolte. La quantité de ^{15}N absorbé par chaque organe a été corrigée en fonction de la moyenne du ^{15}N total absorbé par la plante entière déterminée à partir de toutes les répétitions biologiques.

La période de marquage, réalisée du semis jusqu'à l'application des traitements permet d'obtenir une distribution uniforme à l'intérieur des différents organes et des différents pools d'azote. Toute remobilisation de ^{15}N est proportionnelle à la remobilisation de l'élément N (^{15}N et ^{14}N). Deux types d'organes peuvent ainsi être distingués :

- les organes dits « sources » (NRs) sont caractérisés par la disparition d'une quantité de traceur durant un temps Δt de traitement. Par exemple entre t_0 (fin de la période de contact avec le traceur) et $t_0 + \Delta t$, la remobilisation d'azote dans ces organes, pour chaque intervalle de temps au cours de la cinétique, peut donc être calculée à partir de l'équation (1) :

$$NRs = ({}^{15}N_{t_0} - {}^{15}N_{t_0 + \Delta t}) \times (N_{t_0 + \Delta t} / {}^{15}N_{t_0 + \Delta t}) \quad (1)$$

Avec ${}^{15}N_{t_0}$ = quantité de ^{15}N présent dans l'organe considéré à la fin de la période de contact avec le traceur.

Et ${}^{15}N_{t_0 + \Delta t}$ = quantité de ^{15}N présent dans l'organe considéré au temps Δt de traitement.

Et $N_{t_0 + \Delta t}$ = quantité d'azote total (^{14}N et ^{15}N) présent dans l'organe considéré au temps Δt de traitement.

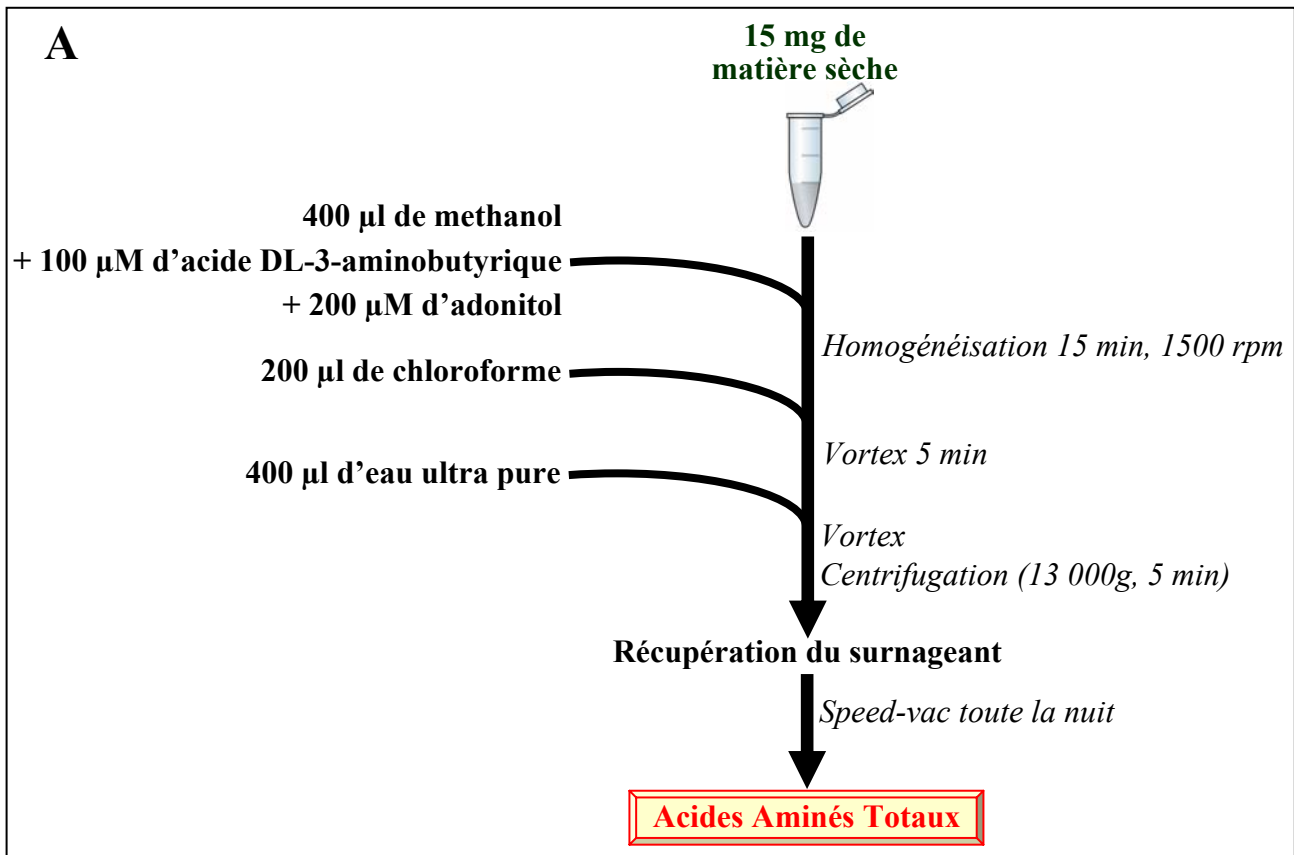
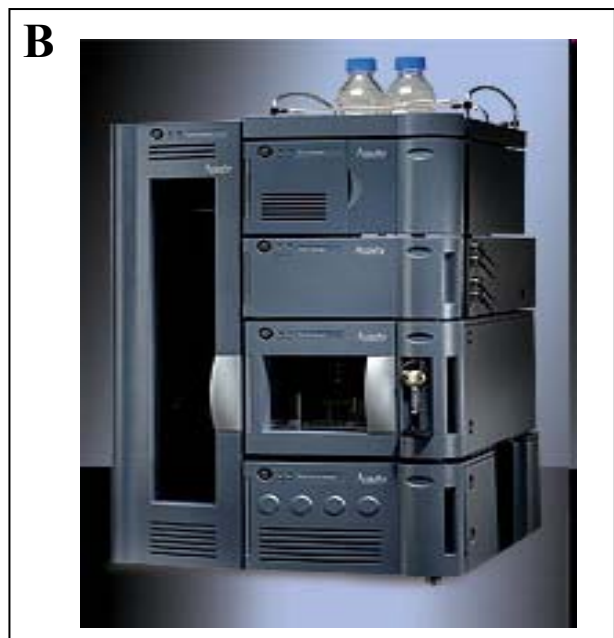


Figure III-8 : (A) Protocole expérimental utilisé pour l'extraction d'acides aminés à partir de matière sèche de feuille de colza. Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante. (B) Système UPLC Acquity™ (Waters corp., Milford, USA) utilisé par l'équipe APBV de l'Université de Rennes 1 pour le dosage des acides aminés.



- les organes dits « puits » sont définis par une augmentation de leur contenu en ^{15}N pendant un temps Δt de traitement. La quantité d'azote reçue à partir de la remobilisation (NRp) est calculée à partir de l'équation (2) :

$$\text{NRp} = \sum \text{NRs} \times (\sum ^{15}\text{N}_{t_0 + \Delta t} / \sum ^{15}\text{N}_{t_0}) \quad (2)$$

Avec $\sum \text{NRs}$ = somme de l'azote remobilisé dans les organes sources.

et $\sum ^{15}\text{N}_{t_0 + \Delta t}$ = quantité de ^{15}N présent dans l'organe considéré au temps Δt de traitement.

et $\sum ^{15}\text{N}_{t_0}$ = somme des quantités de ^{15}N présent dans l'organe considéré au temps Δt de traitement.

Ces calculs de flux seront utilisés pour l'étude des transferts d'azote endogène chez des plants de colza cultivés sur différents niveaux de fertilisation azotée (Chapitre V). Le marquage des plantes au ^{15}N selon la méthode « pulse-chase » a permis de quantifier l'azote foliaire remobilisé et d'identifier le rang foliaire présentant des vitesses contrastées de remobilisation de l'azote.

III.2 Méthode d'analyses des acides aminés

Les extractions et analyses des acides aminés ont été réalisées par le laboratoire UMR INRA 1 118 Amélioration des Plantes et Biotechnologies (APBV) de l'Université de Rennes (collaboration avec Françoise Lecahérec).

Les étapes d'extraction des acides aminés sont détaillées dans la Figure III-8A. Cette extraction au méthanol permet d'obtenir un culot d'acides aminés repris ensuite dans 5 μL d'eau ultra pure. La préparation des échantillons est réalisée par le kit AccQ Tag Ultra Derivatization Kit (Waters corp., Milford USA) en ajoutant 35 μL de tampon borate et 5 μL d'AccQ-FluorTM (AQC reagent kit, Waters) pendant 10 minutes. La réaction est stoppée en mettant les échantillons à 55°C pendant 10 minutes. Les acides aminés sont ensuite séparés grâce au système UPLC AcquityTM (Waters corp., Milford USA ; Figure III-8B) en injectant 1 μL d'échantillon sur une colonne C₁₈ BEH UPLC AcquityTM (1,7 μm 2.1 x 100 mm) à 55°C. L'élution des acides aminés s'effectue à un débit de 0,7 mL.min⁻¹ avec de l'ultra éluant AccQ•Tag dilué 10 fois et de l'acétonitrile selon un gradient d'élution. Les acides aminés sont ensuite détectés à 260 nm grâce à une photo-diode. L'intégration et l'identification des chromatogrammes sont réalisées manuellement avec le logiciel Apex Chromatography

Workstation v 2.15. Les chromatogrammes des acides aminés standards permettent d'identifier et de quantifier chaque acide aminé et d'en déterminer la teneur (en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS). Au préalable, des courbes d'étalonnage de chacun des standards ont été réalisées ($R^2 > 0.96$).

IV. MÉTHODES D'ANALYSES PROTÉOMIQUES

IV.1 Méthodes d'analyses quantitatives et qualitatives des protéines

IV.1.1 Extraction et dosage des protéines totales et solubles

Deux cent milligrammes de feuilles de colza sont broyées dans de l'azote liquide en présence de 50 mg de poly(vinylpyrrolidone) (PVPP). L'addition de PVPP permet de fixer les polyphénols végétaux qui pourraient interférer notamment lors du dosage colorimétrique des protéines. Par la suite deux cas doivent être considérés :

- Dans le cas d'une extraction de protéines solubles (EXTRACTION 1), le broyat est solubilisé dans 300 μL de tampon d'extraction Mc Ilvaine (citrate 100 mM, sodium phosphate 200 mM, pH 6,8). Après centrifugation (1h, 12 000 g, 4°C), le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré. Le culot est à nouveau centrifugé pendant 5min, à 12 000 g et à 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré puis le volume est ajusté à 300 μL avec du tampon Mc Ilvaine.
- Dans le cas d'une extraction de protéines totales (EXTRACTION 2), le broyat est solubilisé dans 2 mL d'acétone contenant 10% TCA (p/v). Après centrifugation (3 min, 16 000 g, 4°C), le culot protéique subit une étape de purification décrite dans le paragraphe IV.1.3 « techniques d'électrophorèse bidimensionnelle ».

La concentration des protéines est déterminée par dosage colorimétrique en microplaque selon la méthode de Bradford (1976). A 10 μL d'échantillon dilué 5 à 10 fois sont ajoutés 200 μL de réactif Bradford dilué 4 fois (Bio-Rad Protein Assay). L'absorbance est lue à 570 nm par le lecteur de microplaques MRX (DYNEX, Guyancourt, France). La quantité de protéines est déterminée par référence à une droite étalon, établie à partir de sérum d'albumine bovine (BSA). Une fois dosés, les extraits protéiques sont ensuite utilisés pour les analyses électrophorétiques (SDS-PAGE et 2-DE) et pour l'étude des activités protéolytiques ou anti-protéolytiques.

Tableau III-II : Composition du tampon Laemmli concentré deux fois (D'après Laemmli, 1970).

SDS 10%	4 mL
Tris-HCl (50 mM, pH 6,8)	1,2 mL
Glycérol 99%	2 mL
Bleu de Bromophénol 0,1%	1 mL
Eau ultra pure	1,8 mL
Volume total de Laemmli 2×	10 mL

Tableau III-III : Préparation et composition du gel concentration à 5,5% d'acrylamide et de séparation à 15% d'acrylamide pour l'électrophorèse SDS-PAGE (valeurs pour 1 gel de 10x10 cm).

	Gel de concentration	Gel de séparation
Acrylamide 30% (Duracryl)	1,5 mL	6,1 mL
Tampon Tris-Base (0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4%)	2 mL	-
Tampon Tris-Base (1,5 M, pH 8,8)	-	3,13 mL
Eau ultra pure	4,3 mL	3,13 mL
SDS à 10% (p/v)	-	125 µL
		<i>Mélanger 10 minutes</i>
APS à 10% (p/v)	46 µL	31,25 µL
Temed	11 µL	137,5 µL
	<i>Polymérisation en 20 min</i>	<i>Polymérisation en 1 h</i>

Tableau III-IV : Méthode de coloration au nitrate d'argent selon Blum *et al.* (1987) utilisée pour la révélation des protéines séparées en SDS-PAGE ou en électrophorèse bidimensionnelle.

Étapes	Solutions de traitement	Durée de traitement
Fixation	Méthanol 50% (v/v), acide acétique glacial 12% (v/v), 0,5 µg.mL ⁻¹ formaldéhyde 37%	1 heure au minimum
Lavages	Éthanol 50% (v/v)	3 fois 2 minutes
Pré-traitement	0,2 mg.mL ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₃ , 5 H ₂ O	1 minute
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 30 secondes
Imprégnation	2 mg.mL ⁻¹ AgNO ₃ , 0,75 µg.mL ⁻¹ formaldéhyde 37%	20 minutes
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 30 secondes
Révélation	60 mg.mL ⁻¹ Na ₂ CO ₃ , 4 µg.mL ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₃ , 5 H ₂ O, 0,5 µg.mL ⁻¹ formaldéhyde 37%	2 minutes
Arrêt	Méthanol 50% (v/v), acide acétique glacial 12% (v/v)	10 minutes
Lavages	Eau ultra pure	3 fois 30 secondes

IV.1.2 Techniques d'électrophorèse mono-dimensionnelle (SDS-PAGE)

Ce type d'électrophorèse réalisé sur les extraits de protéines solubles en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS), permet de séparer des protéines selon leur masse moléculaire. Les molécules de SDS masquent les charges propres des protéines et leur confèrent alors une charge négative. Au cours de l'électrophorèse, la migration des polypeptides (chargés négativement) s'effectue sous l'influence d'un champ électrique et leur séparation en fonction du poids moléculaire est réalisée par le maillage du gel de polyacrylamide.

La préparation des échantillons diffère dans le cas d'une électrophorèse de type SDS-PAGE non dénaturante et dénaturante :

- La dénaturation s'effectue en chauffant à 100°C pendant 5 minutes les 3 µg de protéines solubles préparés dans le tampon Laemmli 2× (Tableau III-II) contenant 5% de β-mercaptoéthanol (v/v), un agent réducteur des ponts disulfures.
- Lors d'une SDS-PAGE non dénaturante, les échantillons sont simplement préparés dans le tampon Laemmli 2×, sans β-mercaptoéthanol.

La séparation des protéines solubles en fonction de leur poids moléculaire (SDS-PAGE) est réalisée sur des gels verticaux coulés entre des plaques de verre 10x10x0,08 cm (système OWL). La concentration en Duracryl (polymère d'acrylamide modifié à résistance mécanique élevée, COGER) est de 5,5% pour le gel de concentration et de 15% pour le gel de séparation. La composition de ces 2 types de gels est indiquée dans le Tableau III-III. La solution d'ammonium persulfate (APS) et le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine) permettent respectivement d'initier et de catalyser la polymérisation des gels. L'électrophorèse s'effectue dans un tampon de migration Tris/SDS/Glycine (25 mM / 0,1% / 192 mM ; pH 8,8 ; Laemmli, 1970). La migration dure environ 2 heures (200 V et 75 mA) à une température maintenue à 15°C et est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol, utilisé comme marqueur de front de migration, arrive à la base des gels.

Les protéines séparées par électrophorèse sont révélées par coloration au nitrate d'argent en suivant la méthode de Blum *et al.* (1987) décrite dans le Tableau III-IV.

IV.1.3 Mise au point de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE)

Cette technique est la combinaison de deux types d'électrophorèses, l'isoélectrofocalisation (IEF) et la SDS-PAGE. Dans un premier temps, l'IEF fait migrer les

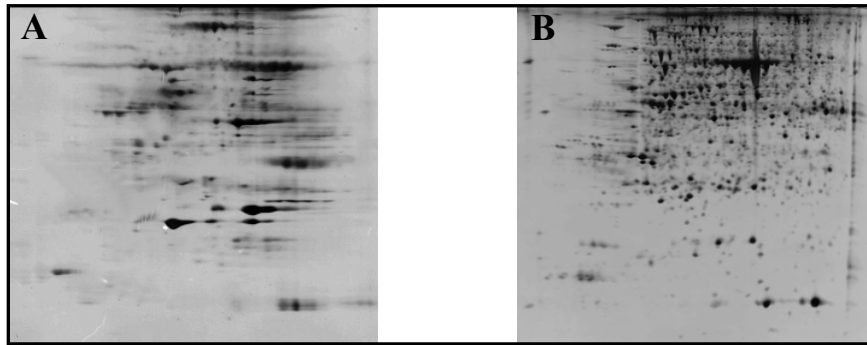


Figure III-9 : (A) Profil d'électrophorèse bidimensionnelle réalisée à partir de protéines solubles selon extraites dans le tampon Mc Ilvaine puis purifiées par le kit ReadyPrep 2D Clean-up (Bio-Rad) et resolubilisées dans un tampon de réhydratation (Destreak contenant 10 mM de TBP et 2% de tampon IPG (ampholytes pH 3-10), GE-Healthcare). (B) Profil d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines totales extraites selon le nouveau protocole mis au point au cours de la thèse (cf. § IV.1.3.1 adapté de Wang *et al.*, 2003), et resolubilisées dans du tampon R2D2 (Mechin *et al.*, 2003).

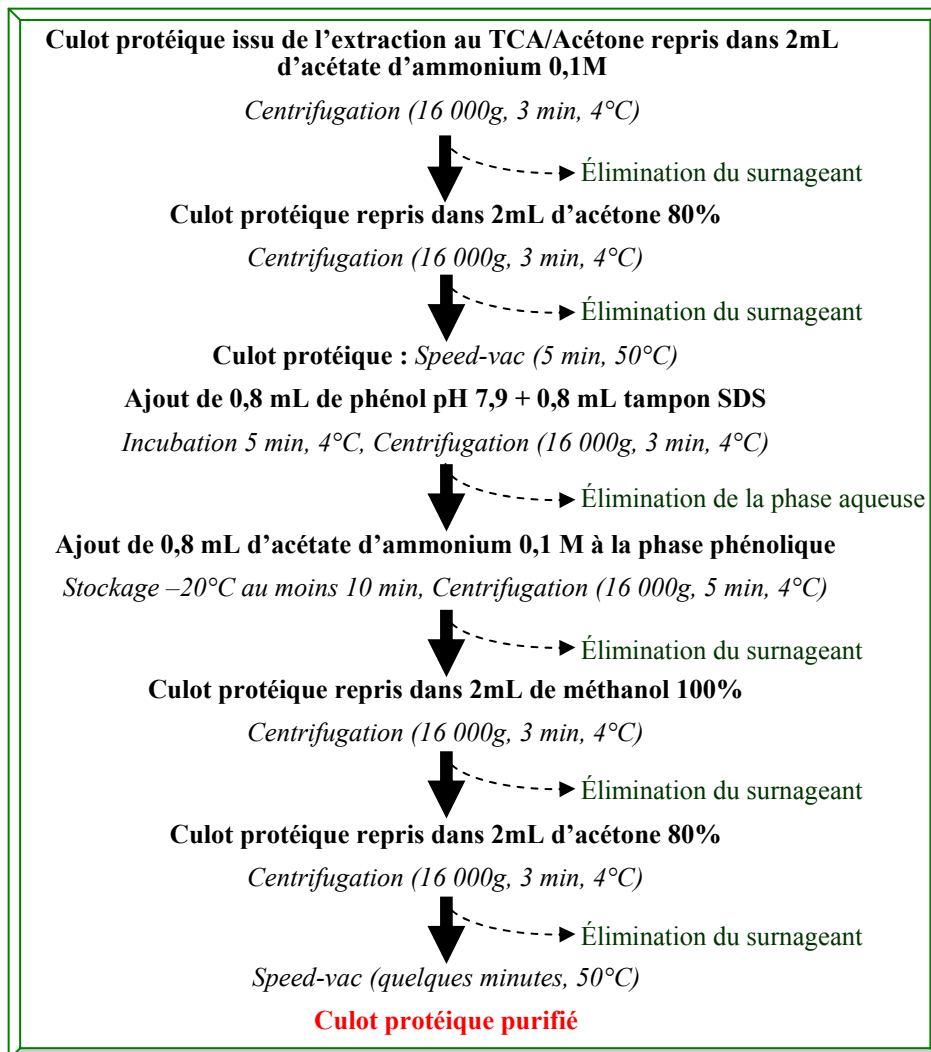


Figure III-10 : Protocole d'extraction et de purification des protéines totales de feuilles de colza utilisé pour l'électrophorèse bidimensionnelle (d'après Wang *et al.*, 2003).

protéines dans un gel constitué d'un gradient de pH, vers une position correspondant à leur point isoélectrique. Dans un second temps, la SDS-PAGE assure la séparation en fonction du poids moléculaires des protéines.

Au début de la thèse, les protocoles d'extraction de protéines et les tampons de resolubilisation utilisés au laboratoire ne convenaient pas à la préparation de gels 2-DE de feuilles de colza (Figure III-9A). En effet, les protéines solubles extraites dans le tampon Mc Ilvaine étaient purifiées par le kit ReadyPrep 2D Clean-up (Bio-Rad). Le culot protéique issu de cette purification était resolubilisé dans un tampon de réhydratation (Tampon Destreak contenant 10 mM de Tributylphosphine (TBP) et 2% de tampon IPG (ampholytes pH 4-7, GE-Healthcare). Le tampon utilisé durant cette étape était peu approprié puisque la resolubilisation de l'extrait était médiocre et longue. Le résultat final aboutissait à une séparation et une résolution des spots de très mauvaise qualité (Figure III-9A).

Une recherche bibliographique approfondie ainsi que des contacts pris avec des chercheurs de laboratoires caennais (LME¹, LBBM²) et une association (SFEAP³) ont permis d'identifier les protocoles les plus appropriés à l'étude du protéome de la feuille de colza. La méthode d'extraction/purification des protéines totales retenue est celle adaptée de Wang *et al.* (2003). De plus, afin d'obtenir une séparation et une resolubilisation optimales des spots protéiques avant IEF (étape cruciale de l'électrophorèse 2-DE), les tests réalisés avec différents tampons ont permis de retenir le tampon R2D2 décrit par Mechin *et al.* (2003). La Figure III-9B présente un exemple de gels 2-DE qui démontrent que la séparation et la résolution des protéines foliaires sont nettement améliorées par cette nouvelle méthode. Les détails concernant l'ensemble de cette mise au point sont décrits ci-après.

IV.1.3.1 Purification des protéines totales

La purification des protéines totales est réalisée selon le protocole adapté de Wang *et al.* (2003) (Figure III-10).

Le culot protéique obtenu après précipitation au TCA/Acétone (10% TCA dans l'acétone, EXTRACTION 2 protocole au § IV.1.1) est repris dans 2 mL d'acétate d'ammonium 0,1 M dissous dans du méthanol à 80%. Après homogénéisation et centrifugation (16 000 g, 3 minutes, 4°C), le culot est lavé avec 2 mL d'acétone à 80% puis centrifugé à nouveau (16 000

¹LME : Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, ²LBBM : Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marine, ³SFEAP : Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique

Tableau III-V : Composition du tampon de solubilisation R2D2 (D'après Mechin *et al.*, 2003).

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

Tableau III-VI : Étapes successives de l'isoélectrofocalisation (IEF) des protéines sur gel-bandelette de 18 cm, pH 4-7 (système PROTEAN IEF (Bio-Rad)).

Étapes	Tension (V)	Durée
1	250	15 minutes
2	10000	2 heures
3	10000	8 heures

Arrêt lorsque le voltage cumulé a atteint 55 000 - 60 000 V

Tableau III-VII : Composition du tampon d'équilibration/réduction et du tampon d'alkylation.

	Équilibration/Réduction	Alkylation
Tris-Base	300 mM	300 mM
SDS	3% (p/v)	3% (p/v)
Tris-HCl	75 mM	75 mM
DTT	65 mM	-
Iodoacétamide	-	50 mM
Bleu de bromophénol	-	0,5%

g, 3 minutes, 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot est séché sous vide (Speedvac concentrator 5301, Eppendorf, France) pendant 5 minutes à 50°C. Le culot est ensuite repris dans 0,8 mL de phénol pH 7,9 et 0,8 mL de tampon SDS (30% saccharose (p/v), 2% SDS (p/v), 0,1 M Tris-HCl (p/v), 0,5% β-mercaptoéthanol (v/v), pH 8). Après une incubation de 5 minutes à 4°C et une centrifugation (16 000 g, 3 minutes, 4°C), la phase phénolique récupérée dans un nouveau tube, est complétée avec 1,75 mL d'acétate d'ammonium 0,1 M puis stockée à -20°C au moins 10 minutes. L'acétate d'ammonium précipite les protéines qui peuvent ainsi être recueillies par centrifugation (16 000 g, 5 minutes, 4°C). Le culot protéique est ensuite lavé avec 1,75 mL de méthanol 100% puis d'acétone 80%. Quelques minutes d'évaporation sous vide permettent d'éliminer les résidus d'acétone.

IV.1.3.2 Solubilisation des protéines et première dimension (IEF)

Le culot protéique obtenu précédemment (§ IV.1.3.1) est solubilisé dans un tampon de solubilisation R2D2 (Tableau III-V ; Mechin *et al.*, 2003). Les protéines solubilisées sont dosées selon la méthode de Bradford (1976) puis 125 µg d'extrait protéique sont préparés dans un volume de 330 µL de R2D2 et déposés sur le plateau du système PROTEAN IEF (Bio-Rad). Le gel d'acrylamide IEF (gel IEF de 18 cm, pH 4-7 ; GE Healthcare) est mis au contact avec l'extrait protéique pendant une heure afin de faciliter l'imprégnation des protéines sur le gel. L'ensemble est recouvert d'huile minérale (environ 3 mL) dans le but d'éviter les phénomènes d'évaporation pendant l'IEF. Cette étape dite de réhydratation est réalisée de manière active car elle s'opère à 50 µA/gel pendant 12 à 16 heures.

L'étape de réhydratation active est suivie de l'IEF au cours de laquelle les protéines dénaturées par l'urée contenue dans le tampon R2D2, migrent en fonction de leurs points isoélectriques respectifs. L'IEF est effectuée jusqu'à atteindre un voltage cumulé de 55 000 – 60 000 V (Tableau III-VI). Après lavage avec de l'eau ultra pure, les gels sont équilibrés avec du tampon contenant du SDS (Tableau III-VII) afin de charger négativement toutes les protéines. Deux étapes d'équilibration sont alors nécessaires :

- La première dite de réduction (15 minutes) en présence de DTT (65 mM) est réalisée dans le but de bloquer les fonctions thiols empêchant ainsi la formation de ponts disulfures.
- La seconde étape dite d'alkylation (15 minutes) avec de l'iodoacétamide (50 mM), prévient la ré-oxydation des protéines au cours de l'électrophorèse et alkyle l'agent réducteur (DTT), minimisant ainsi les traces verticales en deuxième dimension. Lors

Tableau III-VIII : Préparation et composition du gel de séparation à 12% d'acrylamide pour l'électrophorèse SDS-PAGE (valeurs pour 1 gel de 23x23x0,3 cm).

Acrylamide 30% (Duracryl)	50,2 mL
Tampon Tris-Base (1,5 M, pH 8,8)	27,5 mL
Eau ultra pure	30,8 mL
SDS à 10% (p/v)	1,1 mL
<i>Laisser 10 minutes à 30°C</i>	
APS à 10% (p/v)	300 µL
TEMED	55 µL
<i>Polymérisation en 1 heure</i>	

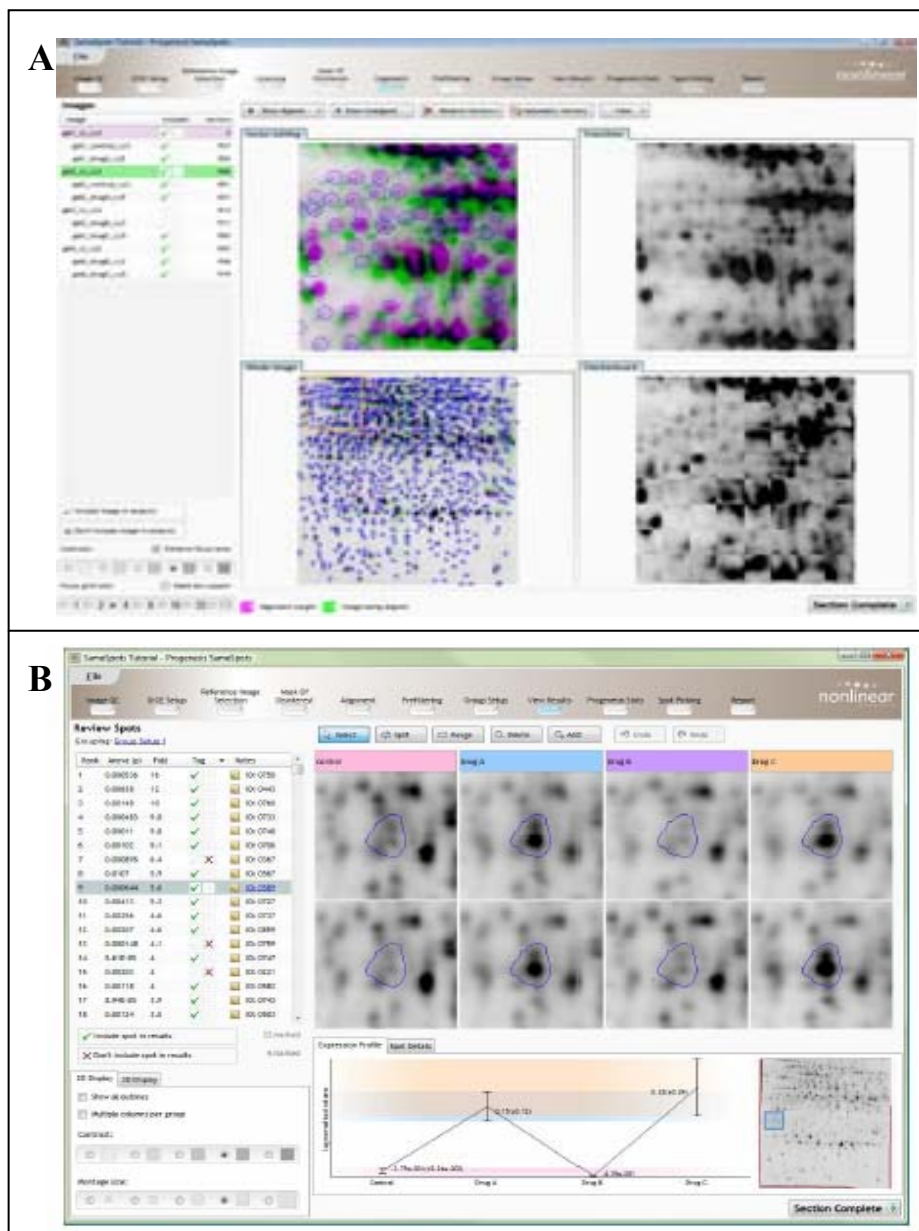


Figure III-11 : Alignement (A) et validation manuelle des spots protéiques (B) par le logiciel Progenesis SameSpots v3.0.

de cette étape, le tampon contient également du bleu de bromophénol (0,5%) permettant de suivre le front de migration de la deuxième dimension.

IV.1.3.3 Deuxième dimension (SDS-PAGE)

La deuxième dimension est réalisée sur des gels verticaux coulés entre des plaques de verre de 23x23x0,3 cm dans la cuve à électrophorèse (système Investigator, MILLIPORE). La concentration en polyacrylamide du gel de séparation est de 12% (Tableau III-VIII). La migration est réalisée dans une cuve placée sous-tension contenant 10 litres de tampon de migration Tris/SDS/Glycine 1X (2,5 mM/0,01%/19,2 mM, pH 8,8). Le haut des gels est recouvert par 2 litres de tampon Tris/SDS/Glycine 2X (5 mM/0,02 %/38,4 mM, pH 8,8). La migration dure environ 5 heures à température ambiante (500 V, 200 W) et est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol (marqueur de front de migration), arrive à la base des gels. Il est ensuite possible de colorer les gels au nitrate d'argent (selon le protocole de Blum *et al.* (1987) décrit § IV.1.2) ou au bleu de Coomassie. La coloration au bleu de Coomassie est réalisée en incubant les gels pendant 2 heures dans un bain colorant à 0,25% (p/v) de Bleu de Coomassie R-250 préparé dans 45% (v/v) de méthanol, 45% d'eau et 10% (v/v) d'acide acétique. Le gel est ensuite décoloré dans une solution (méthanol 45%, eau 45% et acide acétique 10%).

IV.1.4 Analyse des gels

Les gels sont scannés à l'aide du ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (Perkin Elmer) dans le but d'être analysés par le logiciel Progenesis SameSpots v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Les gels sont alignés afin de corriger les différences de migration et de séparation (Figure III-11A). Les trois réplicats sont regroupés pour réaliser une analyse statistique. Les spots identifiés automatiquement par le logiciel, sont ensuite validés manuellement (Figure III-11B). Après soustraction du bruit de fond, le volume de chaque spot est normalisé permettant ainsi de comparer les spots de chaque groupe. L'abondance de chaque spot au cours de la cinétique est présentée sous la forme de la moyenne des répétitions. La variabilité des résultats est donnée sous la forme de la moyenne \pm l'erreur standard (ou SE, « standard error »). Une analyse factorielle des variances de type ANOVA est ensuite réalisée par le « logiciel Minitab 13 for Windows version 13-31 » (2000) (ANOVA à modèle linéaire généralisé). L'ANOVA nécessite un respect de normalisation des valeurs analysées et de l'égalité des variances, vérifiées respectivement par les tests de Ryan-Joiner et de Barlett. Le test de comparaisons multiples choisis est le test de Turkey, au seuil α

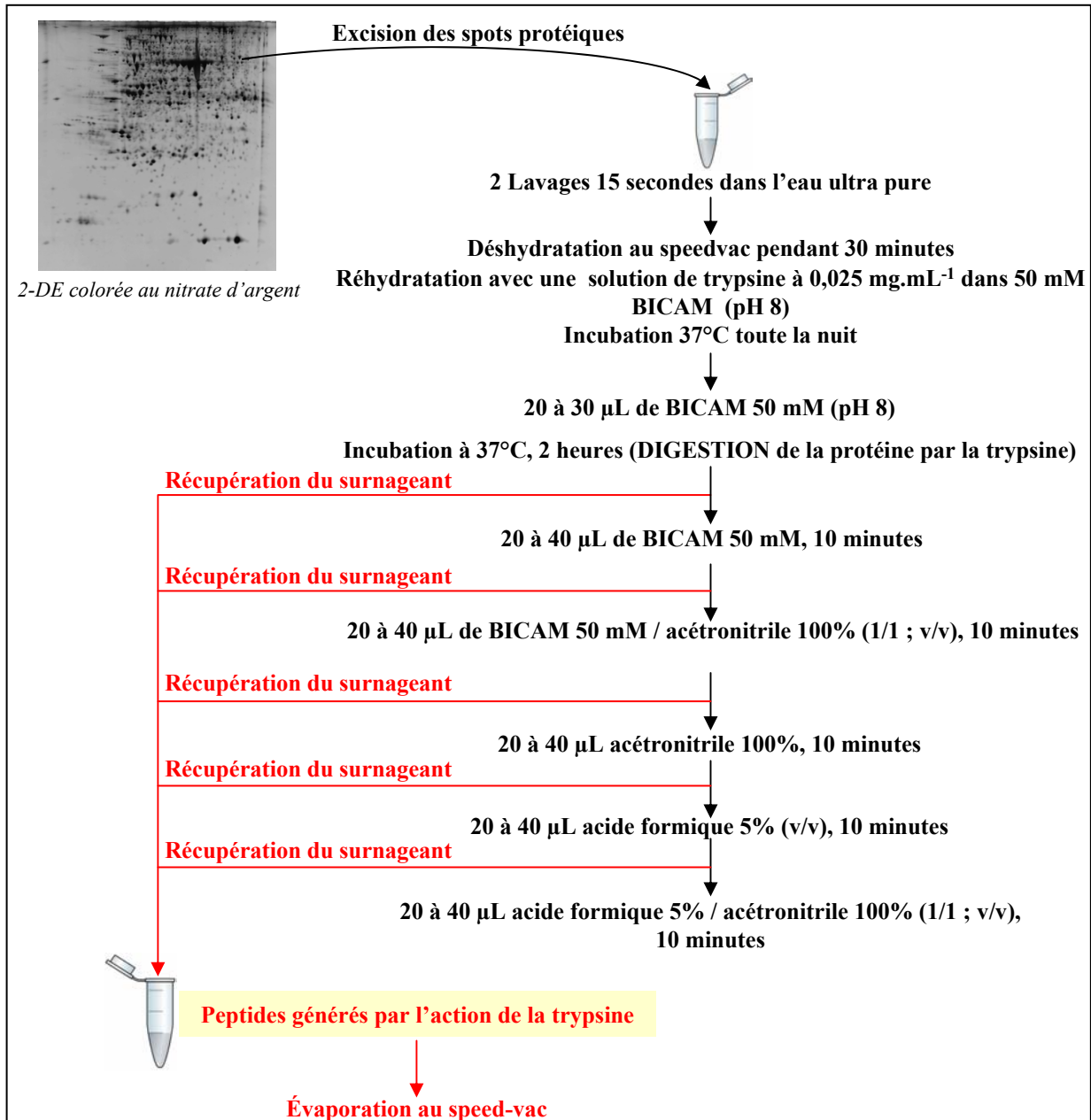


Figure III-12 : Protocole de digestion trypsique des spots protéiques d'intérêt adapté de Gharahdaghi *et al.* (1999). BICAM : Bicarbonate d'ammonium

= 5%. Si $P < 0,05$, les différences seront significatives. Cette analyse statistique a permis de caractériser les spots protéiques spécifiquement induits au cours du processus de sénescence, qui sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse.

IV.1.5 Séquençage des protéines d'intérêt par ESI-LC MS/MS

L'identification par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) permet de mesurer la masse des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines et de fragmenter ces mêmes peptides pour obtenir une information supplémentaire sur leur structure. Avant d'être introduits dans le spectromètre de masse, les peptides peuvent être séparés en amont par l'intermédiaire d'une chaîne chromatographique liquide haute performance (HPLC). La séparation des peptides par HPLC permet également de travailler sur des mélanges protéiques complexes. Ces mélanges peuvent être produits par purification partielle (électrophorèse) ou fractionnement cellulaire. Ces appareils sont particulièrement adaptés à l'identification de protéines issues d'organismes dont les génomes ne sont pas séquencés, mais qui sont fortement conservées chez d'autres organismes.

L'identification de protéines a été réalisée au niveau des plate-formes « Spectrométrie de masse » de Caen (Chapitre IV) et de Rouen (Chapitre V). Grâce à un équipement automatisé, la collaboration avec la plate-forme de Rouen a permis un gain de temps au niveau du séquençage réalisé dans le Chapitre V.

Plateforme de Spectrométrie de masse de Caen (IFR ICORE 146)

Le séquençage des protéines nécessite au préalable la digestion trypsique des protéines selon le protocole adapté de Gharahdaghi *et al.* (1999). Les spots d'intérêt sont excisés des gels, découpés en morceaux et placés dans des eppendorfs. Le protocole de digestion trypsique est détaillé dans la Figure III-12. Les peptides générés sont ensuite dissous dans 10 μL d'acide formique 0,1% sous l'action d'un bain à ultrasons.

L'identification des peptides est réalisée par un couplage de LC/MSD trap (Agilent Technologies) une chromatographie liquide de haute performance (Surveyor LC) avec un électrospray source d'ion (ESI) de spectrométrie de masse en tandem équipée d'une trappe d'ions (LCQ DecaXP, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Les peptides sont séparés sur colonne C_{18} (ThermoHyPurity C_{18} 150 \times 0.18) à l'aide d'un gradient linéaire (débit : 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) d'éluant A (eau ultra pure contenant 0,1% d'acide formique) et d'éluant B (eau ultra pure contenant 0,1% acétonitrile). La sortie de la colonne est connectée à une interface électrospray munie de la technologie Zspray. Les données sont acquises en mode « SCAN »,



Figure III-13 : Digesteur automatique (MultiPROBE II, PerkinElmer) de la plateforme protéomique de Rouen utilisé pour la digestion trypsique des protéines.

considérant seulement les ions positifs. Les données LC MS/MS sont ensuite converties en format DTA permettant ainsi de réaliser des identifications de protéines avec MASCOT Daemon (Matrix Science, London, UK).

Plateforme de Protéomique de Rouen (IFRMP 23)

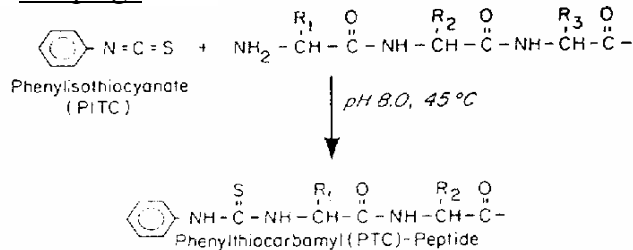
Les spots protéiques sont excisés des gels et placés dans des microtubes ou des plaques 96 puits. La digestion enzymatique par la trypsine est faite grâce à un digesteur automatique (MultiPROBE II, PerkinElmer) (Figure III-13).

Les spots excisés, sont lavés plusieurs fois avec une solution d'hydrogencarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3 , Sigma), puis déshydratés avec de l'acétonitrile et séchés dans un évaporateur-concentrateur pendant quelques minutes. La solution de trypsine 15 ng/ μL (Promega), préparée dans du NH_4HCO_3 à 20 mM, est alors ajoutée sur les morceaux de gel. Les échantillons ainsi préparés sont incubés à 37°C sous agitation toute la nuit. L'échantillon est repris dans une solution d'extraction des peptides (20 μL d'une solution d'acétonitrile 20 mM et 20 μL d'une solution de NH_4HCO_3 20 mM).

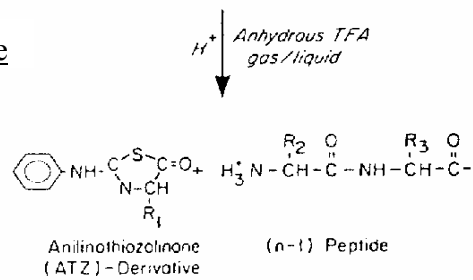
Après digestion à la trypsine, les extraits peptidiques sont resuspendus dans 10 μl d'une solution aqueuse à 5% (v/v) en acétonitrile et 0,2% (v/v) en acide formique. Pour l'analyse nanoLC MS/MS, 5 μl de l'échantillon sont injectés sur le système de nanochromatographie (Ultimate, Dionex, Voisins-le- Bretonneux). Les peptides sont enrichis et dessalés sur une colonne de pré-concentration et séparés sur une colonne C_{18} (Pepmap C_{18} , diamètre interne 75 μm). Un gradient linéaire de 45 min (de 10 à 45% d'acétonitrile dans 0,2% d'acide formique) est programmé à un débit de 200 nL/min. L'éluât est analysé sur le système Q-Trap (Applied Biosystems) équipé d'une source nanospray. Les ions entrant dans le spectromètre de masse sont analysés en continu. Lorsqu'un peptide est détecté, le balayage passe en mode MS/MS afin d'obtenir son spectre de fragmentation. Pour l'identification des protéines, les listes de pics sur les spectres MS/MS sont extraites et comparées aux bases de données contenant des digestats protéiques théoriques (NCBIInr) en utilisant l'outil bioinformatique MASCOT (<http://matrixscience.com>) et son module dédié à l'analyse de spectres MS/MS.

Dans les deux cas, l'identification des protéines est réalisée grâce aux banques de données de NCBIInr (*viridiplantae*) et de *Brassica* EST (*Brassica* Genome Gateway 2007). Au moins deux peptides présentant un score > à 47 ou 51, définis par MASCOT, sont requis pour considérer l'identification positive. Lorsqu'il n'y a qu'un seul peptide, les valeurs des poids

Couplage



Clivage



Conversion

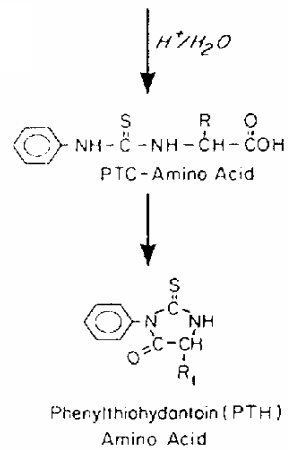


Figure III-14 : Réactions chimiques intervenant dans le micro-séquençage N-terminal par dégradation d'Edman. Cette technique est basée sur la réaction d'un groupement amine terminal libre d'une protéine avec le Phenylisothiocyanate (PITC) ou réactif d'Edman. Ce composé cyclique effectue une attaque nucléophile en milieu basique sur le dernier résidu de la protéine. Le dérivé phénylthiocarbamyl (PTC) du peptide est ensuite clivé par un acide anhydrique et libéré sous la forme d'un dérivé phénylthiohydantoïne (PTH) acide aminé.

moléculaires et pI théoriques et expérimentales ne doivent pas être différents de plus ou moins 25%. Les spectres de chaque peptide sont vérifiés manuellement.

L'alignement des séquences protéiques est réalisé grâce au site internet CLUSTALW (npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html). L'identification des sites de clivage des peptides signaux et des sites de phosphorylation est déterminée par SignalP 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) et NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/), respectivement.

IV.1.6 Identification des protéines par microséquençage N-terminal des protéines

Dans certaines situations, les méthodes d'identification protéique après digestion trypsique et analyse LC MS/MS précédemment décrites (§ IV.1.5) ne donnent pas des résultats exploitables. Dans ce cas, nous avons eu recours à la méthode de microséquençage N-terminal des protéines. Les protéines d'intérêt sont excisées à partir des gels 2-DE réalisés avec 900 µg de protéines et colorés au bleu de Coomassie. Les spots sont incubées une nuit sous agitation dans un tampon d'extraction afin d'extraire passivement les protéines du gel. La solution est ensuite éluée sur un système ProSorb (Applied Biosystems) afin de fixer par filtration la protéine sur un disque de polyvinylidène difluoride (PVDF, Immobilon-P, Proteigene, Saint-Marcel, France). Le disque est ensuite inséré dans un microséquenceur automatique (modèle Procise 494, Applied Biosystems). Le principe du séquençage est basé sur la réaction de dégradation d'Edman dont les étapes sont résumées dans la Figure III-14.

Il se produit tout d'abord un couplage de la protéine au PhenylIsoThioCyanate (PITC) puis un clivage par l'acide TriFluoroAcétique (TFA) qui permet de séparer le 1^{er} acide aminé l'extrémité N terminale (Nt) de la protéine sous forme de dérivé AnilinoThioZolinone (ATZ). Cet acide aminé-ATZ est ensuite transféré dans une chambre de conversion dans laquelle il est converti en acide aminé-PhenylThioHydantoin (PTH). Ce dernier est injecté sur une colonne HPLC (phase inverse greffée en C18) et détecté à 269 nm, et ainsi de suite pour les acides aminés suivants. Comme chaque acide aminé possède un temps de rétention bien défini, une comparaison avec un chromatogramme, réalisé à partir d'acides aminés standard, permet d'identifier le résidu.

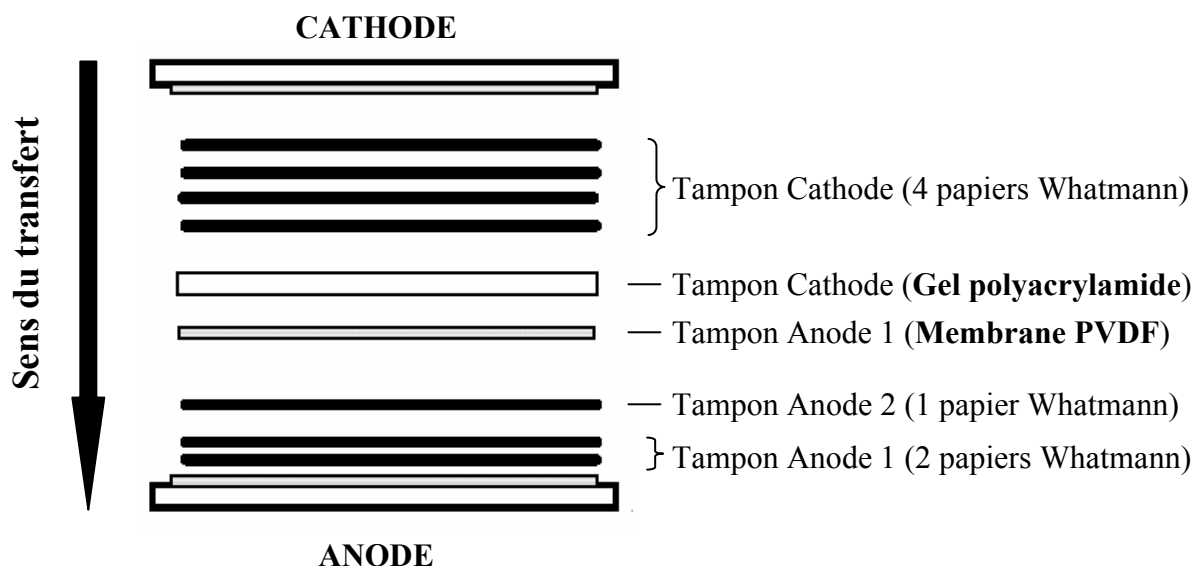


Figure III-15 : Dispositif mis en place lors du transfert électrophorétique semi-sec des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de PVDF (Western blotting sur système électrophorétique semi-sec, système milliblot-graphite electroblotter, MILLIPORE).

Tableau III-IX : Composition des tampons utilisés lors du transfert des protéines par Western Blotting).

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

Après avoir déterminé la séquence N-terminale de la protéine étudiée, une recherche d'homologies avec les séquences protéiques présentes dans les banques de données est réalisée par le biais des outils bio-informatiques suivants :

- Expasy (<http://www.expasy.ch>), site internet donnant accès à des moteurs de recherche tels que PattenProt (http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_pattenprot.html),
- Fasta3 (<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3>) ou
- Protein prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) qui permettent de comparer la séquence Nt déduite du séquençage avec les différentes banques de données.

IV.1.7 Transfert sur membrane PVDF (« Western blotting ») et immunodétection

L'immunodétection est réalisée pour une protéine d'intérêt, BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa, Chapitre IV). Connue comme étant une Water-Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP) du colza et d'autres Brassicacées, des anticorps dirigés contre la protéine WSCP de *Brassica oleracea* (chou-fleur), fournis par l'équipe du Pr. Satoh, Université de Toho (Japon) ont permis de réaliser l'immunodétection.

IV.1.7.1 Transfert électrophorétique des protéines sur PVDF ("western blotting")

Après séparation de l'extrait protéique par 2-DE, le transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers une membrane PVDF est effectué. Ce transfert électrophorétique "semi-sec" est réalisé avec le système de transfert en graphite de MILLIPORE (milliblot-graphite electroblotter system) (Figure III-15). Trois tampons sont utilisés lors du transfert : Anode 1, Anode 2, Cathode (Tableau III-IX) selon le protocole décrit par Towbin *et al.* (1979). Le gel 2-DE utilisé est équilibré pendant 20 minutes dans le tampon Cathode. La membrane de PVDF est plongée pendant 15 secondes dans du méthanol à 100% puis pendant 10 minutes dans de l'eau ultra pure avant d'être équilibrée dans le tampon Anode 2. Des feuilles de papier Whatmann 3 MM de même taille que le gel et la membrane de transfert sont utilisées pour réaliser le "sandwich de transfert" (Figure III-15).

IV.1.7.2 Révélation immunologique de la protéine

Les anticorps anti-WSCP de *Brassica oleracea* (anticorps primaire de lapin) sont fournis par l'équipe du Professeur Satoh (Université de Toho, Japon) et leur production est décrite par Nishio et Satoh (1997). Au terme du western blotting (20 minutes, 100 V, 2,5 mA.cm⁻²), la membrane de PVDF est lavée 3 fois 10 minutes en milieu salin dans du tampon TBST (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 à 0,15% (v/v), pH 8) contenant 5% (p/v) de lait

écrémé en poudre. Ce tampon TBST permet de bloquer les sites de fixation non spécifiques des protéines sur la membrane de PVDF. La membrane est alors incubée pendant 2 heures avec l'anticorps primaire (anticorps polyclonaux de lapin anti-WSCP dilués au 1/1000) préparé dans le TBST contenant 5% (p/v) de lait écrémé en poudre. L'excès d'anticorps est éliminé par 5 lavages successifs avec le TBST. La membrane de PVDF est ensuite incubée durant 2 heures avec des anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline (Bio-Rad). Après 7 lavages dans le TBST puis 3 lavages dans le TBS (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8), la localisation des complexes antigène-anticorps est visualisée grâce au développement de la coloration produite par l'activité de la phosphatase alcaline (Blake *et al.*, 1984) en présence de ses 2 substrats : le p-nitro blue tetrazolium chloride (NBT, BioRAD) et le 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate p-toluidine salt (BCIP ; Bio-Rad) préparés extemporanément dans un tampon de révélation (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 6H₂O 5 mM, pH 9,5). Le complexe antigène-anticorps est visualisé entre 5 et 10 minutes suivant la sensibilité de la réaction. Après révélation, la réaction est arrêtée par 2 lavages dans l'eau osmosée.

IV.2 Détermination des activités protéolytiques et anti-protéolytiques

IV.2.1 Détermination des activités protéolytiques

IV.2.1.1 Analyse des activités protéolytiques par azocaséine

L'activité protéolytique est mesurée selon la méthode de Holwerda et Rogers (1992). La dégradation de l'azocaséine (substrat chromophorique) libère des peptides de faible poids moléculaires. L'hydrolyse de l'azocaséine est ainsi déterminée *via* la mesure de l'absorbance de la solution peptidique à 366 nm après précipitation des plus gros fragments par le TCA.

La dégradation de l'azocaséine s'effectue après incubation de 50 µL de protéines solubles (extraction au tampon Mc Ilvaine, EXTRACTION 1 protocole au § IV.1.1) additionnés de 300 µL de tampon d'incubation (acétate de sodium 100 mM, pH 5), 50 µL d'azocaséine 0,6% (p/v) et 100 µL de Triton X-100 0,1% (v/v). La réaction enzymatique est ensuite arrêtée par addition de 200 µL de TCA 10% (p/v) au mélange réactionnel au temps 0 heure et après 3 heures d'incubation à 30°C. Après 30 minutes à 4°C, le mélange réactionnel est centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C. L'absorbance du surnageant est lue à 366 nm au spectrophotomètre SmartSpec Plus (Bio-Rad). Une unité d'activité protéolytique (U) correspond à l'augmentation de 0,01 unité de DO à 366 nm.

Tableau III- X : Protocole utilisé pour la révélation des activités anti-trypsiques sur gel d'acrylamide après SDS-PAGE (adapté de Yeh *et al.*, 1997)

Étapes	Solutions de traitement	Durée de traitement / Température
Élimination du SDS	2-propanol 25% (v/v)	45 min/25°C
Renaturation des protéines	Tris-HCl, pH 6	45 min/25°C
Traitement Trypsine	Trypsine bovine 40 mg.L ⁻¹ (Tampon Tris-HCl 50 mM, CaCl ₂ 50 mM, pH 7,6)	45 min/25°C
Coloration	0,2 mg.mL ⁻¹ de N-Acetyl-DL-Phenyl-Alanine β-Naphthyl ester (APNE) + 0,4 mg.mL ⁻¹ de tetrazotized O-Dianisidine (98% Tampon Tris-HCl 50 mM, CaCl ₂ 50 mM, pH 7,6, 2% Diméthylformamide (DMF))	45 min/25°C

IV.2.1.2 Analyse des activités protéolytiques sur gel SDS-PAGE

Les activités protéolytiques sont aussi détectées par zymogrames sur gels SDS-PAGE à partir de protéines solubles selon un protocole adapté de celui décrit par Dominguez et Cejudo (1995). Soixante quinze microgrammes de protéines auxquels sont ajoutés du tampon Laemmli 2× (sans β-mercaptoéthanol et sans dénaturation par la chaleur) sont séparés sur gel d'acrylamide (10%) contenant 0,1% de gélatine (p/v). L'électrophorèse est réalisée dans les mêmes conditions que les électrophorèses SDS-PAGE décrites au paragraphe IV.1.2. Les gels sont ensuite incubés dans une solution d'isopropanol 25% (v/v) pendant 30 minutes à température ambiante, puis dans un tampon d'acétate de sodium (100 mM ; pH 5) contenant 10 mM de DTT pendant 16 heures à 30°C. Les gels sont alors colorés, pendant une heure, au bleu de Coomassie R-250 préparé dans 50% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v). La décoloration des gels est ensuite réalisée avec une solution contenant 20% de méthanol (v/v) et 10% d'acide acétique glacial (v/v). L'activité protéolytique est visualisée sur le gel par une plage de digestion blanche sur fond bleu.

IV.2.2 Détermination des activités anti-protéolytiques sur gel SDS-PAGE

Les activités inhibitrices de protéases sont détectées par zymogrames sur gels mono- et bidimensionnels à partir de protéines solubles selon un protocole adapté de celui décrit par Chan et De Lumen (1982). Dans le cas d'une SDS-PAGE, 75 ou 125 µg de protéines diluées dans du tampon Laemmli 2× (sans β-mercaptoéthanol et sans dénaturation par la chaleur) sont séparés sur gel d'acrylamide (18%). Les gels bidimensionnels sont réalisés à partir de 340 µg d'échantillon protéique préalablement purifié par le kit ReadyPrep 2D Clean-up (Bio-Rad) et repris dans du tampon R2D2 (voir § IV.1.3). Les protocoles de première et deuxième dimensions sont les mêmes que ceux détaillés dans le paragraphe IV.1.3.

La coloration est réalisée selon le protocole de Yeh *et al.* (1997) décrit dans le Tableau III-X. Ce protocole, permettant la révélation de l'activité anti-trypsique, a nécessité des mises au point afin d'optimiser les conditions de pH et de température des solutions. La mise au point a montré qu'une température de 25°C et un pH 6 permettent une révélation optimale des activités anti-trypsiques. L'activité anti-protéolytique est visualisée sur le gel par une zone blanche sur fond rose-violet.

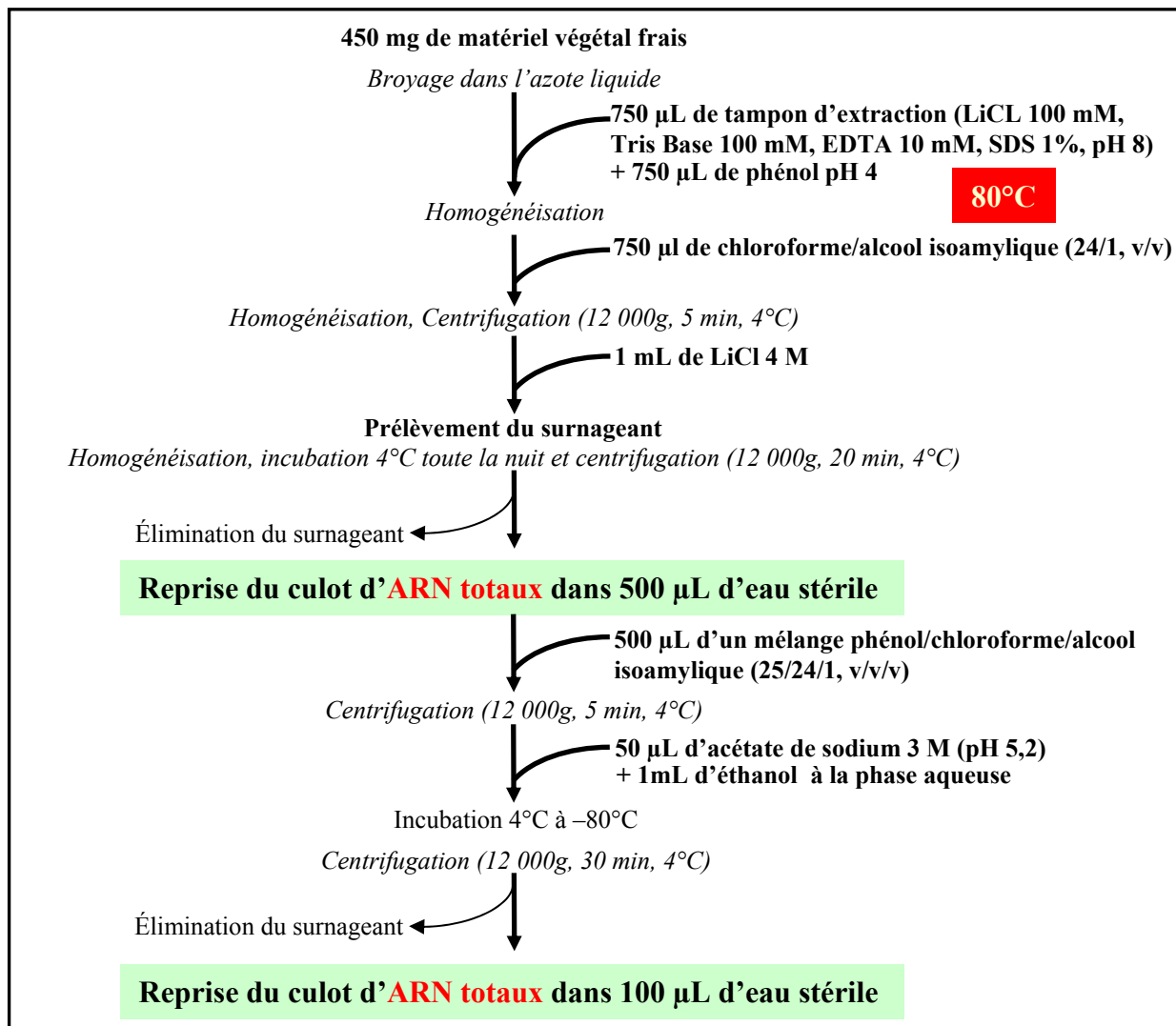


Figure III-16: Protocole d'extraction des ARN totaux au phénol chaud.

Tableau III-XI : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour les PCR semi-quantitatives. T, Thymines ; A, Adénine ; G, Guanine ; C, Cytosine. La lettre M désigne une Adénine ou une Cytosine. Les numéros d'accèsion (NCBI) des gènes *EF1-α*, *Cab* et *BnD22* sont respectivement DQ312264, DQ355993 et X65637. Les amorces utilisées pour le gène *SAG12* sont communes aux gènes *SAG12-1* (AF089848) et *SAG12-2* (AF089849). La taille de l'amplimère ainsi que le nombre de cycles de PCR semi-quantitative sont également précisés pour chaque gène.

Gène		Séquence des amorces	Taille de l'amplimère (en paires de bases)	Nombre de cycles PCR
<i>EF1-α</i>	Sens	5'-TTTCGAGGGTGTACAACATGA-3'	164	25
	Anti-sens	5'-CCGTTCCAATACCAACAATC-3'		
<i>Cab</i>	Sens	5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3'	161	20
	Anti-sens	5'-CCTCCITCGCTGAAGATCTGT-3'		
<i>SAG12</i>	Sens	5'-GGCAGTGGCACACCCAMCCGGTTAG-3'	267	26
	Anti-sens	5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3'		
<i>BnD22</i>	Sens	5'-CCGTTAGCTTCGGATATGA-3'	220	23
	Anti-sens	5'-AGCTATTTGGGGCCGTAATT-3'		

V. MÉTHODES D'ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES

V.1 Extraction des ARNs totaux

L'extraction des ARN totaux, réalisée au phénol chaud, est décrite dans la Figure III-16. L'extraction est suivie d'une purification (dessalage et traitement Dnase) par Kit Qiagen Rneasy Mini Kit (Quiagen, Coutaboeuf, France). Les ARN totaux sont ensuite dosés par spectrométrie UV à 260 nm. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ d'ARN totaux. Afin de vérifier la qualité des ARN extraits et la fiabilité du dosage, 1 μg d'ARN (contenu dans un volume ajusté à 5 μL avec de l'eau stérile) en présence de 5 μL de tampon de charge sont dénaturés 9 minutes à 70°C et déposés sur gel d'agarose 1%. Le tampon de charge contient pour 1 mL (0,025% de bleu de bromophénol, 0,025% de xylème cyanol, 3% de glycérol), 2,5 μL de BET ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 100 μL de MOPS 10X, 615 μL de formamide désionisé et 188 μL de formaldéhyde). Le reste des échantillons est conservé à -20°C avant utilisation pour les réactions de transcription reverse (RT).

La synthèse d'ADNc simple brin par transcription reverse est réalisée à l'aide du kit « iScript cDNA synthesis » (Bio-Rad). A 1 μg d'ARN totaux (complété à 12 μL de volume réactionnel avec de l'eau stérile) sont ajoutés 4 μL de Mix iScript 5 \times (contenant des amorces oligo(dT₁₅)) et 1 μL d'enzyme Reverse transcriptase iScript. Le mélange obtenu est incubé pendant 5 minutes à 25°C puis 30 minutes à 42°C et enfin 5 minutes à 85°C pour stopper la réaction enzymatique.

V.2 Analyse de l'expression des gènes

V.2.1 Analyse de l'expression des gènes en PCR semi-quantitative

Pour chaque gène étudié, le couple d'amorces « sens » et « anti-sens » a été déterminé à partir des séquences nucléotidiques de la banque de données GenBank disponible sur le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Chaque amorce a été définie en utilisant le logiciel Primer3 version V.0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) selon les critères suivants : une longueur des amorces d'environ 20 nucléotides (avec un pourcentage de Guanine et Cytosine si possible supérieur à 50%) et une longueur d'amplimère comprise entre 100 et 300 pb. Les séquences des amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt sont synthétisées par la société Operon Biotechnology et sont présentées dans le Tableau III-XI.

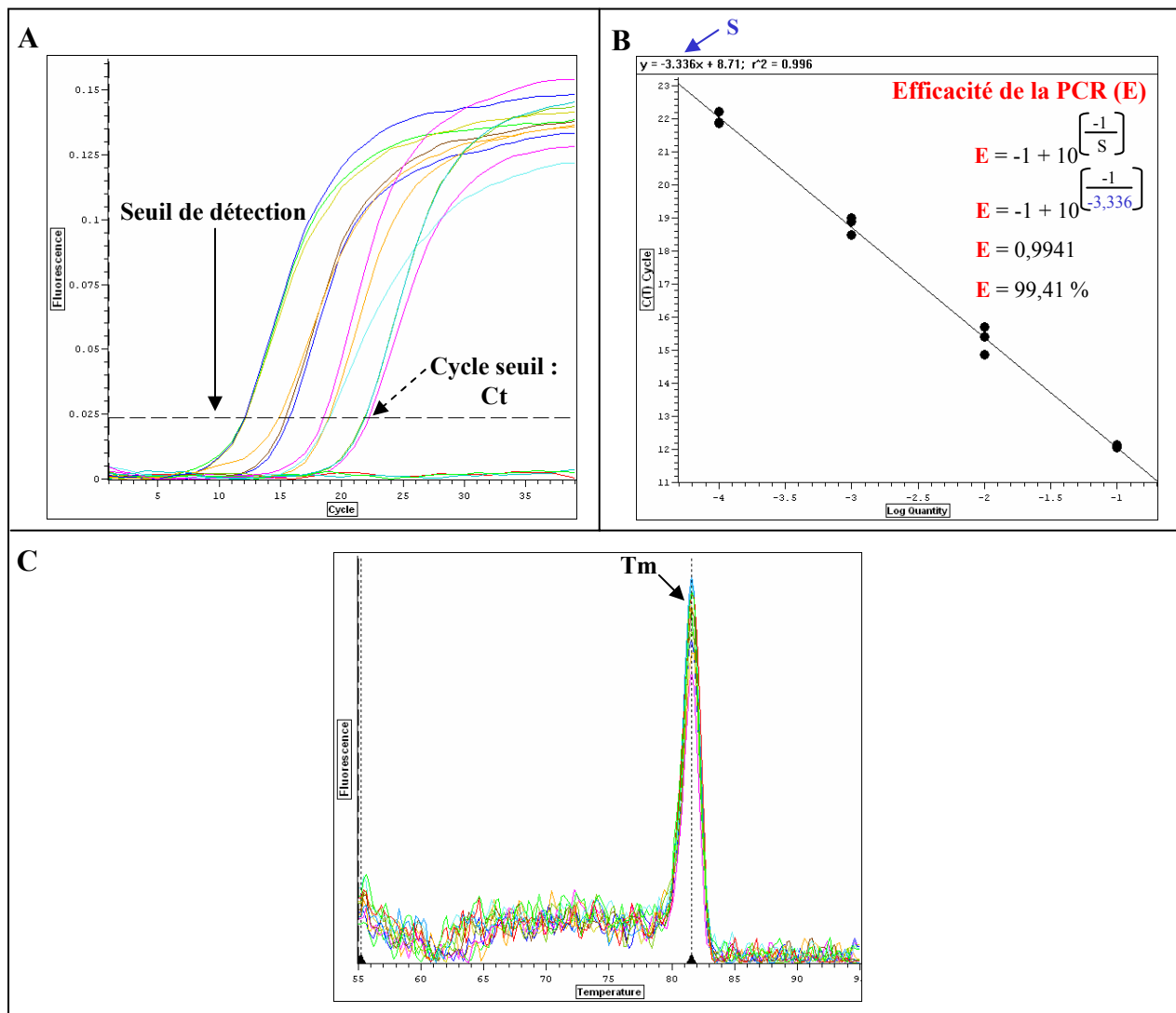


Figure III-17 : Représentations graphiques de la PCR quantitative (Q-PCR) en temps réel. **(A)** Courbe représentative d'une amplification par PCR quantitative. L'intensité de fluorescence est fonction du nombre de cycles. La ligne horizontale définit le seuil de détection de fluorescence. **(B)** Droite obtenue par dilutions en série d'un échantillon d'ADNc donné après PCR quantitative en temps réel. La pente de cette courbe (S) permet de calculer l'efficacité (E) de la PCR. **(C)** Courbe de fusion représentant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température (-dF/dT). Cette courbe permet de déterminer le Tm des produits amplifiés.

Les réactions de PCR sont réalisées à partir de 1 μ L d'ADNc dans un volume total de 12 μ L en présence de tampon de PCR 1 \times (Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X100 à 1%, BSA 0,2 mg.mL⁻¹), 200 μ M de dNTPs, 0,2 μ M d'amorces sens et antisens et 0,4 M de Taq polymérase (5U/ μ L ; QBIogen). Après une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C, un nombre spécifique de cycles d'amplification (Tableau III- XI) est réalisé dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes à 58°C (*SAG12* et *Cab*) ou 60°C (*EF1- α*), et une étape d'élongation d'une minute à 72°C. Pour chaque couple d'amorces, le nombre de cycles de PCR est optimisé afin de ne pas être en saturation de signal au moment de la quantification. L'amplimère obtenu est séquencé (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France) afin de vérifier la spécificité des amorces utilisées pour la réaction de PCR. Pour l'analyse de l'expression des gènes cibles, les produits d'amplification sont séparés sur gel d'agarose (1%), puis photographiés et quantifiés par le logiciel Biocapt (Vilber Lourmat). Le gène *EF1- α* est utilisé comme gène de référence (Nicot *et al.*, 2005) pour les quantifications des gènes d'intérêt.

V.2.2 Analyse de l'expression des gènes en PCR quantitative (Q-PCR)

V.2.2.1 Principe de la Q-PCR

La PCR quantitative permet de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non en fin de la PCR, comme c'est le cas en PCR semi-quantitative. Le principe repose sur l'incorporation d'un fluorochrome, le SYBR Green, dans l'ADN double brin. Après l'élongation de chaque cycle de PCR, une mesure de fluorescence émise par le SYBR Green incorporé dans l'ADN est réalisée. L'augmentation de la fluorescence est corrélée à la quantité d'ADN synthétisée. La Figure III-17A illustre une courbe expérimentale typique obtenue par Q-PCR. Le signal de fluorescence est au départ en dessous de la limite de détection (bruit de fond) et augmente avec le nombre de cycles pour atteindre une valeur de fluorescence plus élevée que le bruit de fond ; cette valeur de fluorescence est appelée « seuil de détection ». Pour un gène donné et un échantillon donné, le point d'intersection entre le seuil de détection et la courbe d'amplification permet d'obtenir une valeur de Ct (Cycle threshold ou Cycle seuil) qui indique le nombre de cycles nécessaires pour atteindre la valeur seuil de fluorescence (Figure III-17A).

Tableau III-XII : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour les PCR quantitatives. T, Thymine ; A, Adénine ; G, Guanine ; C, Cytosine. La lettre M désigne une Adénine ou une Cytosine. Les numéros d'accèsion (NCBI) des gènes *EF1- α* , *BnAAPI* et *BnD22* sont respectivement DQ312264, AJ565847 et X65637. La taille de l'amplimère et la valeur seuil (Ct) sont également indiquées.

Gène		Séquence des amorces	Taille de l'amplimère (en paires de bases)	Valeur seuil (Ct)
<i>EF1-α</i>	Sens	5'-GCCTGGTATGGTTGTGACCT-3'	164	0,026
	Anti-sens	5'-GAAGTTAGCAGCACCCCTTGG-3'		
<i>BnAAPI</i>	Sens	5'-ATATGCTTACGCCACGGTTC-3'	154	0,025
	Anti-sens	5'-TCCAAATGCAGCATATCCAA-3'		
<i>BnD22</i>	Sens	5'-CCGGTTAGCTTCGGATATGA-3'	199	0,039
	Anti-sens	5'-AGCTATTTGGGGCCGTA CTT-3'		

V.2.2.2 Détermination et validation des amorces utilisées en Q-PCR

Détermination des couples d'amorces : Les couples d'amorces (« sens » et « anti-sens ») des gènes étudiés ont été déterminés à partir des séquences des gènes cibles disponibles dans la banque de données GenBank. Chaque amorce est définie en utilisant le logiciel Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) selon les critères de sélection suivants : une longueur d'environ 20 nucléotides avec un pourcentage de Guanine et Cytosine si possible supérieur à 50%, une Température de fusion (T_m) de 60°C et une longueur d'amplimère comprise entre 100 et 300 pb. Les séquences des amorces des gènes cibles sont données dans le Tableau III-XII. Les oligonucléotides ont été synthétisés par Operon Biotechnology. Le gène *EFL-α* (Nicot *et al.*, 2005) utilisé pour contrôler les étapes de RT et de PCR, sert également de gène de référence au moment de la quantification .

Validation des amorces : Pour chaque couple d'amorces, la « valeur seuil » et l'efficacité de la PCR doivent être vérifiées au préalable. Ainsi, pour chaque couple d'amorces, des dilutions d'ADNc en série ont été réalisées (dilution d'ADNc allant de 1 à 1000 du produit de la RT) afin de déterminer la courbe standard (Figure III-17B). Cette courbe représente en abscisse le logarithme du facteur de dilution en fonction du nombre de cycles. Le calcul de la pente S (pour « Slope ») de la courbe standard permet de déterminer l'efficacité E de la PCR. Ces deux valeurs sont reliées par la relation suivante :

$$S = \frac{-1}{\log(1+E)} \quad \text{donc} \quad E = -1 + 10^{\left[\frac{-1}{S}\right]}$$

Pour qu'un couple d'amorce soit validé, l'efficacité de PCR doit être égale (ou proche) de 100%, c'est-à-dire que la valeur S de la droite standard doit être égale (ou proche) de -3,323. Pour chaque couple d'amorce, la réaction de Q-PCR est réalisée à partir de 4 µL d'ADNc dilué 200 fois, 500 nM d'amorces et 1× SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) dans le Chromo4 System (Bio-Rad). La Taq polymérase utilisée est de type Hot Start polymérase, c'est-à-dire une polymérase associée à un anticorps qui rend l'enzyme inactive. Par conséquent, la PCR commence par une étape de chauffage de 3 minutes à 95°C qui a pour but de rompre la liaison entre l'enzyme et l'anticorps et ainsi de permettre à la Taq polymérase d'être active. Un programme de 35 cycles comprenant les étapes suivantes est réalisé : une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C et une étape d'hybridation/élongation d'une minute à 60°C. A chaque fin de cycle, une lecture de la fluorescence est effectuée. A l'issue des 35 cycles, un protocole de dissociation thermique (de 65°C à 95°C avec un incrément de

0,2°C.s⁻¹) des produits d'amplification est réalisé dans le but d'établir la courbe de fusion des produits de PCR générés (Figure III-17C) et de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Graphiquement, cette courbe de fusion est obtenue en suivant la dérivée négative de la fluorescence (F) en fonction de la température T (-dF/dT). Si la PCR est spécifique, l'ADN double brin correspond à un amplimère unique et majoritaire qui se dissociera (à 50%) à une température donnée appelée T_m. Cette fusion de l'ADN va entraîner une libération de SYBR Green dans le milieu qui se traduira par une chute de fluorescence matérialisée par l'apparition d'un pic unique au niveau de la courbe de fusion (Figure III-17C). Au contraire si l'amplification est non spécifique, la courbe de fusion révélera la présence de plusieurs pics correspondant aux T_m des différents amplimères. Dans ce cas, les amorces ne sont pas validées et un autre couple d'amorces doit être défini.

Après validation des couples d'amorces (valeur seuil déterminée, E proche de 100% et un pic unique sur la courbe de fusion), les réactions de Q-PCR sont réalisées en utilisant le même protocole que celui qui a servi à l'élaboration de la courbe standard. Le niveau d'expression relative des gènes d'intérêt est calculé en utilisant la méthode des « delta-delta de Ct »

V.2.2.3 Calcul de l'expression relative par la méthode des « delta-delta de Ct »

La quantification relative des résultats de Q-PCR en temps réel est basée sur la méthode des « delta-delta de Ct » ($\Delta\Delta Ct$). Elle repose également sur l'utilisation d'un gène de référence *EFl- α* dont l'expression est connue pour ne pas être affectée par le traitement. Pour chaque condition expérimentale, les réactions de Q-PCR sont réalisées en triplicats. Comme nous l'avons vu précédemment (§ V.2.2.1), les valeurs de Ct sont déterminées graphiquement à partir des courbes d'amplification (Figure III-17A). L'expression relative du gène étudié est déterminée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Expression relative} = (1+E)^{-[\Delta\Delta Ct]} = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

En prenant compte que :

- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ traitement} - \Delta Ct \text{ témoin}$ avec le $\Delta Ct = Ct_{\text{gène étudié}} - Ct_{EFl-\alpha}$
- E est l'efficacité de la PCR qui est voisine de 100%. De manière à simplifier les calculs, E est considéré comme égal à 1, donc

$$\text{Expression relative} = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

Par définition, l'expression relative du gène cible de l'échantillon Témoin est égal à (2⁰), c'est-à-dire 1 (Livak et Schmittgen, 2001).

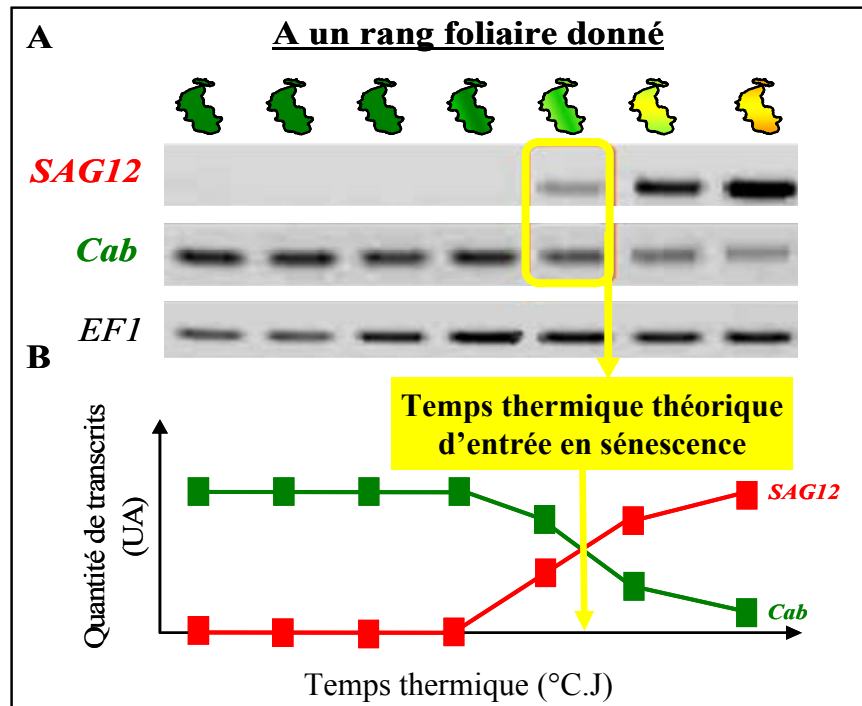


Figure III-18 : (A) Cinétique d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* par RT-PCR, au sein d'un rang foliaire de Colza. Le gène *EF1- α* est utilisé comme gène de référence. (B) Evolution cinétique des quantités de transcrits des gènes *SAG12* et *Cab*. La flèche indique une augmentation d'expression du gène *SAG12* concomitante à une répression du gène *Cab* correspondant à la date théorique d'entrée en sénescence (D'après Gombert *et al.*, 2006).

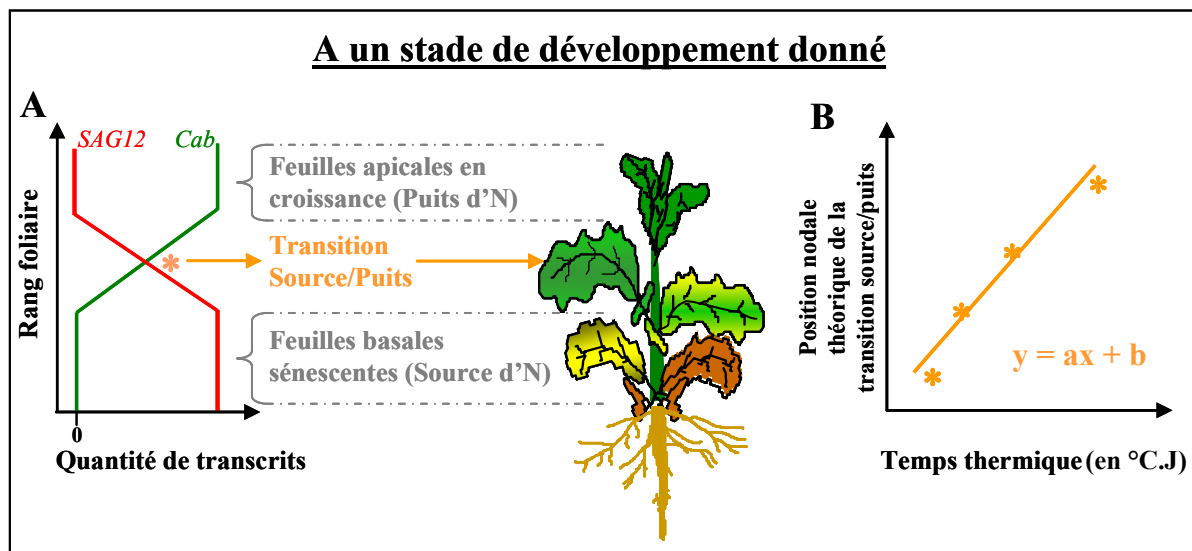


Figure III-19 : (A) Représentation schématique du statut azoté de différents rangs foliaires de colza en fonction de l'expression des gènes *SAG12* et *Cab*. L'astérisque indique la position nodale théorique de la transition source/puits (dernier rang foliaire entré en sénescence) déterminée par l'augmentation de l'expression du gène *SAG12* concomitante à la répression du gène *Cab*. (B) Cinétique de progression de la sénescence foliaire le long de l'axe de la plante. Chaque symbole fait référence à la position nodale théorique déterminée à chaque temps de la cinétique. L'équation de la droite obtenue est de type $y = ax + b$ où a est la pente de la droite c'est-à-dire la vitesse de progression de la sénescence, et b est l'ordonnée à l'origine et correspond au nombre de rangs foliaires sénescents en début de cinétique (D'après Gombert *et al.*, 2006).

V.3 Utilisation de l'indicateur moléculaire de sénescence *SAG12/Cab*

L'expression du gène *SAG12* (codant une protéase à cystéine) et du gène *Cab* (codant une protéine de liaison aux chlorophylles *a/b*) est utilisée comme indicateur de la sénescence. En effet, Gombert *et al.* (2006) ont montré que cet indicateur permet de déterminer la progression spatio-temporelle de la sénescence foliaire chez le colza en identifiant soit (i) la date théorique d'entrée en sénescence d'un rang foliaire donné, soit (ii) le dernier rang foliaire entré en sénescence à un stade de développement donné. La détermination de la date théorique d'entrée en sénescence d'un rang foliaire est réalisée grâce une analyse cinétique de l'expression du gène *SAG12* (augmentant au cours du processus de sénescence) et du gène *Cab* (diminuant au cours de la sénescence) par PCR semi-quantitative.

V.3.1 Détermination de la date théorique d'entrée en sénescence

Les profils d'expression des gènes *SAG12* et *Cab* d'un rang foliaire donné, sont suivis au cours du temps (Figure III-18A). L'évolution cinétique des quantités de transcrits de chacun des gènes permet de déterminer un point d'intersection correspondant à une augmentation de l'expression du gène *SAG12* concomitante à une diminution de l'expression du gène *Cab* (Figure III-18B). Ce point d'intersection donne alors accès à une date de transition source/puits d'une feuille pouvant être considérée comme la date théorique d'entrée en sénescence de la feuille (Gombert *et al.*, 2006).

V.3.2 Détermination du dernier rang foliaire sénescant et de la vitesse de la progression de la sénescence foliaire

La progression spatiale de la sénescence est également étudiée selon cette méthode. A un stade de développement donné, l'expression de ces gènes est suivie au niveau de chaque rang foliaire. La représentation graphique des quantités de transcrits des gènes *SAG12* et *Cab* en fonction du rang foliaire, permet de déterminer un point d'intersection correspondant à une augmentation du gène *SAG12* concomitante à une diminution de l'expression du gène *Cab* (Figure III-19A). Ce point d'intersection permet de déterminer la position nodale théorique de la transition puits/source ou encore de déterminer le dernier rang foliaire sénescant sur l'axe de la plante. Ainsi, de manière théorique, il est possible de déterminer le dernier rang foliaire entré en sénescence dans le but de connaître les rangs foliaires se comportant comme des puits ou des sources (Figure III-19A). Après détermination de ce rang foliaire théorique à chaque

date de récolte, il devient possible d'établir une cinétique de progression de la sénescence foliaire en fonction du temps thermique et ainsi d'estimer la vitesse de progression de la sénescence foliaire (Figure III-19B). L'équation de la droite obtenue est de type $y = ax + b$ où :

- a est la pente de la droite c'est-à-dire la vitesse de progression de la sénescence
- b est l'ordonnée à l'origine et correspond au nombre de rangs foliaires sénescents au début de la cinétique.

CHAPITRE IV

***Implication d'un inhibiteur de
protéases, BnD22, dans la régulation
de la sénescence foliaire***

CHAPITRE IV

IMPLICATION D'UN INHIBITEUR DE PROTÉASES, BnD22, DANS LA RÉGULATION DE LA SÉNESCENCE FOLIAIRE

Ce chapitre réunit deux articles :

- **Article 1 : N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology*, 34, 895-905, 2007**

Philippe Etienne¹, Marie Desclos¹, Lucie Le Gou¹, Julie Gombert¹, Josette Bonnefoy¹, Karine Maurel¹, Frédéric Le Dily¹, Alain Ourry¹, Jean-Christophe Avice¹

¹UMR INRA/UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie (EVA) & Nutrition NCS; ISBIO, Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de CAEN Basse-Normandie, F-14032 Caen Cedex, France.

- **Article 2 : A proteomic profiling approach to reveal a novel role of BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa) / Water-Soluble Chlorophyll binding Protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stress conditions. *Plant Physiology*, 147, 1830-1844, 2008**

Marie Desclos¹, Lucie Dubousset¹, Philippe Etienne¹, Josette Bonnefoy¹, Françoise Lecahérec², Hiroyushi Satoh³, Alain Ourry¹, Jean-Christophe Avice¹

¹UMR INRA/UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS, IFR 146 ICORE, Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen Basse Normandie, F-14032 Caen, France.

²UMR INRA/Agrocampus Rennes/Université de Rennes 1 118 Amélioration des Plantes et Biotechnologies, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France.

³Department of Biomolecular Science, Toho University, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan.

Article 1

Avant-propos

La faible efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) du colza est liée à un défaut de remobilisation de l'azote (N) associée majoritairement à une dégradation incomplète des protéines au cours du processus de sénescence foliaire de type séquentielle. En effet, le processus de remobilisation du N nécessite une fine coordination entre les processus de protéolyse se produisant dans les feuilles sénescentes (tissus sources) et la demande ainsi que l'utilisation du N au niveau des tissus puits. Cette coordination est d'autant plus importante que les plantes sont soumises à divers stress perturbant les relations source/puits (comme par exemple une carence en azote). Dès lors, une meilleure compréhension du comportement des tissus puits vis-à-vis du N remobilisé à partir des feuilles sénescentes, est un pré requis pour l'optimisation de la remobilisation du N foliaire, et par conséquent de l'EUA.

La première étude présentée dans ce chapitre est donc basée sur le postulat que **des inhibiteurs de protéases seraient capables de moduler l'efficacité de remobilisation du N via la régulation du taux de protéolyse foliaire**. Pour cela, l'étude d'activités inhibitrices de protéases (anti-trypsine) a été menée chez différents rangs foliaires de colzas bien alimentés (témoins) ou soumis à une privation en nitrate (traitement qui conduit à une initiation rapide de la sénescence foliaire chez le colza ; Gombert *et al.*, 2006). Au préalable, l'identification de l'état d'avancement de la sénescence de chaque rang foliaire étudié a été déterminée *via* l'indicateur moléculaire de la sénescence, *SAG12/Cab* développé sur le colza par Gombert *et al.* (2006).

Les résultats obtenus montrent que, contrairement aux plantes témoins qui présentent une vitesse de sénescence foliaire constante d'un rang foliaire à l'autre, les plantes privées en N présentent des vitesses de progression de la sénescence contrastées en fonction de la position nodale des feuilles :

- **les feuilles matures ou en phase de maturation** (feuilles basales), présentent une sénescence accélérée qui s'accompagne d'une mobilisation rapide de l'azote foliaire,
- **les feuilles les plus jeunes** (feuilles apicales), présentent un ralentissement de la sénescence couplé à un maintien de la croissance et de la teneur en protéines solubles de ces feuilles.

De plus, la mise au point d'une méthode de détection des activités anti-protéases sur gel 1D a permis de mettre en évidence **l'accumulation d'une activité inhibitrice de protéases à 19 kDa au sein des jeunes feuilles**.

I. N-PROTEIN MOBILISATION ASSOCIATED WITH THE LEAF SENESCENCE PROCESS IN OILSEED RAPE IS CONCOMITANT WITH THE DISAPPEARANCE OF TRYPSIN INHIBITOR ACTIVITY

Key words. *Brassica napus* L., leaf senescence, N recycling, nitrate availability, protease inhibitor, protein mobilisation.

Abstract. *Brassica napus* L. (oilseed rape) is an important crop plant characterised by low nitrogen (N) use efficiency. This is mainly due to a weak N recycling from leaves that is related to incomplete protein degradation. Assuming that protease inhibitors are involved throughout protein mobilisation, the goal of this study was to determine their role in the control of N mobilisation associated with leaf senescence. Results showed that a 19-kDa polypeptide exhibiting trypsin inhibitor (TI) activity presented an increased gradient from the older to the younger leaves. According to the *SAG12/Cab* gene expression profile, which is an indicator of leaf senescence, mature leaves of nitrate-deprived plants presented an earlier initiation of senescence and a decrease in protein concentration when compared with nitrate-replete plants. This coincided with disappearance of both TI activity and a reduction in the transcript level of the *BnD22* gene (encoding a protein sharing homology with Kunitz protease inhibitor). In young leaves of N-deprived plants, initiation of senescence was delayed; soluble protein concentration was maintained while both TI activity and *BnD22* transcripts were high. This indicates that in oilseed rape growing under nitrate deprivation, the more efficient N recycling from mature leaves contributes to the maintenance of growth in young leaves. The data suggest a significant role for protease inhibitors in the regulation of proteolytic processes associated with N mobilisation during leaf senescence.

I.1 Introduction

To maintain or improve crop production with respect to environment and the limitation of fertilizer inputs, it will be necessary to increase the use efficiency of biogenic elements assimilated by plants. Nitrogen (N) use efficiency, which integrates N uptake efficiency and N remobilization efficiency, is mainly related to the capacity of plants to recycle this element efficiently from source organs to sink tissues. In oilseed rape (*Brassica napus* L.), only half the N from fertilizer application is used for seed filling (Schjoerring *et al.*, 1995), thus

demonstrating the weak nitrogen use efficiency of this crop plant as compared to cereals (Dreccer *et al.*, 1997) despite a high N uptake rate. Recent results have shown that this inefficient use of endogenous N would not be due to a limitation of the amino acid transport systems from leaf to phloem (Tilsner *et al.*, 2005) but would be primarily related to a low recycling of foliar N mobilized by senescence due to an incomplete degradation of proteins. This led to an important return of organic N to the soil that was not directly available to the plants without preliminary mineralization and this had significant consequences at both the economic and environmental levels (Dejoux *et al.*, 2000). Moreover, it is now established that this lack of leaf N mobilization has direct impacts on grain yield in oilseed rape crops. For example, the removal of 50% of the leaves at the beginning of the bolting stage led to a strong reduction of the final pod biomass (-30%) in comparison with oilseed rape plants that retained all their leaves (Noquet *et al.*, 2004).

The effective recycling of the nitrogenous compounds from leaves to sink growing tissues or storage organs requires a fine coordination of the proteolysis processes during the degenerative and terminal (cell death) phases of the foliar senescence (Noodén *et al.*, 1997; Gan and Amasino, 1997; Hörtensteiner and Feller, 2002; Yoshida, 2003; Zimmermann and Zentgraf, 2005). Initiation and dynamics of foliar senescence depends on the leaf age but can also be modulated by different biotic or abiotic factors (Buchanan-Wollaston, 1994; Weaver *et al.*, 1998; Noh and Amasino 1999; He and Gan, 2002; Yoshida, 2003; Pourtau *et al.*, 2004). For instance, environmental factors such as mineral N limitation (Smart *et al.*, 1995; Gombert *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2006) or drought conditions (Thomas and Stoddart, 1980) may accelerate the initiation of leaf senescence and lead to many subcellular changes, including an increase in protease activities (Matile, 1982; Thomas and Stoddart, 1980).

In leaves, an efficient senescence may result in the mobilization of more than 70% of leaf proteins with a preferential proteolysis of plastidial proteins such as RuBisCO (Srivalli *et al.*, 2001). Among the susceptible proteolytic systems involved in the N mobilization process associated with senescence, the cysteine and serine proteases are the most often implicated (Srivalli *et al.*, 2001, Buchanan-Wollaston and Ainsworth 1997; Guevara *et al.*, 2001). In broccoli, Coupe *et al.* (2003) have demonstrated that 44% of the total proteolytic activities of senescent tissues were dependent on cysteine and serine proteases. Many genes encoding cysteine proteases were induced during leaf senescence such as *SAG2*, *SAG12* and *RD21* in *Arabidopsis thaliana* (Hensel *et al.*, 1993; Lohman *et al.*, 1994, Yamada *et al.*, 2001) or *BnSAG12-1* and *BnSAG12-2* in oilseed rape (Noh and Amasino, 1999). However, few works have reported that the presence of protease inhibitors should control or delay the senescence

in leaves or flowers (Feller 1986; Sugawara *et al.*, 2002; Sin and Chye 2004). Thus, Sugawara *et al.* (2002) suggested that an inhibitor of cysteine-proteases (*DC-CPI*) would act as a repressor of flower senescence on *Dianthus caryophyllus* L. Among the identified genes encoding for protease inhibitors in *Citrus paradisi*, it seems that only *lkiL-1* and *lkiL-2* (inhibitors of Kunitz type serine proteases) were up-regulated in the young leaves whereas they were strongly down-regulated in the mature leaves (Shatters *et al.*, 2004). In leaves of oilseed rape adapted to water stress, Reviron *et al.* (1992) have reported the accumulation of BnD22, a protein sharing homologies with some Kunitz-type trypsin inhibitors (Downing *et al.*, 1992; Ilami *et al.*, 1997). A negative correlation between the endogenous proteolytic activity in leaves adapted to progressive drought and the presence of BnD22 was established. Using an *in vitro* assay with purified BnD22 protein, Ilami *et al.* (1997) have shown that BnD22 (i) did not inhibit the endogenous leaf proteases, (ii) was able to slightly inhibit chymotrypsin, and (iii) had no significant effects on the other serine proteases tested. Despite the low antiproteolytic activity of the purified mature BnD22, Ilami *et al.* (1997) have suggested that BnD22 may contribute to the control of proteolysis associated with leaf senescence.

Overall, these previous works indicate that the low level of protease inhibitor gene expression coincides with an increase in proteolytic activities in leaves and that the protease inhibitors thus seem to be able to protect the young leaves by preventing or delaying their senescence. However, most of the studies were performed at the transcriptomic level while the physiological function of these protease inhibitors during the foliar senescence processes (and more specifically their protein patterns and anti-protease activities) still remains to be elucidated.

Assuming that protease inhibitors could be involved in the lack of N mobilization from oilseed rape leaves, the goals of this study were to determine whether some protease inhibitors could be involved in the control of leaf senescence associated N recycling during the vegetative stage of oilseed rape. We investigated the protease inhibitor activities with zymograms in different leaf ranks during normal leaf development (control) and during the leaf senescence induced by nitrate deprivation. The main difficulty for this kind of study was to determine the N status in the leaves (sink or source organ). In oilseed rape, Gombert *et al.* (2006) have recently demonstrated that both *SAG12* (encoding a cysteine protease) and *Cab* (encoding a chlorophyll a/b binding protein) gene expression were the most accurate indicators of the temporal and spatial progression of leaf senescence (compared with classical biochemical parameters such as evolution of chlorophyll or protein content). Indeed, a

concomitant up- regulation of *SAG12* and down-regulation of *Cab* genes occurred alongside the sink/source transition for N observed during normal leaf development or in N-deprivation-induced leaf senescence. The discriminating *SAG12/Cab* indicator was used in this study to relate the initiation and progression of foliar senescence to the changes in leaf proteins and more particularly with the patterns of anti-protease activities and *BnD22* gene expression. The relevance of the *SAG12/Cab* molecular indicator for studying leaf senescence in oilseed rape and the physiological function of leaf protease inhibitors are also discussed.

I.2 Materials and methods

I.2.1 Plant material

Seeds of *Brassica napus* L. cv Capitol were sterilized by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by 20% sodium hypochlorite for 20 min and several washes in demineralised water. Seeds were placed on foam rubber (Oasis growing pinpot Agrimedia, TCA Engineering, Battenheim, France) in a greenhouse under dark conditions for 2 d. Just after emergence of the third leaf, seedlings were transferred to 4 L pots filled with perlite (2 plants per pot) and were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night) and a photoperiod of 16 h. During the entire experimental period, natural light was supplemented with Neon tubes (Philips TLD 36W, FACEN, Caen, France) supplying an average PAR (Photosynthetically Active Radiation) of ~200 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at the top of the canopy. Plants were watered every 2 d with 200 mL of nutrient solution containing 2 mM KNO_3 , 3 mM CaCl_2 , 1 mM K_2SO_4 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.4 mM KH_2PO_4 , 0.15 mM K_2HPO_4 , 0.2 mM Fe-Na-EDTA, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.7 μM CuSO_4 and 0.1 μM CoCl_2 . After 60 d of growth, the plants were split into two sets for the application of two contrasting levels of mineral nitrogen nutrition.

I.2.2 Application of mineral N deficiency and tissue sampling

Plants were supplied every 2 d with nutrient solution without KNO_3 (N-deprived plants) or with 2 mM of KNO_3 (control plants). These mineral N treatments were applied during 21 d. Control and N-deprived plants were sampled in triplicate at Day 0 and after 2, 4, 7, 14, 17 and 21 d of treatment. Total fresh weight and root fresh weight were measured. Leaves were separated based on the date of their appearance (defined as the leaf rank number). The leaf

rank number was ordered from the older to the younger leaves. For each leaf, the chlorophyll content was measured using a SPAD-502 (Minolta, Tokyo, Japan) apparatus (Rossato *et al.*, 2001), and leaf area was determined with a LI-COR 300 area meter (LI-COR, Inc. Lincoln, Nebraska, USA). Thereafter, leaves were weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

1.2.3 Determination of total N content

An aliquot of each leaf was freeze-dried, weighed for dry matter determination and ground to a fine powder. The total N content was quantified with a continuous flow isotope mass spectrometer (IsoPrime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to a C/N analyser (EA 3000, EuroVector, Milan, Italy). Each N concentration was an average of three replicates \pm SE.

1.2.4 Extraction of soluble proteins and detection of trypsin inhibitor activity by SDS-PAGE

Frozen leaf samples (450 mg fresh weight) from each triplicate were ground in a mortar with liquid nitrogen and extracted in citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM Na₂HPO₄, pH 6.8) in the presence of 150 mg PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone). The homogenate was centrifuged at 12000 g, 4°C for 1h. The resulting supernatant was used for determination of total soluble proteins by protein-dye staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard. For detection of total soluble proteins, 3 μ g were prepared in 2 \times Laemmli lysis buffer with β -mercaptoethanol. SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) using a 5.5% polyacrylamide (w/v) stacking gel and a 15% polyacrylamide (w/v) resolving gel. Gels were stained with the silver staining procedure described by Blum *et al.* (1987). For detection of trypsin inhibitor (TI) activity, 75 μ g of soluble proteins were prepared in 2 \times Laemmli lysis buffer without β -mercaptoethanol and separated by SDS-PAGE as described above, except that the resolving gel was prepared with 18% polyacrylamide (w/v). Gels were stained using a procedure adapted from Yeh *et al.* (1997). Briefly, gels were washed for 30 min with 25% 2-Propanol (v/v) and for 30 min with 20 mM Tris buffer (pH 6) to remove SDS and renature proteins. Thereafter, gels were incubated for 30 min in Tris-CaCl₂ buffer (50 mM Tris base, 50 mM CaCl₂, pH 7.6) containing 40 mg.L⁻¹ bovine trypsin type I (EC 3.4.21.4). After incubation, the detection of TI was observed after 45 min in staining solution (0.6 mM N-Acetyl-DL-Alanine-2-Naphthyl Ester and 0.84 mM O-

Dianisidine-Tetrazotized in Tris-HCl-CaCl₂ buffer (50 mM Tris base, 50 mM CaCl₂, pH 7.6). After staining, gels were finally fixed in 2% (v/v) acetic acid solution. Gels were scanned with the ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) and the TI activity was estimated with the Millipore BioImage computerized image analysis system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) by measurement of integrated intensity. The images of gels given in this study were obtained for 3 replicates of each leaf rank. Each gel was replicated twice and the data relating to the specific trypsin inhibitor activity for leaves #6 and 7 were expressed as integrated intensity per mg of proteins.

1.2.5 RNA extraction

For a given date of treatment and for each leaf rank, total RNA was extracted from 250 mg of fresh matter corresponding to a mix of triplicates. Frozen leaf samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 µL of extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750 µL of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s. After the addition of 750 µL of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged (15 000 g, 5 min, 4°C). The supernatant was transferred into a 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 µL of sterile water. Fifty microliters of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at -80°C. After centrifugation (15 000 g, 20 min, 4°C), the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15 000 g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was dried 5 min at room temperature and re-suspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed with a spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before RT-PCR analysis.

1.2.6 RT-PCR analysis

For reverse transcription (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). PCRs were obtained using specific primers for the *Brassica napus CabLHB1B2* gene (DQ355993) (forward primer: 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3' and reverse primer 5'-CCTCCITCGCTGAAGATCTGT-3'), primers for the *Brassica napus EF1-α* gene (DQ312264) (forward primer: 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA and reverse primer 5'-CCGTTCCAATACCAATC), primers for the *Brassica napus BnD22* gene X65637)

(forward primer: 5'-CCGGTTAGCTTCGGATATGA-3' and reverse primer: 5'-AGCTATTTGGGGCCGTACTT-3'), and primers shared by the *SAG12-1* (AF089848) and *SAG12-2* (AF089849) genes of *Brassica napus* (forward primer: 5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3' and reverse primer: 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3'). PCRs were performed with Qbiogene Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) on a thermocycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. The amplification program was as follows: 1 cycle at 95°C for 5 min, 22 (*Cab* and *BnD22*), 28 (*SAG12*) or 25 (*EF1- α*) cycles including a denaturing step at 95°C for 45 sec, a primer's hybridization step at 58°C for 45 s and an amplification step at 72°C for 1 min. Each PCR reaction was finished with one cycle at 72°C for 10 min. Four single 267, 220, 161 and 164 bp cDNAs were amplified for the *SAG12*, *BnD22*, *Cab* and *EF1- α* genes, respectively, and the identity of each fragment was checked by sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France). For all RT-PCR reactions, the *EF1- α* gene was used as cDNA synthesis and amplification control. The *EF1- α* gene was selected because its expression during senescence and under biotic and abiotic stress conditions (Nicot *et al.*, 2005) remained constant. In contrast, the ribosomal 25S RNA, which is classically used as reference gene, was preferentially degraded during the senescence process (Masclaux *et al.*, 2000). RT-PCR products were separated by electrophoresis through a 1% agarose gel. Agarose gels were visualized and photographed using a Biocapt imager (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France). The steady-state level of transcripts was estimated by measurement of signal intensities with the Millipore BioImage computerized image analysis system after normalization with the *EF1- α* gene. From each sample, two RT reactions were made and followed by two independent PCRs and the corresponding data did not show significant variation in the steady state transcript level, thus indicating that the RT-PCR method was reproducible. The data related to *SAG12* and *Cab* transcript levels were expressed as a percentage of the maximum of both transcripts observed in overall leaf ranks (the maximum level of transcripts was observed in leaf #5 at Day 21 for *SAG12* and in leaf #6 at Day 0 for *Cab*).

1.2.7 Determination of temporal and spatial progression of leaf senescence using SAG12/Cab gene expression

As recently demonstrated by Gombert *et al.* (2006) in oilseed rape, the gene expression of *SAG12* (encoding a cysteine protease) and *Cab* (encoding a chlorophyll a/b binding protein)

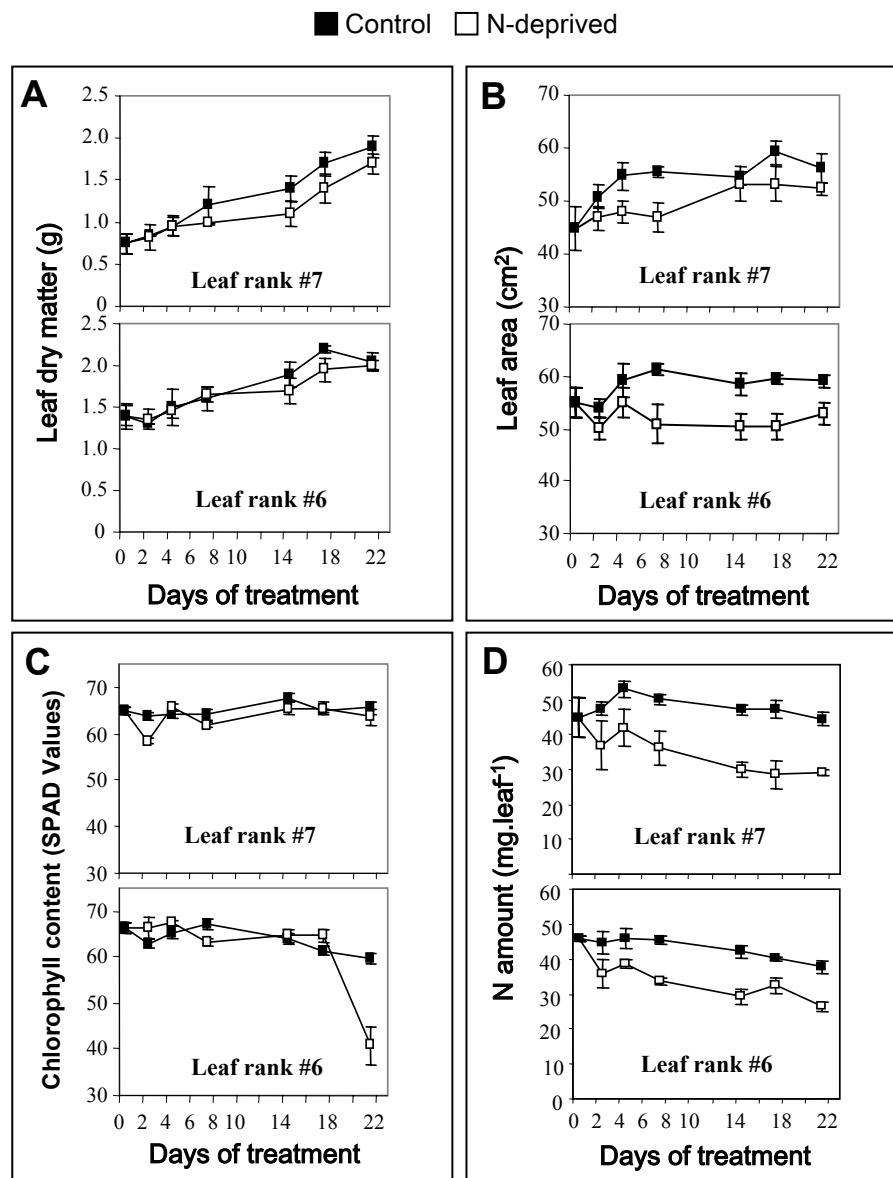


Figure IV-1 : Changes in leaf dry matter (A), leaf area (B), chlorophyll leaf content (C) and N leaf content (D) in the leaf ranks #7 and 6 of oilseed rape supplied (Control) or not (N-deprived) with nitrate during 21 d. Vertical bars indicate \pm standard error of the mean ($n = 3$) and fit within the plot if not visible.

constitute an accurate indicator for following temporal senescence (date of the entry of senescence for a given leaf rank) and spatial senescence (last senescing leaf rank for a given plant at a given stage of development).

To determine the theoretical date of senescence for a given leaf rank, the kinetic expression of *SAG12* (up-regulated during the senescence process) and *Cab* (down-regulated during senescence) was monitored by semi-quantitative RT-PCR. The intersection point corresponding to the concomitant up-regulation of *SAG12* and down-regulation *Cab* genes was considered as the date of the onset of foliar senescence (see Gombert *et al.*, 2006 for details). The rate of senescence progression was studied using the following method. For a given plant at a given development stage, the expression of *SAG12* and *Cab* g was followed as a function of leaf ranks. The last theoretical senescent leaf rank was determined at the intersection point corresponding to the concomitant up- and down-regulation of *SAG12* and *Cab* genes, respectively. Thereafter, changes of these theoretical leaf ranks were expressed as a function of time and the value of the slope of the corresponding linear relationship which provided information about the rate of the leaf senescence progression under N-supplied and N-deprivation conditions (see Gombert *et al.*, 2006 for details).

1.2.8 Statistical analysis of data

Results are presented as mean values \pm standard errors from 3 biological replications ($n = 3$). The effects of mineral N deficiency were determined by analysis of variance and mean separation was performed using the Fisher-Snedecor test. Statistical significance was postulated at $P < 0.05$.

1.3 Results

1.3.1 Leaf dry matter and leaf area (LA)

In plants supplied with nitrate (control), the changes in leaf dry matter at leaf #7 indicated that this leaf continued to grow up until the end of the experiment, reaching approximately 2 g after 21 d (Figure IV-1A). In N-deprived plants, the growth of leaf #7 was similar to control up to day 14 and became significantly lower after this date (Figure IV-1A). In both mineral N treatments, the dry matter of leaves #6 (Figure IV-1A) and #5 increased to a similar extent between Day 0 and Day 7. Whatever the treatments, the dry matter of leaf #4 did not change during all the experiment, and had a mean of 1.35 g.plant⁻¹ (data not shown). The leaf area

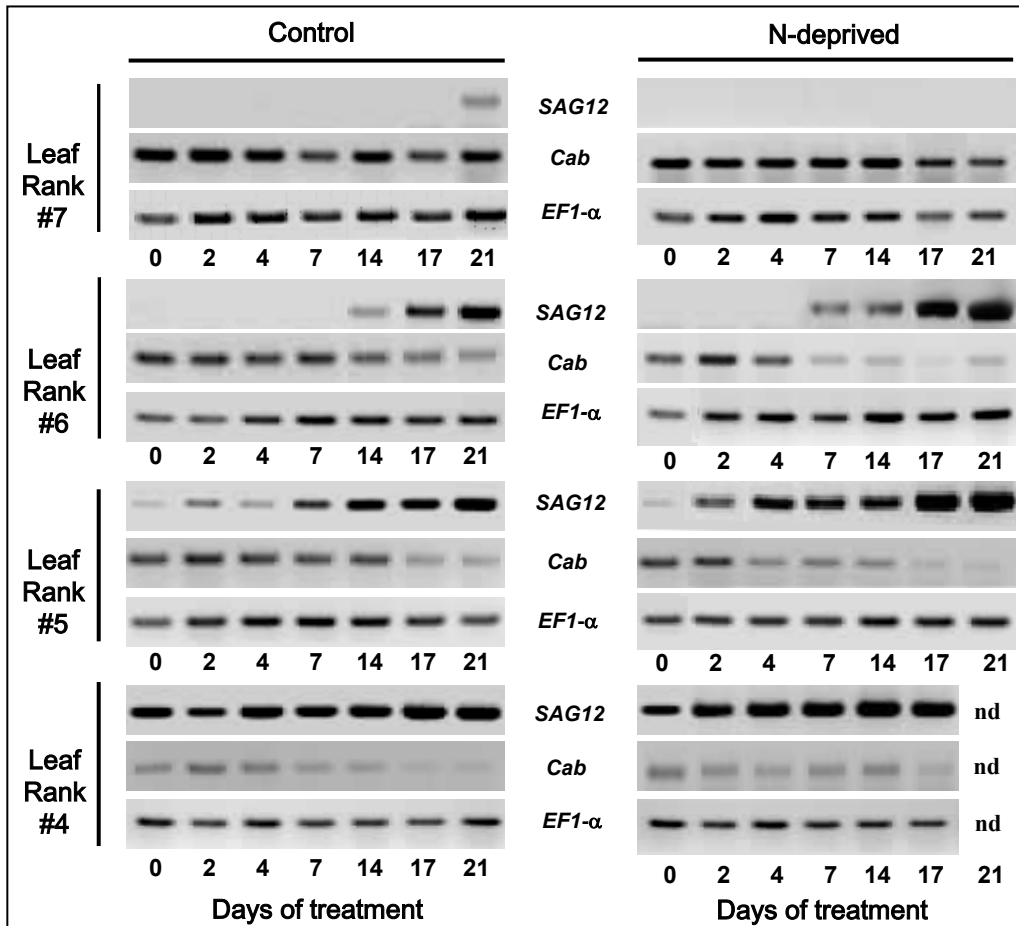


Figure IV-2. RT-PCR analysis of *SAG12* and *Cab* gene expression in different leaf ranks from control (supplied with nitrate) and N-deprived plants. Total RNA was extracted from each leaf rank at 0, 2, 4, 7, 14, 17 and 21 d of treatment. The *EF1-a* gene was used as a cDNA synthesis and amplification control. Nd: non-determined gene expression because the corresponding leaf had fallen.

(LA) expansion in the youngest leaves (*i.e.* leaf ranks #7 and #6) was rapidly affected by mineral N availability. Compared to control plants, LA was significantly reduced in N-deprived plants by Day 4 in leaf #7 and Day 7 in leaf #6 (Figure IV-1B). However, in leaf #7, LA increased in N-deprived plants between Day 7 and Day 14 and finally reached the value of the control. Irrespective of the mineral N treatment, the LA in leaves #5 and #4 did not change significantly for the duration of the experimentation (data not shown). Leaf #4 senesced and fell from N-deprived plants between Days 17 and 21 but was still present in the rosette of control plants.

1.3.2 Changes in chlorophyll and N content in leaves

The decline in leaf chlorophyll content is still considered to be a classical biochemical parameter which provides information on the status of leaf senescence (Osaki *et al.*, 1995; Masclaux *et al.*, 2000). In leaf #7, the chlorophyll content remained high during the entire experimentation and was not affected by N deprivation (Figure IV-1C). A similar pattern was observed in leaf #6 of control plants (Figure IV-1C). Therefore, as compared to control plants, the chlorophyll content had significantly decreased in N-deprived plants by Day 21 for leaves #5 and #6 (Figure IV-1C) or Day 7 for leaf #4 (data not shown). At any given time during the experiment, the lowest level of chlorophyll was obtained in leaf #4 with a large decrease observed from Day 17 for the controls and from Day 7 for N-deprived plants (data not shown). In leaves #7 and #6 of N deprived plants, the N content was significantly lower than in control plants from Day 4 until the end of the experiment (Figure IV-1D). Compared to control, the N content of leaf #7 in N-deprived plants was reduced by 40% after 17 days of experiment (Figure IV-1D). In the mature and maturing leaves of control plants, the N content significantly declined between Day 14 and 21 for leaf #5 and between Day 4 and 7 for leaf #4 (data not shown). In leaves #6, #5 and #4, the deprivation of mineral N provoked a large decline in N content in leaves as compared to control plants. For instance, the N content in leaf #5 decreased by 62.5% in N-deprived plants *versus* only 35% in control plants between the beginning and the end of the experiment (data not shown).

1.3.3 Theoretical date of onset of leaf senescence using molecular indicators

The steady state transcript level of *SAG12* and *Cab* genes presented in Figure IV-2 was monitored in order to characterize the theoretical date of leaf sink/source transition for N of each leaf rank from the control and N-deprived plants (expressed as % of maximum level of transcripts observed in all leaf ranks, for details see Materials and methods). Whatever the

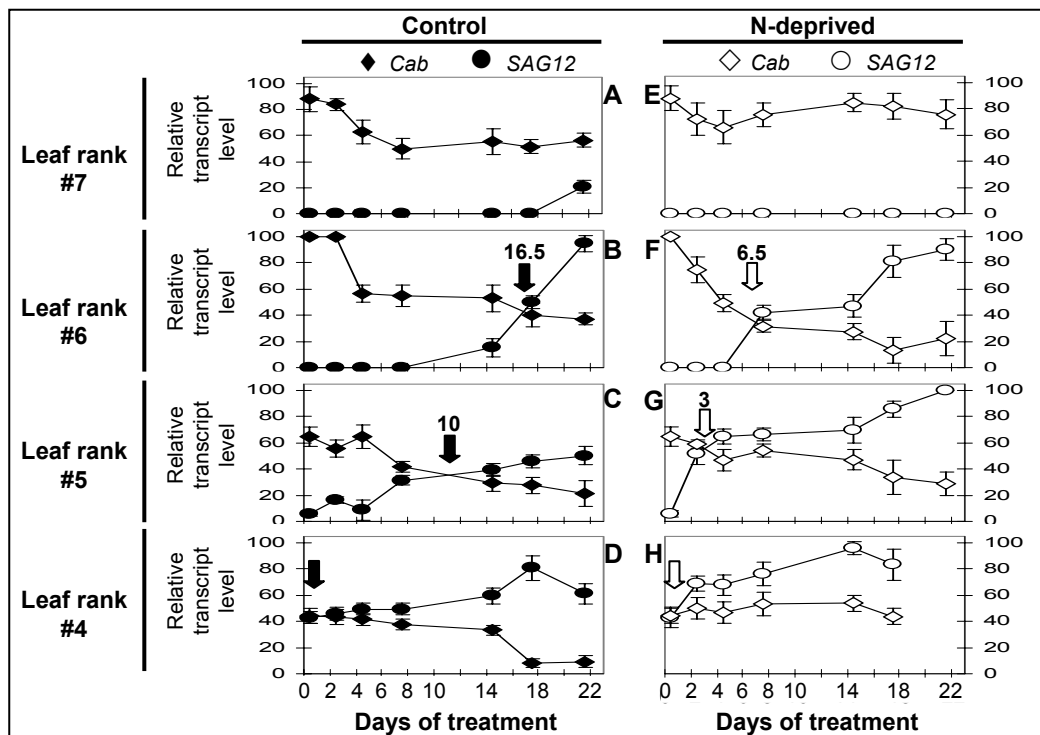


Figure IV-3 : Changes in the steady-state transcript level of *SAG12* and *Cab* genes (expressed as % of maximum transcript level) in different leaf ranks of control (A, B, C, and D) and N-deprived (E, F, G, and H) plants. The maximum level of transcripts (100%) was observed in leaf #5 at Day 21 for *SAG12* and in leaf #6 at Day 0 for *Cab*. Signal intensities were measured by image analysis of gels given in Figure IV-2 and were normalized with the *EFl-a* gene observed in each leaf rank at 0, 2, 4, 7, 14, 17 and 21 d of treatment. The *EFl-a* gene was used as a cDNA synthesis and amplification control. For a given leaf rank, the theoretical date of the onset of senescence, which corresponds to sink/source transition for N is characterized by the intersection point resulting from the concomitant up- and down-regulation of the *SAG12* and *Cab* genes, respectively (for details see Materials and Methods). Vertical arrows indicate the date of theoretical transition from sink to source for a given leaf rank (onset of leaf senescence). Vertical bars indicate the mean \pm standard deviation of two RT-PCR reactions. Control: white arrow, N deprived plant: black arrow.

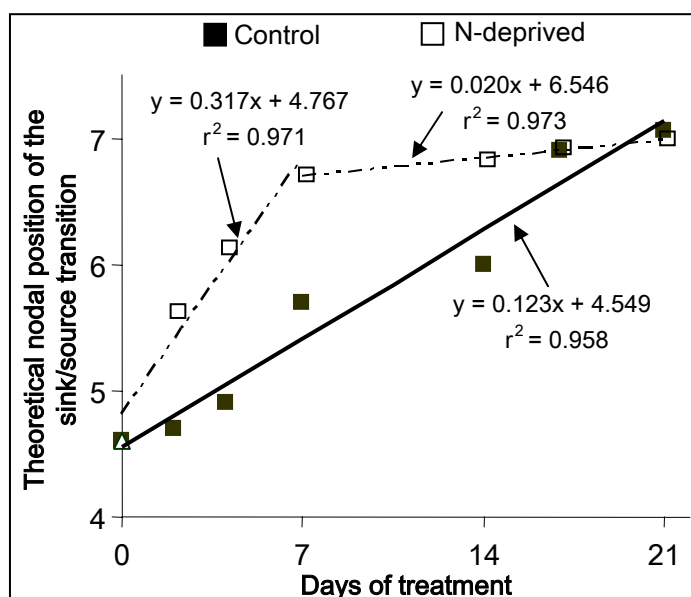


Figure IV-4 : Kinetics of the progression of leaf senescence along the axis of oilseed rape when supplied (Control) or not (N-deprived) with nitrate. At each time, the theoretical nodal position of a leaf rank corresponding to sink/source transition for N is characterized by a concomitant up and down-regulation of the *SAG12* and *Cab* genes respectively, as described by Gombert *et al.* (2006) (for details see Materials and Methods). The slope of each straight line provides information about the rate of progression of leaf senescence for the control or N-deprived plants.

growing conditions (control or N deprivation), leaf senescence progressed sequentially along the axis of the plant (from lower to upper leaves) for the duration of the experiment (Figures IV-2 and IV-3). At Day 0, leaf #4 from both sets of plants was already senescent (Figure IV-3D and H). In control plants, leaf #5 and #6 became senescent during the experiment with a theoretical date of the sink/source transition for N at Day 10, and 16.5, respectively (Figure IV-3C and D). For leaf #7, the lack of the concomitant up and down-regulation of *SAG12/Cab* genes indicated that the senescence process had not begun by the end of the experiment. However, a decrease in the transcript level of the *Cab* gene (between 2 and 7 d) and the weak up-regulation of *SAG12* gene at 21 d in leaf #7 suggested that this leaf was about to enter senescence (Figure IV-3A).

In N-deprived plants, the analysis of *SAG12/Cab* expression revealed that the theoretical dates of sink/source transition for N of leaves #5 and #6 were earlier than leaves from control plants. Thus, theoretical dates of the onset of senescence for leaf #5 and 6 were determined to be Day 3 and 6.5, respectively (Figure IV-3G and H). Leaf #7 did not become senescent under N-deprivation conditions since the *Cab* gene was highly expressed while transcripts of the *SAG12* gene remained undetectable during the entire experiment (Figure IV-3B).

1.3.4 Kinetics of leaf senescence progression

The last theoretical senescent leaf rank characterized by a concomitant up and down regulation of *SAG12* and *Cab* genes was determined at each harvest date (for details see Materials and methods). Thus, the evolution of these theoretical leaf ranks follows a linear relation where the value of the slope corresponds to the rate of leaf senescence progression under N-supplied and N-deprived conditions (Figure IV-4). In control plants, the slope of the straight line indicated that the temporal senescence progression was theoretically 0.123 leaf ranks per day and was constant during all the experiment. In N-deprived plants, this progression was accelerated during the first 7 days of treatment to reach 0.317 leaf ranks per day. By this time around 6.5 leaf ranks were theoretically engaged in the senescence process in N-deprived plants *versus* 5.5 in control plants. By contrast, after 7 d, the temporal progression of leaf senescence in N-deprived plants was highly reduced, being only 0.02 leaf ranks per day (Figure IV-4).

1.3.5 In-gel detection of anti-protease activities in leaf soluble proteins

An *in gel* detection technique has been used in order to identify the presence of trypsin inhibitor (TI) in leaves of oilseed rape. Based on the molecular weight standards and after

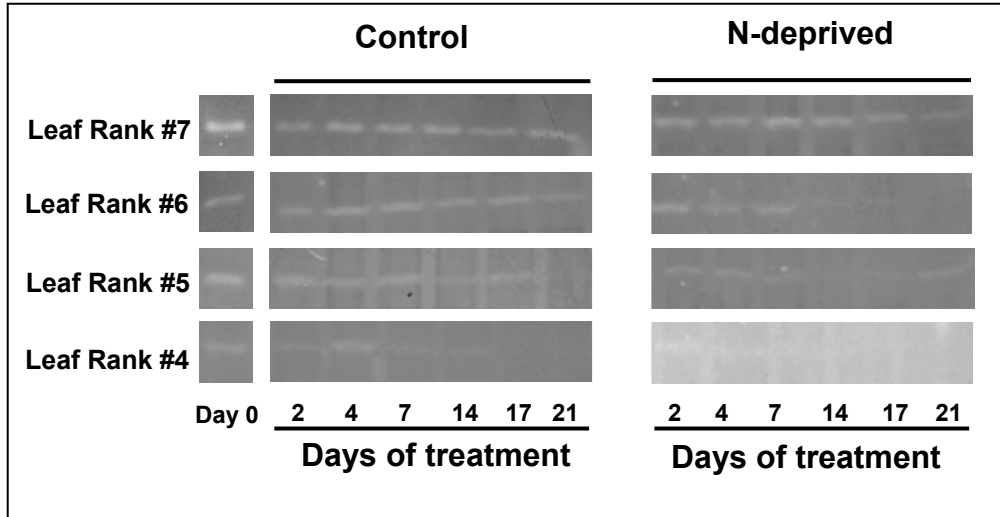


Figure IV-5 : Changes in the 19 kDa anti-trypsin activities in the different leaf ranks of oilseed rape supplied (Control) or not (N-deprived) with nitrate during 21 d. Detection of a 19 kDa protein possessing an anti-trypsin activity was obtained after SDS-PAGE of soluble proteins (75 μ g of proteins loaded per lane). See Materials and Methods section for details.

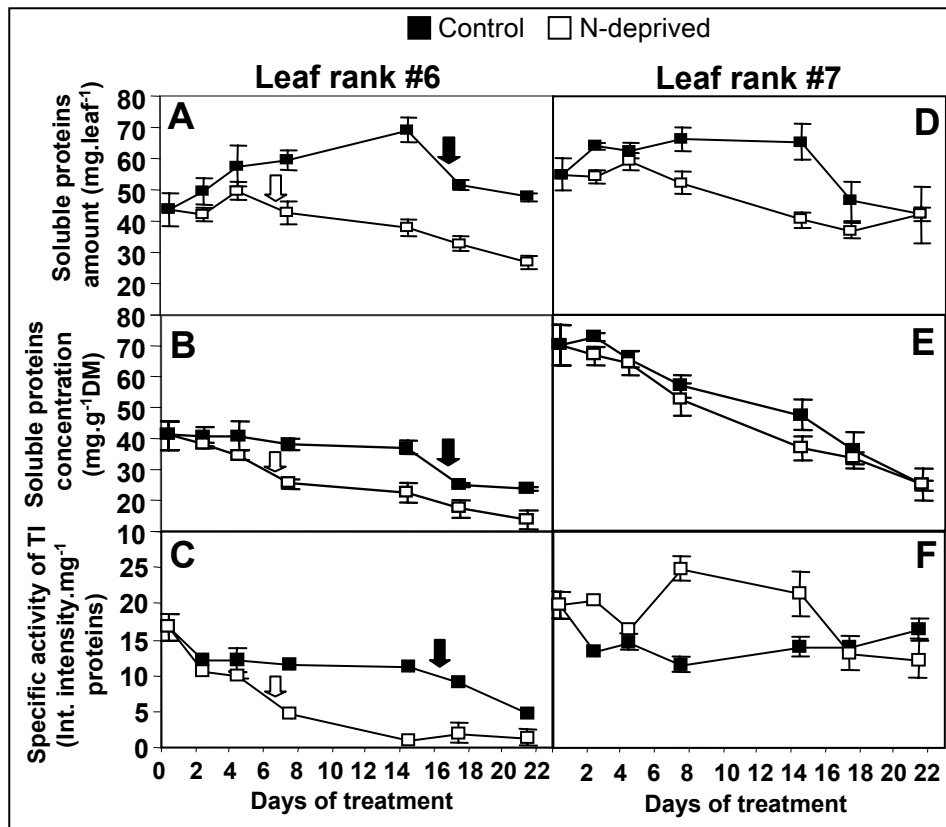


Figure IV-6 : Evolution of the soluble protein content (SP), and of the specific 19 kDa anti-trypsin activity (TI, expressed as integrated intensity per mg of proteins) in leaves #6 (A, B) and #7 (C, D) of oilseed rape supplied (Control) or not (N-deprived) with nitrate during 21 d. Vertical arrows indicate the time of theoretical transition from sink to source for a given leaf rank (onset of leaf senescence) as described in Figure IV-2. Control: black arrow, N deprived plant: white arrow. Vertical bars indicate \pm standard error of the mean ($n = 3$) and fit within the plot if not visible.

comparison with SDS-PAGE profiles obtained following silver nitrate staining, a polypeptide with a molecular weight of 19 kDa and harbouring anti-trypsin activity was detected (Figure IV-5). The TI activity was tested in overall leaf ranks of control and N-deprived plants (Figure IV-5). The zymograms clearly showed that the TI activity was higher in young leaves than in older ones. Additionally, it appeared that the TI activity decreased rapidly after the senescence started. In leaves #4, 5 and 6, the disappearance of TI activity was accelerated when plants were submitted to N deprivation (Figure IV-5).

1.3.6 Changes in the 19 kDa specific TI activity in relation to changes in leaf soluble protein content in mature or maturing leaves (leaf #6)

The evolution of soluble protein (SP) content and concentration was compared to changes in specific TI activity of the 19 kDa protein (Figure IV-6). In control plants, the SP content of leaf #6 remained stable between Day 0 and Day 7 d and slowly decreased until the end of experiment (Figure IV-6A). The decline in the quantity of SP in leaf #6 occurred earlier in N-deprived plants (after Day 4) when compared to control plants (after Day 14) (Figure IV-6A). As compared to control plants, the SP concentrations also decreased in mature (data not shown) or maturing leaves (leaf # 6, Figure IV-6B) of N-deprived plants. In leaf #6 of control plants, the specific TI activity remained constant up to Day 14 but was nearly undetectable after 17 d (Figure IV-6C). The TI activity of leaf #6 of N-deprived plants was similar to that of control plants until day 4 and strongly decreased after this date.

1.3.7 Changes in the 19 kDa specific TI activity in relation to changes in leaf soluble protein content in young leaves (leaf #7)

In the youngest leaf of control plants (rank #7), SP content remained stable between 2 and 14 d and decreased by 31% between Day 14 and Day 17 (Figure IV-6D) while the TI activity was always above the threshold value of 10 during the experimental period (Figure IV-6F). As compared to control plants, the amount of SP in leaf #7 was significantly reduced after 7 d when plants were deprived of nitrate (Figure IV-6D). The SP concentration in leaf #7 was not significantly different between N-deprived plants and control plants during the entire experiment (Figure IV-6E). The TI activity in leaf #7 of N-deprived plants was at least equal if not higher than the level of TI activity observed in leaf #7 of control plants during the 17 d of the experimental period (Figure IV-6F). The maximum value of TI activity in leaf #7 of N-deprived plants was observed at Day 7, and was approximately two fold higher than in control plants.

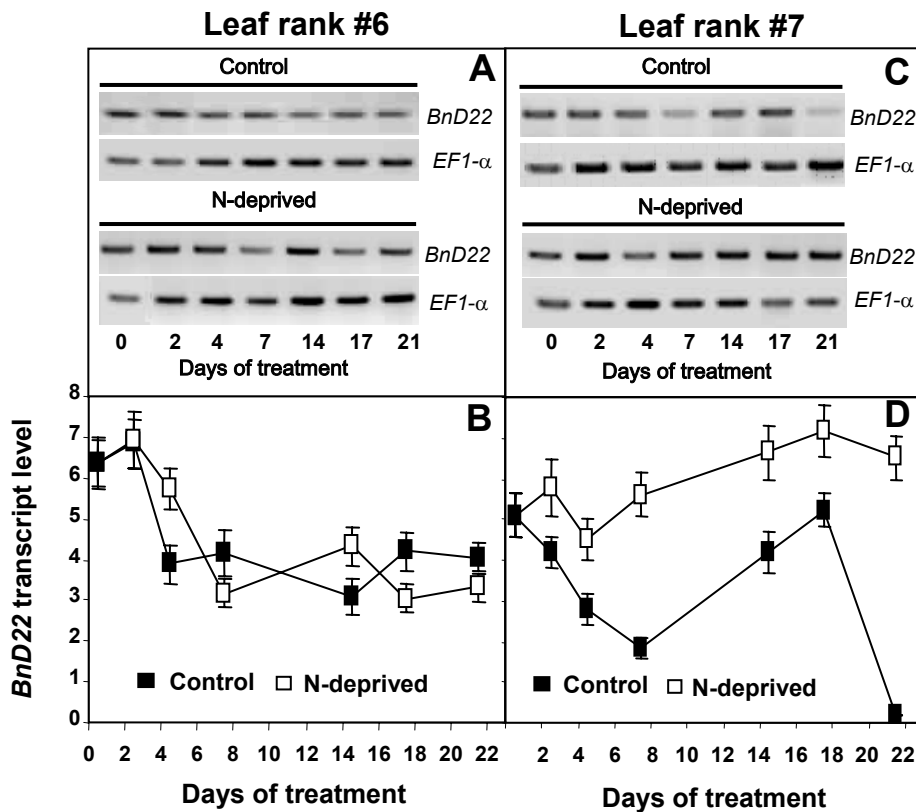


Figure IV-7 : RT-PCR analysis (A, C) and quantification of steady-state transcript level of *BnD22* gene expression (B, D) in leaves #6 (A, B) and #7 (C, D) of oilseed rape supplied (Control) or not (N-deprived) with nitrate during 21 d. Total RNA was extracted from each leaf rank at 0, 2, 4, 7, 14, 17 and 21 d of treatment. The *EF1-a* gene was used as a cDNA synthesis and amplification control. Vertical bars indicate the mean \pm standard deviation of two RT-PCR reactions.

1.3.8 BnD22 gene expression

The analysis of changes in steady state of the transcript level in leaf #6 revealed that *BnD22* mRNA decreased rapidly between 2 and 7 d and remained at a low level thereafter (Figure IV-7A and B). In leaves #5 and #4, the steady state level of *BnD22* transcripts was nearly undetectable (data not shown). There was no effect on gene expression of privation of mineral N as compared to control oilseed rape in leaves #6 (Figure IV-7A and B), #5 and #4 (data not shown). In leaf #7, the steady state level of *BnD22* transcripts was higher under N-deprived conditions (Figure IV-7C and D) throughout the experimental period. For instance, at day 7 the *BnD22* transcript level was 3 fold higher in N-deprived plants than in control plants (Figure IV-7D).

I.4 Discussion

1.4.1 Analysis of foliar N-mobilization using SAG12/Cab gene expression profiles

To determine precisely the date of entry into leaf senescence, the spatio-temporal progression of senescence (Figures IV-2 and IV-3) was studied by using a methodology recently described by Gombert *et al.* (2006) which is based on the analysis of both *SAG12* (encoding a cysteine proteinase) and *Cab* (encoding a chlorophyll-a/b binding protein) gene expression. The slope of the relationship between the theoretical nodal position of leaf rank engaged in senescence and the duration of N treatment indicated that under non-limiting mineral N nutrition (control plants) the progression of leaf senescence was remarkably constant (Figure IV-4). As compared to N-supplied plants (control), the *SAG12/Cab* gene expression profile revealed that the mineral N deprivation led to an increase in the number of senescent leaves up to 0.317 leaf ranks.day⁻¹ during the first 7 d of the experimental period. This implies that the senescence in mature or maturing leaves (leaf ranks ≤ #6) was accelerated in the case of low N availability (Figure IV-4), a pattern previously reported by Smart *et al.* (1995) and Gombert *et al.* (2006). This led to an increase in the apparent mobilization of soluble proteins in leaf #6 (Figure IV-6A) and in other mature leaves of N-deprived plants when compared to control plants. As a consequence, this early source/sink transition enhanced the mobilization of foliar N from these leaves to sustain the N demand of young leaves in full expansion, such as leaf #7.

Based on the *SAG12/Cab* gene expression changes observed in leaf ranks higher than #6, it appeared that in comparison to control plants, N deprivation delayed the initiation of

senescence (Figure IV-4). This could be due to a deceleration of young leaf development provoked by the lack of N in the nutrient solution. Even the leaf area of the young leaf #7 of N-deprived plants was significantly affected when compared to control leaves. However the biomass of leaf #7 (Figure IV-1B), and the soluble protein concentration (Figure IV-6E) were maintained to the same level as in control plants. Therefore, it is likely that in the case of deprivation of the mineral N source, oilseed rape tries to sustain the growth of young leaves by a greater recycling of N compounds from mature leaves. The maintenance of soluble protein (including RuBisCO, data not shown) and chlorophyll concentrations (Figure IV-1C) in the youngest leaf of N-deprived plants suggests that its photosynthesis capacity was also maintained. This hypothesis is supported by the fact that the growth of new leaves of oilseed rape was sustained even when the mineral N deprivation is prolonged until 40 d (Avice J-C., personal communication).

It must be pointed out that the date of the onset of chlorophyll and N content declining for leaves #6 (Figure IV-1C and D), #5 and #4 was strongly delayed in comparison to the theoretical start date of senescence that was determined with the *SAG12/Cab* molecular indicator (Figure IV-4). For instance, in leaf #5 of N-deprived plants, the theoretical date of senescence started at Day 3 while the N foliar content decreased significantly after Day 14 (data not shown). These results were supported by previous studies, which reported that the decrease in chlorophyll or leaf N contents were not accurate indicators of the onset of the sink/source transition during senescence, especially in N-deprived plants (Smart *et al.*, 1995; Hanfrey *et al.*, 1996; Gombert *et al.*, 2006). If the analysis of foliar senescence is strictly based on the changes of N (Figure IV-1D) or soluble protein contents (Figure IV-6D), the changes of these two biochemical parameters may lead to the conclusion that leaf #7 of N-deprived plants was engaged in the senescence process since Day 7. However, the *SAG12/Cab* gene expression profile (Figure IV-4) indicated that leaf #7 was not senescing. This is related to the fact that from the emergence of a leaf to its maturation, there is a phenomenon of N dilution in leaf dry matter which is due to a large accumulation of C compounds during the maturation step of leaf development (Colnenne *et al.*, 1998). Therefore, it appears that monitoring *SAG12/Cab* gene expression avoids the confusion between the N dilution phenomenon and the real initiation of N mobilization associated with the senescence process. These last points reinforce the idea that *SAG12/Cab* is an accurate indicator of the initiation of N recycling during leaf senescence.

It is now well established that leaf senescence is divided into three phases (Noodén *et al.*, 1997, Buchanan-Wollaston 1997; Yoshida 2003; Zimmermann and Zentgraf 2005): (i) an

initiation phase induced by environmental, hormonal or other endogenous signals and characterized by a transition from sink to source and an alteration of cellular redox status; (ii) a degenerative phase, which corresponds to the hydrolysis and mobilization of macromolecules and (iii) a terminal phase, which refers to the irreversible loss of cell integrity and viability. Our results suggest that a concomitant study of the *SAG12/Cab* gene expression profile with a fine description of the modification of proteinase activities and biochemical changes (eg. ROS, N, amino acids, total proteins, chlorophyll content etc.), which are classically associated with leaf senescence, may also allow a better characterization of these different phases. Therefore, it could be hypothesized that using changes in *SAG12/Cab* gene expression as a means to establish a Leaf Senescence Index (LSI) might serve as a fine determination of the timing of different events occurring during the progression of leaf senescence. This determination might also work under conditions where the senescence mechanisms were accelerated or delayed.

The present study demonstrates that leaves of oilseed rape exposed to nitrate deprivation present two contrasting physiological pathways: the mature leaves characterized by an acceleration in the initiation of senescence following by a greater mobilization of N; and the youngest leaves characterized by their capacity to (i) maintain growth, (ii) preserve their soluble protein concentrations and (iii) delay their entry into senescence. Such a difference in leaf physiologies in terms of N management in different areas of the same plant suggests that there is a strong regulation of the mechanisms involved in N mobilization associated with leaf senescence. Among the different possible interpretations, we propose that the proteolytic machinery is more likely to be regulated by protease inhibitors. To address this question, we investigated the detection of protease inhibitor activities and the expression of *BnD22*, a gene encoding a putative inhibitor of trypsin that could be involved, as suggested by Reviron *et al.* (1992), in the regulation of the protein mobilisation occurring during leaf senescence of oilseed rape.

1.4.2 Leaf senescence progression as compared to specific TI activity and BnD22 gene expression changes

Protease inhibitors are well known to be involved in plant defense response by limiting pathogen infestation (Ryan 1990; Koiwa *et al.*, 1997; Michaud, 1998; Mosolov and Valueva, 2005). In addition, protease inhibitors have also other physiological functions at various steps of plant development. For example, they may facilitate protein storage during seed or tuber maturation. They also inhibit the endogenous proteases involved in the mobilization of

organic reserves in seeds that are required to sustain the first step of seedling development. The role of protease inhibitors in the control of the senescing process has also been evoked. For instance, in *Citrus paradisi*, *lkiL-1* and *lkiL-2* (two genes encoding serine protease inhibitors of Kunitz type) were up-regulated in young leaves whereas they were strongly down-regulated in mature leaves (Shatters *et al.*, 2004). Other proteinase inhibitors such as cystatin (an inhibitor of cysteine proteases) were also suspected to modulate the senescence process (Huang *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2002; Sin and Chye, 2004). Moreover, some studies have suggested that proteinase inhibitors and especially the Kunitz type trypsin inhibitors may have a crucial role in programmed cell death (PCD), which influences the course of development and aging of plant tissues (Mosolov and Valueva, 2005; Groover and Jones 1999; Beers *et al.*, 2000). Nevertheless, most of the previous works reporting a role for protease inhibitors in the regulation of senescence were performed at the gene level without a clear demonstration of the anti-protease activity of the corresponding protease inhibitor genes. Based on these data, our first objective was to find some protease inhibitor activities in the soluble protein extracts obtained from contrasting leaves of oilseed rape in which the initiation of leaf senescence is precisely determined by the *SAG12/Cab* gene expression profile.

Using a modified method for the detection of trypsin inhibitor (TI) activity, previously described by Yeh *et al.* (1997), we identified a 19 kDa polypeptide exhibiting a TI activity. Whatever the date of the experiment, the young leaves (rank #7) presented a higher TI activity than older leaves (Figure IV-5). High activity of TI in young leaves is consistent with previous studies, reported by Cipollini and Bergelson (2000), demonstrating the detection of TI activity in the first leaves of 10-day-old oilseed rape seedlings. Our data also indicated that the steady-state level of the *BnD22* transcript is always higher in the young leaf than in the mature leaves (Figure IV-7). Altogether, these results confirm that leaves of oilseed rape possess a TI activity from the beginning of their development, and suggest that the expression of TI in young leaves could be constitutive. In contrast to mature leaves, N deprivation provoked a delay in the initiation of senescence in young leaves as compared to control plants (Figure IV-4). Interestingly, the level of TI activity in young leaves (leaf #7) in the N-deprived plants was equal or higher to control plants during 17 d of treatment (Figure IV-6F). In addition, the level of *BnD22* transcripts in leaf #7 was always higher in N-deprived plants than in control plants (Figure IV-7D). This high accumulation of *BnD22* transcripts and the peak of TI activity coincided with the delay in senescence observed in N-deprived young leaves. Thus, we assumed that in N-deprived young leaves, the protease inhibitors might have

an important physiological function in both the regulation of senescence initiation and the maintenance of the soluble protein concentration. Therefore, by delaying the senescence and keeping the soluble protein concentration, the young leaf should be able to maintain its photosynthetic activity and growth.

TI activity (Figure IV-5) and *BnD22* gene expression (Figure IV-7) tended to decline with leaf age, suggesting the presence of a decreasing gradient of TI activities and *BnD22* gene expression from the youngest to the oldest leaves. As expected, N deprivation accelerated the initiation of leaf senescence in mature leaves (Figure IV-4). In leaf #6, the *SAG12/Cab* gene expression indicated that N-deprivation initiated senescence after 6.5 d versus 16.5 d for control plants. TI activity in leaf #6 was very low after 21 d in control plants whereas there was no TI activity after 14 d in N-deprived plants (Figure IV-5). The soluble protein content (Figure IV-6A) and concentration (Figure IV-6B) in leaf #6 of N-deprived plants significantly decreased after 7 d of treatment when compared to control conditions. The fact that the acceleration of senescence in mature leaves was concomitant with the mobilization of soluble proteins and the strong decrease of both TI activity and *BnD22* gene expression, reinforces the hypothesis of the functional involvement of protease inhibitors in the regulation of the senescence process in oilseed rape. The pioneer work of Reviron *et al.* (1992) have also suggested that the *Brassica napus* drought-induced protein (BnD22), which possesses a high degree of homology with the Kunitz protease inhibitor family, may act in the regulation of leaf senescence. Interestingly, BnD22 accumulation was concomitant with a lower proteolytic activity in the leaves of oilseed rape exposed to water stress (Reviron *et al.*, 1992). In spite of its weak capacity to inhibit chymotrypsin, Ilami *et al.* (1997) have showed that purified BnD22 did not inhibit endogenous leaf proteases nor other serine proteases tested such as trypsin. The results of Ilami *et al.* (1997) do not match with the assumption that BnD22 has a significant role in the control of proteolysis associated with the leaf senescence process.

However, BnD22 may have other functions since Nishio and Satoh (1997) have shown that this protein shared high homology with a Water-Soluble Chlorophyll Protein (WSCP) previously identified in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrys*). This WSCP is specific to plants of the family *Brassicaceae* (defined as class II WSCP), is induced by drought and heat stress, and possesses a Kunitz-type protease inhibitor motif in its sequence, but does not exhibit a significant anti-proteolytic activity against trypsin (for review see Satoh *et al.* 2001). Although the physiological functions of class II WSCP are not completely clarified, there are several hypotheses about its role. Indeed, Satoh *et al.* (1998) have reported that WSCP was able to extract chlorophylls from thylakoid pigment proteins, a property suggesting that

WSCP was a carrier of chlorophyll molecules. Reinbothe *et al.* (2004) also demonstrated that class II WSCPs may act as a carrier of chlorophyllide. Then, as previously suggested by Satoh *et al.* (2001) and Reinbothe *et al.* (2004) for other WSCPs, it is tempting to hypothesize that BnD22 could have interesting implications in the regulation of both the development and senescence of chloroplasts. More recently, Horigome *et al.* (2007) have suggested that class II WSCP may contribute to the photoprotection of chlorophyll molecules bound in the WSCP complex by reducing the photoxydation between chlorophyll and molecular oxygen that is generated in response to environmental constraints or during senescence process. Because our data show that there is an induction of *BnD22* gene expression in young leaves of N-deprived oilseed rape, it could be assumed that BnD22 may contribute to the protection of chloroplast metabolism through its photoprotective function of chlorophyll.

In conclusion, the present study provides convergent arguments to assume that protease inhibitors can play a significant role in the regulation of N mobilization associated with leaf senescence in oilseed rape. By combining proteomics approaches (2D, determination of protease and anti-protease activities) with molecular analysis of senescence using the *SAG12/Cab* molecular indicator, future investigations will attempt to confirm the physiological function of protease inhibitors and their potential impact on the low nitrogen use efficiency usually observed in oilseed rape.

Acknowledgements. The authors would like to thank Ms. Marie-Paule Henry for her valuable help in N analysis. The authors also wish to acknowledge Dr. Olivier Sordet (Laboratory of Molecular Pharmacology, NIH/NCI, Bethesda, MD, USA) for kind revision of this manuscript. This work was supported by a Ph. D. grant for Marie Desclos from INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, France) and the Conseil Régional de Basse-Normandie.

Article 2

Avant-propos

L'ensemble des données obtenues dans l'étude précédente (article 1) suppose que la privation en azote (N) minéral se traduit:

- dans les feuilles âgées, par une **accélération de la sénescence**, une disparition rapide de l'activité inhibitrice de protéases de type trypsine (TI) à 19 kDa et une diminution de l'expression du gène *BnD22* (*Brassica napus* drought 22 kDa), un inhibiteur de protéases de type Kunitz,
- dans les jeunes feuilles, par un **ralentissement de la sénescence**, une accumulation de l'activité TI à 19 kDa et une induction de l'expression du gène *BnD22*.

Le travail présenté dans ce deuxième article avait pour objectif d'identifier précisément la protéine à l'origine de l'activité TI à 19 kDa identifiée précédemment. Pour cela deux expérimentations ont été conduites : une privation en nitrate et un traitement au méthyljasmonate (MeJA). Le MeJA est une phytohormone connue pour accélérer le processus de sénescence foliaire (He *et al.*, 2002) ainsi que pour induire des inhibiteurs de protéases (Cipollini et Sipe, 2001).

L'identification de la protéine à activité TI a été conduite par comparaison de gels bidimensionnels (2-DE) colorés au nitrate d'argent et de zymogrames 2-D. Une analyse 2-DE couplée au séquençage par ESI LC-MS/MS a permis de démontrer que **la protéine BnD22 (*Brassica napus* drought 22 kDa) était à l'origine de l'activité TI**. En effet, cette protéine est un inhibiteur putatif de protéases à sérine de type Kunitz, précédemment mis en évidence chez des colzas soumis à un stress hydrique (Reviron *et al.*, 1992). De plus, l'expression du gène *BnD22* suivie par Q-PCR concorde avec le niveau d'abondance de la protéine BnD22 et le niveau d'activité TI de cette protéine. Notre étude est, à ce jour, la première **(i) à mettre en évidence une activité anti-protéasique après 2-DE et (ii) à associer une activité TI à la protéine BnD22**.

La protéine BnD22 est également connue chez le colza pour être une protéine de liaison aux chlorophylles (**WSCP : Water Soluble Chlorophyll binding Protein**). L'utilisation d'anticorps spécifiques de WSCP de *Brassica oleracea* couplée à des westerns blots après 2-DE a permis d'identifier deux autres WSCPs. La double fonction WSCP/TI de la protéine BnD22, au sein des jeunes feuilles, est discutée.

II. A PROTEOMIC PROFILING APPROACH TO REVEAL A NOVEL ROLE OF BnD22 (*BRASSICA NAPUS* DROUGHT 22 KDA)/WATER SOLUBLE CHLOROPHYLL BINDING PROTEIN IN YOUNG LEAVES DURING NITROGEN REMOBILIZATION INDUCED BY STRESSFUL CONDITIONS

Abstract. Despite its Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP) function, the putative trypsin inhibitor (TI) activity of the BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa) protein and its physiological function in young leaves during leaf N remobilization promoted by stressful conditions remains an enigma. Therefore, our objectives were to determine (i) if BnD22 is related to the 19 kDa-TI previously detected in *Brassica napus* young leaves, and (ii) if the levels of *BnD22* transcripts, BnD22 protein and TI activity in young leaves are associated with plant responses to stress conditions (N starvation and MeJA treatments) that are able to modulate leaf senescence. Compared to control, N starvation delayed initiation of senescence and induced 19 kDa-TI activity in the young leaves. After 3 d with MeJA, the 19 kDa-TI activity was 7-fold higher than the control. Using 2-DE gel, TI activity and ESI-LC MS/MS analysis, it was demonstrated that two 19 kDa proteins with *pI* 5.0 and 5.1 harbouring TI activity, correspond BnD22 perfectly. *BnD22* gene expression, TI activities and BnD22 protein presented similar patterns. Using polyclonal anti-WSCP antibodies of *Brassica oleracea*, six polypeptides separated by 2-DE were detected in young leaves treated with MeJA. ESI-LC MS/MS analysis of six polypeptides confirms their homologies with WSCP. Results suggest that BnD22 possesses dual functions (WSCP and TI) that lead to protect younger tissues from adverse conditions by maintaining metabolism (protein integrity and photosynthesis). By sustaining sink growth of stressed plants, BnD22 may contribute to a better utilization of recycling N from sources, a physiological trait that improves the N use efficiency.

II.1 Introduction

To maintain or increase crop yields while benefiting the environment through reductions in N fertilizer inputs, it will be necessary to improve both N-use efficiency (Good *et al.*, 2004) and especially the recycling of endogenous N from vegetative organs to the growing tissues. When the N demand for growing vegetative or reproductive tissues exceeds the mineral N

availability, the extent of endogenous N mobilization, particularly from senescing leaves, may lead to higher N use efficiency (Aerts and Chapin, 2000; Yasamura *et al.* 2007). Proteolysis is one of the most important processes of N remobilization (Hörtensteiner and Feller, 2002; Zimmerman and Zentgraf, 2005). Moreover, the effective recycling of the N compounds from source leaves to sink growing tissues requires a fine coordination between sink demand and the processes of proteolysis. This is particularly important when plants are confronted by stresses that could lead to strong modification of the source/sink relationships. Therefore, understanding the mechanisms and associated regulation of (i) leaf proteolysis that preside over efficient protein-N remobilization and (ii) maintenance of sink strength, is a prerequisite for improving N recycling and subsequently N use efficiency.

Among the factors able to modulate the N use efficiency, the inhibitors of proteases may have a pivotal role in both mechanisms, *i.e.* rate of protein-N remobilization in source leaves and maintenance of metabolism in young leaves. Indeed, a few studies (Sugawara *et al.*, 2002; Sin and Chye, 2004; Shatters *et al.*, 2004) have suggested the involvement of protease inhibitors in the control of proteolysis during the senescence process in which the cysteine and serine proteases are the proteolytic systems that have been the most frequently implicated (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Jiang *et al.*, 1999). Serine proteinase inhibitors including potato inhibitors I and II (Ryan, 1990), Bowman-Birk inhibitors or trypsin inhibitors (TI) of Kunitz type (Richardson, 1991) have been the most commonly studied. Many studies revealed that these protease inhibitors are more abundant in young leaves than in old or mature leaves (Reviron *et al.*, 1992; Cipollini and Bergelson, 2000; Etienne *et al.*, 2007). Inhibitors of Kunitz type serine proteases (*IkiL-1* and *IkiL-2*), identified in leaves of *Citrus paradise* Macf., were down-regulated in mature leaves, whereas they were up-regulated in young leaves (Shatters *et al.*, 2004). Gene expression of leaf protease inhibitors was stimulated by phytohormones which induced senescence or plant responses to abiotic and biotic stresses such as abscisic acid (Peña-Cortés *et al.*, 1991; Horn *et al.*, 2005), jasmonic acid (Farmer and Ryan, 1992; Sanchez-Hernandez *et al.*, 2004) and ethylene (O'Donnell *et al.*, 1996). Numerous studies demonstrated that environmental constraints which stimulated senescence (Yoshida 2003), such as drought (Downing *et al.*, 1992; Kang *et al.*, 2002), N starvation (Etienne *et al.*, 2007), and wounding (Shatters *et al.*, 2004) can also modulate the expression of protease inhibitors in young leaves. Although it was clearly established that protease inhibitors acted as defense proteins in leaves against pathogen attacks (Ryan, 1990; Horn *et al.*, 2005; Mosolov and Valueva, 2005), the physiological function of protease inhibitors induced in young leaves

in response to modification of source/sink relationships induced by abiotic stresses remains unclear.

Brassica napus L. (oilseed rape) is a particularly interesting plant for studying the involvement of protease inhibitors in leaves and their contribution to N use efficiency. Indeed, this important crop plant, requires high amounts of mineral N but is characterized by low N use efficiency as only 50% of fertilizer-N is recovered by the crop at harvest date (Schjoerring *et al.*, 1995) leading to a large restitution of this element to the soil (Dejoux *et al.*, 2000). Moreover, a high concentration of N in leaves shed before flowering (exceeding 2% of dry weight; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2005b) indicates that oilseed rape is not able to efficiently mobilize the N from leaves to growing tissues during senescence. During the vegetative stages of oilseed rape, this lack of mobilization of endogenous leaf N was not due to a limitation in the amino acid transport from leaves to phloem (Tilsner *et al.*, 2005). Therefore, the weak N remobilization could be related to an incomplete hydrolysis of foliar proteins leading to low recycling of endogenous foliar N from source leaves and/or to a limitation of sink demand of young leaves. When oilseed rape is submitted to resource limitation such as nitrate starvation (Etienne *et al.* 2007) or water deficit (Reviron *et al.* 1992), senescence is induced and propagated from old to mature leaves while senescence is delayed in young leaves. These differences in behaviour between leaves suggest a fine and high regulation of metabolism at a whole plant level and have important consequences on N use efficiency especially in the case of asynchronism between the N remobilization from source leaves and N demand in sink leaves. Recently, Etienne *et al.* (2007) have shown that the delay of senescence in N-deprived young leaves of oilseed rape was concomitant with an accumulation of TI activity detected by zymogram at 19 kDa. Additionally, the pioneer works of Reviron *et al.* (1992) have reported that BnD22 (*Brassica napus* drought 22 kDa), a protein with high homology with TI, was accumulated in young leaves of drought stressed-oilseed rape characterized by a delay in senescence. Despite its homology with the Kunitz protease inhibitor family, purified BnD22 protein did not significantly inhibit the endogenous leaf proteases or other serine proteases tested such as trypsin and chymotrypsin (Ilami *et al.*, 1997; Nishio and Satoh, 1997). However, the high abundance of BnD22 in young leaves adapted to drought was consistent with the hypothesis that BnD22 may contribute to the protection of the young leaves by delaying their senescence. These studies suggested a role of protease inhibitors in the maintenance of growth in young leaves submitted to abiotic stresses. The accumulation of *BnD22* transcripts in young leaves submitted to drought (Downing *et al.*, 1992) and N starvation (Etienne *et al.*, 2007) reinforces this assumption. Moreover, BnD22 is also known to

be a Water-Soluble Chlorophyll Protein (WSCP) of class II (specific class including *Brassicacea*; Nishio and Satoh, 1997). This WSCP is able to bind chlorophyll molecules, suggesting a role as a chlorophyll carrier (Satoh *et al.*, 2001; Reinbothe *et al.*, 2004) and an involvement in the regulation of both the development and senescence of chloroplasts. Recently, Horigome *et al.* (2007) have suggested this WSCP may contribute to the photoprotection of chlorophyll molecules.

Compared to its WSCP function, the putative protease inhibitor activity of BnD22 remains an enigma. Therefore, assuming that a protease inhibitor may have a central role in the maintenance of metabolism in young leaves leading to the modulation of N use efficiency, our objectives are (i) to determine if BnD22 is related to the 19 kDa TI previously detected in *Brassica napus* young leaves, and (ii) to verify if the levels of the *BnD22* transcript and protein as well as TI activity in young leaves are associated with the plant tolerance response to stressful conditions such as N starvation and methyl jasmonate (MeJA). Proteomic approaches using high resolution 2-DE and identification of the protein by sequencing (ESI-LC MS/MS) revealed that (i) a TI activity could be detected after 2-DE gel separation, (ii) TI activity was harboured by BnD22, and (iii) BnD22 cross-reacted with the antibodies which recognized a WSCP of *Brassica oleracea* (Nishio and Satoh, 1997). The dual WSCP/TI functions of BnD22 in young leaves of *Brassica napus* L. submitted to stress conditions are discussed.

II.2 Materials and methods

II.2.1 Plant material

Seeds of *Brassica napus* (cv Capitot) were surface-sterilized by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by 20% sodium hypochlorite for 20 min. After 10 washes in demineralized water, seeds were germinated on foam rubber (Oasis growing pinpot, Agrimedia). Just after emergence of the third leaf, seedlings were transplanted into 2 L pots filled with attapulgit (1 plant per pot) and were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night) and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with Neon tubes (Philips TLD 36W) supplying an average photosynthetically active radiation of 200 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the top of the canopy. Plants were watered every 2 d with 100 mL of nutrient solution containing 2 mM KNO₃, 3 mM CaCl₂, 1 mM K₂SO₄, 0.5 mM MgSO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.15 mM K₂HPO₄, 0.2 mM Fe-Na-EDTA, 14 μM H₃BO₃, 5 μM MnSO₄, 3 μM ZnSO₄, 0.7 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.7 μM CuSO₄ and 0.1 μM CoCl₂. After 85 days of growth

corresponding to the rosette stage, plants were split into four sets for nitrate starvation and corresponding control or foliar spraying of methyl jasmonate (MeJA) and the corresponding control (water spraying).

II.2.2 Application of treatments (mineral N starvation or MeJA spraying) and tissue sampling

Rosette plants grown with nutrient solution containing 3 mM KNO₃ were split into two sets of plants. Plants were supplied every 2 d with nutrient solution without KNO₃ (N starvation) and 3 mM of KNO₃ (control plants). These mineral N treatments were applied during 28 days. Plants were sampled in triplicate after 14, 21, and 28 d of treatment.

For MeJA treatment, one set of plants was sprayed with MeJA solution (100 µM MeJA, 0.05% Tween 20, 6.5 mL plant⁻¹ d⁻¹) applied to the leaves. The second set of plants, corresponding to the control, was sprayed with water (containing 0.05% Tween 20, 6.5 mL plant⁻¹ d⁻¹) on the same date. Control and MeJA treated plants were sampled in triplicate on the first day (Day 0 of experiment) and after 1, 3 and 7 d of treatment.

For all treatments, each leaf rank was separated based on the date of their appearance from the oldest to youngest. The chlorophyll content was measured using a SPAD-502 chlorophyll meter (Minolta, Tokyo, Japan). Thereafter, leaves were weighed and the laminae was separated from the petiole, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

II.2.3 Soluble proteins extraction and SDS-PAGE

Frozen laminae samples (200 mg fresh weight) from each triplicate were ground in a mortar with liquid nitrogen in the presence of 150 mg PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). Soluble protein samples were extracted in citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM Na₂HPO₄, pH 6.8). The homogenate was centrifuged at 12000 g at 4°C for 1h and the resulting supernatant was used for the determination of soluble protein concentration by protein-dye staining (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (BSA) as standard. For SDS-PAGE, 3 µg of soluble proteins were prepared in 2× Laemmli lysis buffer containing β-mercaptoethanol (5% v/v). SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) in a 5.5% polyacrylamide (w/v) stacking gel and a 15% polyacrylamide (w/v) resolving gel. Gels were stained with the silver staining procedure described by Blum *et al.* (1987).

II.2.4 Total proteins extraction

Frozen laminae samples (200 mg fresh weight) from each triplicate were ground in a mortar using liquid nitrogen and re-suspended in 2 mL of cold acetone containing 10% TCA. After centrifugation at 16 000 g for 3 min at 4°C, the supernatant was discarded and the pellet was rinsed as previously described by Wang *et al.* (2003). The pellet was re-suspended in 200 µL of rehydration R2D2 buffer (5 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propane-sulfonate, 2% N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate, 20 mM dithiothreitol, 5 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine, 0.5% IPG buffer (GE Healthcare, Saclay, France), pH 4 to 7; Mechin *et al.*, 2003). The total protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) using BSA as standard.

II.2.5 Two-Dimensional Electrophoresis (2-DE)

For 2-DE of soluble proteins, 100 µL of protein extract were purified using a ReadyPrep 2-DE cleanup kit (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). The final pellet was re-suspended in rehydration R2D2 buffer. The extract of total or soluble proteins was first separated according to charge in the electrofocusing PROTEAN IEF system (Bio-Rad), at 20°C, using 18-cm gel strips forming an immobilized linear pH gradient from 4 to 7 (GE Healthcare). Each strip was rehydrated at 50 µA/gel for 14h in the presence of 330 µL of R2D2 buffer containing 125 µg of total or soluble proteins. Isoelectric focusing ran for 15 min. at 250 V, 2h at 500 V, and then until 50 kV at 10 000V. After electrofocusing, the strips were immediately equilibrated in the equilibration buffer (75 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 300 mM Tris Base) containing DTT (65 mM) followed a second incubation in equilibration buffer containing iodoacetamide (50 mM) and bromophenol blue (0.5%). Second dimension electrophoresis was carried out on 12 % polyacrylamide (w/v) gels (20 cm × 20 cm) using an Investigator system (Millipore, Saint-Quentin Fallavier, France) at 300 mV. Gels were stained using the silver staining procedure described by Blum *et al.* (1987). Gels were scanned with the ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) before image analysis.

II.2.6 Image analysis of 2-DE gels

Images of the 2-DE gels were acquired with the ProXPRESS 2D proteomic Imaging System and analyzed using the Progenesis SameSpots Software v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) according the manufacturer's protocol. Gels from three independent biological replicates were used. Spot detection, warping and matching were performed automatically by the software. Matching was automatic but verified manually:

artifacts, or spots that could not be confidently verified as true matches, were disregarded rather than manually edited, and misalignments were corrected by manual warping when appropriate. *Mr* and *pI* were calculated using Samespots software calibrated with commercial molecular mass standards (precision protein standards unstained; Bio-Rad) run in separate marker lane on 2-DE gel.

II.2.7 Detection of trypsin inhibitor (TI) activity after SDS-PAGE and 2-DE

For SDS-PAGE, one volume of each triplicate was mixed together and prepared in 2× lysis buffer without β-mercaptoethanol. SDS-PAGE was performed using a 5.5% polyacrylamide (w/v) stacking gel and a 18% polyacrylamide (w/v) resolving gel as described by Etienne *et al.* (2007). Seventy five micrograms of soluble proteins were loaded per lane and separated by SDS-PAGE. For the 2-DE gel, 340 μg of soluble proteins were purified using a ReadyPrep 2-D cleanup kit (Bio-Rad). After solubilization in R2D2 buffer, proteins were separated by 2-DE gels as described above. For detection of TI activity, gels were stained as described by Etienne *et al.* (2007) using a procedure adapted from Yeh *et al.* (1997). Briefly, gels were washed for 30 min with 25% 2-Propanol (v/v) and 30 min with Tris buffer (20 mM, pH 6). Thereafter, gels were incubated 30 min in Tris-CaCl₂ buffer (50 mM Tris base, 50 mM CaCl₂, pH 7.6) containing 40 mg.L⁻¹ bovine trypsin type I (EC 3.4.21.4). The detection of trypsin inhibitor was observed after 45 min in staining solution (0.6 mM N-Acetyl-DL-Alanine-2-Naphthyl Ester and 0.84 mM O-Dianisidine-Tetrazotized in Tris-HCl-CaCl₂ buffer (50 mM Tris base, 50 mM CaCl₂, pH 7.6)). Gels were finally washed in 2% acetic acid (v/v) and were scanned with the ProXPRESS 2D proteomic Imaging System. TI activity was estimated with the Millipore BioImage computerized image analysis system (Millipore) by measurement of integrated intensity. For each leaf rank, gels were made for each biological repetition (*n*=3). Each gel was replicated two times and the data relating to the specific TI activity were expressed as integrated intensity per mg of proteins. Gels presented in the manuscript corresponded to the gels obtained with the mix of the 3 biological repetitions.

II.2.8 Immunoblot analysis

The proteins samples were firstly separated by 2-DE as described above except that 250 μg of proteins were loaded in the strip. Electrophoretic transfer of polypeptides from 2-DE gels on to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Proteigene, Saint-Marcel, France) was conducted by semi-dry electroblotting (2.5 mA for 20 min, Milli Blot system, Proteigene), according to the protocol described by Towbin *et al.* (1979). After blotting, PVDF

membranes were treated with polyclonal anti-cauliflower-WSCP (dilution 1/1000) rabbit antibodies which cross-reacted with class II WSCP of *Brassica olearacea* (Nishio and Satoh, 1997). The antigen–antibody complex was visualized with alkaline phosphatase linked to goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad, dilution 1/6000) as described by Blake *et al.* (1984).

II.2.9 Protein Identification by ESI-LC MS/MS

Spots of interest were manually excised from gels and destained as described by Gharahdaghi *et al.* (1999). After digestion with 40 μ L of Sequencing Grade Modified Trypsin solution (41 units par μ L; Promega, Charbonnières-Les-Bains, France) overnight at 37°C, samples were re-suspended in 10 μ L of 0.1% formic acid in ultra pure water. An electrospray ion trap spectrometer (LCQ DecaXP, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) coupled on line with HPLC (SurveyorLC) was used for peptides analysis. Peptides were separated by reversed-phase HPLC on a C₁₈ capillary column (ThermoHyPurity C18 150 \times 0.18). A linear 18-min gradient (flow rate, 3 μ L.min⁻¹) from 5 to 80% B was used, where solvent A was 0.1% aqueous formic acid and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile. The electrospray ionization parameters were as follows: spray voltage, 3.5 kV; sheath gas flow rate, 30; capillarity temperature, 200°C; capillarity voltage, 30 V; Tube lens offset, 35 V. Mass spectrometry was acquired in a mode that alternated a full MS scan (mass range: 400–1600) and a collision induced dissociation tandem mass spectrometry (MS/MS) of the most abundant ion. The collision energy for the MS/MS scan was preset at the value of 35%. The LC MS/MS data were converted into DTA-format files which were further searched for proteins with MASCOT Daemon (Matrix Science, London, UK). Proteins with two or more unique peptides matching the protein sequence were automatically considered as a positive identification. In the situation where proteins had a unique peptide sequence match, the difference between theoretical and experimental M_r / pI should not exceed $\pm 25\%$ variance to be considered a match. Moreover, only peptides matching an individual ion score > 41 were accepted as a positive identification. For protein identification, two strategies were employed to mine the maximum information. Measured peptides were searched in the NCBI nr-protein sequence database *viridiplantae* (green plants) and in the *Brassica* EST database (*Brassica* Genome Gateway 2007).

Alignment analysis of assigned proteins was predicted using CLUSTALW (npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html). The research of predicted cleavage sites of signal peptides and phosphorylation sites was performed using SignalP 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) and NetPhos 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/), respectively.

II.2.10 RNA extraction

Total RNA was extracted from 250 mg of laminae 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 μ L extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750 μ L of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 sec. and after addition of 750 μ L of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 15 000 g (5 min., 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 μ L of sterile water. Fifty microliters of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at -80°C. After centrifugation (15 000 g, 20 min., 4°C), the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15 000 g for 5 min. at 4°C. The resulting pellet was dried for 5 min at room temperature and re-suspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed by spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and quantitative PCR (Q-PCR) analyses.

II.2.11 RT and Q-PCR conditions

For RT, 1 μ g of total RNA was converted to cDNA with an "iScript cDNA synthesis kit" using the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France). For Q-PCR amplification, primers of *BnD22* were designed after multiple alignment of nucleotidic sequences between *BnD22* (Accession no. X65637), encoding a *Brassica napus* trypsin inhibitor, *WSCP1* (Accession no. AB012699), and *WSCP2* (Accession no. AB078330), encoding a *Brassica oleracea* Water Soluble Chlorophyll binding Proteins 1 and 2, respectively, and *Heat Stress Induced Protein* (Accession no. AJ007414), encoding a *Brassica oleracea* Heat Stress Induced Protein. In order to target *BnD22* cDNA, specific primers were designed in the non conserved region. Thus, specific primers selected for the Q-PCR analysis were: *BnD22* forward primer: 5'-CCGGTTAGCTTCGGATATGA-3' and reverse primer: 5'-AGCTATTTGGGGCCGTACTT-3'. For Q-PCR analysis, *EF1- α* gene (Accession no. DQ312264), encoding a *Brassica napus* Elongation Factor, was used as an internal control gene (Nicot *et al.*, 2005) and was amplified using the following specific primer: *EF1- α* forward primer: 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3' and reverse primer 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3'. Q-PCR reactions were performed with 4 μ L of 200 \times

Table IV-I: Changes in chlorophyll content in mature leaves submitted to N starvation or MeJA treatments. Mean values of chlorophyll are expressed as percentage of control for each date of treatment \pm SE.

		Days of treatment						
		0	1	3	7	14	21	28
MeJA		100	95.5 (\pm 7.2)	75.3 (\pm 12.4)	22.0 (\pm 14.1)			
N Starvation						84.7 (\pm 3.9)	25.5 (\pm 3.3)	15.9 (\pm 8.0)

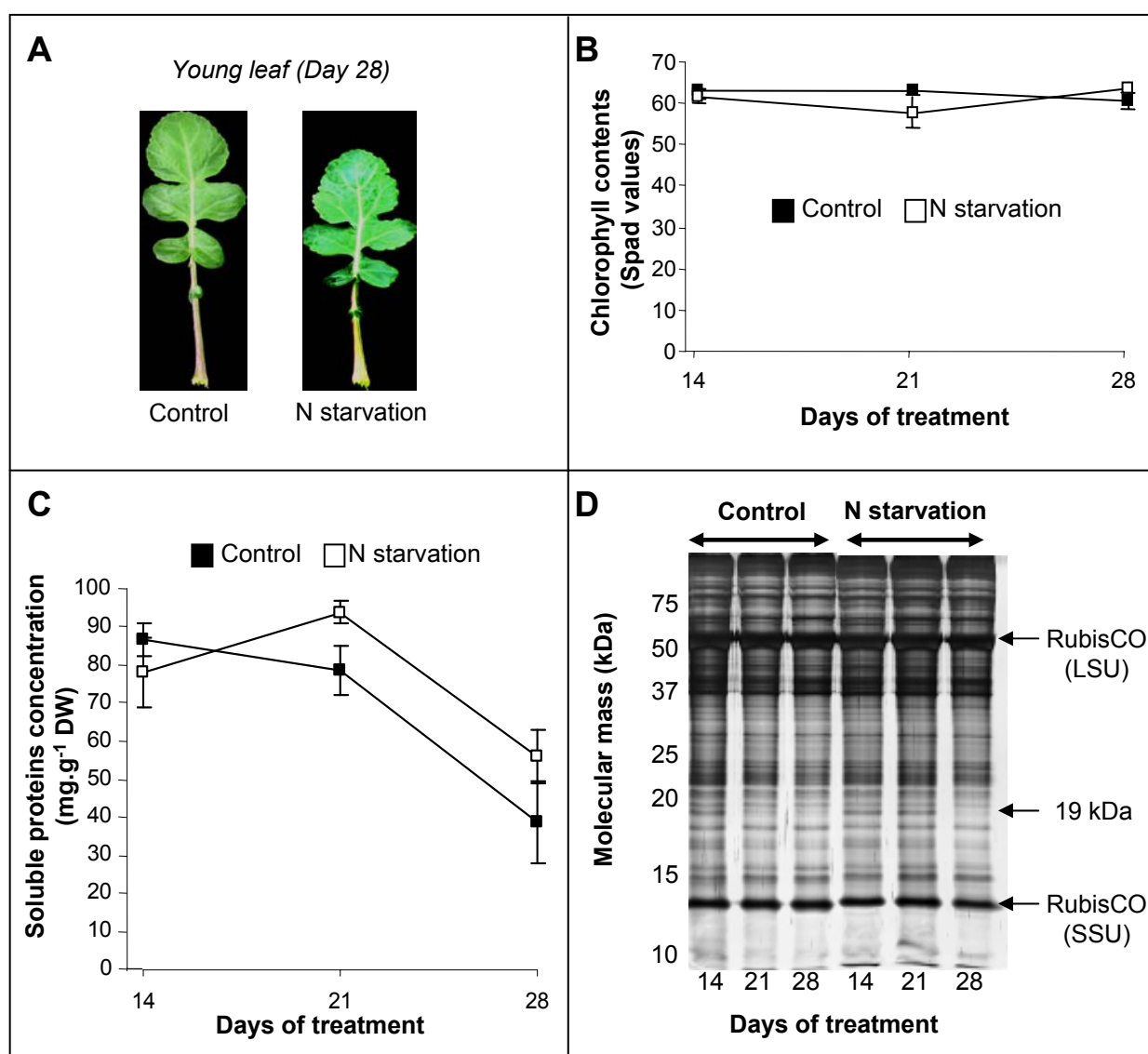


Figure IV-8 : Photography of young leaves of oilseed rape supplied (control) or not (N starvation) with nitrate during 28 d (A). Changes in chlorophyll content (B), soluble protein amount in laminae (C) and SDS-PAGE profiles of soluble proteins (D) in the laminae of young leaf of oilseed rape supplied (Control; ■) or not (N starvation; □) with nitrate during 28 d. Vertical bars indicate \pm standard error of the mean ($n = 3$) and fit within the plot if not visible. SDS-PAGE was obtained by loading a constant amount of 3 μ g of soluble proteins per lane and using silver nitrate staining. Molecular mass markers (kDa) are listed on the left of the gel. A protein at 19 kDa with specific changes during N treatment was indicated on the right of the gel. LSU: large sub-unit of RubisCO (55 kDa); SSU: small sub-unit of RubisCO (14 kDa).

diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1× SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a ChromoFour System (Bio-Rad). For each pair of primers, a threshold value and PCR efficiency have been determined using a cDNA preparation diluted over 10-fold. For both 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 of Q-PCR. After sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France) and Blastn analysis (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) to check the correct amplification of the target cDNA, the *BnD22* amplicon (199 bp of length) was 100% homologous to the *BnD22* cDNA sequence. For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were realized in triplicate and the relative expression of the *BnD22* genes in each sample was referred to a control sample (Control plant at day 14 for N starvation experiment and Control plant at day 0 for MeJA treatment) and was determined with the delta-delta Ct method using the following equation: relative expression = $2^{-[\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}}]}$, with $\Delta Ct = Ct_{BnD22} - Ct_{EF1-\alpha}$ 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 *BnD22* gene in the control sample was equal to one (2^0), by definition (Livak and Schmittgen, 2001).

II.2.12 Statistics

Results are presented as mean values for the three plant material (triplicate) batches with standard errors. The effects of mineral N starvation or MeJA treatment were assessed by analysis of variance and mean separation was performed using Fisher-Snedecor test. Statistical significance was postulated at $P < 0.05$.

II.3 Results

II.3.1 Effects of N starvation and MeJA on Brassica napus leaves

In mature leaves, N starvation led to precocious senescence symptoms as indicated by visible yellowing (data not shown) and a large decrease in chlorophyll content (Table IV-I). The young leaves of N-deprived oilseed rape had no visible senescence symptoms (Figure IV-8A). The chlorophyll content in laminae of young leaves remained high throughout the experiment and was not affected by N starvation (Figure IV-8B). The decline in the soluble proteins concentration in laminae of mature leaves occurred earlier in N-deprived plants than control plants (data not shown). In contrast, the soluble protein concentration in laminae of

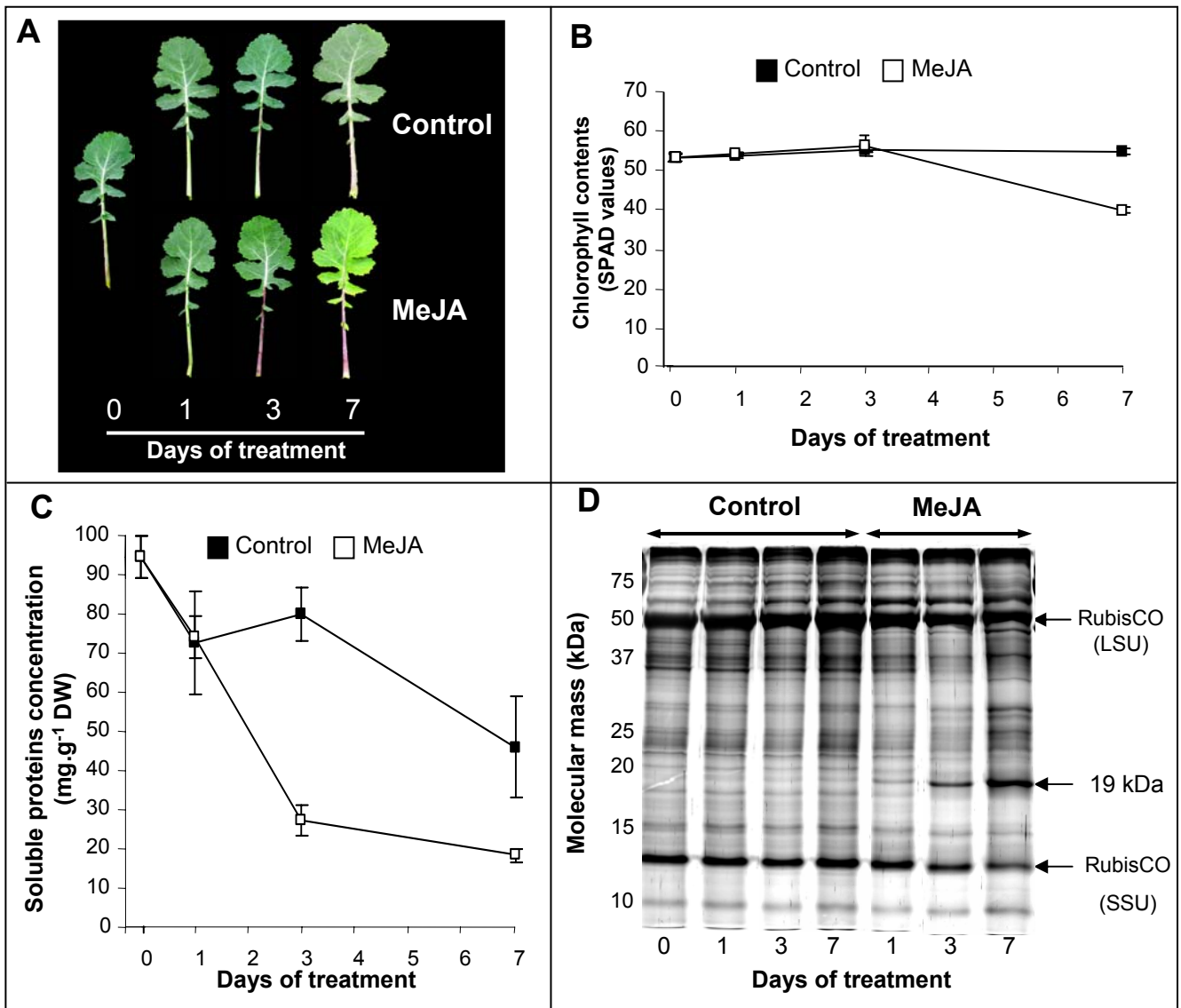


Figure IV-9 : Photography of young leaves of oilseed rape in Control or plant treated with MeJA pulverization during 7 d (A). Changes in chlorophyll content (B), soluble protein amounts in laminae (C) and SDS-PAGE profiles of soluble proteins (D) in the laminae of young leaves of oilseed rape treated (Control; ■) or not (MeJA; □) with MeJA during 7 d. Vertical bars indicate \pm standard error of the mean ($n = 3$) and fit within the plot if not visible. SDS-PAGE was obtained by loading a constant amount of 3 μ g of protein per lane and using silver nitrate staining. Molecular mass markers (kDa) are listed on the left of the gel. A protein at 19 kDa specifically induced by MeJA treatment was indicated on the right of the gel. LSU: large sub-unit of RubisCO (55 kDa); SSU: small sub-unit of RubisCO (14 kDa).

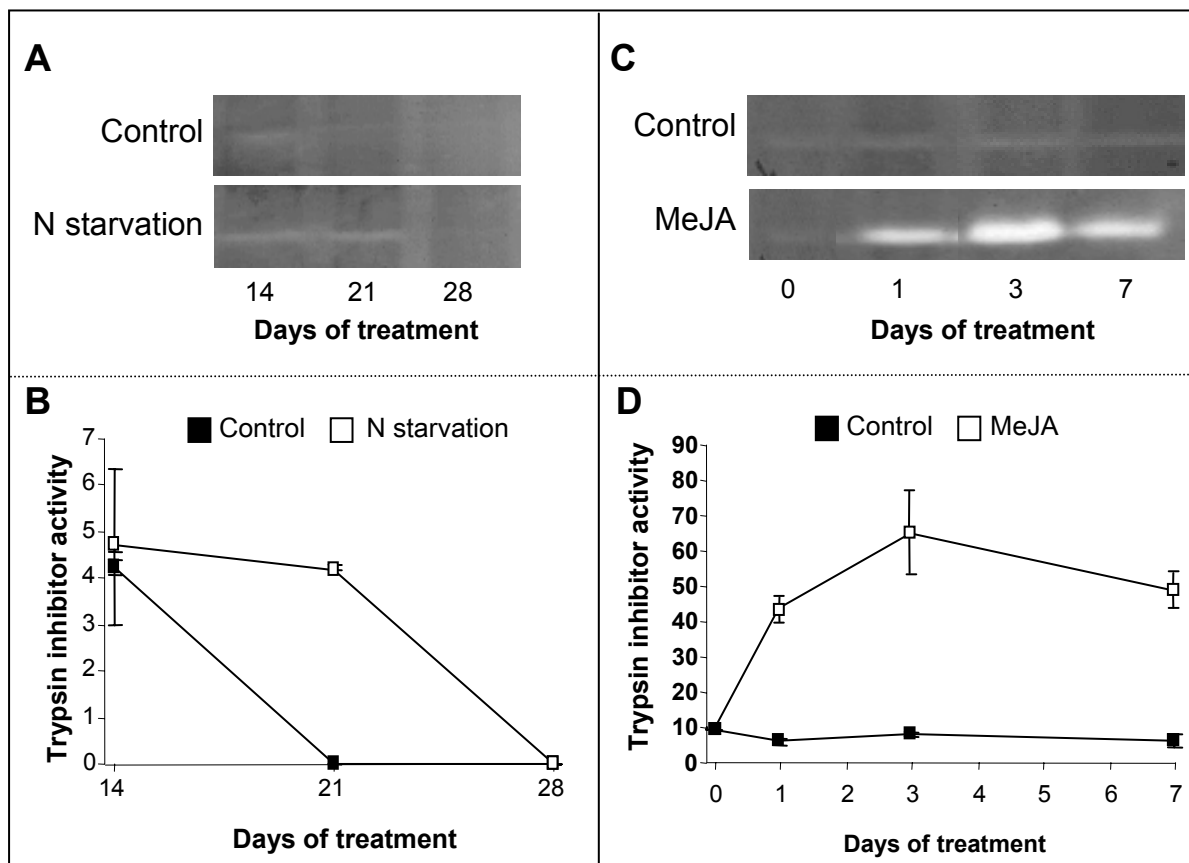


Figure IV-10 : Changes in the 19 kDa Trypsin inhibitor (TI) activities in laminae of young leaves of oilseed rape supplied (Control: ■) or not (N starvation; □) with nitrate between 14 and 28 d (A and B). Changes in the 19 kDa TI activities in laminae of young leaves of oilseed rape treated (□) or not (■) with MeJA during 0, 1, 3 and 7 days of treatment (C and D). Detection of a 19 kDa protein possessing a TI activity was obtained after SDS-PAGE of soluble proteins (125 μ g of proteins loaded per lane; A and C). TI activity corresponds to specific activity and is expressed as integrated intensity per mg of soluble proteins.

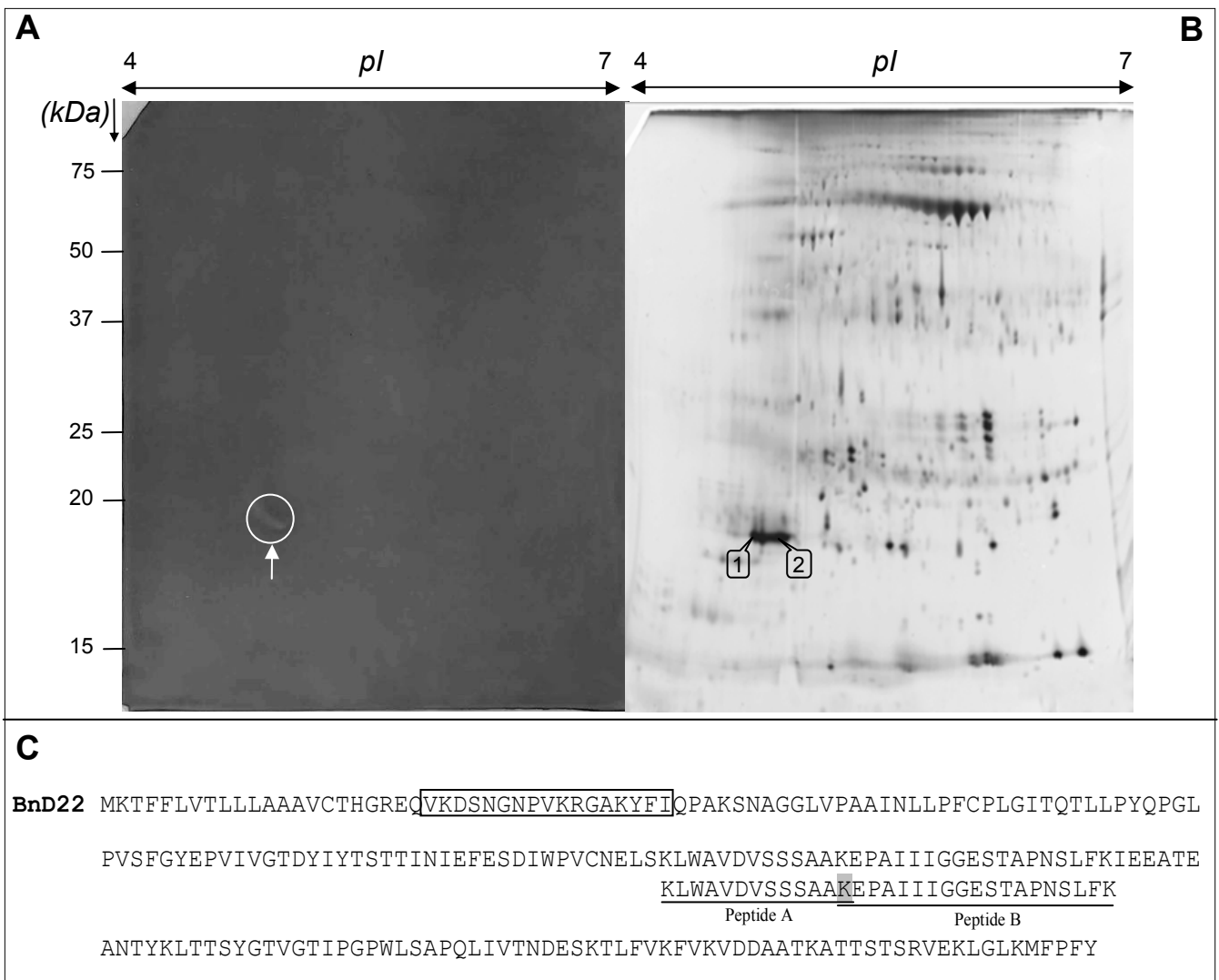


Figure IV-11 : Two-dimensional gel electrophoresis analysis of soluble proteins (340 μ g) isolated from laminae of young leaves of plants treated with MeJA at 7 d after TI detection (**A**) or silver staining (**B**). Arrows indicate TI activity and two spots (spots #1 and 2) corresponding with the TI activity are numbered. Identified spots were excised and digested with trypsin and analyzed by ESI-LC MS/MS. (**C**) Alignment of 218 amino acids sequence of BnD22 (accession no. X65637) and sequenced peptides A and B by ESI-LC MS/MS from each spot. The shading amino acid is shared by peptides A and B. Amino acids sequence of the motif of Kunitz-type protease inhibitor was surrounded (Nishio and Satoh, 1997).

young leaves decreased between day 21 and day 28 in both treatments (Figure IV-8C). To further investigate whether nitrate availability led to a modification of protein patterns in young leaves, SDS-PAGE was performed (Figure IV-8D). However, protein at 19 kDa which was present at day 14 in both treatments, disappeared after 21 days in control plants and 28 days in N-deprived plants.

In response to MeJA treatment, leaf senescence was accelerated in mature leaves in comparison to control plants (Table IV-I). Young leaves of MeJA treated plants showed yellowing at day 7 when compared to control oilseed rape (Figure IV-9A). There was also a decline in chlorophyll content in young leaves of MeJA treated plants between day 3 and day 7 (Figure IV-9B) and the concentration of soluble proteins at day 3 (-70% as compared to control; Figure IV-9C). SDS-PAGE profiles revealed a decrease in both sub-units of RuBisCO after 3 days of MeJA treatment (Figure IV-9D). In comparison to the controls, a protein of 19 kDa was specifically expressed in young leaves of plants treated with MeJA since day 1 and was strongly accumulated at day 3 and 7 to reach a maximum of 9% of total soluble proteins (Figure IV-9D).

II.3.2 Changes in trypsin inhibitor (TI) activities

In laminae of young leaves of control plants (Figure IV-10, A and C), 19 kDa-TI activity was weakly present until day 14 and disappeared at day 21 (Figure IV-10B). Nitrate starvation induced TI activity in the laminae of young leaf after 14 and 21 days (Figure IV-10, A and B). The laminae of young leaves from plants treated with MeJA had significantly higher TI levels than control plants on all dates of treatment (Figure IV-10C). For instance after 3 d of MeJA treatment, TI activity levels were 7-fold higher than in control plants (Figure IV-10D). This elevated TI level was maintained until day 7.

II.3.3 Detection of TI activity after 2-DE and protein identification

The TI activity in young leaves treated during 7 d with MeJA was also detected after separation of soluble proteins by 2-DE (Figure IV-11A). A 2-DE gel stained with silver nitrate (Figure IV-11B) indicated that TI activity corresponded to two spots with molecular mass of 19 kDa and *pI* of 5.0 and 5.1, respectively. These two spots were analyzed using ESI-LC MS/MS and the identified peptides A and B (Figure IV-11C) revealed 100% homology to the amino acid sequence of BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa protein accession no. X65637; Figure IV-11C).

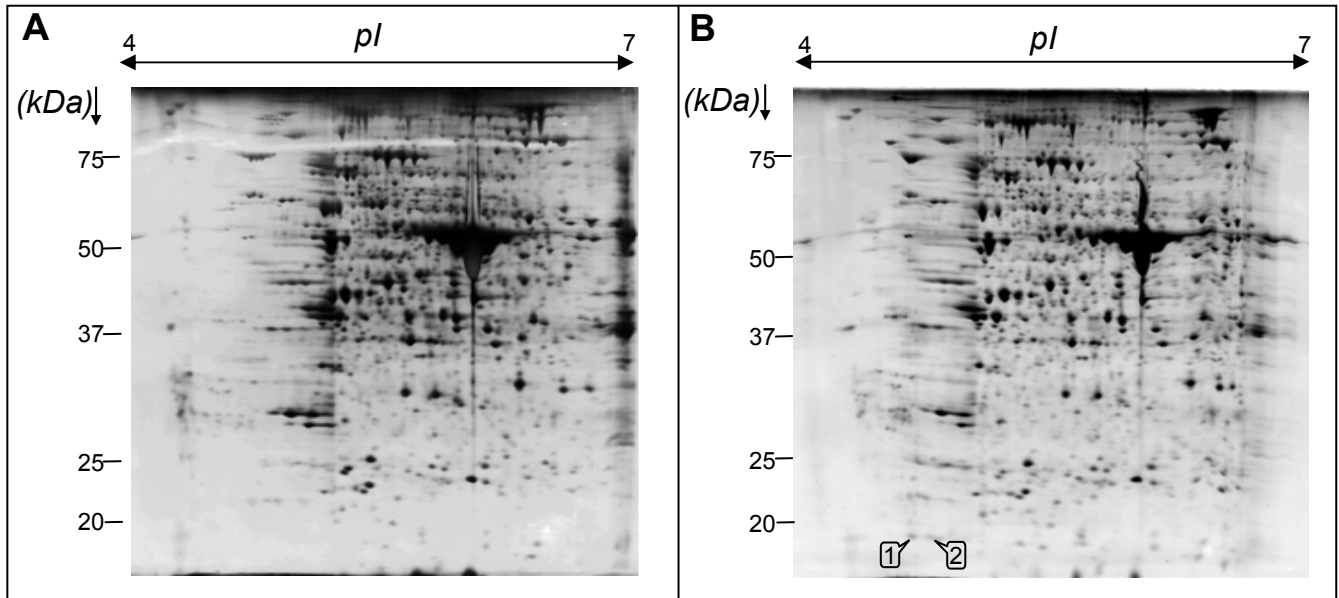


Figure IV-12 : Silver stained two-dimensional electrophoresis gels of total proteins from laminae of young leaves of oilseed rape supplied (A) or not (B) with nitrate at 21 d, 125 μ g of total protein were loaded on IEF strip (for details see Materials & Methods). Two spots corresponding with BnD22 were numbered as 1 and 2. Molecular mass markers (kDa) are listed on the left of the gel.

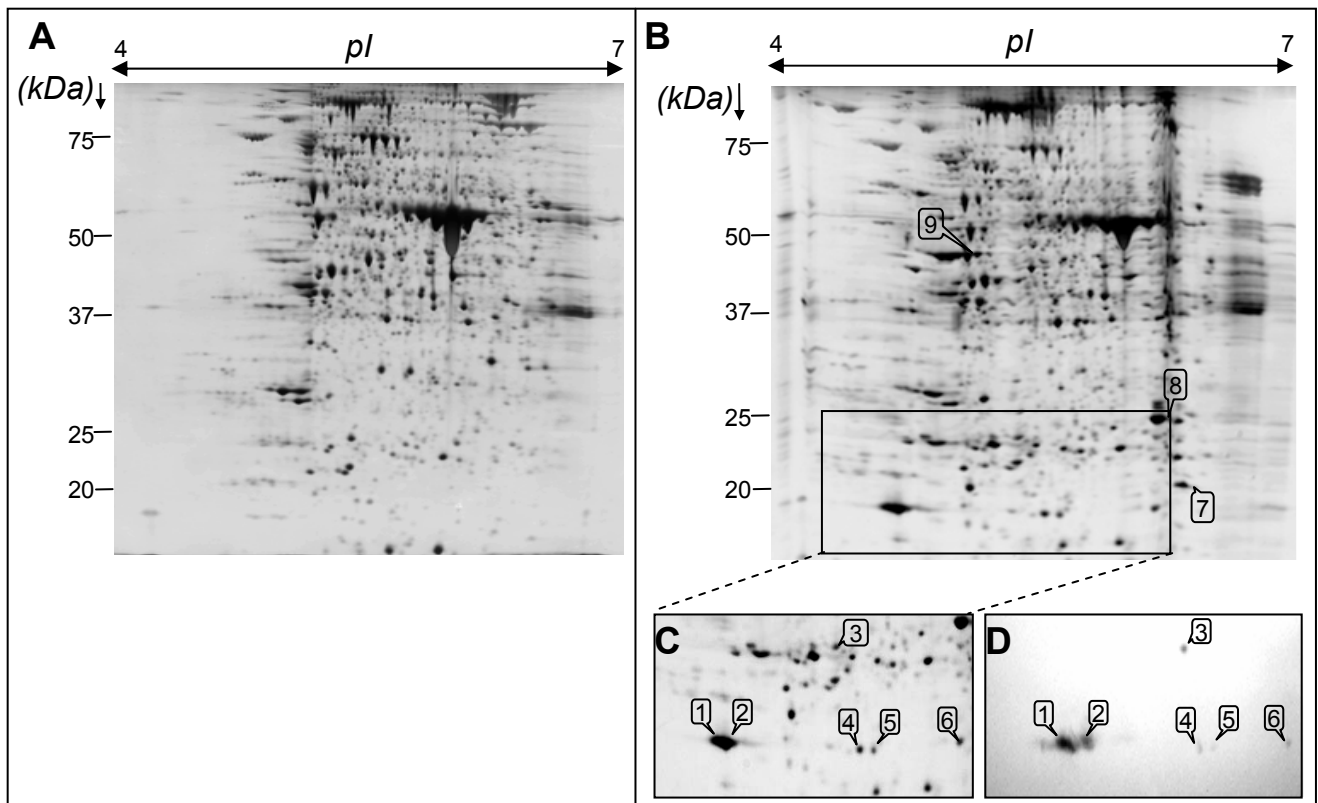


Figure IV-13 : Silver stained two-dimensional electrophoresis gels of total proteins from laminae of young leaves of control plants (A) and plants treated with MeJA (B) during 7 d. 125 μ g of total protein were loaded on IEF strip (for details see Materials & Methods). Molecular mass markers (kDa) are listed on the left of gel. 2-DE immunoblot from the lamina of a plant treated with MeJA using anti-WSCP antibodies (C). Total proteins were transferred to a PVDF membrane before immunodetection using anti-WSCP antibodies. Only the region of the 2-DE gel displaying the protein after silver staining is shown in (D). This region is surrounded by a box in (B). Polypeptides induced by MeJA and/or recognized by the antibodies, are numbered from 1 to 9, excised, digested and identified by ESI-LC MS/MS (see Tables IV-II and IV-III).

II.3.4 Identification of BnD22 after separation of total proteins from laminae by 2-DE

The identification of BnD22 in laminae of young leaves of N-deprived and MeJA treated plants was confirmed by 2-DE analysis of total proteins (Figures IV-12 and IV-13). After silver staining of total proteins from control and N-deprived plants during 21 d, approximately 950 individual protein spots could be separated by 2-DE across a *pI* range of 4-7 (Figure IV-12, A and B). Among the proteins presenting a different pattern between the control and N-deprived plants, two proteins (spots #1 and 2) were also observed at 19 kDa and *pI* 5.0 and 5.1 in laminae of young leaves submitted to N starvation (Figure IV-12B). Partial sequences from these two spots, identified by ESI-LC MS/MS, were identical to the peptides A and B previously identified by ESI-LC MS/MS after separation of soluble proteins by 2-DE (Figure IV-11C). Consequently, database searches revealed that both polypeptides in Figure IV-12 also presented 100% homology to BnD22 (Figure IV-11C).

Figure 6 shows representative images of 2-DE gels obtained from total proteins of laminae of young leaves from control or MeJA treated plants after 7 days of experimentation. The total number of protein spots on 2-DE gels as well as the total protein content (data not shown) declined when plants were treated with MeJA (975 spots in control (Figure IV-13A) *versus* 850 spots in MeJA treatment (Figure IV-13B)). Two spots with a molecular mass of 19 kDa and *pI* of 5.0 and 5.1 were largely accumulated in the MeJA treatment (Figure IV-13B). These two proteins (spots #1 and 2) were analysed using ESI-LC MS/MS (Figure IV-11C). The obtained partial sequences were strictly identical to peptides A and B and consequently showed 100% homology to BnD22 as described above after 2-DE of soluble proteins (Figure IV-11C).

II.3.5 Immunodetection of BnD22 and WSCP in young leaves of *B. napus* using anti-WSCP antibodies from *B. oleracea* and identification of cross-reacted proteins by ESI-LC MS/MS

BnD22 is also considered to be a class II Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP) (Nishio and Satoh 1997; Satoh *et al.*, 1998). To evaluate the different forms of BnD22 and WSCP, 2-DE immunoblot analysis was performed using the anti-WSCP antibodies from *Brassica oleracea* (Figure IV-13D). Six spots between 19 and 23 kDa were recognized by antibodies against WSCP in plants treated with MeJA (Figure IV-13, C and D). A pair of polypeptides of 19 kDa and *pI* of 5.0 and 5.1 corresponding with BnD22 (spots #1 and 2) were particularly noticeable. Antibodies against WSCP recognized four others spots with lower intensity signals: one spot at 23 kDa with a *pI* of 5.6 (spot #3), and three spots at 19 kDa and *pI*

Table IV-II : Identification of spots recognized by anti-WSCP antibodies after western blot of a 2-DE gel of total proteins of leaves treated by MeJA. Spots are presented in Figure IV-13C. Data are obtained by ESI-LC MS/MS analysis. The normalized volume of each spot identified was indicated for control (black) and MeJA treatment (white). Experimental *pIs* and *Mr*, the ESI-LC MS/MS identified peptides were also indicated. The assigned protein of the best matched was given with the organism in which it has been identified and its GenBank protein accession number.

N° spot	Spot Volume variations	Homologous protein/ AN ^a / Species	Expe. <i>Mr/pI</i>	Matched Peptides ^b	
1		BnD22/X65637/ <i>Brassica napus</i>	19/5.0	KLWAVDVSSSAK KEPAIIIGGESTAPNSLFK	
2		BnD22/X65637/ <i>Brassica napus</i>	19/5.1	KLWAVDVSSSAK KEPAIIIGGESTAPNSLFK	
3		WSCP2/ AB078330/ <i>Brassica oleracea</i>	23/5.6	RSNGGGLLPVPVKL	
4		WSCP1/ AB012699/ <i>Brassica oleracea</i>	HSIP/ AJ007414/ <i>Brassica oleracea</i>	19/5.7	KYFIQPAKS KEPAIIIGGERT RTAPNSLFKI
5		WSCP1/ AB012699/ <i>Brassica oleracea</i>	HSIP/ AJ007414/ <i>Brassica oleracea</i>	19/5.8	KYFIQPAKS KEPAIIIGGERT RTAPNSLFKIEEATGAHTYKL
6		WSCP1/ AB012699/ <i>Brassica oleracea</i>	HSIP/ AJ007414 / <i>Brassica oleracea</i>	19/6.4	KEPAIIIGGERT

^a GenBank protein accession number. ^b Partial amino acid sequences determined by ESI LC-MS/MS

Table IV-III : Identification of spots highly induced by MeJA after 7 days of treatment. Spots are presented in Figure IV-13. The normalized volume of each spot identified was indicated for control (black) and MeJA treatment (white). For details see Table IV-II.

N° spot	Spot Volume variations	Homologous protein/ AN ^a / Species	Expe. <i>Mr/pI</i>	Matched peptides ^b
7		Putative trypsin inhibitor/U18995/ <i>Brassica oleracea</i>	21/6.5	RSLFIAAGPKPEAGGEDSSRS RVGFVPEEENLNKIM
8		WSCP2/ AB078330/ <i>Brassica oleracea</i>	25/6.5	RSNGGGLLPVPVK.L RKEPFYGGIAYKL RTTAQYLILPLSPRS
9		Jacalin lectin family protein/NM112518/ <i>Arabidopsis thaliana</i>	49/5.2	KVYVGGQDSGVVYVKF KIYVGGQDSCVTFYFKA

^a GenBank protein accession number. ^b Partial amino acid sequences determined by ESI LC-MS/MS

	1		80
BnD22	-MKTf----FLVtLLlAAAVcThGReQVkdSNGnPVkRGAKYfIQP--AKSNAGGLVPAAINLLPFCPLGITQTLLPYQP		
HSIP	-MKTf----FLVtLLlAAAVcThGReQVkdSNGnPVkRGAKYfIQP--AKSNAGGLVPAAINLLPFCPLGITQTLLPYQP		
WSCP1	-MKTf----FLVtLLlAAAVcThGReQVkdSNGnPVkRGAKYfIQP--AKSNAGGLVPAAINLLPFCPLGITQTLLPYQP		
WSCP2	MMSFPLVSEFLITLMLAAAVcThG*ENRVDLTDGNPLRRTAQYIILPLPRSNCGGLLPVPVKLQPLCPLGITQSQSVKALP		
	81		150
BnD22	GLPVSFGYEPVIVGTDYIYtSTtINIEFESDIWpVCNELSKLWAVDVSSSAAKEPAIIIGGESTAPNSLFKIEEAT---E		
HSIP	GLPVSFGYEPVIVGTDYIYtSTtINIEFRSEIWPVCNELSKLWAVDVSSSAAKEPAIIIGGERLTPAPNSLFKIEEAT---C		
WSCP1	GLPVSFGYEPVIVGTDYIYtSTtINIEFRSEIWPVCNELSKLWAVDVSSSAAKEPAIIIGGERLTPAPNSLFKIEEAT---C		
WSCP2	GLPVSFSYPAIMD-TYVNEMEAINIEFKSDAWPGCEEFskWEVDESSSALEPAIILVGGKKHERNSWFKIEBRKEPFYCG		
	151		228
BnD22	ANtYKlLTSYgTVGTIPGPWLSAPQLIVTNDESKTLFVKFVKVDDAATKATTSTSRVEKLGKLMFPFY		
HSIP	AHtYKlLTSgTVGTIPGPWLCAPQLIAtNDDAKTLFVKFVKVDDATKATTSTSRVEKLGKLMFPFY		
WSCP1	AHtYKlLTSgTVGTIPGPWLCAPQLIAtNDDAKTLFVKFVKVDDATKATTSTSRVEKLGKLMFPFY		
WSCP2	GIAyKlLTLtLGTIGTVPGPWEENAPQLVLTNDLAKTFLVKFHRVHGDTT-ATTSTSRQEKLGKLMFPFY		

Figure IV-14 : Sequence alignment of 228 amino acids of BnD22 (spots #1 and 2) with HSIP, WSCP1 (spots #4, 5 and 6) and WSCP2 (spot #3) which correspond to 6 spots detected by polyclonal anti-WSCP antibodies (Table IV-II, Figure IV-13). The peptides identified by ESI-LC MS/MS are underlined. Amino acid residues that are not identical to those to BnD22 are shaded in blue. Amino acid sequence of the motif of Kunitz-type protease inhibitor was framed in green (Nishio and Satoh, 1997). Asterisks in orange indicate predicted sites of N and C signal peptide cleavages. Predicted site of amino acids phosphorylation are in red bold. BnD22, *Brassica napus* Drought induced protein of 22 kDa (accession no. X65637) ; WSCP1, Water Soluble Chlorophyll binding Protein of *Brassica oleracea* (accession no. AB012699); WSCP2, Water Soluble Chlorophyll binding Protein of *Brassica oleracea* (accession no. AB078330); HSIP, Heat Stress-Induced Protein of *Brassica oleracea* (accession no. AJ007414).

5.7 (spot #4), 5.8 (spot #5) and 6.4 (spot #6), respectively. To identify spots corresponding with signals, a western blot was compared with a silver stained 2-DE gel.

Identification by ESI-LC MS/MS revealed that polypeptides of 19 kDa and *pI* 5.0 and 5.1 (spots #1 and 2) were identical to BnD22 (Table IV-II). Spot #3 at 23 kDa and *pI* 5.6 matched with WSCP2 of *Brassica oleracea* (accession no. AB078330; Table IV-II). Using the Progenesis SameSpots software, image gel analysis revealed that BnD22 was induced 12-fold by MeJA whereas WSCP2 was increased 4-fold (Table IV-II). Spots #4, 5 and 6 of WSCP1 were induced 10, 4 and 6-fold, respectively (Table IV-II).

After Blastp analysis (NCBI database), spots #4, 5 and 6 at 19 kDa and *pI* 5.7, 5.8 and 6.4 respectively, were identified as Heat Stress-Induced Protein (HSIP, accession no. AJ007414) or WSCP1 (accession no. AB012699) of *Brassica oleracea*. Multiple alignments of amino acid sequences (Figure IV-14) allowed determination of the degree of homology between BnD22 and the 3 other proteins recognized by antibodies against WSCP (Figure IV-13). Thus, HSIP and WSCP1 were strictly identical and shared 96% homology to BnD22 (Figure IV-14). Consequently, these data suggest that WSCP1 and HSIP were the same protein and were different to BnD22. WSCP2 identified in spot #3 at 23 kDa and *pI* 5.6 showed only 54% homology to BnD22 and 55% homology to WSCP1.

Figure IV-14 indicated that BnD22 and WSCP1 presented a similar N-signal peptide (cleaved between amino acids #19 and 20) and C-signal peptide (cleaved between amino acids #196 and 197), while WSCP2 harboured only a N-signal peptide which is cleaved between amino acids #24 and 25). Interestingly, WSCP2 did not possess the specific motif of the Kunitz-type protease inhibitor (Figure IV-14) while this motif was present in BnD22 and WSCP1. Moreover, searches of predicted sites for phosphorylation of amino acids revealed 10 sites for BnD22 and WSCP1 and 16 sites for WSCP2 (Figure IV-14).

II.3.6 Identification of others proteins highly induced by MeJA

Although proteins recognized by anti-WSCP antibodies were induced by MeJA, others proteins were also up-regulated by this hormone (Figure IV-13). Among the induced proteins, 3 polypeptides were highly accumulated (at least 5-fold) and were identified by ESI-LC MS/MS (Table IV-III). The selected proteins correspond to a putative trypsin inhibitor at 21 kDa (spot #7 induced 11-fold; accession no. U18995), a WSCP2 at 25 kDa (spot #8 induced 11-fold, accession no. AB078330), and a Jacalin related-lectin family protein at 49 kDa (spot #9 induced 5-fold; accession no. NM_112518). This last result is in accordance with those reported in recent works using transcriptional approaches (Jiang *et al.*, 2006; Sarosh and

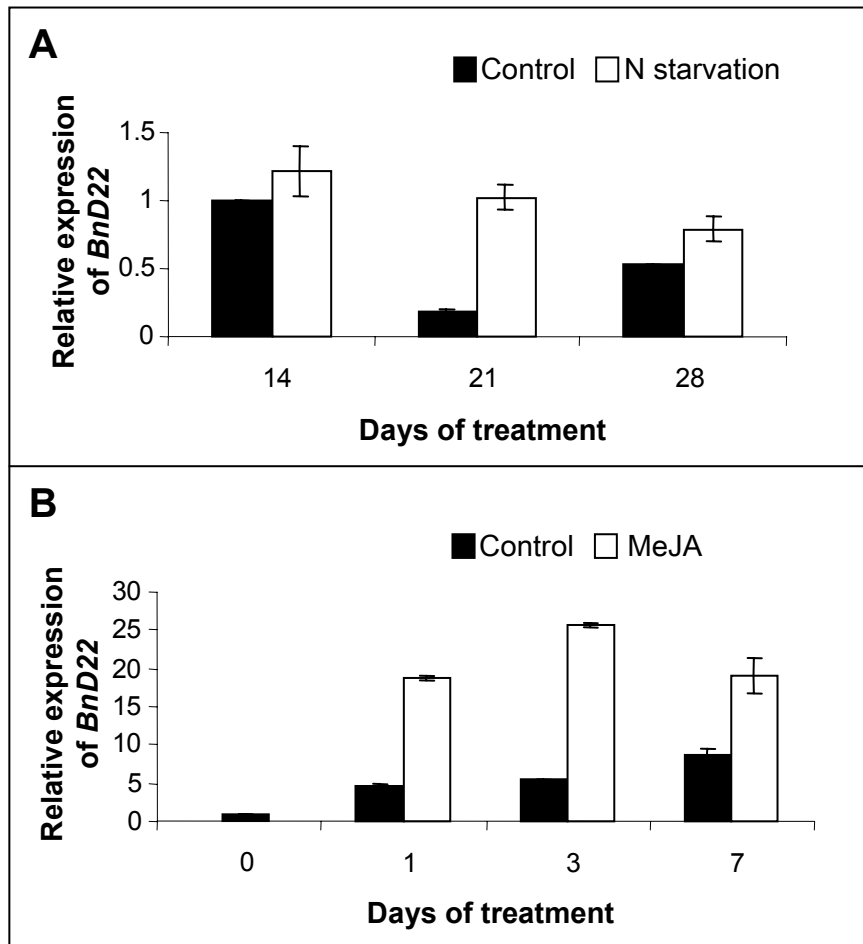


Figure IV-15 : Q-PCR relative *BnD22* gene expression in laminae of young leaves of oilseed rape supplied (Control; ■) or not (N starvation; □) with nitrate during 28 d (A). Q-PCR relative *BnD22* gene expression in the laminae of young leaves of oilseed rape treated (□) or not (■) with MeJA during 7 d (B). Level of *BnD22* gene expression at day 0 for MeJA experiment or day 14 for N starvation experiment was equated to 1. Vertical bar indicates standard error of the mean ($n=3$).

Meijer, 2007). Indeed, in *Brassica napus*, Sarosh and Meijer (2007) have shown that MeJA induced the gene expression of Jacalin-related lectins which have a role in plant defense pathway.

II.3.7 *BnD22* gene expression

In order to determine whether TI activity was correlated with *BnD22* gene expression, the level of *BnD22* transcripts was studied by Q-PCR in the laminae of young leaves in the control, N-deprived or MeJA-treated oilseed rape. Compared to day 14, the *BnD22* transcript level in laminae of control plants decreased 5 fold at day 21 and 2 fold at day 28 (Figure IV-15A). Under N-deprived conditions, *BnD22* expression increased in young laminae throughout the experiment and was always higher than the control at all time points.

Figure 8B presented the accumulation of *BnD22* transcripts in young laminae from control and MeJA treated plants. In control plants, the transcript level of *BnD22* increased during the experiment. Compared to the control plants, the expression of *BnD22* in plants treated by MeJA significantly increased at all time points. For instance, between day 0 and 3, the expression of the *BnD22* gene increased 27 fold in MeJA treated plants *versus* only 8 fold higher in control plants.

II.4 Discussion

The goals of this study were to verify if BnD22 (i) was homologous to the 19 kDa protease inhibitor previously detected by Etienne *et al.* (2007) in young leaves of oilseed rape, and (ii) could be involved in the N use efficiency through the maintenance of physiological functions of sink tissues in plants submitted to stressful conditions. N starvation and MeJA treatment were used to induce leaf senescence (Rossato *et al.*, 2002; Gombert *et al.*, 2006) and TI activity (Cipollini and Sipe, 2001; Etienne *et al.*, 2007).

Detection of TI activity after SDS-PAGE revealed that 19 kDa TI activity was induced in young leaves of N-deprived and MeJA-treated plants compared to the controls. In young leaves treated with MeJA, TI activity was 7-fold higher than in controls after 3 days of treatment (Figure IV-10D). To identify the proteins harbouring TI activity, soluble protein extracts of young leaves treated with MeJA were analyzed by 2-DE gels and through detection of TI activity (Figure IV-11). Two polypeptides that were common in both gels were identified precisely at a molecular mass of 19 kDa and a *pI* of 5.0 and 5.1, respectively. ESI-LC MS/MS

analysis (Table IV-II) revealed that both polypeptides were homologous to BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa), a protein previously identified in the youngest leaves of *Brassica napus* subjected to drought or salinity stress (Reviron *et al.*, 1992). Thus, our study revealed for the first time that (i) a TI activity could be detected after 2-DE gel separation and (ii) BnD22 has an *in vitro* protease inhibitor activity. This protease inhibitor activity was consistent with its homology to the Kunitz-type proteinase inhibitor family which contains a specific signature motif (Ilami *et al.*, 1997). In fact, this protein of 22 kDa contains N and C-terminal signal peptides (Figure IV-14) as reported by Ilami *et al.* (1997). After the cleavage of the N- signal peptide (between amino acids #19 and 20) and C- signal peptide (between amino acids #197 and 198), the mature protein contains 178 amino acids with a predicted molecular mass of 19 kDa and *pI* 4.6. This data is in accordance with the two polypeptides detected at 19 kDa in our study (spots #1 and 2, Figure IV-13). Previously, protease inhibitor activity of the purified mature BnD22 corresponding to a protein at 19 kDa has been studied by Ilami *et al.* (1997), but the purification by RPLC of this protein led to inactivation of BnD22 protease inhibitor activity. Using proteomics approaches, our study clearly demonstrated that these 19 kDa mature proteins possess a TI activity. Interestingly, Reviron *et al.* (1992) have noted that drought also increased the synthesis of two polypeptides at 20 kDa and *pI* 5.1, and another pair of BnD22 polypeptides at 22 kDa and *pI* 5.1. It is likely that the accumulation of BnD22 isoforms was stress-dependent. According to SDS-PAGE (Figures IV-8 and IV-9) and 2-DE profiles (Figures IV-12 and IV-13), 19 kDa-BnD22 protein abundance and *BnD22* gene expression (Figure IV-15) presented similar patterns in both treatments. These changes in transcript abundance suggest that mineral N availability and MeJA could play a direct or indirect part in the regulation pathway of the *BnD22* gene, as previously observed under various stressful conditions. Indeed, similar transcriptional responses were observed in *Brassica oleracea* submitted to other constraints such as heat stress (Annamalai and Yanagihara, 1999) and leaf detachment (Nishio and Satoh, 1997). Moreover, both the BnD22 gene and protein have been shown to accumulate in the youngest leaves of oilseed rape subjected to salinity acclimation and abscissic acid treatment (Downing *et al.*, 1992; Reviron *et al.*, 1992; Ilami *et al.*, 1997). From these data it can be suggested that BnD22 has a proteinase inhibitor role in the response of young leaves to several environmental constraints. Furthermore, in response to water deficit or osmotic stress, the endogenous levels of jasmonates markedly increase in plants, such as maize (*Zea mays*, Xin *et al.*, 1997), barley (*Hordeum vulgare*, Kramell *et al.*, 1995), soybean (*Glycine max*, Creelman and Mullet, 1995) and pear (*Pyrus bretschneideri*, Gao *et al.*, 2004). It has been shown that exogenous application

of MeJA can improve the tolerance of plants to drought (Ghasempour *et al.*, 1998). Increase in jasmonate levels can induce the expression of specific genes in plant which are involved in stress tolerance and several metabolic defense mechanisms such as protease inhibitors (Creelman and Mullet, 1997; Kessler and Baldwin 2002; Mikkelsen *et al.*, 2003; Sarosh and Meijer, 2007). It is interesting to point out that in oilseed rape (i) drought induced the BnD22 gene expression (Downing *et al.*, 1992) and corresponding protein (Reviron *et al.*, 1992), and (ii) MeJA increased the *BnD22* transcript up to 27-fold after 3 days of treatment (Figure IV-15B). Thus, it could be hypothesized that the induction of BnD22 observed in leaves of water-stressed oilseed rape would be mediated by MeJA.

In a drought resistant genotype of wheat (*Triticum aestivum*), the induction of a protein homologous to BnD22 identified in the thylakoid membrane showed a significant role for BnD22 during the stress response (Guseynova *et al.*, 2006). In our study, BnD22 represented up to 9% of the leaf soluble protein content in plants treated with MeJA whereas it represented approximately 1% of the soluble protein content in plants adapted to drought (Downing *et al.*, 1992; Ilami *et al.*, 1997). The accumulation of this inhibitor in response to diverse treatments suggested a physiological plant function for this protease inhibitor in plant responses to stresses. The accumulation of BnD22 in young leaves of oilseed rape subjected to abiotic stress is in accordance with the protective role that has been proposed for the accumulation of this TI undergoing desiccation (Reviron *et al.*, 1992). TIs induced by desiccation may protect enzymes susceptible to dehydration or contribute to the inhibition of proteases activated during water stress (Lam *et al.*, 1999). Because of the highly hydrophilic nature of TI, the accumulation of BnD22 in salt-stressed plants can also serve as an osmoprotectant (Dombrowski, 2003). Moreover, it is well known that the induction of TI expression by wounding and insect damage is dependent on increases in the wound-related hormone, jasmonic acid (Ryan, 1990). The induction of TI activity, BnD22 protein and corresponding mRNA by MeJA application suggest that BnD22 could be part of a cross-tolerance response acting as an antiherbivore compound by inhibiting pathogen proteases (Heath *et al.*, 1997). Overall results indicate that the accumulation of the BnD22 in young leaves in response to pathogen attacks, wounding, osmotic stresses (drought and NaCl) and mineral N starvation was a means to preserve younger tissues from adverse conditions.

Abiotic stresses such as drought, heat-stress or N-starvation, which led to the accumulation BnD22, also led to a delay of leaf senescence in young leaves (Reviron *et al.*, 1992; Annamalai and Yanagihara, 1999; Etienne *et al.*, 2007). In the present study, N-deprived young leaves retained their hardening and had the same morphology as untreated plants, although this was

accompanied by an accumulation of TI activity for 7 days longer than in the control plants (Figures IV-8 and IV-10). These results are consistent with those reported by Etienne *et al.* (2007) where the delay of senescence in N-deprived young leaves was concomitant with an accumulation of TI activity and high *BnD22* gene expression. In recent studies, it has been suggested that leaf senescence can be regulated by protease inhibitors and especially TI of Kunitz type (Beers *et al.*, 2000; Sugawara *et al.*, 2002; Shatters *et al.*, 2004; Mosolov and Valueva, 2005; Etienne *et al.*, 2007). As previously suggested by Ilami *et al.* (1997), the hypothesis of involvement of *BnD22* in regulating proteolysis during leaf senescence is reinforced by the fact that *BnD22* accumulation in young expanding leaves of oilseed rape was concomitant with a lower proteolytic activity in leaves submitted to water stress. Moreover, as reported by Diop *et al.* (2004) in *Vigna unguiculata* (L.) Walp, there was a correlation between the level of protein and transcripts of an anti-protease (cystatin) and the degree of water stress tolerance. Consequently, in our study, it could be assumed that under N-deprived conditions, *BnD22* induction in young leaves of *Brassica napus* could preserve the integrity of photosynthetic enzymes by inhibiting proteases in order to maintain metabolic activity and growth. In response to MeJA treatment, high levels of *BnD22* protein accumulation (12-fold, Figure IV-13) and *BnD22* TI activity (7-fold, Figure IV-10D) were maintained in young leaves until 7 days, while senescence-like symptoms such as yellowing caused by a large decline in chlorophyll are visible (Figure IV-9, B and C; Figure IV-10B). Moreover, the hydrolysis of soluble protein content in young leaves treated with MeJA 3 days after starting the experiment (Figure IV-9C) was accompanied by reduced levels of RuBisCO (Figure IV-9D), the most abundant protein in leaves and the main N reserves in the vegetative organs during leaf senescence (Lawlor, 2002). In many species, the cysteine and serine proteases are proteolytic systems that are the most frequently implicated in the N mobilization processes associated with leaf senescence (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Coffeen and Wolpert, 2004; Roberts *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Pak and van Doorn (2005) have suggested that about 40% of the total protease activity in *Iris* could be governed by serine proteases. Therefore, in our study, the high level of *BnD22* and the corresponding anti-protease activity is not sufficient to avoid the protein breakdown associated with senescence. So, in response to MeJA treatment, it is likely the balance between the level of protease activities (induced during senescence) and anti-protease activities was in favour of proteolysis. This suggests that the ratio of proteases activities / protease inhibitor activities also modulates the rate of remobilization of protein-N compounds in leaves of oilseed rape. In addition, this could explain why, despite the high level

of BnD22-TI activity (Figure IV-10D), there is a decrease of protein amount per laminae (Figure IV-9C) treated by MeJA.

Nishio and Satoh (1997) have clearly demonstrated that BnD22 belongs to a class II Water-Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP) previously identified in *Brassica oleracea*. Using polyclonal antibodies against the WSCP of cauliflower, six polypeptides were detected after 2-DE and western blots from total protein extracts of young leaves treated with MeJA (Figure IV-13). ESI-LC MS/MS analysis revealed that anti-WSCP antibodies cross-reacted with two other proteins WSCPs (WSCP1 and WSCP2) which are induced by MeJA (Figure IV-14 and Table IV-II). WSCP2 was detected at 23 kDa and *pI* 5.6 whereas three spots of WSCP1 exhibited similar molecular mass of 19 kDa, but with different *pI* 5.7, 5.8 and 6.4 (Figure IV-13). As reported by Reviron *et al.* (1992), the fact that BnD22, WSCP1 presented different *pI* could be explained by (i) the products of genes from the two different genomes (*B. rapa* x *B. oleracea*) of the amphidiploid *Brassica napus*, or (ii) posttranslational processing. For instance, from the data provided by NetPhos analysis (Figure IV-14), it could be assumed that the different *pI* may correspond to a different degree of amino acid phosphorylation (Villardell *et al.*, 1990). Moreover, analysis of alignment between BnD22 and other WSCPs showed that these proteins are different (Table IV-II, Figures IV-13 and IV-14). Although the incomplete genome sequence information limited analysis of *Brassica napus* proteins, these data suggest that the *Brassica napus* proteome could contain several WSCPs as observed for *Brassica oleracea*. In this study, only BnD22 possess a TI activity after 2-DE. In spite of the presence of a motif of the Kunitz-type protease inhibitor, the lack of TI activity in WSCP1 (spots #4, 5 and 6) could be explained by their low abundance (Figures IV-11 and IV-13). Concerning protein WSCP2, the absence of a motif of the Kunitz-type protease inhibitor explains that no TI activity is associated with this protein. WSCP2 was induced by MeJA at 23 and 25 kDa (Figure IV-13). These differences of *Mr* could be due to the cleavage of N-signal peptide between amino acids #24 and 25 (Figure IV-14). These post-translational modifications may explain that WSCP2 at 25 kDa is not recognized by anti-WSCP antibodies contrary to WSCP2 at 23 kDa.

Interestingly, BnD22 is a class II WSCP that is able to bind chlorophyll (Chl *a/b*) and chlorophyll precursors such as chlorophyllides *a*, *b* in tetrameric forms (Nishio and Satoh, 1997; Schmidt *et al.*, 2003; Horigome *et al.*, 2007). It has been proposed the WSCP as a chlorophyll carrier implied either chlorophyll degradation (Satoh *et al.*, 1998) or chlorophyll biosynthesis (Schmidt *et al.*, 2003; Reinbothe *et al.*, 2004). However, recent studies have indicated that during leaf senescence, BnD22/WSCP could form tetrameric BnD22-Chl

complex in order to protect chlorophylls against photodegradation (Horigome *et al.*, 2007). During leaf senescence, the chlorophyll degradation produces radical oxygen species such singlet-oxygen which are able to propagate cellular damage including decomposition of chlorophyll (Mittler *et al.*, 2004). Schmidt *et al.* (2003) have shown that unbound Chl *a* was rapidly degraded whereas WSCP-bound Chl *a* was decomposed at a significantly slower rate. Moreover singlet-oxygen production was lower for WSCP-bound Chl than for unbound Chl, suggesting that the BnD22-Chl complex could protect against photodegradation of Chl in stressed young leaves (Schmidt *et al.*, 2003; Horigome *et al.*, 2007). The tetrameric assembly of the BnD22-Chl complex reduces contact between the Chl and molecular oxygen and may cause the fluorescence quenching leading to energy dissipation (Horigome *et al.*, 2007). It is consistent with non photochemical quenching (NPQ) identified at the beginning of leaf senescence (Wingler *et al.*, 2004). On the other hand, Park *et al.* (2007) have shown that during leaf senescence, a Senescence-Associated Gene called Stay-green gene (*Sgr*) and corresponding protein, are highly induced. In fact, *Srg* protein regulates chlorophyll degradation by inducing Chl-LHCPII complex disassembly leading to the degradation of free chlorophylls by catabolic enzymes such as chlorophyllases (Park *et al.*, 2007). In our study, in leaves treated by MeJA, chlorophyll contents decline (especially at day 7, Figure IV-9B) in spite of a high induction of BnD22/WSCPs proteins (Figure IV-13B). Consequently, it could be assumed that in response to MeJA treatment, the presence of WSCPs seems to be insufficient to avoid the chlorophyll breakdown by senescence-induced protein chlorophyll degradation such as *Sgr* protein.

Despite N starvation conditions having reduced the growth at whole plant level, the young leaves showed a significant growth ($+362.6 \pm 0.056$ mg of DM vs $+553.1 \pm 0.024$ mg of DM in control between day 14 and day 28; data not shown) and a similar chlorophyll content as compared to control (Figure IV-8B). These data are in accordance with results recently reported by Etienne *et al.* (2007) and suggest that CO₂ assimilation is maintained in young leaves despite N starvation. Interestingly, this maintenance of growth in young leaves of N-deprived plants was accompanied by changes in protein pattern, including the accumulation of BnD22 (Figure IV-9D). This suggests that, under stress conditions, the presence of BnD22-Chl complex may act as a photoprotection mechanism in order to delay leaf senescence in young leaves (Schmidt *et al.* 2003; Etienne *et al.*, 2007). Altogether, results suggest that BnD22 possesses dual functions (WSCP and TI) that lead to protect younger tissues from adverse conditions by maintaining metabolism (protein integrity and photosynthesis).

II.5 Conclusion

Using proteomics approaches, this study clearly reveals that the 19 kDa-TI activity induced in young leaves of oilseed rape in response to stress provoked by N starvation or MeJA is identical to BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa) a protein that belongs to class II Water Soluble Chlorophyll binding Protein (WSCP). The level of gene expression, protein abundance and TI activity of BnD22 observed in young leaves present similar patterns and are associated with the maintenance of growth, chlorophyll content and concentration of soluble proteins. This leads to maintenance of sink strength and may have important consequences for N use efficiency. The dual WSCP/TI functions of BnD22 suggest that this protein is strongly involved in the maintenance of metabolism (protein integrity and photosynthesis capacity) of young leaves especially when plants are confronted with adverse conditions. In a sense, it could be assumed that BnD22 may have an important role in plant resistance to diverse forms of stress. Future investigations using immunolocalization at sub-cellular level in oilseed rape leaf and/or GFP technologies in *Arabidopsis* will attempt to determine the intracellular localization and confirm the physiological functions of BnD22 in the maintenance/protection of the young leaves of plants exposed to various stresses. Additionally, in order to estimate the contribution of BnD22 to N use efficiency, it could be interesting to study genotypes of *Brassica napus* characterized by contrasting leaf N remobilization, leaf lifespan or by their resistance to low mineral N availability.

Acknowledgements. The authors would like to thank Dr. Laurent Coquet, Dr. Philippe Laîné, Dr. Aurélie Verneuil, Dr. Vianney Pichereau for their valuable help in ESI-LC MS/MS analyses, and Sandrine Rezé for its technical help in Q-PCR analyses. We would like to thank the three anonymous reviewers for their valuable comments.

CHAPITRE V

***Modifications protéomiques associées
à la remobilisation de l'azote foliaire
chez le colza soumis à différents
niveaux de fertilisation azotée***

CHAPITRE V

MODIFICATIONS PROTÉOMIQUES ASSOCIÉES À LA REMOBILISATION DE L'AZOTE FOLIAIRE CHEZ LE COLZA SOUMIS À DIFFÉRENTS NIVEAUX DE FERTILISATION AZOTÉE

Title: A combined ^{15}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 (Article 3)

Marie DESCLOS¹, Philippe ETIENNE¹, Laurent COQUET², Pascal COSETTE², Josette BONNEFOY¹, Raphaël SEGURA¹, Sandrine REZE¹, Alain OURRY¹, Jean-Christophe AVICE¹

¹INRA, UMR INRA/UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie (EVA) et nutriments N C S, IFR 146 ICORE, Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de CAEN Basse-Normandie, F-14032 Caen, France.

²CNRS, UMR 6522 CNRS, University of Rouen, Proteomic Platform of the Federative Institute for Peptides Research (IFRMP 23), Mont-Saint-Aignan, France.

Article soumis à Proteomics

Avant-propos

La faible EUA observée chez le colza est essentiellement liée à un défaut de vidage en azote (N) des feuilles au cours de la sénescence séquentielle. Cette faible remobilisation du N foliaire est due à une protéolyse incomplète des protéines foliaires. Actuellement, les protéines impliquées dans les mécanismes responsables de la remobilisation du N au cours de la sénescence foliaire et plus particulièrement les systèmes protéolytiques sont très mal connus chez le colza.

Ainsi, un des objectifs principaux de mon travail de thèse a consisté à caractériser les événements protéomiques majeurs qui interviennent lors de la remobilisation du N des feuilles sénescentes.

Cette analyse protéomique s'est appuyée sur une étude cinétique (28 jours) de la remobilisation du N chez des rangs foliaires présentant des niveaux de sénescence contrastés. Des états d'avancement plus ou moins marqués de la sénescence foliaire ont été obtenus grâce à l'application de niveaux d'apport en nitrate variables: milieu nutritif optimal (4mM), carencé (0,4 mM) ou privé en nitrate (0 mM). Le traceur isotopique ^{15}N a été utilisé pour déterminer, par marquage de chasse, les taux de remobilisation réelle de N endogène associée à la sénescence foliaire. L'évolution des quantités de N, des flux du N remobilisé (*via* l'analyse des flux de ^{15}N) et des teneurs en protéines totales ainsi que la détermination des dates théoriques d'entrée en sénescence par les indicateurs moléculaires de la sénescence (*SAG12/Cab*), nous ont permis d'isoler un rang foliaire mature (Feuille #8) présentant des vitesses d'entrée en sénescence contrastées. A partir de cette feuille, une approche protéomique globale a été conduite dans le but d'identifier les protéines spécifiquement induites au cours du processus de sénescence.

Les résultats révèlent que **55 protéines sont spécifiquement induites au cours de sénescence foliaire**. Ces protéines interviennent majoritairement dans le métabolisme énergétique, les processus de détoxification, la réponse aux stress, la synthèse de phytohormones et la protéolyse. Parmi ces protéines, **les rôles de 4 protéases (FtsH, une protéase chloroplastique ; protéase à aspartate ; protéasome beta sous-unité A1 ; protéase à cystéine SAG12-1), successivement induites au cours de la sénescence, sont plus particulièrement discutés.**

Abstract. Our goal was to identify the leaf proteomic changes which appeared during N remobilisation associated with leaf senescence of oilseed rape in response to contrasting nitrate availability. Leaf senescence status was followed using ^{15}N tracing, patterns of chlorophyll level, total protein content and a molecular indicator recently developed in oilseed rape based on expression of *SAG12/Cab* genes. Three phases associated with leaf senescence were distinguished. Proteomics revealed that 55 proteins involved in metabolism, energy, detoxification, stress response, proteolysis and protein folding, were significantly induced during leaf senescence. Among these proteins, 4 proteases were identified. FtsH, a chloroplastic protease, was induced transiently during senescence. Considering the dynamics of N remobilisation, chlorophyll and protein content, the pattern of FtsH expression indicated that this protease could be involved in the degradation of chloroplastic proteins. Aspartic protease increased at the beginning of senescence and was maintained at a high level, implicating this protease in proteolysis during the course of leaf senescence. Two proteases, Proteasome beta subunit A1 and SAG12, were induced and continued to increase during the later phase of senescence, suggesting that these proteases are more specifically involved in the proteolysis processes occurring at the final stages of leaf senescence.

I. INTRODUCTION

Nitrogen (N) is a biogenic macroelement required in large quantities by crops to achieve optimal yield. N fertilisation is one of the major costs associated with crop production, and the environmental damage associated with the large use of N fertilisers can lead to significant consequences for terrestrial ecosystems (Vitousek *et al.*, 1997; Matson *et al.*, 2002). Therefore, to maintain or increase crop yield with consideration of the environment (reduction of N fertilisation) it will be necessary to improve the N use efficiency of crops and particularly their N remobilisation efficiency. Indeed, remobilisation of endogenous N from senescing leaves, which is a series of events comprising proteolysis and translocation of leaf N compounds (Hörtensteiner and Feller 2002; Zimmerman and Zentgraf, 2005), is considered as one of the key process regulating the N economy of plants (Gallais and Hirel, 2004; Good *et al.*, 2004; Yasumura *et al.*, 2007).

Senescence is the ultimate stage of leaf development and is a genetically programmed process. It is generally accepted that leaf senescence is divided into three phases (Buchanan-

Wollaston 1997; Yoshida 2003; Zimmerman and Zentgraf 2005): (1) an initiation phase induced by environmental, phytohormonal or other endogenous signals and characterised by a transition from sink to source and an alteration of cellular redox status; (2) a degenerative phase, which corresponds to the large scale hydrolysis and mobilisation of macromolecules and (3) a terminal phase, which corresponds to the irreversible loss of cell integrity. The senescence process involves the synthesis of new mRNA and proteins despite a wide range of both nucleic acid and protein degradation (Smart, 1994). The transcriptome analysis of the senescing leaves of *Arabidopsis* revealed that expression of 2500 genes was up-regulated during this process (Guo *et al.*, 2004). Although the function of many senescence associated genes (*SAGs*) remains unknown, some of them are genes encoding hydrolytic enzymes such as proteinases, lipases, RNases, and other proteins like kinases, and transcription factors (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2008). For instance, many genes encoding cysteine proteases were induced during leaf senescence such as *SAG2*, *SAG12* and *RD21* in *Arabidopsis thaliana* (Yamada *et al.*, 2001) or *BnSAG12-1* and *BnSAG12-2* in oilseed rape (Noh and Amasino, 1999). However, it should be noted that cellular signalling and metabolic events are also driven by protein-protein interactions, posttranslational protein modifications, and enzymatic activities that cannot be predicted accurately or described by transcriptional profiling approaches alone. In several studies, it appeared that the correlation between mRNA and protein level was insufficient to predict protein expression levels from quantitative mRNA data (Gygi *et al.*, 1999b ; Griffin *et al.*, 2002; Swidzinski *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2004; Gallardo *et al.*, 2008). For instance, a recent study of the proteome and transcriptome during a developmental process as complex as seed development has shown that only 50% of proteins display a profile similar to that of the corresponding transcripts (Gallardo *et al.*, 2008). This highlights that proteomics approaches can provide novel indications to understand physiological and metabolic mechanisms of many complex processes in plant development such as senescence.

In recent years, proteomics has been applied to investigate leaf senescence and plant programmed cell death in *Trifolium repens* (Wilson *et al.*, 2002), *Pisum sativum* (Schiltz *et al.*, 2004), *Oryza sativa* (Zhao *et al.*, 2005), and *Arabidopsis thaliana* (Swidzinski *et al.*, 2004; Hebel *et al.*, 2008). During leaf senescence, proteomic approaches indicated that more than 50% of the detected soluble leaf proteins visualised in 2-DE gels decline in their abundance as compared to green mature leaves of *Trifolium repens* (Wilson *et al.*, 2002). These authors also found obvious ultrastructural changes in chloroplasts that correlated with several temporal expression patterns of proteins. The temporal changes in the abundance of

proteins may indicate the sequence of biochemical and cellular events occurring during leaf senescence. A comparative proteomic study of wild type Arabidopsis and early leaf senescence mutant (*old1-1*), revealed that the large and three small subunits of RuBisCO were down-regulated during senescence of *old1-1* leaf (Hebeler *et al.*, 2008). This reflects the degradation of the photosynthetic machinery during leaf senescence in the *old1-1* mutant plants. Moreover, in these mutants, 13 distinct proteins showed significant regulation at an early stage of leaf senescence. Up-regulation of several members of the glutathione S-transferase family class phi and quinone reductase fit well into the context of leaf senescence since these proteins are generally involved in the protection of cells against reactive oxygen species (ROS) which are increasingly generated by lipid degradation during leaf senescence (Hebeler *et al.*, 2008). The increase in abundance of several antioxidant, mitochondrial and extracellular proteins was also consistent with the observation that induction and progression of leaf senescence in Arabidopsis are accompanied by oxidative stress (Swidzinski *et al.*, 2004). During N mobilisation from senescent leaves to filling seeds in pea, a proteomic approach has also reported the increase of proteins related to the maintenance of photosynthetic machinery (Schiltz *et al.*, 2004). For instance, the RuBisCO Activase, which maintains RuBisCO photosynthetic activity, and several chaperones acting as RuBisCO-binding proteins to prevent the degradation of RuBisCO, were induced in particular. During the leaf senescence of pea, Schiltz *et al.*, (2004) have also reported the induction of chloroplastic proteases such as ATP-dependent Clp protease and ATP-dependent Zn-activated protease (FtsH) which were concomitant with the decline of leaf proteins.

As in many crops belonging to the monocarpic group of plants, the capacity of oilseed rape (*Brassica napus*) to recycle N efficiently from the senescing leaves to the reproductive organs is a determinant of seed yield. Although oilseed rape requires high amounts of N, this crop is characterised by low N use efficiency: only 50% of the fertiliser N is recovered by the crop (Schjoerring *et al.*, 1995). This low recovery of endogenous N was mainly due to the weak N remobilisation observed in leaves appearing during the vegetative phase of development (rosette stage) when the sequential leaf senescence process occurred (Malagoli *et al.*, 2005a; Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007). This leads to a large deposition of N to the soil (Dejoux *et al.*, 2000). During the sequential leaf senescence of oilseed rape, it appeared that the weak N remobilisation would not be due to a limitation of the amino transport systems from leaf to phloem but would be primarily related to an incomplete hydrolysis of foliar proteins (Tilsner *et al.*, 2005). Despite these recent observations, the cellular mechanisms responsible for the insufficient remobilisation of leaf proteins have not

been elucidated. Thus, oilseed rape seemed to be an interesting plant model for investigation and characterisation of physiological and proteomic processes that are related to the N remobilisation associated with sequential leaf senescence.

The main objective of this study was to determine the dynamics of the leaf proteome associated with the process of N remobilisation during leaf senescence in oilseed rape. Because the mineral N availability influences the initiation and progression of leaf senescence (Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007), oilseed rape plants were subjected to three levels of nitrate (High N: HN, Low N: LN, N starvation: 0N). To assess whether proteomic changes were associated with leaf N remobilisation and senescence, we first used a long term steady state ^{15}N pulse-chase labelling method in order to (1) quantify N remobilisation at the whole plant level and (2) and characterise the leaf rank which presented the main source of endogenous N. In addition, the leaf senescence status was followed in the main source leaf by the rate of N remobilisation (using ^{15}N tracing), chlorophyll level patterns, total protein content and *SAG12/Cab*, a recent molecular indicator developed in oilseed rape (Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007). In this specific source leaf model, the global comparative proteomic analysis (2-DE, image analysis and LC-MS/MS methods) aimed to identify induced proteins which might have key functions during N mobilisation associated with leaf senescence. Combining a dynamic study of N remobilisation / senescence status with temporal changes in abundance of individual proteins constitutes an original contribution to the understanding of the leaf senescence process. The chronology of cellular events occurring during the progressive stages of foliar senescence is discussed.

II. MATERIALS AND METHODS

II.1 Plant material and ^{15}N labelling experiments

Seeds of *Brassica napus* (cv Capitot) were surface-sterilised by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by 20% sodium hypochlorite for 20 min. After several washes in demineralised water, seed germination was carried out on foam rubber (Oasis growing pinpot, Agrimedia). Just after the emergence of the third leaf, seedlings were transplanted into 2 L pots filled with attapulgit (1 plant per pot) and were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night) and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with Neon tubes (Philips TLD 36W) supplying an average photosynthetically active radiation of 200 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the top of the canopy. Plants were watered

every 2 d with 100 mL of nutrient solution containing 4 mM KNO₃, 3 mM CaCl₂, 1 mM K₂SO₄, 0.5 mM MgSO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.15 mM K₂HPO₄, 0.2 mM Fe-Na-EDTA, 14 μM H₃BO₃, 5 μM MnSO₄, 3 μM ZnSO₄, 0.7 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.7 μM CuSO₄ and 0.1 μM CoCl₂. In order to obtain homogeneous ¹⁵N labelled plants, a long term steady-state method of ¹⁵N labelling was carried out by supplying plants with 4 mM K¹⁵NO₃ (2 % atom excess) for 85 days. Afterward, ¹⁵N labelling was stopped and the rosette plants were separated and cultivated for the chase period under three contrasting N fertiliser regimes: 4 mM of KNO₃ (HN: High N, control plants), 0.4 mM of KNO₃ (LN: Low N) or without KNO₃ (0N). These mineral N treatments were applied during 28 days. Plants were sampled in triplicate after 7, 14, 21, and 28 d of treatment. This protocol allowed us to investigate the dynamics of endogenous N remobilisation to the different plant compartments in response to N limitation or starvation.

For all treatments, each leaf rank was separated and numbered on the basis of the date of their appearance from the oldest to youngest. The leaf rank number was ordered from the older to the younger leaves. The chlorophyll content was measured using a SPAD-502 chlorophyll meter (Minolta, Tokyo, Japan). Thereafter, leaves were weighed and the laminae was separated from the petiole, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

II.2 Sampling and calculation of N remobilisation using ¹⁵N tracing

An aliquot of each plant part (laminae, petiole, taproot) was freeze-dried, weighed for dry matter determination and ground to a fine powder. The total N and ¹⁵N contents were quantified with a mass spectrometer (IsoPrime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to an analyser (EA 3000, EuroVector, Milan, Italy). Natural ¹⁵N abundance (0.3663%) of atmospheric N₂ was used as reference for ¹⁵N analysis. Therefore, excess ¹⁵N [E(%)] in given tissue was obtained by $E(\%) = A(\%) - 0.3663$, where A(%) is tissue ¹⁵N abundance given by a mass spectrometer. The calculation of N remobilisation is based on various assumptions as previously described by Avice *et al.* (1996). Briefly, the apparent change (dN/dt) in N content in an organ during the chase period is the difference between N inflow and outflow from this organ:

$$dN/dt = N \text{ inflow} - N \text{ outflow} = N_{t+dt} - N_t \quad (1)$$

where N_t and N_{t+dt} are the N contents at time t and $t+dt$, respectively.

For a given organ, the increase in ^{14}N content during the chase period was derived from ^{14}N taken up (N inflow). Therefore, N inflow derived from N uptake during dt can be calculated from the ^{15}N dilution as:

$$\text{N inflow} = N_{t+dt} \times (1 - E_{t+dt} / E_t) \quad (2)$$

where E_t and E_{t+dt} are the ^{15}N atom % excess in the organ measured at time t and $t+dt$, respectively. N outflow from a plant organ, corresponding to endogenous N remobilisation during dt , can therefore be calculated from Equation 1:

$$\text{N outflow} = \text{N remobilisation} = N_t - N_{t+dt} + \text{N inflow} \quad (3)$$

Then, substitution from Equation 2 gives:

$$\text{N remobilisation} = [(N_t \times E_t) - (N_{t+dt} \times E_{t+dt})] / E_t \quad (4)$$

II.3 Total proteins extraction

Protein extraction, 2-DE and image analysis of 2-DE was performed as described by Desclos *et al.* (2008). For total protein extraction, frozen laminae samples (200 mg fresh weight) from each triplicate were ground in a mortar using liquid nitrogen and re-suspended in 2 mL of cold acetone containing 10% TCA. After centrifugation at 16 000 g for 3 min at 4°C, the supernatant was discarded and the pellet was rinsed. The pellet was re-suspended in 200 μL of rehydration R2D2 buffer (5 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propane-sulfonate, 2% N-decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate, 20 mM dithiothreitol, 5 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine, 0.5% IPG buffer (GE Healthcare, Saclay, France), pH 4 to 7). The total protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) using BSA as standard.

II.4 2-DE and image capture

The extract of total proteins was prepared in rehydration R2D2 buffer (125 μg in 330 μL) and was first separated according to charge in the electrofocusing PROTEAN IEF system (Bio-Rad, Marne la Coquette, France), at 20°C, using 18-cm gel strips forming an immobilised linear pH gradient from 4 to 7 (GE Healthcare, Rouen, France). Each strip was rehydrated at 50 $\mu\text{A}/\text{gel}$ for 14h. Isoelectric focusing ran for 15 min. at 250 V, 2h at 500 V, and then until 50 kV at 10 000V. After electrofocusing, the strips were immediately equilibrated in the equilibration buffer (75 mM Tris-HCl, 3% (w/v) SDS, 300 mM Tris Base)

containing DTT (65 mM) followed a second incubation in equilibration buffer containing iodoacetamide (50 mM) and bromophenol blue (0.5%). Second dimension electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out on 12 % polyacrylamide (w/v) gels (20 cm × 20 cm) using an Investigator system (Millipore, Saint-Quentin Fallavier, France) at 300 mV. Gels were stained using the silver staining procedure described by Blum *et al.* (1987). Gels were scanned with the ProXPRESS 2D proteomic Imaging System (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) before image analysis.

II.5 Image analysis of 2-DE

After image acquisition, 2-DE gels were analysed using Progenesis SameSpots Software v3.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) according the manufacturer's protocol. Gels from three independent biological replicates were used. A 2-DE gel that was the more representative of three replicates was arbitrarily chosen as the reference gel and spots of others gels were then aligned with it. Spot detection, warping and matching were performed automatically by the software. Matching was automatic but verified manually: artefacts as well as spots that could not be confidently verified as true matches, were disregarded rather than manually edited, and misalignments were corrected by manual warping when appropriate. *Mr* and *pI* were calculated using Samespots software calibrated with commercial molecular mass standards (precision protein standards unstained; Bio-Rad) run in a separate marker lane on the 2-DE gel. ANOVA ($P < 0.05$) was performed (MiniTAB) to compare the relative abundance of detected spots.

II.6 Protein Identification by LC MS/MS

Excised spots were washed several times with water and dried for a few minutes. Trypsin digestion was performed overnight with a dedicated automated system (MultiPROBE II, PerkinElmer). The gel fragments were subsequently incubated twice for 15 min in a H₂O/CH₃CN solution to allow extraction of peptides from the gel pieces. Peptide extracts were then dried and dissolved in starting buffer for chromatographic elution, consisting of 3% CH₃CN and 0.1% HCOOH in water. Peptides were enriched and separated using a lab-on-a-chip technology (Agilent, Massy, France) and fragmented using an on-line XCT mass spectrometer (Agilent). The fragmentation data were interpreted using the DataAnalysis

program (version 3.4, Bruker Daltonic, Billerica, USA). For protein identification, tandem mass spectrometry peak lists were extracted and compared with the protein database using the MASCOT Daemon (version 2.1.3; Matrix Science, London, UK) search engine. The searches were performed with no fixed modification and with variable modifications for oxidation of methionines, and with a maximum of one missed cleavage. Tandem mass spectrometry spectra were searched with a mass tolerance of 1.6 Da for precursor ions and 0.8 for MS/MS fragments.

The LC MS/MS data were converted into DTA-format files which were further searched for proteins with MASCOT Daemon. Only peptides matching an individual ion score > 51 were considered. Proteins with two or more unique peptides matching the protein sequence were automatically considered as a positive identification. Among the positive matches based on one unique peptide, the fragmentation spectrum from each peptide was manually interpreted using the conventional fragmentation rules. In particular, we looked for a succession of at least five *y*- and/or *b*-ions, specific immonium ions, specific fragment ions (proline and glycine), and signatures of any modifications carried by the peptides. Measured peptides were searched in the NCBI nr-protein sequence database *viridiplantae* (green plants).

II.7 N-terminal amino acid sequence analysis

For N-terminal amino acid sequences, 2-DE gels were performed by loading 900 µg of total proteins and by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. The spots of interest were excised and incubated in a buffer to extract the protein from the acrylamide gel. After overnight incubation under shaking, the solution was eluted on a ProSorb Filter (Applied Biosystems, Courtabeuf, France) to fix the protein on a PVDF disc. The N-terminal sequences of proteins were determined by introducing the PVDF disc into an Applied Biosystems 494 automated protein sequencer (Applied Biosystems). Runs of Edman degradation (15 cycles of pulsed-liquid chemistry) were carried out. The sequences obtained were matched to public protein sequence databases with PATTINPROT (PBIL, Lyon, France, <http://npsa-pbil.ibcp.fr>), and with MS-PATTERN on the protein prospector web site (<http://prospector.ucsf.edu>). For inconclusive searches, sequences were matched against microbial genomes at the NCBI using the more general tBLASTn algorithm.

II.8 RNA extraction

For a given date of treatment and for each leaf rank, total RNA was extracted from 250 mg of fresh matter. Frozen leaf samples were ground to a powder with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 750 μ L extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750 μ L of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s. After addition of 750 μ L of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged (15 000 g, 5 min, 4°C). The supernatant was transferred into 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 μ L of sterile water. Fifty microlitres of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate total RNA for 1 h at -80°C. After centrifugation (15 000 g, 20 min, 4°C), the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15 000 g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was dried for 5 min at room temperature and re-suspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before RT-PCR analysis.

II.9 RT-PCR analysis

For RT, 1 μ g of total RNA was converted to cDNA with "iScript cDNA synthesis kit" according to the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). PCRs were obtained using specific primers for the *Brassica napus CabLHB1B2* gene (DQ355993) (forward primer: 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3' and reverse primer 5'-CCTCCITCGCTGAAGATCTGT-3'), primers for the *Brassica napus EF1- α* gene (DQ312264) (forward primer: 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA and reverse primer 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC), and primers shared by the *SAG12-1* (AF089848) and *SAG12-2* (AF089849) genes of *Brassica napus* (forward primer: 5'-GGCAGTGGCACACCAMCCGGTTAG-3' and reverse primer: 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3'). PCRs were performed with Qbiogene Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The amplification program was: 1 cycle at 95°C for 5 min, 22 (*Cab*) or 28 (*SAG12*) or 25 (*EF1- α*) cycles including a denaturing step at 95°C for 45 sec, a primer's hybridisation step at 58°C for 45 s and an amplification step at 72 min for 1 min. Each PCR

reaction was ended with one cycle at 72°C for 10 min. Four single 267, 220, 161 and 164 bp cDNAs were amplified for the *SAG12*, *BnD22*, *Cab* and *EF1- α* genes, respectively, and the identity of each fragment was checked by sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France). For all RT-PCR reactions, the *EF1- α* gene was used as a cDNA synthesis and amplification control. The *EF1- α* gene was selected because its expression during senescence and under biotic and abiotic stress conditions (Nicot *et al.*, 2005) remained constant in opposite to ribosomal 25S RNA which is classically used as reference gene, but which was preferentially degraded during the senescence process (Masclaux *et al.*, 2000). RT-PCR products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel. The steady-state level of transcripts was estimated by measurement of signal intensities with a Biocapt software (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France) computerised image analysis system after normalisation with the *EF1- α* gene. From each sample, two RT reactions were made and followed by two independent PCRs and the corresponding data have not presented significant variation of the steady state transcript level, indicating that the RT-PCR method was reproducible. The data related to *SAG12* and *Cab* transcript levels were expressed as a % of the maximum of both transcripts observed in overall leaf ranks (the maximum level of transcripts was observed in leaf #8 at Day 21 in N-deprived plants for *SAG12* and in leaf # 8 at Day 0 for *Cab*).

II.10 Determination of the theoretical date of senescence

As recently demonstrated by Gombert *et al.* (2006) and Etienne *et al.* (2007) in oilseed rape, the gene expressions of *SAG12* (encoding a cysteine protease) and *Cab* (encoding a chlorophyll a/b binding protein) constitute an accurate indicator to follow temporal senescence (date of the entry of senescence for a given leaf rank). To determine the theoretical date of senescence for a given leaf rank, the kinetic expression of *SAG12* (up-regulated during senescence process) and *Cab* (down-regulated during senescence) was monitored by semi-quantitative RT-PCR. The intersection point corresponding to the concomitant up-regulation of *SAG12* and down-regulation *Cab* genes was considered as the date of the onset of foliar senescence (Gombert *et al.*, 2006).

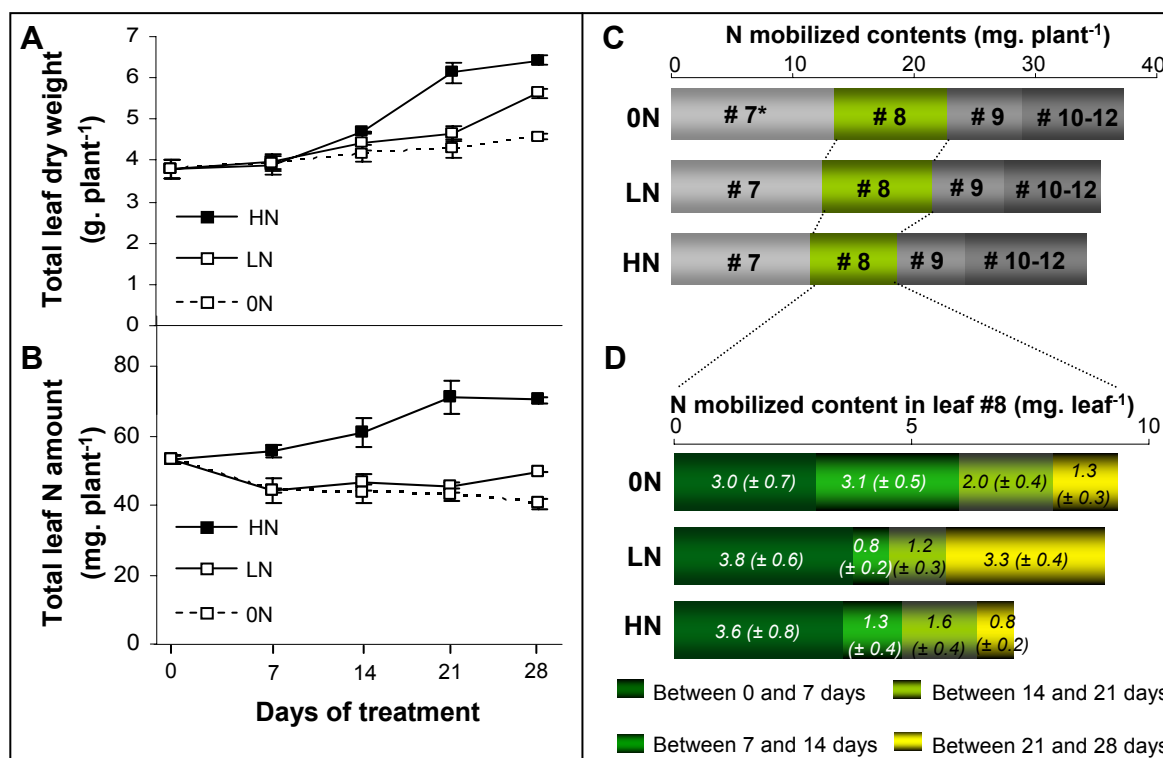


Figure V-1 : Changes of dry weight (A) and N total (B) in leaves of oilseed rape subjected to different mineral N availability during 28 days: HN (4 mM nitrate, control), LN (0.4 mM nitrate) and 0N (0 mM nitrate). Vertical bars indicate \pm SE of the mean ($n = 3$). The cumulative amount of total remobilized N and its partitioning in different leaf ranks (C) in HN, LN and 0N plants after 28 days of experimentation. Asterix indicates that leaf #7 has fallen at day 28 in 0N plants. The cumulative amount of N remobilized from leaf #8 of HN, LN et 0N (D). Data are expressed as mg of remobilized N \pm SE of the mean ($n = 3$) for each weekly interval of experiment (0-7 day, 7-14 day, 14-21 day, 21-28 day).

Table V-I. Changes in N remobilised by whole plant subjected to HN (4 mM nitrate, control), LN (0.4 mM nitrate) and 0N (nitrate deprivation) conditions during 28 days. The amount of remobilized N was determined from the ¹⁵N data obtained by the long term ¹⁵N pulse chase labelling detailed in Materials and methods (section II.2).

Treatment	N remobilised (mg. plant ⁻¹)			
	Between 0 and 7 days	Between 7 and 14 days	Between 14 and 21 days	Between 21 and 28 days
HN	10.5 (± 0.8)	9.2 (± 0.9)	8.3 (± 0.8)	11.6 (± 1.2)
LN	13.2 (± 0.5)	10.0 (± 0.5)	3.8 (± 0.6)	14.1 (± 0.9)
0N	15.2 (± 0.5)	8.3 (± 0.4)	8.9 (± 0.4)	9.8 (± 0.7)
Treatment	Total after 7 days	Total after 14 days	Total after 21 days	Total after 28 days
HN	10.5 (± 0.8)	19.7 (± 1.7)	28.0 (± 2.5)	39.6 (± 3.7)
LN	13.2 (± 0.5)	23.2 (± 1.0)	27.0 (± 1.6)	41.1 (± 3.4)
0N	15.2 (± 0.5)	23.5 (± 0.9)	32.4 (± 1.3)	42.3 (± 2.0)

II.11 Statistical analysis

Results are presented as mean values for the three plant material batches (triplicate) with standard errors. The effects of mineral N starvation were assessed by analysis of variance and mean separation was performed using a Turkey test. Statistical significance was postulated at $P \leq 0.05$.

III. RESULTS

III.1 Changes in dry matter and total N in leaves of HN, LN and 0N plants

The total leaf dry matter of control plants (4 mM of nitrate, HN) increased by 70% during treatment (day 28, Figure V-1A). Compared to HN plants, leaf biomass of N-limited (0.4 mM of nitrate, LN) and N-deprived (0N) plants was significantly reduced after 21 d. At day 28, as compared to HN plants, the leaf dry matter was reduced of 13% in LN plants and 29% in 0N plants (Figure V-1A). Figure V-1B indicates that the leaf N content of HN plants increased until the end of the experiment, reaching 70 mg at day 28 (Figure V-1B). As expected, the leaf N content in LN and 0N was significantly lower than HN plants throughout the experiment. The total N amount in leaf tissues in LN and 0N had declined significantly at day 7 and remained constant (between 40 and 50 mg) until day 28 (Figure V-1B).

III.2 Comparison of N remobilisation in HN, LN and 0N plants

A method of long term ^{15}N pulse chase labelling was carried out in order (1) to determine the level of N remobilisation within the plant and (2) to identify the leaf rank that showed a contrasting N remobilisation during the vegetative phase for further proteomic analysis during the progression of senescence. With regard to the whole plant, the total amount of N remobilised after 28 days of treatment was not significantly different for all treatments (Table V-I). In HN plants, the amount of N remobilised per week was constant throughout the experiment (about 10 mg per week; Table V-I). After 7 days, the highest level of N remobilisation was observed in 0N and LN plants. At day 14 and 21, 0N plants presented the more important N remobilisation (Table V-I). As previously reported (Gombert *et al.*, 2006;

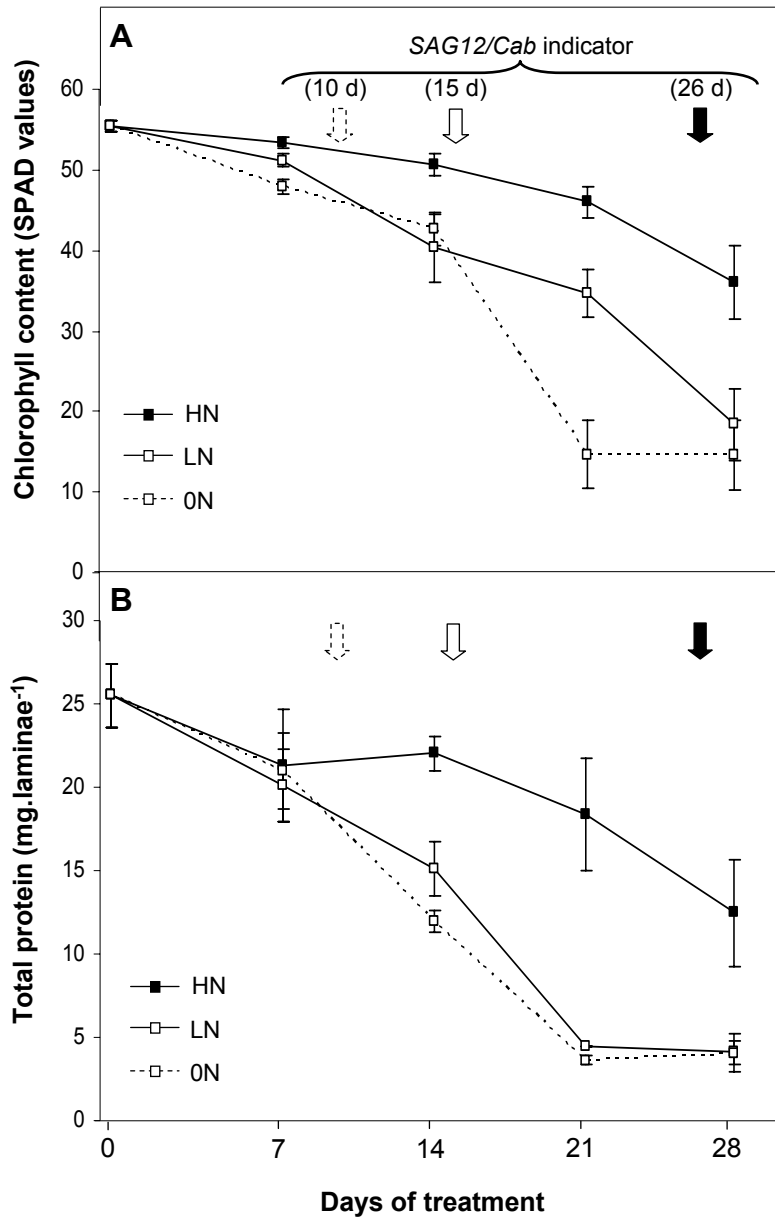


Figure V-2 : Changes in chlorophyll content (**A**) and total protein amounts (**B**) in the laminae of leaf #8 of oilseed rape subjected to different mineral N availability during 28 days: HN (4 mM nitrate, control), LN (0.4 mM nitrate) and ON (0 mM nitrate). Vertical bars indicate \pm standard error of the mean ($n = 3$). Vertical arrows indicate the time of theoretical transition from sink to source for a given leaf rank (onset of leaf senescence) determined by the molecular indicator *SAG12/Cab*. Control: black arrow, N deprived plant: white arrow.

Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008), these results confirm that low mineral N availability or N starvation limit aerial growth and provoke a rapid remobilisation of endogenous N in oilseed rape.

Because leaves represent the main source of N, we investigated the partitioning of cumulative remobilised N in these aerial organs (Figures V-1C and D). Whatever the treatments, N exported from leaves after 28 days (Figure V-1C) represents approximately 86% of total remobilised N (Table V-I). For all treatments, N remobilisation from leaf ranks #7 and #8 was higher than the other leaf ranks (Figure V-1C). The amount of N remobilised from leaf #7 after 28 days was similar in the three N treatments. On the other hand, after 28 days, leaf #8 has mobilised 9 ± 1.5 mg in LN plants and 9.3 ± 1.9 mg in 0N plants *versus* 7.1 ± 1.8 mg for HN plants (Figure V-1D). Although the final N remobilisation was similar in leaf #8 under LN and 0N conditions, the rate of N remobilisation was different between treatments during the first 14 days of the experiment (Figure V-1D). Indeed, between 0 and 14 days, leaf #8 of 0N plants exported 6.1 mg of N whereas only 4.6 mg of N was remobilised in LN plants. These results indicated that in contrast to leaf #7, leaf #8 presented the greatest differences in N mobilisation in response to the three mineral N treatments. In addition to these observations, leaf #7 detached from 0N plants between 21 and 28 days. Consequently, leaf #8 was chosen for the dynamic studies of sequential leaf senescence and the associated proteomic changes during the 28 days of the experiment. Because the N remobilisation was stronger in the laminae than the petiole of leaf #8 (data not shown), the investigations of the senescence proteome were focused on laminae #8.

III.3 Indicators of leaf senescence: changes in chlorophyll level, protein content and determination of theoretical date of senescence initiation

Declines in leaf chlorophyll and protein contents are still considered to be biochemical criteria providing information about the status of leaf senescence (Osaki *et al.*, 1995; Masclaux *et al.*, 2000). These senescence indicators were used to determine the senescence progression of laminae #8 in HN, LN and 0N plants. The level of chlorophyll declined significantly after 21 days in laminae #8 of control (HN) plants (Figure V-2A). Compared to HN conditions, the chlorophyll in laminae #8 of LN plants significantly declined from 14 days, progressively decreased until 21 days and strongly decreased thereafter. The level of chlorophyll in 0N plants was reduced from day 7, and strongly decreased (-50%) between 14 and 21 days (Figure V-2A).

There was also an impact of mineral N availability on the total protein amounts in laminae #8 (Figure V-2B). Whatever the N treatment, total protein content declined slightly between 0 and 7 days. Thereafter, the total protein content rapidly declined in LN and 0N plants as compared to HN plants. Between day 7 and day 28, the total protein amount decreased 2-fold in HN plants *versus* 6-fold in LN and 0N treatments. However, LN and 0N plants presented different rates of proteins degradation between 7 and 14 days: total protein content decreased by 20% in LN plants *versus* 36% in 0N conditions (Figure V-2B).

Recently, Gombert *et al.* (2006) have shown that the changes of *SAG12/Cab* gene expression constitute an accurate molecular indicator of leaf senescence initiation (for details, see material and methods section II.9). The steady-state transcript level of *SAG12* and *Cab* genes was monitored in order to characterise the theoretical date of onset of senescence of laminae #8 in HN, LN and 0N plants. In HN plants, the theoretical date of onset of senescence was determined to be 26 days (Figure V-2A and B). Compared to HN plants, these dates were earlier for LN and 0N treatments (Day 15) for LN plants and (Day 10) for 0N plants (Figure V-2A and B). It is worth noting that the theoretical date of onset of senescence corresponded approximately to a 50% reduction in initial protein content (Figure V-2B).

III.4 Identification of proteins induced during leaf senescence and comparative proteomic study

The temporal changes of the leaf proteome during senescence progression were investigated by 2-DE quantitative analysis in order to identify induced-proteins at different stages of N remobilisation. One of the major goals of protein identification was to find whether some functions or metabolic pathways were preferentially involved in N remobilisation. During our experiment, laminae #8 of control (HN) plants became senescent after 26 days (Figure V-2A), and was characterised by a weak level of N remobilisation (Figure V-1D), which was mainly due to a low rate of protein degradation (Figure V-2B). Therefore, the analysis of the leaf proteome in HN plants allowed identification of the induced proteins that were implied in the first steps of N remobilisation associated with senescence. In contrast with HN plants, laminae #8 of LN and 0N plants presented earlier leaf senescence (Figure V-2B) and rapid N remobilisation (Figures V-1 and V-2B). Moreover, LN and 0N had different rates of N remobilisation (Figure V-1D) and protein degradation (Figure V-2B) between day 7 and day 14. Consequently, the proteomics study of laminae #8 of LN

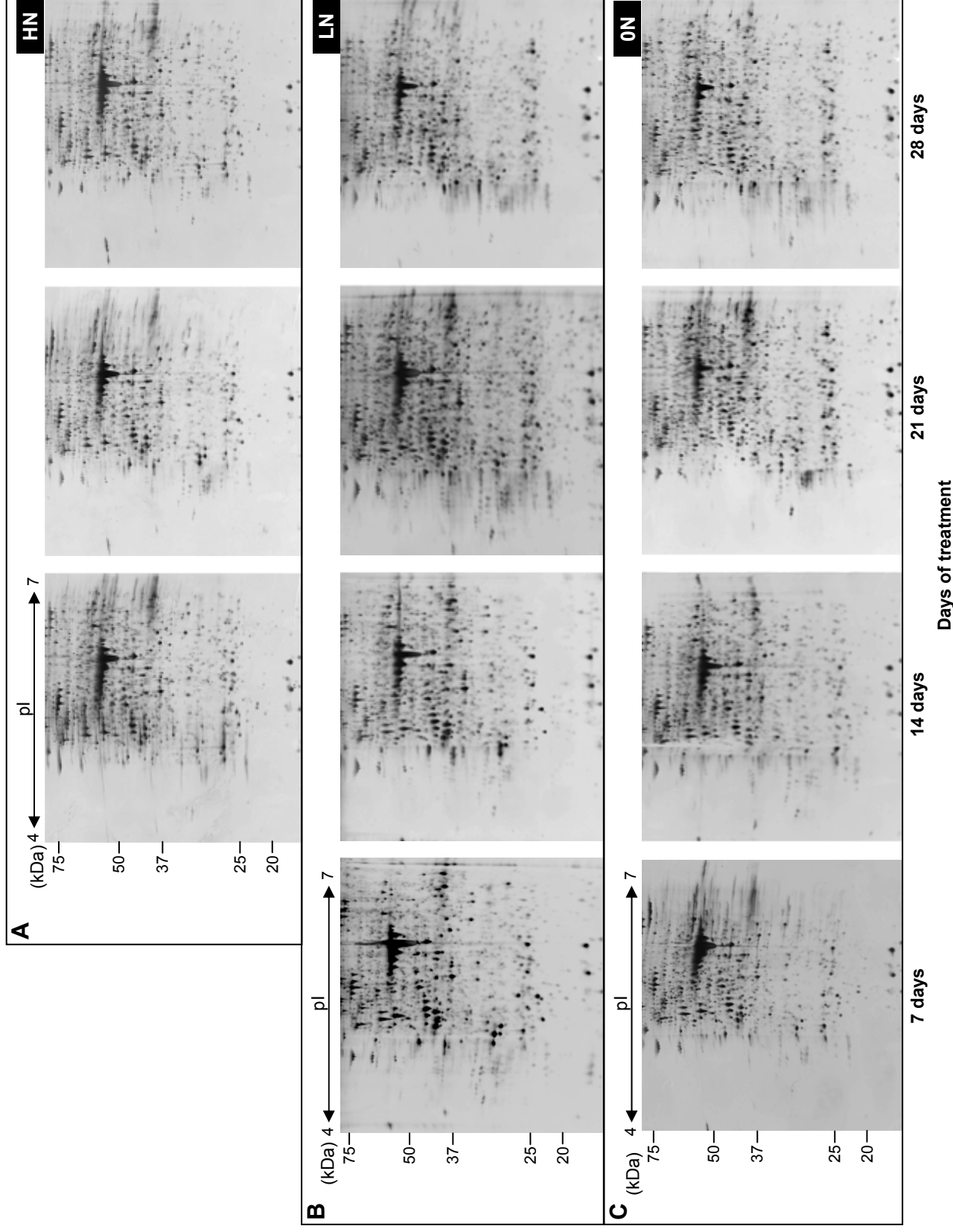


Figure V-3 : 2-DE gel of total proteins from laminae #8 of HN plants (4 mM nitrate, control) at 14, 21 and 28 d (**A**), of LN (0.4 mM nitrate, **B**) and ON (0 mM nitrate) plants at 7, 14, 21 and 28 d (**C**). A total of 125 μ g of total proteins was loaded on an IEF strip (for details see ‘‘Materials and Methods’’). Molecular mass markers (kDa) are listed on the left of the gel.

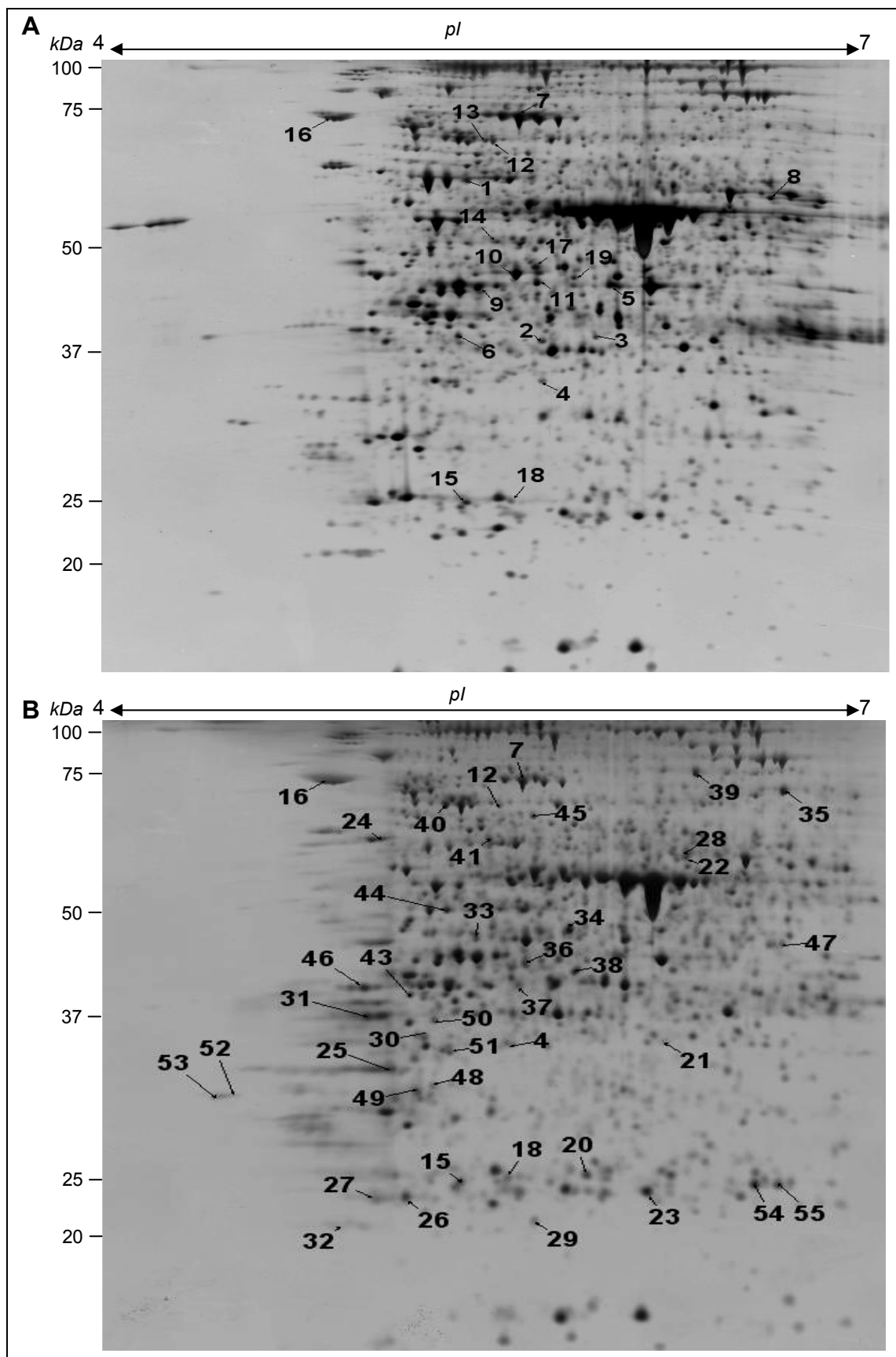


Figure V-4: Annotation of induced-spot proteins in 2-DE gels of HN plants (A), LN and ON plants (B). The labelled proteins are listed in Tables 2, 3, 4 and 5.

Table V-II : Identification of senescence-induced proteins in leaf #8 of HN plants (4 mM nitrate, control) by LC-MS/MS. Spots were presented in Figure V-4A. The histograms in the second column represent the percentage of spot total volumes at 14, 21 and 28 days of treatment. Vertical bars indicate \pm SE of the mean (n = 3). Significant ANOVA was followed by a Turkey test ($P \leq 0.05$) carried out on the percentage of leaf-normalised spot volumes. Different letters indicate a significant difference between days of treatment. Experimental and theoretical pI/Mr , number of LC-MS/MS matched peptides, and the percentage of sequence coverage of the protein by matched peptides were also indicated. The assigned protein of the best matched is given with the organism in which it has been identified and its GenBank protein accession number. The data were classified according to the protein function group described by Bevan *et al.* (1998). ^a PM, number of peptides matched; ^b % SC, percentage of sequence coverage.









Spot no.	Spot % volume variations 14-21-28 d	Exp. pI / Mr	Theo. pI / Mr	PM ^a	SC ^b (%)	Protein name / Organism /NCBI accession no.	Functional classification
Induced between 14 and 21 days							
02. Energy							
1		5.2/57.0	5.2/55.3	8	17	ATPase alpha subunit / <i>Arabidopsis hirsute</i> / gi 139389626	02.20 Electron transport
Induced between 21 and 28 days							
01. Metabolism							
2		5.5/39.0	5.4/36.6	3	12	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase precursor / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 11228579	01.01 Amino acids
3		5.7/39.0	5.4/36.6	1	3	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase precursor / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 11228579	01.01 Amino acids
4		5.5/34.0	8.1/41.7	3	9	Cysteine synthase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 572517	01.01 Amino acids
02. Energy							
5		5.8/44.8	5.6/42.7	8	19	Glyceraldhyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 336390	02.01-02 Glycolysis/ Gluconeogenesis
6		5.1/38.7	5.6/39.2	4	15	Pyruvate dehydrogenase (acyl-transferring) / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 15241286	02.01-02 Glycolysis/ Gluconeogenesis
7		5.4/78.0	5.8/81.4	7	10	Transketolase-like protein / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 7329685	02.07 Pentose Phosphate
8		6.4/54.3	6.0/50.0	4	8	2-oxoglutarate dehydrogenase, E3 subunit / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 4210334	02.10 TCA cycle

Table V-II : Continued












Spot no.	Spot % volume variations 14-21-28 d	Exp. pI / Mr	Theo. pI / Mr	PM ^a	SC ^b (%)	Protein name / Organism /NCBI accession no.	Functional classification
Induced between 21 and 28 days (Continued)							
03. Cell Growth/Division							
9		5.3/44.8	5.3/41.7	7	22	Actin / <i>Brassica napus</i> / gi 4139264	03.01 Cell growth
05. Protein synthesis							
10		5.4/46.7	5.7/46.7	1	3	Chloroplast elongation factor TuB (EF-TuB) / <i>Nicotiana sylvestris</i> / gi 218312	05.04 Translation factors
11		5.5/45.8	5.8/51.6	10	26	Arabidopsis Rab GTPase homolog E1b translation factor / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 15237059	05.04 Translation factors
06. Protein destination and storage							
12		5.3/67.7	5.8/76.0	10	16	Chloroplast FtsH protease / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 1483215	06.13 Proteolysis
13		5.3/65.0	5.7/73.2	5	9	FtsH protease 8 / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 42561751	06.13 Proteolysis
14		5.4/50.4	5.9/54.4	4	8	Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 15218090	06.13 Proteolysis
15		5.1/25.1	8.8/26.9	5	19	Chaperonin 10 / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 3057150	06.20 Folding and Stability
16		4.6/72.0	5.1/77.1	10	12	Heat shock protein 70 / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 6746592	06.20 Folding and Stability
10. Signal transduction							
17		5.5/48.0	5.3/46.9	4	12	Eukaryotic initiation factor 4A / <i>Oryza sativa</i> / gi 303844	10.99 Others
11. Disease/Defence							
18		5.4/25.6	8.2/28.5	5	20	Dehydroascorbate reductase / <i>Brassica oleracea</i> / gi 46093477	11.06 Detoxification
19		5.8/46.6	5.6/46.5	4	11	Monodehydroascorbate reductase / <i>Brassica oleracea</i> / gi 46093475	11.06 Detoxification

Table V-III : Identification of senescence-induced proteins in laminae of leaf #8 of LN plants (0.4 mM nitrate) by LC-MS/MS. Spots were presented in Figure V-4B. Details otherwise as for Table V-II.

Spot no.	Spot % volume variations 7-14:21-28 d	Exp. pl / Mr	Theo. pl / Mr	PM ^b	SC ^c (%)	Protein name / Organism / NCBI accession no.	Functional classification
Induced between 7 and 14 days							
02. Energy							
7	a b b b	5.4/78.0	5.8/81.4	4	6	Transketolase like protein / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 7329685	02.07 Pentose Phosphate
Induced between 14 and 21 days							
01. Metabolism							
4	a a b ab	5.3/34.5	8.1/41.7	3	9	Cysteine synthase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 572517	01.01 Amino acids
02. Energy							
20	a a b a	5.6/25.7	5.4/27.1	2	9	Cytosolic triose phosphate isomerase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 15233272	02.01/02.02 Glycolysis/ Gluconeogenesis
21	a ac b c	6.0/34.5	8.4/42.3	1	2	Chloroplast malate dehydrogenase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 3256066	02.10 TCA cycle
22	a ab b b	6.0/55.4	6.1/55.1	8	17	ATPase subunit 1 / <i>Brassica napus</i> / gi 112253900	02.20 Electron transport
23	a ab b a	5.9/24.4	5.5/29.4	6	34	Carbonic anhydrase 1 ; carbonate dehydratase/ zinc binding protein / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 30678347	02.30 Photosynthesis
06. Protein destination and storage							
15	a a b ab	5.1/25.1	8.8/26.9	5	19	Chaperonin 10 / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 3057150	06.01 Folding and stability
24	a a b ab	4.8/57.8	5.0/55.7	6	16	Protein disulfide isomerase / <i>Brassica carinata</i> / gi 7799357	06.01 Folding and stability
25	a a b b	4.9/32.1	5.1/54.2	5	17	Aspartic protease / <i>Brassica napus</i> / gi 1326165	06.13 Proteolysis

Table V-III : Continued

Spot no.	Spot % volume variations 7-14:21-28 d	Exp. pl / Mr	Theo. pl / Mr	PM ^b	SC ^c (%)	Protein name / Organism / NCBI accession no.	Functional classification
Induced between 14 and 21 days (Continued)							
06. Protein destination and storage (Continued)							
26	a a b ab	4.9/24.0	5.5/28.2	5	33	Ferritin-1, chloroplast precursor / <i>Brassica napus</i> / gi 1527217	06.13 Proteolysis
27	a a b ab	4.8/23.8	5.5/28.1	3	15	Ferritin-1, chloroplast precursor / <i>Brassica napus</i> / gi 1527217	06.13 Proteolysis
28	a ab bc c	6.1/61.0	6.0/59.1	9	20	MPPBETA; Metalloendopeptidase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 15232845	06.13 Proteolysis
29	a a b ab	5.4/21.9	5.3/25.1	3	18	20S proteasome beta subunit A1 (CC17) / <i>Brassica napus</i> / gi 41352683	06.13 Proteolysis
11. Disease/Defence							
30	a ab b b	5.0/34.5	4.9/24.5	1	5	DREPP plasma membrane polypeptide family protein / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 15235363	11.05 Stress responses
31	a a b ab	4.8/36.8	4.9/24.5	2	10	DREPP plasma membrane polypeptide family protein / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 15235363	11.05 Stress responses
32	a a b ab	4.8/21.4	7.7/28.8	6	30	2-Cys peroxiredoxin BAST1, chloroplast precursor (Thiol-specific antioxidant protein) / <i>Spinacia oleracea</i> / gi 1498247	11.06 Detoxification
18	a a b ab	5.4/25.6	7.6/28.6	5	20	Dehydroascorbate reductase / <i>Brassica oleracea</i> / gi 46093477	11.06 Detoxification
33	a a b b	5.2/47.7	5.1/40.8	6	24	Anthocyanidin synthase / <i>Brassica oleracea</i> / gi 29423729	11.06 Detoxification
Induced between 21 and 28 days							
01. Metabolism							
34	a ab ab b	5.6/48.1	5.4/42.8	4	13	S-adenosylmethionine synthetase / <i>Brassica juncea</i> / gi 10443981	01.01 Amino acids
35	a a a b	6.4/69.2	6.0/111.6	4	5	α-mannosidase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gi 10177664	01.05 Sugars and polysaccharides

Table V-III : Continued

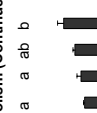
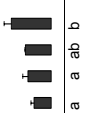
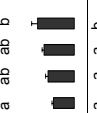
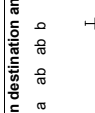
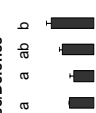


Spot no.	Spot % volume variations 7-14-21-28 d	Exp. pl / Mr	Theo. pl / Mr	PM ^b	SC ^b (%)	Protein name / Organism / NCBI accession no.	Functional classification
<i>Induced between 21 and 28 days (Continued)</i>							
01. Metabolism (Continued)							
36		5.4/44.0	6.3/41.4	3	8	12-oxophytodienoate reductase 1 (OPR1) / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll15223138	01.06 Lipid and sterol
02. Energy							
37		5.4/40.9	5.5/42.1	4	14	Phosphoglycerate kinase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll15219412	02.01/02.02 Glycolysis/ Gluconeogenesis
38		5.6/42.7	6.3/45.3	12	37	Succinyl-CoA ligase (GDP-forming) beta-chain, mitochondrial / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll15225353	02.10 TCA cycle
39		6.1/76.4	6.2/81.5	7	10	NADH dehydrogenase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll18421656	02.13 Respiration
40		5.1/73.0	5.2/68.6	12	26	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A / <i>Brassica napus</i> / gll2493122	02.20 Electron transport
06. Protein destination and storage							
41		5.3/57.8	6.6/62.4	9	20	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplast precursor (CPN-60) / <i>Brassica napus</i> / gll134104	06.01 Folding and stability
11. Disease/Defence							
42		5.3/41.8	5.6/38.4	7	27	Nitrilase-like protein / <i>Brassica napus</i> / gll14211396	11.06 Detoxification

Table V-IV : Identification of senescence-induced proteins in laminae of leaf #8 of 0N plants (0 mM nitrate) by LC-MS/MS. Spots were presented in Figure V-4B. Details otherwise as for Table V-II.

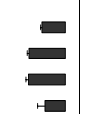
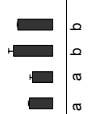






Spot no.	Spot % volume variations 7-14-21-28 d	Exp. pl / Mr	Theo. pl / Mr	PM ^b	SC ^b (%)	Protein name / Organism / NCBI accession no.	Functional classification
<i>Induced between 7 and 14 days</i>							
06. Protein destination and storage							
12		5.3/67.7	5.8/76.0	16	10	Chloroplast Fish protease / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll148321	06.13 Proteolysis
01. Metabolism							
4		5.3/34.5	8.1/41.7	3	9	Cysteine synthase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll572517	01.01 Amino acids
43		4.9/39.6	5.2/39.1	2	10	Glutamate ammonia ligase / <i>Brassica napus</i> / gll599656	01.02 Nitrogen
ADP-glucose							
44		5.1/50.4	5.8/57.0	3	6	pyrophosphorylase small subunit / <i>Brassica rapa</i> / gll13487709	01.05 Sugars and polysaccharides
35		6.4/69.2	6.0/111.6	4	5	α-mannosidase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll10177664	01.05 Sugars and polysaccharides
02. Energy							
20		5.6/25.7	5.4/27.1	2	9	Cytosolic triose phosphate isomerase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll15233272	02.01/02.02 Glycolysis/ Gluconeogenesis
Putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll15982735							
45		5.5/62.0	5.3/60.4	5	11	phosphoglycerate mutase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gll15982735	02.01/02.02 Glycolysis/ Gluconeogenesis
46		4.8/40.5	6.0/42.0	2	8	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast precursor / <i>Triticum aestivum</i> / gll1173347	02.01/02.02 Glycolysis/ Gluconeogenesis

Table V-IV : Continued


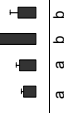

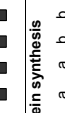
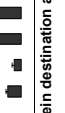
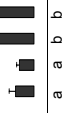


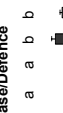
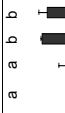


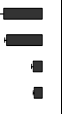
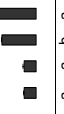
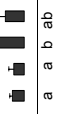


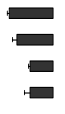
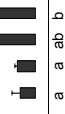
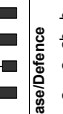

Spot no.	Spot % volume variations 7-14-21-28 d	Exp. pl / Mr	Theo. pl / Mr	PM ^b	SC ^b (%)	Protein name / Organism / NCBI accession no.	Functional classification
<i>Induced between 14 and 21 days (Continued)</i>							
02. Energy (Continued)							
21		6.0/34.5	8.4/42.3	1	2	Chloroplast malate dehydrogenase / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gij3256066	02.10 TCA cycle
47		6.4/46.5	6.1/45.7	9	24	Isocitrate dehydrogenase, putative / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gij15218669	02.10 TCA cycle
48		5.0/31.2	6.5/25.8	2	9	Vacuolar ATPase subunit E-like protein / <i>Theilungella halophila</i> / gij20340245	02.20 Electron transport
49		5.0/30.8	5.8/27.0	5	21	VHA-E3, Vacuolar ATPase subunit isoform 3 / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gij15222641	02.20 Electron transport
05. Protein synthesis							
50		5.0/36.6	5.1/32.2	2	7	40S ribosomal protein SA (p40) / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gij15214300	05.01 Ribosomal protein
06. Protein destination and storage							
15		8.8/26.9	8.8/26.9	5	19	Chaperonin 10 / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gij3057150	06.01 Folding and stability
25		4.9/32.1	5.1/54.2	5	17	Aspartic protease / <i>Brassica napus</i> / gij1326165	06.13 Proteolysis
26		4.9/24.0	5.5/28.2	5	33	Ferritin-1, chloroplast precursor / <i>brassica napus</i> / gij1527217	06.13 Proteolysis
27		4.8/23.8	5.5/28.1	3	15	Ferritin-1, chloroplast precursor / <i>Brassica napus</i> / gij1527217	06.13 Proteolysis
11. Disease/Defence							
51		5.1/33.6	5.5/22.0	3	9	Dehydrin / <i>Brassica juncea</i> / gij90654235	11.05 Stress responses
52		4.2/30.6	4.8/34.5	7	25	Plastid-lipid associated protein PAP2 / <i>Brassica rapa</i> / gij14248550	11.05 Stress responses

Table V-IV : Continued

Spot no.	Spot % volume variations 7-14-21-28 d	Exp. pl / Mr	Theo. pl / Mr	PM ^b	SC ^b (%)	Protein name / Organism / NCBI accession no.	Functional classification
<i>Induced between 14 and 21 days (Continued)</i>							
11. Disease/Defence (Continued)							
53		4.2/30.6	4.8/34.5	8	34	Plastid-lipid associated protein PAP2 / <i>Brassica rapa</i> / gij14248550	11.05 Stress responses
30		5.0/34.5	4.9/24.5	1	5	DREPP plasma membrane polypeptide family protein / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gij15235363	11.05 Stress responses
31		4.8/36.8	4.9/24.5	2	10	DREPP plasma membrane polypeptide family protein / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gij15235363	11.05 Stress responses
33		5.2/47.7	5.1/40.8	6	24	Anthocyanidin synthase / <i>Brassica oleracea</i> / gij29423729	11.06 Detoxification
18		5.4/25.6	7.6/28.6	5	20	Dehydroascorbate reductase / <i>Brassica oleracea</i> / gij46093477	11.06 Detoxification
<i>Induced between 21 and 28 days</i>							
01. Metabolism							
34		5.6/48.1	5.4/42.8	4	13	S-adenosylmethionine synthetase / <i>Brassica juncea</i> / gij10443981	01.01 Amino acids
06. Protein destination and storage							
16		4.6/72.0	5.1/77.1	10	12	Heat shock protein 70 / <i>Arabidopsis thaliana</i> / gij6746592	06.01 Folding and stability
24		4.8/57.8	5.0/55.7	6	16	Protein disulfide isomerase / <i>Brassica carinata</i> / gij77999357	06.01 Folding and stability
29		5.4/21.9	5.3/25.1	3	18	20S proteasome beta subunit A1 (CC17) / <i>Brassica napus</i> / gij41352683	06.13 Proteolysis
11. Disease/Defence							
32		4.8/21.4	7.7/28.8	6	30	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplast precursor (Thiol-specific antioxidant protein) / <i>Spinacia oleracea</i> / gij1498247	11.06 Detoxification

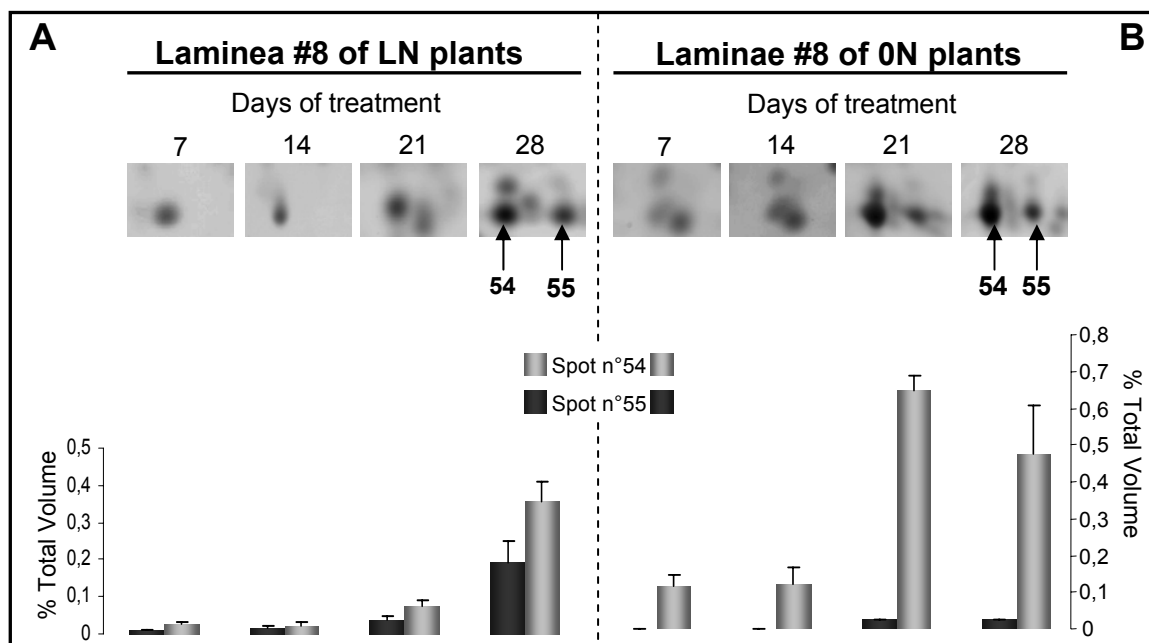


Figure V-5 : Changes in relative spot volume of spots 54 and 55 in laminae #8 of LN (0.4 mM nitrate, **A**) and 0N (0 mM nitrate, **B**) plants. Vertical bars indicate \pm SE of the mean ($n = 3$).

Table V-V : Identification of spots 54 and 55 in laminae#8 of LN (0.4 mM nitrate) and 0N (0 mM nitrate) plants by N-terminal amino acid sequence analysis.

Spot no.	N-terminal amino acid sequence	Exp. pI / Mr	Theo. pI / Mr	Protein name / Organism /NCBI accession no.	Function
54 and 55	FGALPIAVDWRK	6.3/25 6.4/25	6.99/38.3	Senescence specific cysteine protease (SAG12-1) / <i>Brassica napus</i> / gj 5823018	06.13 Proteolysis

and 0N plants enabled characterisation of the induced proteins involved in later stages of N remobilisation during leaf senescence.

Representative 2-DE gels from HN, LN and 0N plants are shown in (Figure V-3). The abundance of each spot was expressed as a percentage of the total density of all detected spots so as to identify proteins which were significantly induced, despite the massive protein degradation which occurred during leaf senescence (Figure V-2B). In fact, protein spots with a similar percentage of volume throughout the experiment indicated that their degradation was comparable to the average rate of total protein degradation. Tables V-II, V-III and V-IV summarise respectively the proteins presenting significant induction in laminae #8 of HN, LN and 0N plants. All identified proteins were annotated in Figure V-4 and were classified into functional classes according to the scheme by Bevan *et al.* (1998) and the KEGG PATHWAY Database (www.genome.ad.jp/kegg/pathway/html).

In control (HN) plants, one protein spot was up-regulated between 14 and 21 days whereas 19 protein spots were induced between 21 and 28 days (Table V-II, Figure V-4). Between 21 and 28 days, the proteins identified in HN plants were mainly involved in “Protein destination and Storage” (26%) and “Energy” (21%). Between day 7 and day 28, a total of 26 and 29 spots were increased in LN and 0N plants, respectively (Tables V-III, V-IV and V-V, Figure V-5). In LN and 0N treatments, these proteins were mainly involved in “Metabolism” (15%), “Energy” (30%), “Protein destination and Storage” (30%) and “Disease and Defence” (20%). Two protein spots (spots #54 and #55), which were identified as the senescence specific cysteine protease SAG12-1, were spots with the highest level of induction in this study (Table V-5, Figure V-5A and B). The up-regulation of this protein was 17-fold between 21 and 28 days in LN plants (Figure V-5A), and 10-fold between 14 and 21 days in 0N plants (Figure V-5B) whereas other proteins were induced by approximately 2 to 3-fold.

By coupling the theoretical date of leaf senescence given by the *SAG12/Cab* molecular indicator and the change of the total protein content (expressed as a percentage of the initial total protein content observed at Day 0), it is possible to distinguish three phases during leaf senescence (Figure V-6): initiation/ beginning of N remobilisation (phase 1); intermediate phase (phase 2); and terminal phase (phase 3). Phase 1 was characterised by the time interval between the date of maximum leaf protein (corresponding to the initial protein content observed at day 0 for leaf #8 in this experiment) and the theoretical date of onset of senescence (determined by *SAG12/Cab*), which corresponded approximately to a 50% reduction in total initial protein content. Phase 2 was located between the theoretical date of

senescence (or 50% of initial protein content) and the date corresponding to 10% of initial total protein content. Phase 3 was the late stage of leaf senescence (< 10% of initial protein content). Based on the data given in Tables V-II to V-V, the induced proteins identified in HN, LN and 0N plants were ranked into the three different phases of leaf senescence as a function of their date of induction (Figure V-6). In addition, the data given in Figure V-6 allowed identification of proteins that are induced during the same phase of senescence between HN, LN and 0N plants (see protein written in bold in Figure V-6).

The different functions of identified proteins which are specifically induced during leaf senescence of oilseed rape are extensively discussed in the next section.

V. DISCUSSION

Identification of proteins that are putatively involved in the process of N remobilisation has provided a foundation for further studies to examine the possible roles and functions of these proteins. The protein content of leaves declines progressively during senescence, due to the conjunction of a general decrease in proteosynthesis and a massive degradation by proteases (Smart, 1994). However, our study revealed that certain proteins did not have the same profile as the majority of proteins during N remobilisation in the leaves of oilseed rape. We have identified these proteins using proteomic approaches on leaves characterised by contrasting senescence. Proteomics analysis was based on the rate of N remobilisation (using ¹⁵N tracing method), protein content and molecular indicators of leaf senescence initiation such as *SAG12/Cab* that have been developed recently in oilseed rape (Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007). In this study, these different indicators were used to distinguish three phases of leaf senescence which allowed discussion about the function of each identified-protein with regard to N remobilisation dynamics associated with foliar senescence. In the following sub-sections, the roles of induced-proteins were discussed for each group of functions (as classified by Bevan *et al.* (1998)).

IV.1 Detoxification

Five proteins related to detoxification were identified during N remobilisation: monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR), anthocyanidin synthase, 2-cysteine peroxiredoxin and plastid lipid-associated protein (PAP) (Figure V-6).

Expression of monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) might contribute towards limiting the overproduction of reactive oxygen species (ROS). MDHAR was only expressed at the early stage of senescence whereas DHAR was detected from the early stage of senescence to the intermediate phase (Figure V-6). In fact, the levels of the different ROS have to be tightly regulated during leaf senescence. The excessive formation of ROS is called “oxidative stress” as reported by Zimmermann and Zentgraf (2005). Since these radicals are very toxic for cells, organisms have developed different systems of detoxification involving various enzymes and nonenzymatic components consisting of antioxidative molecules such as ascorbate, glutathione, α -tocopherol and carotenoids (Noctor and Foyer, 1998). To maintain a sufficient level of ascorbate, ascorbate oxidation always leads to monodehydroascorbate (MDA) which normally has a short life span that, if not rapidly reduced by MDHAR, disassociates into ascorbate and dehydroascorbate (DHA). DHA is reduced to ascorbate by the action of DHAR, using glutathione as the reducing substrate. Expression of DHAR, responsible for regenerating ascorbate, regulates the cellular ascorbate redox state, which in turn affects cell responsiveness and tolerance to environmental ROS. The increase of DHAR expression limited the cellular alterations caused by ROS and maintained higher levels of chlorophyll, RuBisCO, light-harvesting complex II (LHCII), and photosynthetic machinery, resulting in delayed leaf aging. The effect of DHAR expression on leaf aging inversely correlated with the level of lipid peroxidation, indicating that DHAR functions to protect against ROS-mediated damage (Chen and Gallie, 2006).

Anthocyanidin synthase, which was involved at the end of phase 1 and during phase 2, was also classed among the detoxification mechanisms. This enzyme catalyses the ultimate step in the biosynthesis of the anthocyanin class of flavonoids (Wilmouth *et al.*, 2002). The anthocyanins accumulated during leaf senescence might physiologically protect against photo-oxidative stress (Gould *et al.*, 2002; Philpott *et al.*, 2004).

The 2-cysteine peroxiredoxin was accumulated at later stage of leaf senescence in order to maintain, as well as possible, the antioxidant status. It constitutes an ancient family of peroxide detoxifying enzymes which are able to protect DNA, membranes and some enzymes against damage by thiol, or to remove H₂O₂, alkyl hydroperoxides, and hydroxyl radicals (Kim *et al.*, 1988; Lim *et al.*, 1993). The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein (Baier and Dietz, 1997). The *bas1* gene expression is under the control of the cellular redox state, which is in accordance with the anti-oxidant function of the enzyme. It has been supported that antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin expression in Arabidopsis specifically increases expression of MDHAR and ascorbate

peroxidase, which in turn counteract the loss of 2-cysteine peroxiredoxin function (Baier *et al.*, 2000).

Plastid lipid-associated protein (PAP), a predominant structural protein associated with carotenoids and other non-green neutral lipids in plastids, was expressed during the late stage of leaf senescence. The expression of *PAP* genes can be induced by externally applied hormones (Vishnevetsky *et al.*, 1997) and stresses such drought or wounding (Chen *et al.*, 1998; Gillet *et al.*, 1998). The enhanced PAP might coordinate with the increased carotenoids to exert photoprotection. PAP2 decreases in senescing leaves of *Brassica rapa* (Kim *et al.*, 2001). In contrast, results of this study propose that this protein might protect against photo-damage in later stages of senescence in *Brassica napus*.

IV.2 Energy

Energy metabolism was represented in phases 1 and 2 of N remobilisation (Figure V-6). During leaf senescence, the decrease in photosynthetic activity was characterised by a decrease in (1) the level of LHCII (Humbeck *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2004), (2) the amount and activity of RuBisCO (Batt and Woolhouse 1975; Jiang *et al.*, 1993), (3) the CO₂-exchange rate (Jiang *et al.*, 1993), and (4) the level of mRNA expression of photosynthesis-related genes (Bate *et al.*, 1991, Humbeck *et al.*, 1996). The decline in photosynthesis during senescence may result in sugar starvation leading to the activation of lipid conversion to sugars. During leaf senescence, thylakoid breakdown leads to release of lipids, which are known to be converted to sugars through the glyoxylate cycle (Buchanan-Wollaston, 1997; Kim and Smith, 1994). The sugars produced by conversion of large amounts of lipids may be in excess of the requirement for senescent leaf respiration and this may be exported to other growing parts of the plant. Our results show enhanced expression of several enzymes implicated in glycolysis/gluconeogenesis (Figure V-6) such as cytosolic triose phosphate isomerase, putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G-3P DH), phosphoglycerate kinase and sedoheptulose-1,7-biphosphatase (similar to fructose 1,6 biphosphatase ; Raines *et al.*, 1992). All these enzymes are known to participate in the production of pyruvate. Thus, the oxidative decarboxylation of pyruvate catalysed by pyruvate dehydrogenase, which is induced in our study during phase 1 (Figure V-6), enables the production of acetyl CoA which regulates the TCA cycle (Nicolas *et al.*, 2004). A recent study (Giegé *et al.*, 2003) has revealed that the glycolytic pathway is associated with mitochondria by attachment to the cytosolic face of the

outer mitochondrial membrane. Such compartmentalisation of glycolysis leads to direct transfer of pyruvate into the mitochondrion, where it is used as a respiratory substrate. Therefore, as also reported by Zimmerman and Zentgraf (2005), our data confirm that the function of the mitochondria is maintained during the gradual breakdown of the cell up to a very late point of senescence. This is essential for the cell to gain energy *via* ATP synthesis during respiration (Thomas and Stoddart, 1980).

When photosynthesis decreases during senescence, chloroplasts produce less NADPH, H⁺ and ATP. The TCA cycle also provides intermediates to generate ATP. Senescence induced-TCA enzymes presented in this study were isocitrate dehydrogenase, succinyl-CoA ligase, malate dehydrogenase, and 2-oxoglutarate dehydrogenase (Figure V-6). The fact that pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase are both α -keto acid enzymes complexes could explain the simultaneous regulation of these enzymes. Up-regulation of the isocitrate dehydrogenase gene was also reported in senescing wheat leaves by Gregersen and Holm (2007) and not in senescing Arabidopsis leaves (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005), suggesting differences in the senescence process between different species. An important step is the production of ATP *via* malate dehydrogenase which catalyses the oxidation of malate to oxaloacetate. In leaf beet, it has been shown that activity of the malate dehydrogenase was increased during senescence (Pistelli *et al.*, 1992). Energy is needed for catabolic processes and it has been suggested that the increasing respiration detected in both detached and attached leaves during senescence might provide ATP for these processes (Solomos 1988, Oleksyn *et al.*, 2000). In this study, the induction of NADH dehydrogenase and ATP synthase is related to energy supply. NADH dehydrogenase is the first enzyme of the mitochondrial electron transport chain, which translocates four protons across the inner membrane per molecule of oxidised NADH. This electrochemical potential allows the production of ATP *via* ATP synthase, a major ATP supplier in the cell. In a recent study, it has been found that this enzyme was induced during leaf senescence in rice (Liu *et al.*, 2008). Moreover, the up-regulation of ATPases when N remobilisation is important (phases 1 and 2, Figure V-6) may lead to an increase in the consumption of ATP which could be supplemented by significant production of ATP (by ATP synthase) during leaf senescence. The increased expression of vacuolar ATP synthase (phase 2, Figure V-6) might be closely associated with the proton transport across the tonoplast. For instance, the V-type H⁺ ATPases are known to cause the acidification of intracellular compartments. In vacuoles of plants, a pH of about 5 is favourable to the breakdown of macromolecules by different acid hydrolases including

proteases, glycosidases, lipases, nucleases and phosphatases (Beyenbach and Wiczorek, 2006). These enzymes are important in leaf senescence processes.

The regulation of enzymes involved in energy production was also described in recent proteomic studies of leaf senescence induced by abiotic stress such as cadmium pollution (Kieffer *et al.*, 2008), high-salinity (Wang *et al.*, 2008), water logging (Ahsan *et al.*, 2007) and heat (Lee *et al.*, 2008). Identification of proteins related to energy metabolism in the present study confirms that this metabolism changes during senescence.

IV.3 Metabolism

The major transport form of reduced N is amino acids. Cysteine synthase, glutamate ammonia ligase, aspartate-semialdehyde dehydrogenase and SAM synthetase were proteins of amino acid metabolism that were induced during the leaf senescence process (phases 1, 2 and 3, Figure V-6). Cysteine synthase catalyses the formation of cysteine, the only sulphide donor for all reduced sulphur containing cell constituents in plants. Cysteine accelerates senescence (Thimann *et al.*, 1974) and is involved in synthesis of glutathione, a thiol implicated in resistance to abiotic and biotic stresses (May *et al.*, 1998). Thus, it could be hypothesised that cysteine synthase could contribute towards protection against ROS by producing the antioxidant glutathione.

In *Brassica napus*, glutamate ammonia ligase is the glutamine synthetase (GS) isoform BnGSR2, whose gene was induced after onset of leaf senescence (Ochs *et al.*, 1999; Finnemann and Schjoerring, 2000). The fact that GS is a key enzyme responsible for ammonia assimilation and represents the major pathway for incorporation of ammonia into amino acids, explained the presence of this enzyme in our study. The expression of cytosolic GS isoform BnGSR2, that was observed in phase 2 of leaf senescence, suggests a crucial role for recovery of N from leaves senescing through the conversion of ammonia to glutamate, a major form of N that is remobilised from senescing leaves to growing parts of plants through the phloem (Ochs *et al.*, 1999). Induction of cytosolic GS during leaf senescence has been also shown in rice (Kamachi *et al.*, 1991), in tobacco (Masclaux *et al.*, 2000), in potato (Teixera *et al.*, 2005), and in Arabidopsis (Diaz *et al.*, 2008).

The aspartate-semialdehyde dehydrogenase produces the branch point intermediate between the lysine and threonine/methionine pathways (Paris *et al.*, 2002). Expression of this enzyme at the onset of leaf senescence (Figure V-6) suggests a functional role for the

corresponding proteins in intermediary N metabolism of senescing leaves. Metabolism could be oriented in methionine synthesis, an essential precursor for production of ethylene *via* the SAM synthetase which is expressed at the end of phase 2 or during phase 3 ie. later than aspartate-semialdehyde dehydrogenase. From methionine and ATP, SAM synthetase catalyses the biosynthesis of SAM, a precursor for the biosynthesis of ethylene (Yang and Hoffman, 1984). Increases in *SAM synthetase* gene expression in response to mechanical stimuli have been reported in wounded *Arabidopsis* leaves (Kim *et al.*, 1994). The role of the ethylene pathway in senescence has been demonstrated by several studies. For instance, ethylene-insensitive mutants showed delayed leaf senescence (Oh *et al.*, 1997). Therefore, it is also likely that SAM, catalysed by SAM synthetase induced in later phases of senescence (Figure V-6), allows the production of ethylene, a phytohormone capable of promoting senescence process.

ADP-glucose pyrophosphorylase, α -mannosidase and carbonic anhydrase belong to proteins involved in carbohydrate metabolism and were induced mainly in phase 2 (Figure V-6). ADP glucose pyrophosphorylase, which plays a central role in starch synthesis, was identified at the intermediate phase of leaf senescence. These data are in contrast to observations in senescing leaves of barley where protein levels of ADP glucose pyrophosphorylase declined during leaf senescence (Wiedemuth *et al.*, 2005). The relative abundance of α -mannosidase during phases 2 and 3 of senescence (Figure V-6) indicated a rapid degradation of N-glycans, suggesting remobilisation of cell wall components (Kimura *et al.*, 2008). Directly involved in CO₂ metabolism, carbonic anhydrase is an enzyme associated with the Calvin cycle (Jebanathirajah and Coleman 1981). However, the presence of carbonic anhydrase when chloroplasts are degraded, suggests a possible antioxidant function as suggested by Slaymaker *et al.* (2002).

IV.4 Protein biosynthesis

Besides the presence of a massive proteolysis, it is also necessary for plants to ensure protein biosynthesis so that leaf senescence processes can be accomplished. Elongation factor TuB (EF-TuB), Rab GTPase and eukaryotic initiation factor 4A (eIF-4A) were only identified at the early stage of leaf senescence (phase1, Figure V-6) whereas 40S ribosomal protein SA (p40) was expressed in phase 2 (Figure V-6). *Arabidopsis* Rab GTPase homolog E1b translation factor is similar to EF-TuB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). During polypeptide

synthesis, EF-TuB plays an important role in promoting the binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the ribosome (Riis *et al.*, 1990). However, in maize submitted to heat stress, EF-TuB has been found to protect heat-labile proteins such as citrate synthase and malate dehydrogenase from heat-induced damage (thermal aggregation), suggesting a second role as a chaperone (Moncilovic and Ristic, 2007).

The up-regulation of eIF-4A at the onset of senescence was consistent with the results obtained by Thompson *et al.* (2004) for the eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) and confirmed the important role of this category of proteins in the first step of senescence. eIF-4A exhibits striking homology with a pea DNA helicase 45 (PDH45) which contains RNA helicase activity (Pham *et al.*, 2000; Sanan-Mishra *et al.*, 2005). Overexpression of PDH45 in tobacco plants confers tolerance to high salinity as tested by a leaf disk senescence assay (Pham *et al.*, 2000; Sanan-Mishra *et al.*, 2005). According to Sanan-Mishra *et al.* (2005), it is likely that during leaf senescence (1) PDH45/ eIF-4A may act at the translation level to enhance or stabilise protein synthesis, or (2) PDH45/ eIF-4A may associate with DNA multisubunit protein complexes to alter gene expression.

p40s are acidic proteins of eukaryotic cells occurring either free in the cytoplasm or in association with ribosomes, the latter occurring in both monosomes and polysomes. p40s may play a role in the regulation of protein synthesis, although the exact mechanism is not known (Garcia-Hernandez *et al.*, 1996). The presence of p40 at the late phase of leaf senescence could be explained by maintenance of protein synthesis despite the massive protein degradation.

IV.5 Stress-proteins and hormones

We identified stress-related proteins such as DREPP, dehydrin and transketolase. DREPP protein, which was identified during phase 2 of leaf senescence (Figure V-6), was also induced during cold acclimation of *Arabidopsis* leaves (Kawamura and Uemura, 2007). DREPP protein possesses a sequence similar to vacuolar Ca²⁺ binding-protein in radish (Yuasa and Maeshima, 2000; Kawamura and Uemura, 2007). Ca²⁺ elevations upon stress have been reported in a number of different systems and have identified Ca²⁺ as the most ubiquitous cellular second messenger (Snedden and Fromm, 2001). Our results suggest that DREPP-like proteins may be associated with the Ca²⁺ pathway during leaf senescence. Dehydrins are intracellular stabilisers acting upon targets in both the nucleus and cytoplasm (Close 1996; Koag *et al.*, 2003). Previous studies indicated consistent association of dehydrins with stress

responses such high-light stress, low temperature, drought stress or heavy-metal stress (Richard *et al.*, 2000 ; Kimura *et al.*, 2003 ; Tommasini *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2008). In *Brassica juncea*, dehydrins enhanced the tolerance for heavy metals by reducing lipid peroxidation and maintaining membrane stability in the plants (Xu *et al.*, 2008). The capacity of dehydrins to bind membranes and their presence at the late stage of leaf senescence (Figure V-6), suggest that dehydrin could protect mitochondrial and nucleus membranes in order to maintain production of energy (see section IV.2) and transcription mechanisms, respectively. Transketolase-like enzyme catalyses the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis (Lois *et al.*, 1998). Isoprenoids play numerous functional roles in plants as hormones (gibberellins, abscisic acid), photosynthetic pigments (side chain of phytol, carotenoids), electron carriers (side chain of plastoquinone), and structural components of membranes (phytosterols). Moreover, thiamine (vitamin B1) is an essential cofactor that is required for the activity of several enzymes (for instance, transketolase and pyruvate dehydrogenase), which are associated with major metabolic pathways (Jacob-Wilk *et al.*, 1997). Expression of transketolase at the onset of leaf senescence (Figure V-6) suggests a role of defence in leaves.

Hormones have been thought to play a role in regulation of senescence (Thomas and Stoddart, 1980). A study on gene transcript profiles for hormone pathways in senescing *Arabidopsis* leaves suggested the involvement of cytokinin, jasmonic acid, salicylic acid, ethylene, auxin and abscisic acid (van der Graaff *et al.*, 2006). In our study, three proteins were involved in hormone biosynthesis. The first was nitrilase-like protein which is a soluble cytoplasmic protein associated with the plasma membrane (Bartling *et al.*, 1994). Nitrilase is involved in auxin biosynthesis by synthesising indole-3-acetic acid (IAA) from indole-3-acetonitrile. For soybean it has been shown that senescence can be retarded by application of auxin (Noodén *et al.*, 1997). However the induction of nitrilase genes and the increase of IAA levels in senescing *Arabidopsis* leaves mean that auxin levels may increase during leaf senescence (Quirino *et al.*, 1999). Authors suggest that leaves do not senescence uniformly and it is quite possible that auxin levels are selectively increased only in a certain population of cells. The high concentration of free auxin in central regions of the laminae at the end of leaf development could reveal protection of vascular tissues which are required for nutrient export during leaf senescence (Gan and Amasino, 1997; Aloni *et al.*, 2003). The second protein related to hormone biosynthesis was 12-oxophytodienoate reductase involved in biosynthesis of jasmonic acid (JA) identified at the late phase of senescence (Figure V-6). In *Arabidopsis* leaves, the genes of *12-oxophytodienoate reductase 1* are up-regulated during

senescence, especially at the early stage of leaf senescence (He *et al.*, 2002). Although JA is known to induce senescence, the action of JA on leaf senescence processes remains unclear. These results suggest that JA plays a role in the senescence program. It is likely that an increase in jasmonate levels can induce the expression of specific genes involved in stress tolerance and several metabolic defence mechanisms (Rakwal and Komatsu, 2000). The third enzyme involved in hormone biosynthesis of ethylene was the S-adenosyl-methionine (SAM) synthetase which is described in amino acid metabolism (see section IV.3).

IV.6 Proteolysis and protein folding

Leaf proteins, especially RuBisCO, are degraded and become a major endogenous N source. The N remobilised during protein degradation in the oldest leaves can be translocated to young leaves (Fischer and Feller, 1994). In our study, seven proteases were identified at different phases (Figure V-6).

Different large-scale transcriptome analyses for gene expression of senescing leaves have identified ferritin as a SAG (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Pic *et al.*, 2002; Bhalerao *et al.*, 2003; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003; Gepstein *et al.*, 2003). Ferritins are iron-storage proteins involved in the regulation of free iron levels in the cells (Andrews *et al.*, 1992). In *Brassica napus*, it has been shown that expression of the *ferritin* gene increased significantly as senescence progressed, with a maximum level observed at the final senescence stage (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997). Interestingly, knock-out mutants of the *ferritin* gene show symptoms of accelerated natural senescence in *Arabidopsis* (Murgia *et al.*, 2007). Thus, the iron detoxification function of ferritin during leaf senescence of oilseed rape may have a protective role against increase of ROS.

In this experiment, HSP70, chaperonin 10 and disulfide isomerase were chaperones identified during N remobilisation (Figure V-6). These results suggest that they play a crucial role in preventing aggregation of the denatured proteins and facilitating refolding during N remobilisation (Wang *et al.*, 2004). In response to high-salinity or iron deficiency, HSP70 could play a significant role in protecting proteins from denaturation and degradation (Wang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). This protein is involved in the transportation of proteins across organelle membranes. Moreover, chaperonin 10 is a co-factor of chaperonin 60 (cpn60) which regulates cpn60-mediated protein folding (Koumoto *et al.*, 1996). Cpn60 plays a role in acclimating photosynthesis to heat stress, possibly by protecting RuBisCO activase from thermal denaturation (Salvucci, 2008). Moreover, it has been shown that many proteins that

are synthesised in the endoplasmic reticulum are folded with an accompanying formation of intramolecular disulfide bonds, aided by protein disulfide isomerase (Wadahama *et al.*, 2007).

FtsH protease is the most well characterised protease of the thylakoid membranes and is involved in turnover of photosynthetic protein complexes such as LHCII during senescence of *Arabidopsis* (Lindahl *et al.*, 2000; Zeliko *et al.*, 2005). Because these proteases were accumulated at the early phase of senescence (Figure V-6) and decreased at the end of senescence (Table V-IV), they might degrade PSII proteins during proteolysis (Schiltz *et al.*, 2004). Mitochondrial processing peptidase (MPP) was also induced early during senescence suggesting an important role of this peptidase in the first step of the leaf senescence process. MPP is an integral component of the respiratory cytochrome *bcl* complex (Dessi *et al.*, 2000). In addition, this plant complex contains the α - and β - forms of MPP (Braun and Schmitz, 1995). MPP cleaves some cytosolic protein precursors targeted to the mitochondrial matrix or inner membrane (Gakh *et al.*, 2002). In this study, the α -subunit was expressed after the β -subunit at the onset of leaf senescence (Figure V-6). These results suggest that MPP may have a function in leaf senescence by facilitating importation of cytosolic proteins in mitochondria to maintain mitochondrial functions for energy production.

Proteasome $\beta 1$ subunit (CCI7) was identified at an early and late stage in our study (Figure V-6). In eukaryotes, the 26S proteasome is a multicatalytic proteinase complex comprising the 20S core particle (two outer rings and two inner rings containing 7 α and 7 β subunits, respectively) that performed proteolysis and a 19S regulatory particle that recognises specific proteins that have been targeted for proteolysis by ubiquitination (Baumeister *et al.*, 1998). In the 20S core particle, proteasome $\beta 1$ subunit is responsible for the “Peptidyl Glutamyl Peptide Hydrolase” (PGPH) activity of the 26S proteasome that cleaves targeted proteins after an acidic amino acid. Thus, during the senescence process, it can be proposed that the $\beta 1$ subunit was induced to increase the PGPH activity of the 26S proteasome. Moreover, other studies have shown that in tobacco leaves, the $\beta 1$ proteasome subunit was induced earlier during elicitation of defence reactions (Etienne *et al.*, 2000, Suty *et al.*, 2003) and contributes to the regulation of ROS production by a negative regulation of NtrbohD, a tobacco NADPH oxidase (Lequeu *et al.*, 2005). According to these data, in our study the CCI7 could be induced so as to limit ROS production during the senescence process in *Brassica napus*.

Aspartic protease was shown to be present from phase 2 to the final phase (Figure V-6) suggesting that this protease had also an important role in proteolysis. In *Brassica napus*, a

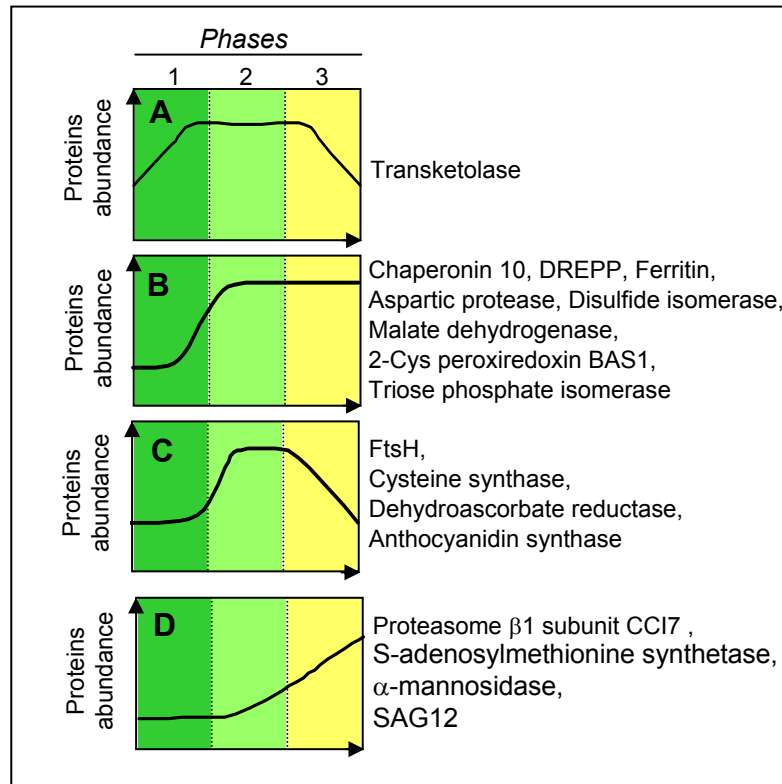


Figure V-7 : Clustering of expression profiles of proteins induced at least in two N treatments during the three phases of leaf senescence as defined in Figure V-6. Four profiles were defined on the basis of analyses of changes in protein abundances (percentage of spot volumes given in Tables V-3, V-4 and V-5) in three N treatments (HN, LN and 0N). Proteins were clustered as a function of their expression profiles and are annotated to the right of profiles. Phases 1, 2 and 3 were determined as indicated in Figure V-6.

cDNA clone identical to the aspartic protease gene from *B. oleracea* (gi|510879) is increased during leaf senescence (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997). The nucleotide sequence of this gene is identical to nucleotide sequence of aspartic protease in our study. During leaf senescence, its expression occurred earlier than BnSAG12-1 protease. *SAG12* is one of the senescence-associated genes identified in *Arabidopsis*, oilseed rape, and barley during leaf senescence (Guo *et al.*, 2004; Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007, Parrott *et al.*, 2007). In *Brassica napus*, *BnSAG12-1* and *BnSAG12-2* encode a senescence-specific papain-like Cys-protease. Moreover, studies of the *SAG12* promoter (Pro_{SAG12}) have shown it to be tightly regulated during leaf senescence (Gan and Amasino, 1995; Noh and Amasino, 1999). The expression of a SAG12-GFP fusion protein in transgenic *Arabidopsis* plants showed that SAG12 localises to Senescence-Associated Vacuoles (SAVs) (Otegui *et al.*, 2005). These SAVs had intense proteolytic activity and were present in the peripheral cytoplasm of mesophyll and guard cells in *Arabidopsis* and soybean. The fact that BnSAG12-1 was induced 17-fold (Figure V-5, Table V-V) reveals an important role of this protein in proteolysis during late stages of leaf senescence in oilseed rape.

IV.7 Integration of physiological and proteomics data reveals the chronology of proteomics events related to N remobilisation associated with leaf senescence

From the data given in Figure V-6, it appeared that several proteins are induced in two or three N treatments during the same phases of senescence (see proteins written in bold in Figure V-6). These proteins were mainly related to “Energy”, “Defence” and “Proteolysis and protein folding”. Therefore, it is proposed that proteins which were common at least in two N treatments were particularly involved in senescence processes. Based on this postulate, a clustering approach of the expression of these specific proteins during the three phases was used to establish four different expression profiles of protein (Figure V-7), suggesting diverse and complex patterns of regulation. The first profile, specific to transketolase (spot #7), is defined by induction in phase 1 and down-regulation in phase 3 (Figure V-7A). Chaperonin 10 (spot #15), DREPP (spots #30 and 31), ferritin (spots #26 and 27), aspartic protease (spot #25), malate dehydrogenase (spot #21), disulfide isomerase (spot #24), 2-cys peroxiredoxin BAS1 (spot #32) and triose phosphate isomerase (spot #20) belong to the second protein expression profile. These proteins were increased after the theoretical date of senescence and

remained constant until the end of phase 3 (Figure V-7B). Chloroplast FtSH (spot #12), cysteine synthase (spot #4), dehydroascorbate reductase (spot #18) and anthocyanidin synthase (spot #33) constituted the third profile. These proteins were up-regulated in phase 2 and their abundance declined in phase 3 (Figure V-7C). The last profile included SAM synthetase (spot #34), SAG12-1 (spots # 54 and 55), α -mannosidase (spot #35) and proteasome β 1 subunit CCI7 (spot #29) which were accumulated after the onset of foliar senescence and continued to increase until late stages of senescence (Figure V-7D). The presence of transketolase protein at an early stage of leaf senescence suggests an important role in defence mechanisms. During phase 2, several proteins associated with protein folding were identified, suggesting an important protection of certain proteins despite accumulation of proteases. In phase 2, DREPP, dehydroascorbate reductase and anthocyanidin synthase were also induced suggesting these proteins are involved in the stress response and detoxification in order to limit cell damages as much as possible in the early steps of senescence. Moreover, identification of proteins related to energy reveals that during leaf senescence, cellular metabolism was re-orientated to produce ATP.

Proteases have an important role in N remobilisation during leaf senescence, and their identification may help to understand the proteolysis mechanisms associated with N remobilisation, which is considered to be weak in leaves of oilseed rape. Our study reveals that four proteases are involved in this process after the theoretical date of senescence (phases 2 and 3, Figure V-7). Chloroplast FtsH was induced during phase 2 and declined thereafter. Considering the increase in N remobilisation (Figure V-1D) and the large decline in chlorophyll and protein content (Figure V-2A and B) during phase 2, the pattern of FtsH abundance is consistent with the idea that this protease is involved in the degradation of chloroplastic protein in leaf oilseed rape. On the other hand, the abundance of aspartic protease increased between phases 1 and 2 and was maintained to high levels until the last phase of senescence (Figure V-7B), suggesting that this protease is involved in proteolysis throughout the leaf senescence process. Proteasome β 1 subunit CCI7 and SAG12 were induced at the end of phase 2 and continued to increase during the later phase of senescence (Figure V-7). This observation indicates that CCI7 and particularly SAG12, which is highly induced (up to 17-fold; Figure V-5, Table V-V), are proteases more specifically involved in the proteolysis processes occurring at the ultimate stages of leaf senescence.

V. CONCLUDING REMARKS

In conclusion, this study presents the first proteome analysis of leaf senescence in oilseed rape. The results of 2-DE analysis were compared to the dynamics of N remobilisation (using ^{15}N tracing methodologies), and indicators of senescence status (chlorophyll level, protein content, *SAG12/Cab*) and revealed that the expression of specific proteins participating in the process of energy, detoxification, protein folding, and more particularly in proteolysis, play a pivotal role during leaf senescence. Although the function of these proteins has been well characterised, it is possible that the presence of certain proteins in senescing leaves is entirely unconnected with their principal function. For instance, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase also functions as a protein phosphotransferase/kinase and plays a role in DNA repair and membrane fusion (Sirover, 1999). Therefore, in order to improve N use efficiency in oilseed rape, the future challenge will be to confirm the role/function of these proteins in leaf senescence using transgenic approaches or by studying genotypes with contrasting N remobilisation efficiency. Furthermore, a combination of physiological, proteomic and transcriptomic approaches might help to complete the study of cellular events related to N-remobilisation leaf senescence processes.

Acknowledgements. The authors would like to thank Ms. Marie-Paule Henry for her valuable help in N analysis, and Anne-Françoise Ameline for her help in experimental work. The authors also wish to acknowledge Dr. Olivier Sordet (Laboratory of Molecular Pharmacology, NIH/NCI, Bethesda, MD, USA) for kind revision of this manuscript. This work was supported by a Ph. D. grant for Marie Desclos from INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, France) and the Conseil Régional de Basse-Normandie.

CHAPITRE VI

***Études physiologique et biochimique
des phases ultimes du développement
d'une feuille de colza : Effet d'une
privation en azote***

CHAPITRE VI

ÉTUDES PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DES PHASES ULTIMES DU DÉVELOPPEMENT D'UNE FEUILLE DE COLZA : EFFET D'UNE PRIVATION EN AZOTE

Title: Chronology of physiological, biochemical and molecular events involved in the N remobilisation and N recycling associated with leaf senescence in *Brassica napus*: impact of nitrate starvation (Article 4)

Marie DESCLOS¹, Philippe ETIENNE¹, Françoise LECAHEREC², Laurent LEPORT², Alain BOUCHEREAU², Sandrine REZE¹, Josette BONNEFOY¹, Alain OURRY¹, Jean-Christophe AVICE¹

¹INRA, UMR INRA/UCBN 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie (EVA) et nutriments N C S, IFR 146 ICORE, Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de CAEN Basse-Normandie, F-14032 Caen, France.

²INRA, UMR INRA/Agrocampus Rennes/Université de Rennes 1 118 Amélioration des Plantes et Biotechnologies (APBV), Campus de Beaulieu, avenue du Général Leclerc, 35042 Rennes cedex, France.

Article soumis à Plant and Cell Environment

Avant-propos

Déterminer les processus clés qui sont spécifiquement impliqués dans la remobilisation de l'azote (N) foliaire nécessite d'étudier les phases ultimes de développement d'une feuille sur des pas de temps plus fins que ceux retenus dans notre première étude protéomique (Chapitre V, pas de temps de 7 jours).

Les objectifs de cette dernière étude visaient donc :

- **à déterminer le plus finement possible la chronologie et la séquence d'événements physiologiques, biochimiques et moléculaires correspondant à des stades clés de la mobilisation du N foliaire** au cours de la sénescence séquentielle,
- **à vérifier l'impact d'une privation en N minéral**, qui accélère la sénescence foliaire chez des feuilles matures (Chapitres IV.I et V), **sur la chronologie et la séquence de ces événements.**

Pour cela, une étude des événements physiologiques, biochimiques et moléculaires associés à la remobilisation du N (N total, protéines, acides aminés, activité protéolytique totale, activité protéolytique spécifique détectée sur gel, expression du gène *BnD22* codant un inhibiteur de protéases (Chapitre IV), expression du gène *BnAAP1* codant un transporteur d'acides aminés) et à la sénescence foliaire (C total, chlorophylles, photosynthèse) a été menée sur un pas de temps de 4 jours. L'évolution de ces paramètres a été suivie de la maturité à l'abscission d'un rang foliaire chez des colzas soumis ou non à une privation en nitrate.

A l'exception des capacités photosynthétiques, cette étude montre clairement que **la chronologie des événements reste identique chez les feuilles de plantes bien alimentées en nitrate (témoin) ou privées en nitrate.** Comparativement aux plantes témoins, la quantité de N résiduel des feuilles mortes de plantes privées en N est significativement plus faible. **Ce faible contenu en N peut être expliquée par une sénescence prématurée liée à une protéolyse rapide, conduisant à une augmentation de la durée et de l'intensité des processus de recyclage du N.** De plus, les résultats de cette étude physiologique, biochimique et moléculaire ont été confrontés aux données issues de l'analyse protéomique (Chapitre V).

Abstract. Oilseed rape is a major worldwide crop plant characterised by a low Nitrogen Use Efficiency (NUE), which is essentially due to a weak remobilisation of N from senescent leaves. In order to understand the mechanisms involved in remobilisation of foliar N, our first goal was to establish the chronology of the physiological, biochemical and molecular events specifically associated with N remobilisation [contents of N compounds, proteolytic activities, gene expression of *BnAAP1* (encoding an amino acid transporter) and *BnD22* (encoding an inhibitor of protease)], and leaf senescence (photosynthesis activity, chlorophyll and C content). The second objective was to evaluate whether nitrate-starvation, known to accelerate leaf senescence, impacted on these events. Despite events appearing early in N-deprived plants, the event sequence during leaf senescence was quite similar under adequate N or N-starvation conditions, with the exception of an observed decrease in photosynthesis. Compared to control, the remobilisation of available N compounds was more rapid, the duration of processes related to N recycling was longer and the intensity of these events increased in N-deprived plants. This leads to a lower residual amount of N in fallen leaves of N-deprived plants than in the control, suggesting that one strategy to improve NUE could be to increase the period of N recycling.

I. INTRODUCTION

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is the most important crop in the European Union, with an average planting of 8 million ha in 2007 (data from FAOStat: <http://faostat.fao.org/>). The production of oilseed rape has increased 2-fold over the past decade, and will increase further in the future due to a massively growing demand for food needs and renewable fuels. The increase in yield of oilseed rape during the last decades is not only due to breeding of high-potential cultivars or sophisticated production engineering but also to higher fertiliser inputs. Oilseed rape has relatively high demand for nitrogen (N), but only 50% of the fertiliser N is recovered by the crop in the seeds (Schjoerring *et al.*, 1995; Dreccer *et al.*, 2000). This poor N utilisation in tissues results in a low N-harvest index mainly due to low seed yield potential and a small grain harvest index, as well as the loss of N-rich leaves as they age and detach (Hocking *et al.*, 1997). The high N level in fallen leaves is due to the weak N remobilisation observed in leaves that appear during the vegetative phase of development (rosette stage) when the process of sequential leaf senescence occurs. Consequently, pollution of the

environment by N-leaching has emerged as a serious concern in agriculture. To maintain or increase the crop yield while respecting the environment would require enhancement of N use efficiency (NUE) during vegetative growth through the improvement of N uptake, N assimilation and N remobilisation (Lam *et al.*, 1996, Gallais and Hirel, 2004; Good *et al.*, 2007; Hirel *et al.*, 2007). Leaf senescence has attracted attention due to the importance of efficient nutrient use so that high yields can be obtained.

Leaf senescence is a programmed process representing the final phase of leaf development. This process is a succession of many physiological and molecular events that arise according a three-stage process (Noodén *et al.*, 1997), comprising an initiation phase (sink/source transition), a degenerative phase (disassembly of cellular components) and a terminal phase (loss of cell integrity and cell death) (Yoshida, 2003; Zimmermann and Zentgraf, 2005). Generally, senescence starts in distant parts of the leaves, and the cells near the vascular bundle are the last ones to senesce. In cells, senescence-related changes are first detected in the chloroplast, whereas the mitochondria and nucleus remain intact until advanced stages of senescence (Smart, 1994). In addition to chloroplast disintegration, a decline in photosynthesis, degradation of proteins and nucleic acids and a decrease in chlorophyll levels, senescence processes also include mobilisation of nutrients and organic resources from senescing leaves to young plant organs (Thomas and Stoddart, 1980; Gan and Amasino, 1995; Buchanan-Wollaston, 1997). This process consists of an ordered sequence of physiological, biochemical, and ultrastructural changes. During leaf senescence, it is possible to distinguish two phases in the remobilisation of N compounds. The first phase corresponds to the remobilisation of available N reserves (nitrate, amino acids, soluble proteins) without any great perturbations of cellular metabolism. The second phase, defined as N recycling, is associated with mobilisation of structural N compounds such as proteins attached to membranes and leads on to modifying the integrity of cellular organelles.

Few studies have investigated the macroscopic and biochemical events during leaf senescence. One of the few notable examples is the dismantling of chloroplasts in white clover, whose ultrastructural changes have been followed using transmission electron microscopy (Wilson *et al.*, 2002). Therefore, a deeper understanding of developmental and physiological processes of leaf senescence can be derived from molecular studies in *Brassica napus* (Buchanan-Wollaston *et al.*, 1997), in *Arabidopsis thaliana* (Guo *et al.*, 2004) or in *Triticum aestivum* (Gregersen and Holm, 2007). These studies revealed that senescence is controlled by nuclear genes (Smart *et al.*, 1995; Noodén *et al.*, 1997), and demonstrated that expression of the majority of genes was down-regulated, whereas the expression of other

genes was up-regulated. Two categories of leaf senescence responsive genes have been distinguished by Gan and Amasino (1997): *SDG* for *Senescence-Down Gene* and *SAG* for *Senescence-Associated Gene*. Several *SAGs* with putative or known functions were suggested to be involved with changes in senescing cells. For instance, these genes encode protease, ribonuclease, phospholipase D, catalase, chitinase, and ACC oxidase (Buchanan-Wollaston, 1997). Expression of the *BnAAP1* gene which encodes amino acid transporters is also known to increase in senescing leaves (Tilsner *et al.*, 2005). The up-regulation of the *BnAAP1* transcript level coincided with a large decrease in amino acid content in senescent leaves of oilseed rape, suggesting that export of amino acids is efficient during foliar senescence (Tilsner *et al.*, 2005). In contrast, the abundance of transcripts encoding proteins involved in photosynthesis decreased during senescence (Hensel *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1993; Humbeck *et al.*, 1996). Recently, Etienne *et al.* (2007) and Desclos *et al.* (2008) have shown that *BnD22* (*Brassica napus* Drought 22 kDa protein), a protease inhibitor of Kunitz type, corresponding with a senescence down-regulated senescence gene (*SDGs*). This protein could be involved in the regulation of proteolytic processes associated with N remobilisation and recycling during leaf senescence of oilseed rape (Etienne *et al.*, 2007; Desclos *et al.*, 2008).

Leaf senescence is influenced by various environmental stresses including abiotic and biotic factors. The environmental factors include drought (Borell *et al.*, 2000), extreme temperature (Huang *et al.*, 2001), and nutrient limitation such as low mineral N availability (Gombert *et al.*, 2006). Leaf senescence can occur prematurely under these unfavourable environmental conditions. For instance, N deficiency accelerates senescence in older leaves, enabling these mobile nutrients to be recycled towards the developing tissues (Tilsner *et al.*, 2005; Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007). Common processes participating in developmental and stress-induced senescence include dismantling of cellular constituents, breakdown of the major macromolecules, proteins, nucleic acids, and transport of recycled metabolites from senescent leaves to growing tissues. Recently, the chronology of leaf senescence events has been studied in pea leaf exposed to mild water deficit (Pic *et al.*, 2002). The authors concluded that, although water accelerated initiation of leaf senescence, the sequence of the events was conserved across various leaf positions and experimental conditions. In oilseed rape, there is no clear information about the chronology of changes occurring during the transition leading to leaf senescence. Furthermore, better characterisation of the N remobilisation and recycling events during senescence might enable identification of key processes for the improvement of N use efficiency in oilseed rape.

Therefore, the goals of this study were (i) to characterise the sequence of physiological, biochemical and molecular events during natural leaf senescence and (ii) to determinate if this sequence of events was similar in N starvation-induced senescence. The net photosynthesis rate, level of chlorophyll, the content of C, N, proteins and amino-acids, and proteolytic activities were analysed throughout leaf senescence in mature leaves of oilseed rape subjected or not to nitrate starvation. In addition, expression of genes specifically related to the N remobilisation processes such as *BnAAP1* (encoding an amino acid transporter), *SAG12* (encoding a specific-cysteine protease) or *BnD22* (encoding a trypsin inhibitor of Kunitz type) were studied during leaf senescence. Because previous studies on oilseed rape have demonstrated that changes of *SAG12* and *Cab* gene expressions constituted an accurate and sensible indicator of leaf senescence (Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007), the progression of leaf senescence in this study was determined using this molecular indicator. Our study reveals that the duration and intensity of N remobilisation is affected by nitrate starvation, but the chronology of events associated with leaf senescence is similar in adequate and deprived mineral N conditions.

II. MATERIALS AND METHODS

II.1 Plant material

Seeds of *Brassica napus* (cv Capitol) were surface-sterilised by exposure to 80% ethanol for 30 s followed by 20% sodium hypochlorite for 20 min. After 10 washes in demineralised water, seeds were germinated on foam rubber (Oasis growing pinpot, Agrimedia). Just after emergence of the third leaf, seedlings were transplanted into 1 L pots filled with perlite/vermiculite (1/1; 1 plant per pot) and were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night) and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with High Pressure Sodium Lamps (Philips, MASTER GreenPower T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 280 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the top of the canopy. During 85 days, plants were watered every 2 d with 100 mL of nutrient solution containing 3 mM KNO_3 , 3 mM CaCl_2 , 1 mM K_2SO_4 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.4 mM KH_2PO_4 , 0.15 mM K_2HPO_4 , 0.2 mM Fe-Na-EDTA, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.7 μM CuSO_4 and 0.1 μM CoCl_2 .

II.2 Application of mineral N starvation and tissue sampling

After 85 days of growth corresponding to the rosette stage, plants were split into two sets for the application of two contrasting levels of mineral N nutrition: plants were supplied every 2 d with nutrient solution without KNO₃ (N starvation) or with 3 mM of KNO₃ (control plants). The two mineral N treatments were applied over a 28 day period. Time courses of the experiment were expressed in days after the beginning of treatment (Day 0) and in thermal time calculated by daily integration of temperature minus a base temperature of 5°C.

Plants were sampled in triplicate after 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28 days. For all treatments, each leaf rank was separated based on the date of emergence from the oldest to youngest. The determination of the relative chlorophyll concentration using the non-destructive SPAD (Soil Plant Analysis Development) chlorophyll meter (Minolta, SPAD-502 model, Tokyo, Japan) was performed on laminae. Thereafter, leaves were weighed and the laminae was separated from petiole, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

II.3 Determination of the total amount of N and C

An aliquot of each laminae was freeze-dried, weighed for dry matter determination and ground to a fine powder. The total amounts of N and C (Total N, Total C) were quantified with a continuous flow isotope mass spectrometer (IsoPrime, GV Instrument, Manchester, UK) linked to an analyser (EA 3000, EuroVector, Milan, Italy). Each N and C amount was an average of three replicates \pm SE.

II.4 Net photosynthetic rate

The net photosynthetic rate was measured using a LI-6400 (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA) at 23°C on leaves under their ambient CO₂ atmospheric concentrations (approximately 400 ppm) at 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ photosynthetic photon flux (PPF) provided by a LED light. Temperature and PPF parameters were validated as the optimal values for photosynthesis analysis in leaves of oilseed rape. Measurements were determined at 2, 5, 7, 11, 13, 18 and 22 days of treatment. In each treatment, the net photosynthetic rates were an average of three replicates \pm SE comprised of leaves from three different plants.

II.5 Amino acids analysis

An aliquot of each leaf was freeze-dried, weighed for dry matter determination and ground to a fine powder. Methanol-chloroform-water-based extractions were made on 15 mg of the dry powder using the following procedure: the powder was suspended in 400 mL of a 100 mM DL-3-aminobutyric acid solution and 200 μ M adonitol in methanol, followed by 15 min of agitation at room temperature. Two hundred microlitres of chloroform were then added, followed by a 5-min agitation step. Finally, 400 mL of water was added, and samples were then vortexed vigorously to induce phase separation and centrifuged at 13,000g for 5 min. The polar extract containing in the supernatant was transferred to a clean vial and dried over-night under vacuum. Dry residues were resuspended in 5 μ L of ultra-pure water and were used for the derivatisation using the AccQ-Tag Ultra derivitisation kit (Waters corp., Milford, USA). Derivatised amino acids were analysed using an Acquity UPLC system (Waters). One microlitre of the reaction mixture was injected onto an Acquity UPLC BEH C18 1.7- μ m 2.1- \times 100-mm column heated at 55°C. Amino acids were eluted with a mixture of 10-fold diluted AccQ-Tag Eluent A (Waters) and pure acetonitrile at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹ according to the following gradient: initial, 99.9% A; 0.54 min, 99.9% A; 6.50 min, 90.9% A, curve 7; 8.50 min, 78.8% A, curve 6; 8.90 min, 40.4% A, curve 6; 9.50 min, 40.4% A, curve 6; 9.60 min, 99.9% A, curve 6; and 10.10 min, 99.9% A. Derivatised amino acids were detected at 260 nm using a photo diode array detector. Amino acids were characterised by co-chromatography of individual standards and quantified by comparison of individual external calibration curves.

II.6 Extraction and quantification of soluble proteins

Frozen leaf samples (450 mg fresh weight) from each triplicate were ground in a mortar with liquid nitrogen and extracted in citrate Na-phosphate buffer (20 mM citrate and 160 mM Na₂HPO₄, pH 6.8) in the presence of 150 mg PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone). The homogenate was centrifuged at 12 000 g at 4°C for 1h. The resulting supernatant was used for determination of total soluble proteins by protein-dye staining (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

II.7 Protease activity assay

The assessment of total protease activity was carried out according to the method of Holwerda and Rogers (1992). In brief, 50 μL protein extract was mixed with 300 μL of sodium acetate buffer (100 mM, pH 5.0) containing 50 μL azocasein (0.6%, w/v, Sigma) supplemented with 100 μL of Triton X-100 (0.1%, v/v), and the mixture was incubated at 30°C for 3h on an orbital shaker. The reaction was stopped by adding 200 μL 10% TCA. After incubation at 4°C for 30 min, the mixture was centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C. The absorbance of the supernatant was determined at 366 nm (Spectrophotometer SmartSpec Plus, Bio-Rad) against controls that had been prepared by the method described above, with the exception that TCA was added before the reaction. One unit of protease activity was defined as the enzyme amount that gives an absorbance of 0.01.

II.8 Detection of protease activities by zymogram on gelatin-polyacrylamide gels

Protease activity stain was performed as reported by Dominguez and Cejudo (1995). Protein samples (75 μg) were prepared in 2 \times Laemmli lysis buffer without β -mercaptoethanol. SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) using a 5.5% polyacrylamide (w/v) stacking gel and a 10% polyacrylamide (w/v) resolving gel copolymerised with 0.1% (w/v) gelatin. After SDS-PAGE, the gels were pre-immersed in a 25% isopropanol (v/v) aqueous solution at room temperature for 30 min, and then transferred at 30°C overnight to sodium acetate buffer (100 mM; pH 5.0) containing 10 mM DTT. After incubation, the gels were stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 50% methanol and 10% acetic acid for 1h, then finally destained with 20% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid. Protease activity was visible as clear bands against a dark-blue background.

II.9 RNA extraction

Total RNA was extracted from 250 mg of laminae 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 μL extraction buffer (0.1 M Tris, 0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS (w/v), pH 8) and 750 μL of hot phenol (80°C, pH 4). This mixture was vortexed for 30 s and

after addition of 750 µL of chloroform/isoamylalcohol (24:1), the homogenate was centrifuged at 15 000 g (5 min, 4°C). The supernatant was transferred into a 4 M LiCl solution (w/v) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation (15 000 g, 30 min, 4°C), the pellet was suspended in 250 µL of sterile water. Fifty microlitres of 3 M sodium acetate (pH 5.6) and 1 mL of 96% ethanol were added to precipitate the total RNA for 1 h at -80°C. After centrifugation (15 000 g, 20 min, 4°C), the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol, then centrifuged at 15 000 g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was dried for 5 min at room temperature and re-suspended in sterile water containing 0.1% SDS and 20 mM EDTA. Quantification of total RNA was performed by spectrophotometer at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT) and PCR analyses.

II.10 RT and Q-PCR conditions for *BnAAP1* and *BnD22* genes

For RT, 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an "iScript cDNA synthesis kit" using the manufacturer's protocol (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France). In order to target *BnD22* (encoding *Brassica napus* drought 22 kDa protein, Accession no. X65637) and *BnAAP1* (encoding *Brassica napus* amino acid permease, Accession no. AJ565847) cDNA, specific primers were designed in the non conserved region. Thus, specific primers selected for the Q-PCR analysis were: *BnD22* forward primer: 5'-CCGGTTAGCTTCGGATATGA-3' and reverse primer: 5'-AGCTATTTGGGGCCGTACTT-3' and *BnAAP1* forward primer: 5'-ATATGCTTACGCCACGGTTC-3' and reverse primer: 5'-TCCAAATGCAGCATATCCAA-3'. For Q-PCR analysis, the *EF1-α* gene (Accession no. DQ312264), encoding a *Brassica napus* Elongation Factor, was used as an internal control gene (Nicot *et al.*, 2005) and was amplified using the following specific primer: *EF1-α* forward primer: 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA-3' and reverse primer 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC-3'. The *EF1-α* gene was selected because its expression during senescence and under biotic and abiotic stress conditions (Nicot *et al.*, 2005) remained constant, in contrast to ribosomal 25S RNA which is classically used as reference gene but is preferentially degraded during the senescence process (Masclaux *et al.*, 2000). Q-PCR reactions were performed with 4 µL of 200× diluted cDNA, 500 nM of primers, and 1× SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) in a ChromoFour System (Bio-Rad). For each pair of primers, threshold values and PCR efficiency were determined using a cDNA preparation

diluted more than 10-fold. For each pair 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 of the Q-PCR. After sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France) and Blastn analysis (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) to check the correct amplification of the target cDNA, the *BnD22* and *BnAAP1* amplicons (199 bp and 154 bp of length, respectively) were 100% homologous to their corresponding cDNA sequence. For each sample, the subsequent Q-PCR reactions were carried-out in triplicate and the relative expression of the *BnD22* or *BnAAP1* genes in each sample was referred to a control sample at day 0 and was determined with the delta-delta Ct method using the following equation:

$$\text{Relative expression} = 2^{-[\Delta\text{Ct}_{\text{sample}} - \Delta\text{Ct}_{\text{control}}]}$$

where Ct refers to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification, and

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{target gene}} - \text{Ct}_{\text{EF1-}\alpha}$$

Using this analysis method, relative expression of the target genes (*BnD22* or *BnAAP1*) in the control sample was equal to one (2^0), by definition (Livak and Schmittgen, 2001).

II.11 RT-PCR analysis for *Cab* and *SAG12* genes

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). PCRs were obtained using specific primers for the *Brassica napus CabLHB1B2* gene (encoding Chlorophyll a/b binding protein, Accession no. DQ355993) (forward primer: 5'-GGCAGCCCATGGTACGGATC-3' and reverse primer 5'-CCTCCITCGCTGAAGATCTGT-3'), primers for the *Brassica napus EF1- α* gene (Accession no. DQ312264) (forward primer: 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA and reverse primer 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC), and primers shared by the *SAG12-1* (encoding senescence specific-cysteine protease, Accession no. AF089848) and *SAG12-2* (AF089849) genes of *Brassica napus* (forward primer: 5'-GGCAGTGGCACACCCAMCCGGTTAG-3' and reverse primer: 5'-AGAAGCMTTCATGGCAAGACCAC-3'). PCRs were performed with Qbiogene Taq polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Courtabeuf, France). Amplification program was: 1 cycle at 95°C for 5 min, 22 (*Cab*), 28 (*SAG12*) or 25 (*EF1- α*) cycles including a denaturing step at 95°C for 45

sec, a primer's hybridisation step at 58°C for 45 s and an amplification step at 72°C for 1 min. Each PCR reaction was ended with one cycle at 72°C for 10 min. Four single 267, 161 and 164 bp cDNAs were amplified for *SAG12*, *Cab* and *EF1- α* genes, respectively, and the identity of each fragment was checked by sequencing (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France). For all RT-PCR reactions, the *EF1- α* gene was used as cDNA synthesis and amplification control. RT-PCR products were separated by electrophoresis through a 1% agarose gel. The steady-state level of transcripts was estimated by measurement of signal intensities using Biocapt software (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France) after normalisation with the *EF1- α* gene. From each sample, three RT reactions were made and followed by three independent PCRs and the corresponding data did not present significant variation of the steady state transcript level, indicating that the RT-PCR method was reproducible. The data related to *SAG12* and *Cab* transcript levels were expressed as % of the maximum of both transcripts observed per leaf rank (the maximum level of transcripts was observed in leaf #13 of control plants at day 20 for *SAG12* and in leaf #13 at day 0 for *Cab*).

II.12 Determination of temporal and spatial progression of leaf senescence using *SAG12/Cab* gene expression

As recently demonstrated by Gombert *et al.* (2006) in oilseed rape, the kinetics of gene expression of *SAG12* (encoding a cysteine protease) and *Cab* (encoding a chlorophyll a/b binding protein) constitute an accurate indicator for following temporal senescence (date of entry into senescence for a given leaf rank) and spatial senescence (last senescing leaf rank for a given plant at a given stage of development).

To determine the theoretical date of senescence for a given leaf rank, the kinetic expression of *SAG12* (up-regulated during senescence process) and *Cab* (down-regulated during senescence) was monitored by semi-quantitative RT-PCR. The intersection point corresponding to the concomitant up-regulation of *SAG12* and down-regulation of *Cab* was considered as the date of the onset of foliar senescence (see Gombert *et al.*, 2006 for details).

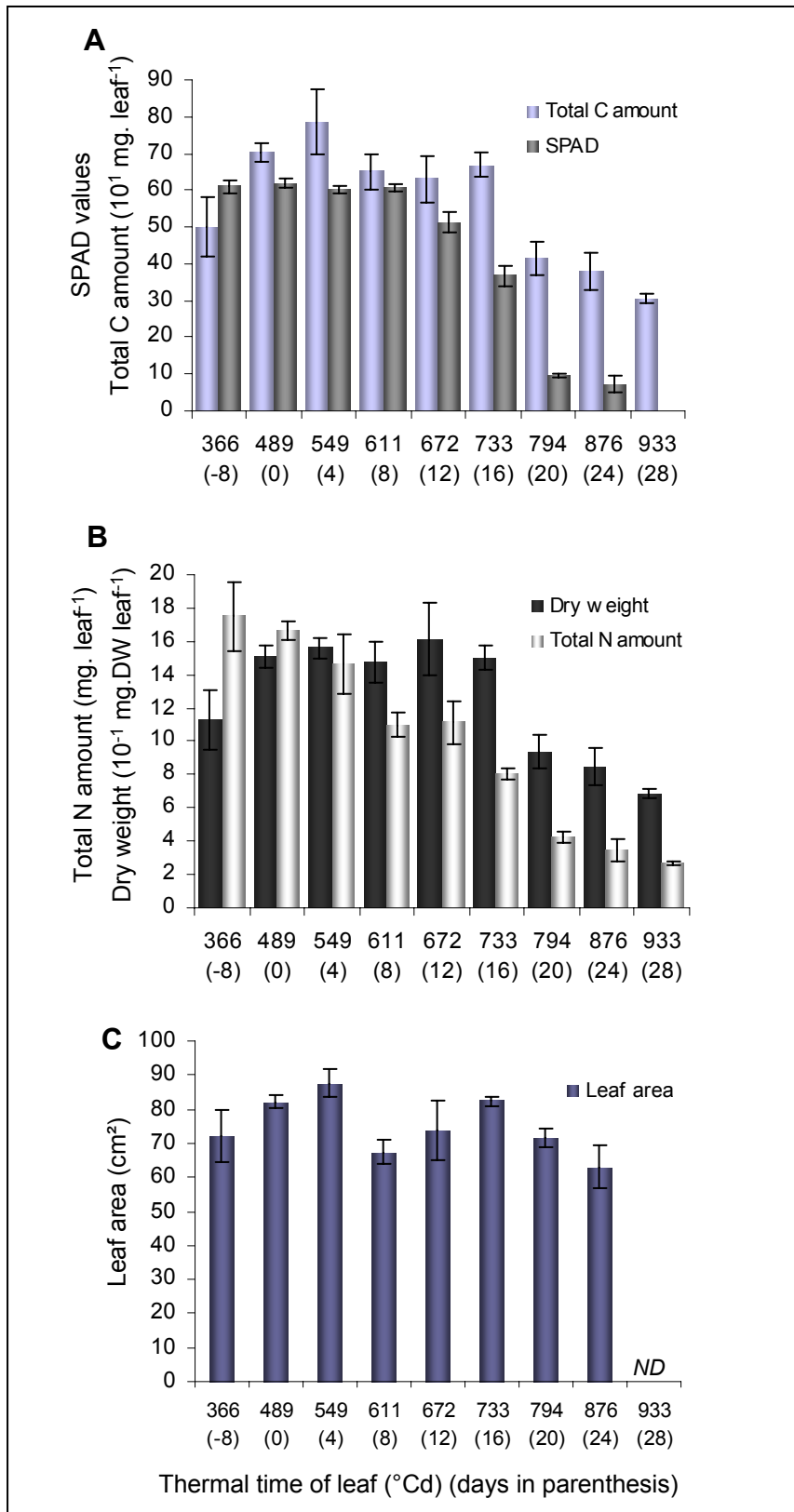


Figure VI-1 : Changes in SPAD values, Total C (A), N amounts and Dry weight (B), and Leaf area value (C) in laminae #13 of *Brassica napus* from 366°C.d to 933°C.d. Thermal time was expressed from the day of emergence of leaf #13. Leaf abscission appeared at 933°C.d. ND: non determined. Vertical bars indicate \pm standard error of the mean ($n = 3$).

II.13 Statistics

Results are presented as mean values for the three plant material (triplicate) batches with standard errors. The effects of mineral N starvation were assessed by analysis of variance and mean separation was performed using a Turkey test. Statistical significance was postulated at $P \leq 0.05$.

III. RESULTS

III.1 Determination of a mature leaf for studying the chronology of physiological, biochemical and molecular events during senescence

In this study, the progression of leaf senescence was studied in mature leaves that became senescent during the experiment. In order to define which leaf was “mature” at day 0, the SPAD values, total C and N, dry weight and leaf area were followed in different leaf ranks in control plants throughout the experiment (data not shown). These data revealed that leaf #13 could be considered as mature at day 0 (Figure VI-1). Indeed, total C and dry weight of leaf #13 reached maximal values at day 0 and decreased at day 16 (Figure VI-1 A and B). SPAD values and total N were optimal at day -8 and decreased from day 12 (Figure VI-1 A and B). Leaf area values remained constant throughout the experiment (Figure VI-1C). Maximal values of measured parameters allow confirm that leaf #13 was a full expanded leaf and have attained its maturity at day 0.

In this study, progression of leaf senescence was studied on leaf #13 in plants under conditions of natural leaf senescence (control plants) and N starvation-induced senescence. Leaf #13 of N-deprived plants senesced early and its lifespan was reduced in comparison to control plants. The age of leaf #13 was expressed in thermal time (base 5°C) and the time course of experimentation was expressed in days after the beginning of N treatment (Day 0).

III.2 Changes in chlorophyll level and net photosynthetic rates

In both N treatments, chlorophyll levels of laminae #13 showed a typical decrease during leaf senescence. In control plants the chlorophyll level significantly decreased from day 12 (-

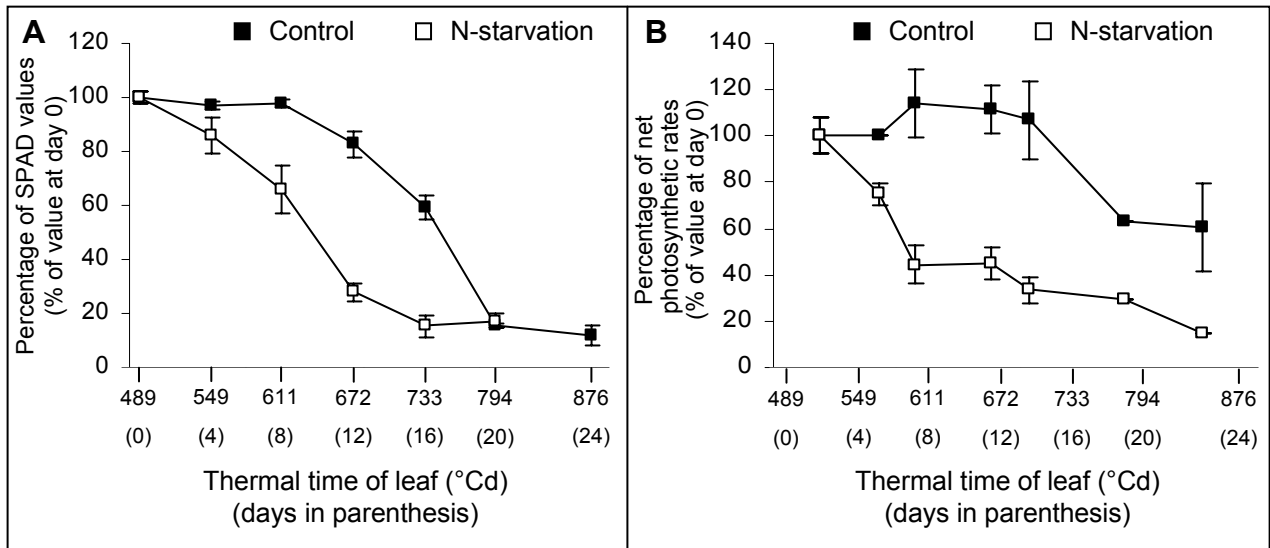


Figure VI-2 : Changes in SPAD values (A) and net photosynthetic rates in laminae #13 of *Brassica napus* supplied with 3 mM nitrate (Control ■) or without nitrate (N-starvation □). Values of SPAD and net photosynthetic rate are given as a percentage of the initial values observed at day 0. At day 0, values of 100% correspond to 61.9 for SPAD and to 13.2 $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for net photosynthesis. Vertical bars indicate \pm standard error of the mean ($n = 3$).

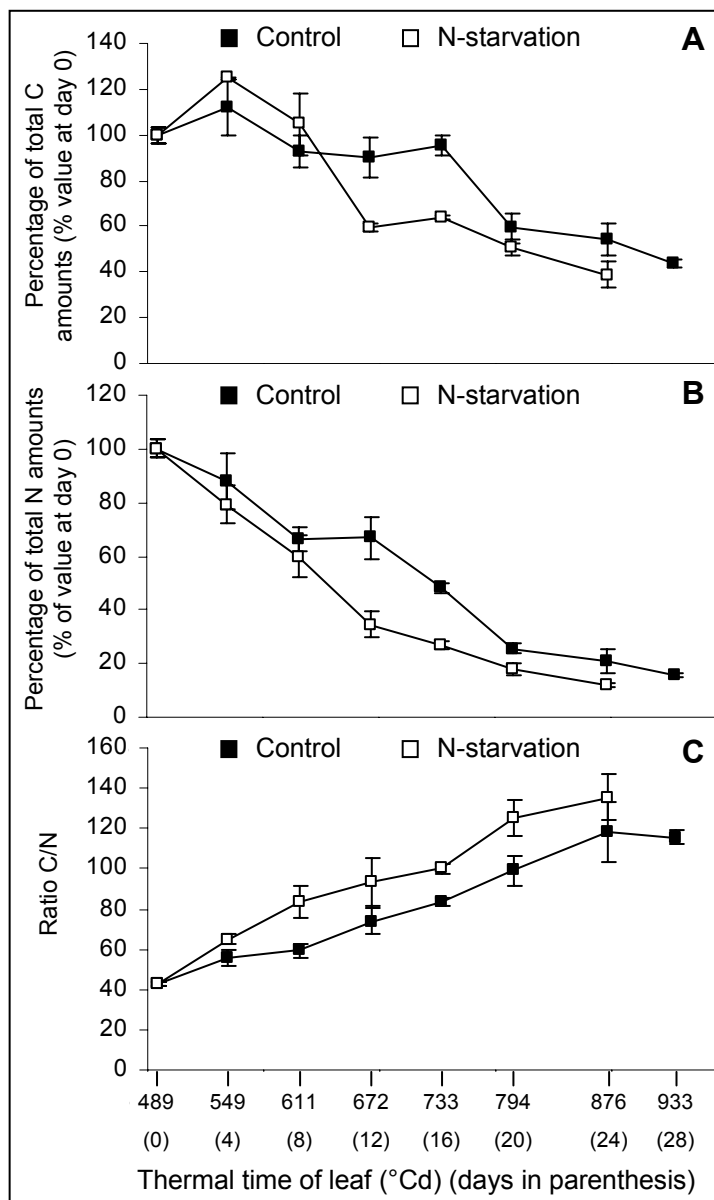


Figure VI-3 : Changes in Total C (A), N contents (B) and Ratio C/N (C) in laminae #13 of *Brassica napus* supplied with 3 mM nitrate (Control ■) or without nitrate (N-starvation □). Treatments were applied until leaf abscission i.e. at 933°C.d (28 d) for control plants and at 876°C.d (24 d) for N-deprived plants. Values of total C and N are given as a percentage of initial amounts observed at day 0. At day 0, values of 100% correspond to 701.7 $\text{mg}\cdot\text{laminae}^{-1}$ for total C and to 16.6 $\text{mg}\cdot\text{laminae}^{-1}$ for total N. Details otherwise as for Figure VI-2.

22%) whereas in N-deprived plants it declined progressively from day 0 (Figure VI-2A). The lowest chlorophyll content was at day 20 in control plants and at day 16 in N-deprived plants.

Net photosynthetic rates also declined earlier and more rapidly in N-deprived plants than control plants as leaves aged (Figure VI-2B). The net photosynthetic rate was reduced by 30% at day 13 in control plants whereas in N-deprived plants it was decreased by 55% between day 0 and day 7.

III.3 Changes in total C and N

In this study, leaf #13 had fallen by day 24 and day 28 in control and N-deprived plants, respectively (Figure VI-2A). In control plants, the percentage of the total C remained constant from day 0 to day 13, and then decreased by 60% until the leaves fell down (Figure VI-3A). In N-deprived plants, the percentage of total C increased by 25% between day 0 and day 4, and decreased by 45% between day 8 and day 12, and by 12% between day 16 and day 24 (Figure VI-3A).

The total N decreased with rosette ageing in a similar way for both treatments (Figure VI-3B). Nevertheless, in N-deprived plants, total N slowly decreased throughout the experiment whereas in control plants, total N decreased in two phases. The first decrease appeared between day 0 and day 8, and the second decline was from day 12 to the end of leaf life. The N residual N in fallen leaves of N-deprived plants was significantly lower ($12.1\% \pm 0.9$) than the residual N in fallen leaves of control plants ($15.9\% \pm 0.7$). These data suggest a better N recycling during N starvation-induced senescence compared to natural senescence.

The ratio C/N was increased in both treatments throughout the experiment (Figure VI-3C). Therefore, N-deprived plants had significantly higher C/N ratios at days 8, 16 and 20 than control plants. In both treatments, changes in total N during leaf senescence could be explained by changes in the N-remobilisable pools which are comprised of proteins and amino acids. Because nitrate represented only 1% of N total (data not shown), it was not included in these N-remobilisable pools.

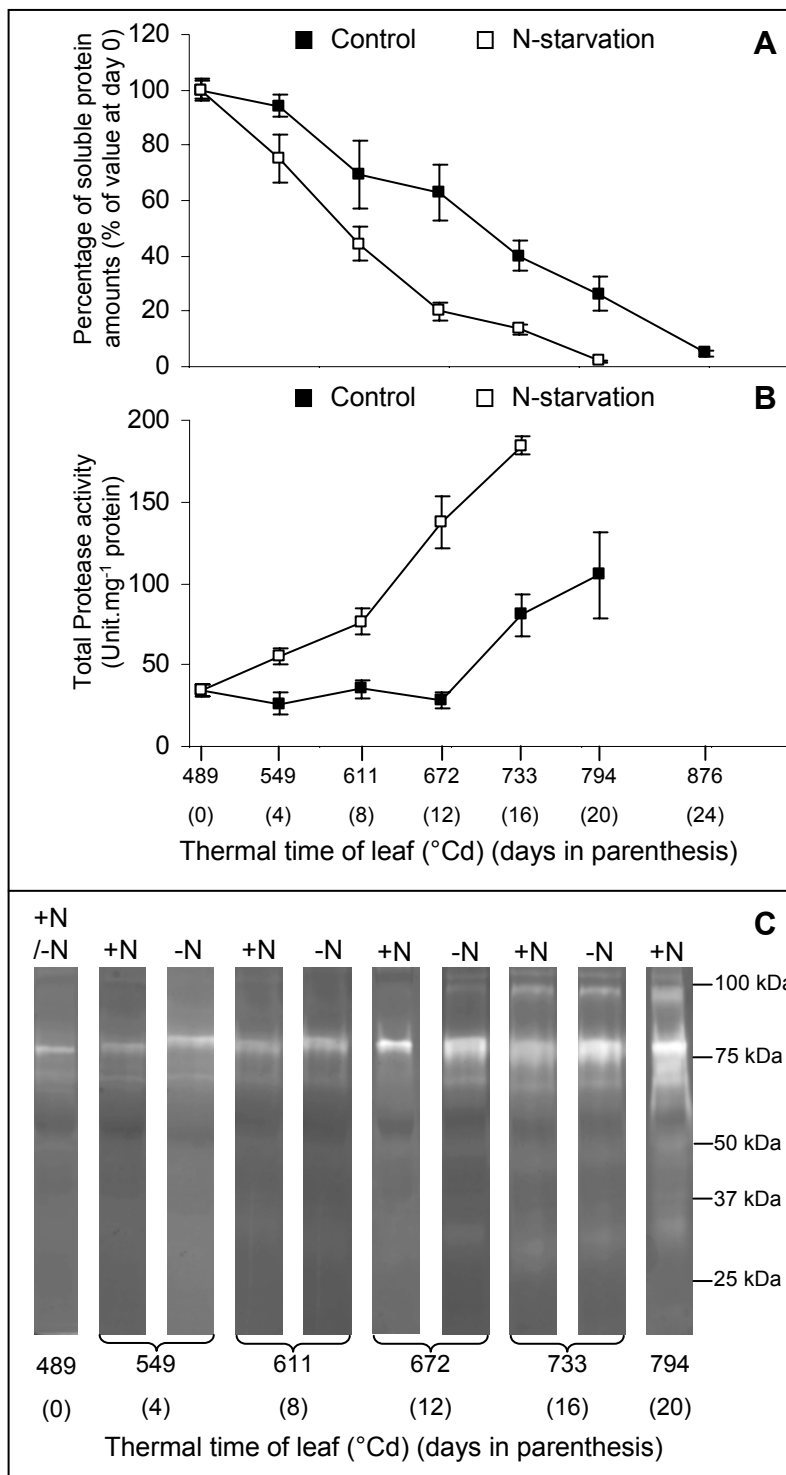
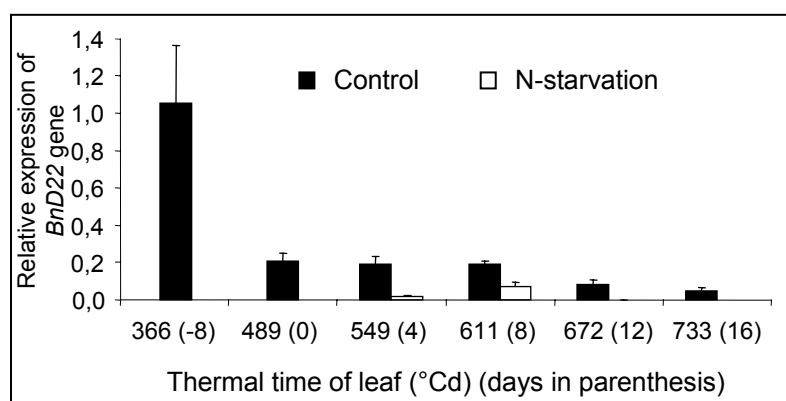


Figure VI-4 : Changes in soluble protein amounts (A), in total protease activities at pH 5 (B), and in zymograms of protease activities detected after SDS-PAGE in presence of gelatine (C) in laminae #13 of *Brassica napus* supplied with 3 mM of nitrate (Control ■) or without nitrate (N-starvation □). Values of soluble proteins amounts are given as a percentage of initial amounts observed at day 0. At day 0, value of 100% corresponds to 54.1 mg.laminae⁻¹ for soluble protein contents (A). Vertical bars indicate \pm standard error of the mean ($n = 3$).



III.4 Changes in the amount of soluble proteins, protease activities and gene expression of *BnD22*

The amount of soluble protein showed a typical decline during leaf senescence in both treatments, but this decline occurred earlier in N-deprived plants than control plants (Figure VI-4A). In control plants, soluble protein amounts decreased by 30% between day 0 and day 8, and by 50% between day 12 and day 24. The amount of soluble protein in N-deprived plants was reduced by 80% between day 0 and day 12 and again by 18% between day 12 and day 16.

Because proteins were degraded during leaf senescence, we measured protease activities. In control plants, protease activity increased from day 12 (Figure VI-4B). In N-deprived plants, protease activity increased progressively throughout the experiment. At day 4, proteolytic activities in N-deprived plants were 2-fold higher when compared to control plants. Protease activity was induced 3-fold in control plants between day 12 and day 20 whereas it was induced 5-fold in N-deprived plants between day 12 and day 16 (Figure VI-4B).

Zymograms were also performed in order to identify proteolytic activities in laminae #13 (Figure VI-4C). In both treatments, similar protease activities were detected at the same molecular weight. At day 0, a single band of protease activity was detected at 76 kDa suggesting the presence of a constitutive protease (Figure VI-4C). This activity was increased in both treatments throughout the experiment. Moreover, this activity was stronger in N-deprived plants than control plants. Two other bands of protease activity were detected as leaf senescence progressed at 99 kDa and 101 kDa (Figure VI-4C). In control plants, both activities appeared at day 16 whereas in N-deprived plants these proteases were detected at day 12.

Because the *BnD22* gene, which encodes a protease inhibitor, has been identified in young leaves (Desclos *et al.*, 2008), transcript levels during leaf senescence were analysed by Q-PCR from 8 days before the beginning of treatment (Day 0) (Figure VI-5). The *BnD22* transcript level decreased 5-fold between day -8 and day 0 (Figure VI-5). In control plants, *BnD22* expression remained constant from day 0 to day 8, and then decreased by 50% at day 12. The *BnD22* transcript level declined at day 0 in N-deprived plants (Figure VI-5).

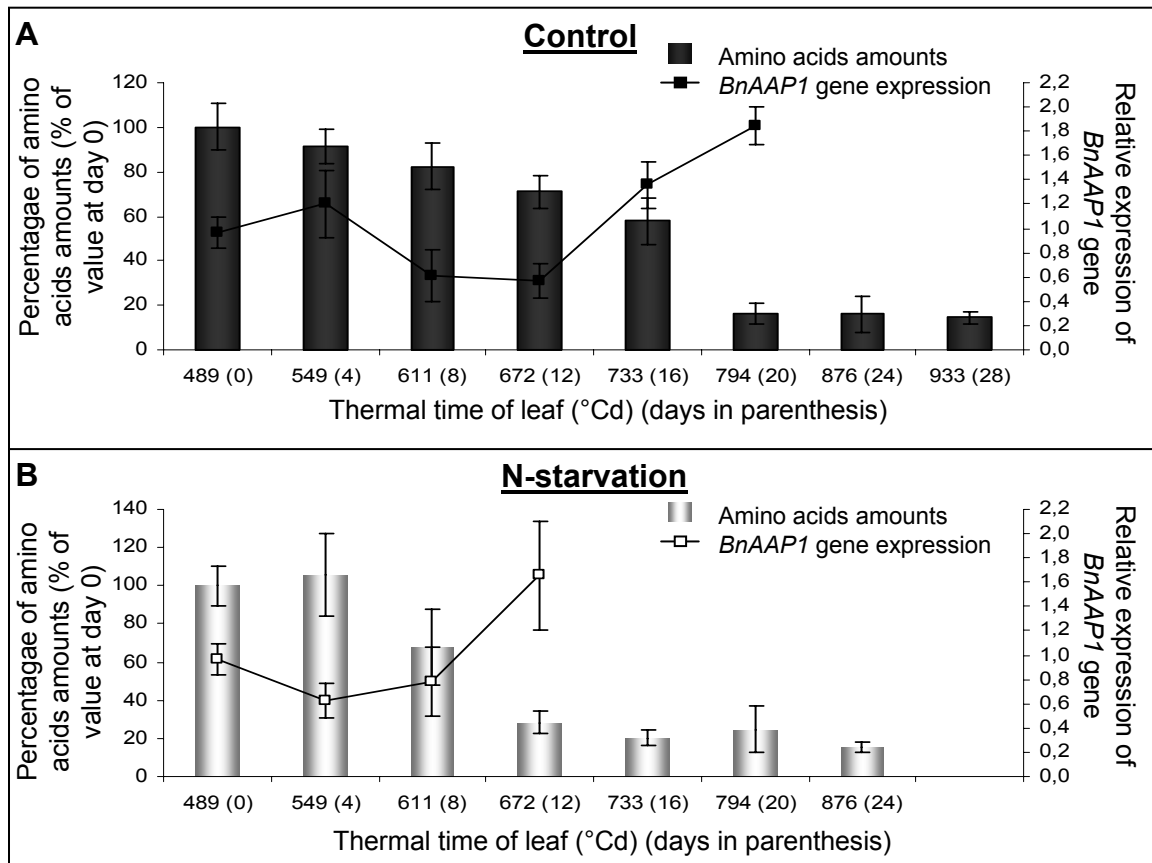


Figure VI-6 : Changes in total amino acids and relative expression of *BnAAP1* gene in laminae #13 of *Brassica napus* supplied with 3mM of nitrate (Control; **A**) or without nitrate (N-starvation; **B**). Values of total amino acids amounts are given as a percentage of initial amounts observed at day 0. At day 0, values of 100% correspond to 41.9 $\mu\text{moles.laminae}^{-1}$ for amino acid amounts. Details otherwise as for Figure VI-2.

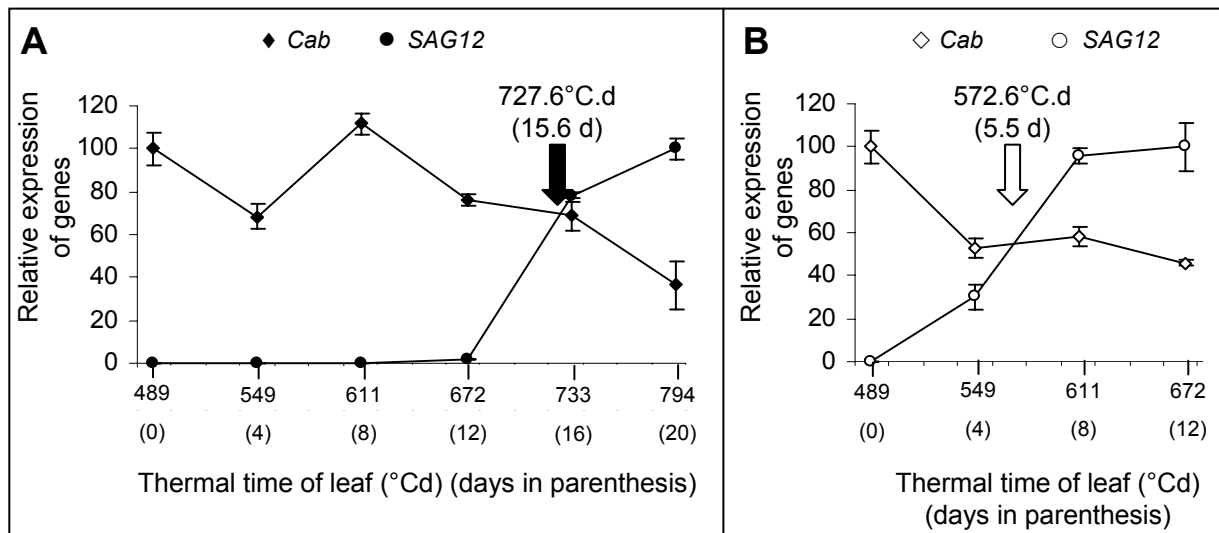


Figure VI-7: Changes in the steady-state transcript level of *SAG12* and *Cab* genes (expressed as % of maximum transcript level) in laminae #13 of *Brassica napus* supplied with 3 mM of nitrate (**A**) or without nitrate (**B**). The *EF1-a* gene was used as a cDNA synthesis and amplification control. The theoretical date of the onset of senescence, which corresponds to sink/source transition for N is characterised by the intersection point resulting from the concomitant up- and down-regulation of the *SAG12* and *Cab* genes, respectively (for details see Materials and Methods). Vertical arrows indicate the date of theoretical transition from sink to source (onset of leaf senescence). Vertical bars indicate the mean \pm standard deviation of two RT-PCR reactions. Control: white arrow, N deprived plant: black arrow.

Table VI-I. Amino acids amounts of laminae #13 of *Brassica napus* supplied with 3 mM nitrate (Control) or without nitrate (N-starvation). Amino acids amounts are given in $\mu\text{mol.laminae}^{-1}$ and classed in function of their abundance. ^aThe amino acids Leu, His, Tyr, Trp, Orn, Met, and b-Ala were regrouped because they showed the same patterns and they represented $\leq 0.2 \mu\text{mol.laminae}^{-1}$ each.

	Thermal time of leaf ($^{\circ}\text{C.d}$) (days in parenthesis)							
	489 (0)	549 (4)	611 (8)	672 (12)	733 (16)	794 (20)	876 (24)	933 (28)
Control								
Glu	15.40 (± 1.21)	13.10 (± 0.49)	12.20 (± 1.41)	11.00 (± 0.30)	9.10 (± 1.97)	2.00 (± 0.71)	0.90 (± 0.47)	0.20 (± 0.07)
Asp	10.60 (± 0.43)	9.20 (± 0.92)	8.30 (± 0.80)	6.00 (± 0.32)	4.70 (± 1.06)	0.89 (± 0.20)	0.62 (± 0.26)	0.12 (± 0.04)
Ser	5.07 (± 0.55)	4.83 (± 0.57)	3.68 (± 0.88)	3.12 (± 0.71)	2.59 (± 0.36)	1.13 (± 0.21)	1.06 (± 0.52)	0.80 (± 0.12)
a-Ala	2.20 (± 0.20)	2.10 (± 0.23)	1.80 (± 0.22)	1.70 (± 0.16)	1.40 (± 0.12)	0.30 (± 0.09)	0.30 (± 0.14)	0.20 (± 0.03)
Gln	1.66 (± 0.35)	1.27 (± 0.09)	1.40 (± 0.16)	1.73 (± 0.57)	1.22 (± 0.21)	0.55 (± 0.10)	0.82 (± 0.51)	1.53 (± 0.38)
Thr	1.20 (± 0.03)	1.00 (± 0.10)	0.80 (± 0.12)	0.80 (± 0.09)	0.60 (± 0.03)	0.30 (± 0.06)	0.30 (± 0.11)	0.20 (± 0.03)
Hser	1.06 (± 0.47)	1.66 (± 0.16)	1.26 (± 0.17)	1.13 (± 0.05)	0.87 (± 0.12)	0.56 (± 0.15)	0.46 (± 0.21)	0.60 (± 0.07)
Val	0.86 (± 0.18)	0.89 (± 0.07)	0.85 (± 0.06)	0.73 (± 0.07)	0.70 (± 0.07)	0.29 (± 0.13)	0.42 (± 0.23)	0.41 (± 0.07)
Pro	0.70 (± 0.03)	0.50 (± 0.03)	0.40 (± 0.05)	0.40 (± 0.07)	0.40 (± 0.02)	0.20 (± 0.05)	0.20 (± 0.05)	0.20 (± 0.05)
GABA	0.43 (± 0.10)	1.04 (± 0.16)	1.09 (± 0.17)	0.53 (± 0.11)	0.50 (± 0.04)	0.18 (± 0.04)	0.35 (± 0.15)	0.56 (± 0.09)
Phe	0.40 (± 0.11)	0.37 (± 0.03)	0.45 (± 0.03)	0.44 (± 0.09)	0.32 (± 0.03)	0.15 (± 0.09)	0.21 (± 0.08)	0.19 (± 0.04)
Lys	0.37 (± 0.14)	0.46 (± 0.06)	0.34 (± 0.05)	0.38 (± 0.06)	0.36 (± 0.02)	0.25 (± 0.01)	0.28 (± 0.07)	0.26 (± 0.02)
Gly	0.35 (± 0.05)	0.21 (± 0.10)	0.21 (± 0.08)	0.26 (± 0.09)	0.17 (± 0.03)	0.22 (± 0.08)	0.44 (± 0.36)	0.11 (± 0.02)
Ile	0.30 (± 0.08)	0.20 (± 0.02)	0.30 (± 0.04)	0.20 (± 0.05)	0.20 (± 0.02)	0.20 (± 0.07)	0.20 (± 0.07)	0.20 (± 0.05)
Asn	0.28 (± 0.11)	0.20 (± 0.03)	0.32 (± 0.02)	0.23 (± 0.09)	0.22 (± 0.04)	0.05 (± 0.02)	0.10 (± 0.06)	0.06 (± 0.02)
Others ^a	1.13 (± 0.26)	1.18 (± 0.13)	1.07 (± 0.15)	1.18 (± 0.29)	1.03 (± 0.11)	0.61 (± 0.14)	0.68 (± 0.38)	0.49 (± 0.13)
N-starvation								
Glu	15.40 (± 1.21)	15.70 (± 2.37)	11.70 (± 4.59)	3.50 (± 0.79)	2.30 (± 0.35)	0.90 (± 0.36)	0.20 (± 0.05)	
Asp	10.60 (± 0.43)	9.58 (± 2.11)	7.58 (± 2.58)	1.78 (± 0.41)	1.03 (± 0.17)	0.52 (± 0.18)	0.12 (± 0.05)	
Ser	5.07 (± 0.55)	6.96 (± 0.90)	4.38 (± 1.04)	1.92 (± 0.34)	1.21 (± 0.23)	1.66 (± 0.84)	0.78 (± 0.18)	
a-Ala	2.20 (± 0.20)	2.60 (± 0.38)	1.90 (± 0.60)	0.80 (± 0.22)	0.40 (± 0.06)	0.50 (± 0.33)	0.20 (± 0.04)	
Gln	1.66 (± 0.35)	2.41 (± 0.43)	1.60 (± 0.24)	1.23 (± 0.32)	0.50 (± 0.09)	2.24 (± 1.83)	1.45 (± 0.04)	
Thr	1.20 (± 0.03)	1.10 (± 0.21)	0.80 (± 0.21)	0.40 (± 0.02)	0.30 (± 0.04)	0.30 (± 0.04)	0.30 (± 0.01)	
Hser	1.06 (± 0.47)	1.64 (± 0.31)	1.69 (± 0.24)	0.80 (± 0.27)	0.71 (± 0.00)	0.78 (± 0.17)	0.59 (± 0.02)	
Val	0.86 (± 0.18)	1.12 (± 0.17)	0.92 (± 0.20)	0.53 (± 0.02)	0.41 (± 0.10)	0.57 (± 0.09)	0.49 (± 0.06)	
Pro	0.70 (± 0.03)	0.60 (± 0.04)	0.50 (± 0.11)	0.20 (± 0.02)	0.20 (± 0.03)	0.40 (± 0.35)	0.30 (± 0.12)	
GABA	0.43 (± 0.10)	1.03 (± 0.17)	1.19 (± 0.47)	0.31 (± 0.10)	0.19 (± 0.05)	0.53 (± 0.32)	0.73 (± 0.19)	
Phe	0.40 (± 0.11)	0.53 (± 0.08)	0.51 (± 0.08)	0.29 (± 0.02)	0.24 (± 0.06)	0.26 (± 0.09)	0.22 (± 0.02)	
Lys	0.37 (± 0.14)	0.68 (± 0.13)	0.58 (± 0.08)	0.33 (± 0.10)	0.44 (± 0.20)	0.32 (± 0.17)	0.24 (± 0.03)	
Gly	0.35 (± 0.05)	0.29 (± 0.07)	0.33 (± 0.14)	0.19 (± 0.04)	0.21 (± 0.08)	0.18 (± 0.06)	0.21 (± 0.11)	
Ile	0.30 (± 0.08)	0.30 (± 0.08)	0.40 (± 0.03)	0.30 (± 0.01)	0.20 (± 0.06)	0.20 (± 0.04)	0.20 (± 0.01)	
Asn	0.28 (± 0.11)	0.40 (± 0.01)	0.36 (± 0.04)	0.12 (± 0.02)	0.11 (± 0.05)	0.07 (± 0.01)	0.06 (± 0.03)	
Others ^a	1.13 (± 0.26)	1.67 (± 0.32)	1.52 (± 0.20)	0.92 (± 0.09)	1.02 (± 0.36)	0.78 (± 0.09)	0.47 (± 0.18)	

III.5 Changes in amino acid content and in gene expression of *BnAAP1*, an amino acid permease

The percentage of total amino acids declined during leaf senescence in both treatments but this decrease occurred earlier in N-deprived than control plants (Figure VI-6 A and B). In control plants, the amount of total amino acid significantly decreased by 30% between day 0 and day 12, and by 54% between day 12 and day 20. In N-deprived plants at day 12, the amount of total amino acid was significantly reduced by 70% between 4 and 12 days. Thereafter, the level of amino acids remained low (Figure VI-6 A and B).

The abundance of different amino acids was also studied during leaf senescence (Table VI-I). At day 0, glutamate was the most abundant amino acid (36% of total amino acids) followed by aspartate and serine (25 and 12% of total amino acids, respectively). In both treatments, the amount of amino acids largely followed the change in total amino acids. The amino acid contained in the fallen leaves was not significantly different in control and N-deprived plants, and corresponded approximately with 15% of the maximal amount of total amino acids. In fallen leaves of both treatments, glutamine and GABA were accumulated slightly and represented 23% and 10% of total amino acids, respectively.

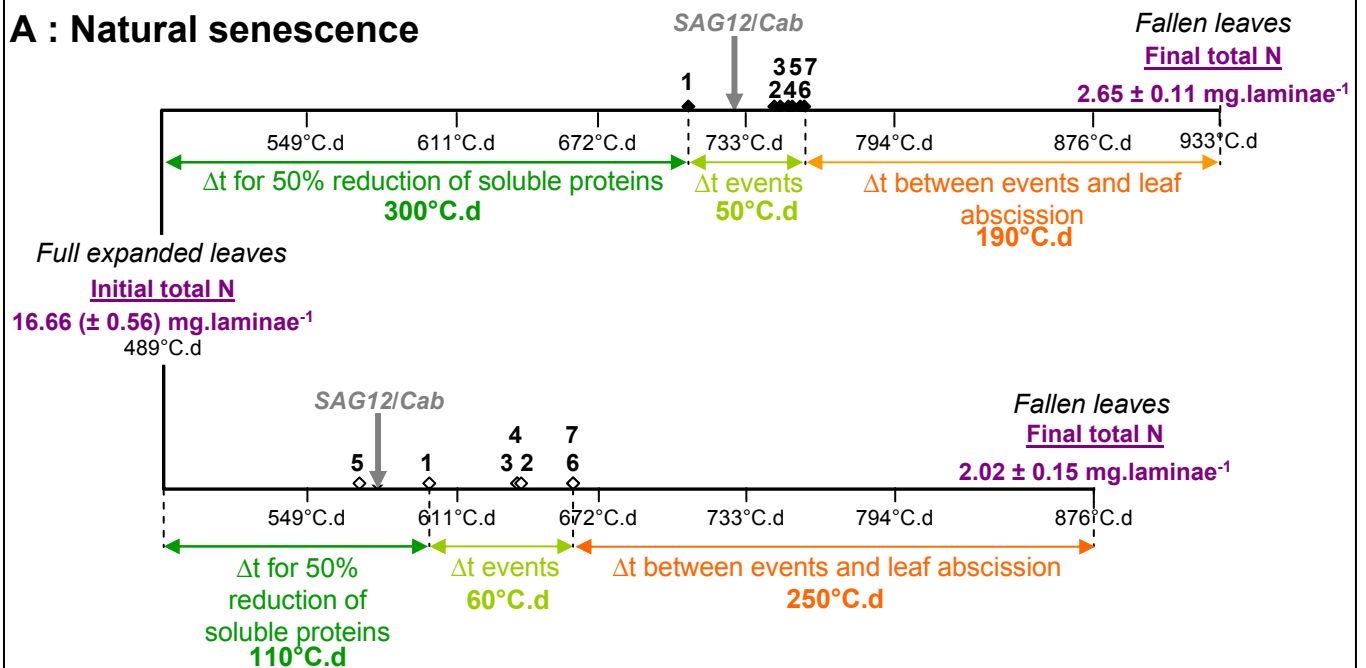
Interestingly, the relative expression of the amino acid permease gene *BnAAP1*, which is involved in amino acid transport, was induced during the decline of total amino acids. Indeed, *BnAAP1* expression was increased from day 12 and 8 in control and N-deprived plants, respectively (Figure VI-6 A and B). In both treatments, the up-regulation of the *BnAAP1* gene was concomitant with the decline in amino acids.

III.6 Determination of the theoretical date of leaf senescence initiation by the *SAG12/Cab* indicator and the chronology of events associated with N remobilisation during senescence

In both N treatments, the decrease in the steady-state transcript level of the *Cab* gene and the increase in the transcript level of the *SAG12* gene enabled characterisation of the theoretical date of leaf senescence initiation of leaf rank #13 (for details see Materials and methods; Figure VI-7). The analysis of *SAG12/Cab* expression revealed that the theoretical date of senescence initiation of leaf #13 in N-deprived plants (day 15.6 ; 727.6°C.d) was earlier than leaves from control plants (day 5.5 ; 572.6°C.d). In control plants, the date of leaf

1 Soluble proteins decrease (-50% of initial contents)	2 Total amino acids decrease (-50% of initial contents)	3 Chlorophyll decrease (-50% of initial contents)	4 Proteolytic activities pH 5 increase ($\times 2.5$)
5 Photosynthesis decrease (-30% of initial contents)	6 Total C decrease (-30% of initial contents)	7 Total N decrease (-60% of initial contents)	

A : Natural senescence



B : N starvation – induced senescence

Figure VI-8 : Chronology of events (1-7) related to remobilisation of N reserves, N recycling and senescence processes observed in laminae #13 of *Brassica napus* supplied with 3 mM of nitrate (A) or without (B). *SAG12/Cab*, theoretical date of the onset of senescence. List of selected events: 1, Soluble protein amounts reduced by 50%. 2, Total amino acids reduced by 50%. 3, Chlorophyll levels reduced by 50%. 4, Proteolytic activities at pH 5 increased 2.5-fold. 5, Net photosynthesis rate reduced by 30%. 6, Total N reduced by 60%. 7, Total C reduced by 30%.

senescence initiation occurred 200°C.d before the abscission whereas it was 300°C.d in N-deprived plants (Figure VI-8).

Figure VI-8 illustrates the chronology of events associated with leaf senescence and has been defined as the “event sequence”. This event sequence was established from the dynamic study of parameters related to N remobilisation (total N, soluble proteins and total amount of amino acids, and proteolytic activities) and senescence (chlorophyll content, *SAG12/Cab*, net photosynthetic rates, total C). The event sequence in laminae of N-deprived plants displayed similarities with control plants, except the net photosynthetic rate. The photosynthetic rate of N-deprived laminae was earlier than the theoretical date of the onset of senescence. The duration of the event sequence was similar in control plants (50°C.d) and in N-deprived plants (60°C.d). The first event observed was a 50% decrease in the initial soluble protein content, which was close to the theoretical date of leaf senescence initiation. This 50% level of soluble proteins occurred earlier in N-deprived plants (110°C.d) than in control plants (300°C.d). Therefore, the duration between the event sequence and leaf abscission was longer in response to N-starvation (250°C.J) than under natural senescence conditions (190°C.J). Interestingly, residual N in fallen leaves was significantly lower in N-deprived plants (2.02 ± 0.15 mg.laminae⁻¹) compared to control plants (2.65 ± 0.11 mg.laminae⁻¹).

IV. DISCUSSION

The remobilisation and recycling processes of endogenous N compounds associated with the sequential type of leaf senescence are considered to be inefficient in oilseed rape and contribute towards limiting N use efficiency. Little is known about the time courses of physiological, biochemical and molecular mechanisms occurring during the last stages of leaf development. Therefore, the aim of this study was (i) to determine the chronology of leaf senescence events in natural conditions (control) and (ii) to evaluate whether N-starvation, an environmental factor known to accelerate the occurrence of leaf senescence, impacted on these events.

As expected, leaf senescence processes appeared earlier in mature leaves submitted to N-starved plants compared to control conditions. This result was supported by previous studies which reported acceleration of initiation of leaf senescence in oilseed rape exposed to nitrate deficiency (Tilsner *et al.*, 2005; Gombert *et al.*, 2006; Etienne *et al.*, 2007). Figure VI-8 illustrated the chronology of events based on the parameters analysed. The event sequence in

leaves of N-deprived plants displayed similarities with those observed in leaves of control plants, except the net photosynthetic rate. Recently, Pic *et al.* (2002) have demonstrated that senescence induced by mild drought in pea was shown to follow the same sequence of macroscopic, biochemical and molecular events as natural senescence. In response to N-starvation, the decline in the measured parameters occurred earlier compared to control plants. As observed in drought-induced senescence, the N-induced senescence program was probably not a direct consequence of stress sensed at a cellular level, but it was triggered by an early signal occurring while leaf photosynthesis was still active, followed by a developmentally controlled senescence program (Pic *et al.*, 2002).

The decrease of 30% in net photosynthetic rate was the first event in N-deprived plants whereas in control plants it was event number 5 (Figure VI-8). During natural leaf senescence, the decline in photosynthesis is attributed to a reduction in chlorophyll content. A similar trend of declining photosynthesis has been also observed in *Arabidopsis* (Hensel *et al.*, 1993) and soybean (Jiang *et al.*, 1993). During leaf senescence, a decrease in photosynthetic activity is characterised by a decrease in the light-harvesting capacity of PSII (Humbeck *et al.*, 1996; Lu and Zhang, 1998), the amount and activity of RuBisCO (Jiang *et al.*, 1993), CO₂-exchange rate (Jiang *et al.*, 1993), and the level of mRNA expression of photosynthesis-related genes (Humbeck *et al.*, 1996). Under N starvation, the decrease in photosynthetic rate occurred earlier than in control plants (Figure VI-8). The greater decline in photosynthesis (65%) at the beginning of treatment cannot be attributed exclusively to the decrease in chlorophyll content (25%). In many studies, it was found that there is a linear relationship between net photosynthetic rate and the rate of stomatal conductance in sunflower, sorghum and wheat submitted to N deficiency (Cechin and Fumis, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Del poso *et al.*, 2007). The 85% decrease in the rate of stomatal conductance between day 0 and day 4 in low N-grown plants (data not shown) might explain this result. Lower stomatal conductance rates in low N-grown plants have also been reported in lettuce and in winter wheat (Broadley *et al.*, 2000; Shangguan *et al.*, 2000). Our observations should be confirmed in *Brassica napus* by the study of stomatal conductance and net photosynthetic rates in response to different levels of N fertilisation.

Degradation of the photosynthetic apparatus leads to a decrease in photoassimilate production and export to sinks, and increases the dependence of senescing tissues on respiratory metabolism (Feller and Fischer 1994). In both conditions of senescence, the photosynthetic rate and chlorophyll content declined before the decrease in total C, suggesting the existence of another source of sugars. A decline in photosynthesis during senescence may

result in sugar starvation leading to the activation of starch degradation and the conversion of lipids to sugars. Thylakoid breakdown leads to release of lipids, which are converted to sugars through the glyoxylate cycle (Kim and Smith, 1994; Buchanan-Wollaston, 1997). The sugars produced may be required for respiration of senescing leaves. The high level of gene expression and protein abundance of enzymes participating in the process of glycolysis/gluconeogenesis are known to play an important role during leaf senescence (Buchanan-Wollaston, 1997; Chapter V). In tobacco leaves, an accumulation of carbohydrates (glucose, fructose, sucrose and starch) was observed in the sink/source transition (Masclaux *et al.*, 2000). N deficiency often results in sugar accumulation (Ono *et al.*, 1996). Glucose in combination with a low N supply can induce yellowing and alter gene expression in a senescence-specific manner in *Arabidopsis* leaves (Pourtau *et al.*, 2004, 2006). These data formed the basis of the hypothesis that high sugar levels in the leaf cells are the cause of early leaf senescence. Interestingly, it has been proposed that senescence can be triggered by a high availability of carbon relative to N instead of carbohydrates alone (Martin *et al.*, 2002). These authors suggested that C and N interactions are likely to play an important role in the regulation of leaf senescence. In our study, the C/N ratio increased during leaf senescence in both treatments, but the up-regulation was greater in N-deprived plants than control plants.

This work was based on events particularly associated with leaf senescence. The sequence of selected events occurred earlier in N-deprived plants than control plants but the interval between events was similar in both N conditions (Figure VI-8). Based on the changes in *SAG12/Cab* gene expression, it seemed that in comparison to control plants, N deprivation accelerated the initiation of senescence. These results are consistent with those reported by Gombert *et al.* (2006) and Etienne *et al.* (2007). Moreover, the date corresponding to a 50% reduction in the amount of soluble protein was close to the theoretical date of senescence initiation that was deduced from *SAG12/Cab* gene expression. This suggested that *SAG12/Cab* is an accurate indicator of leaf senescence. The large decline in total N during leaf senescence is due to a decrease in the amount of soluble protein (Figure VI-4) and amino acids (Figure VI-5), two forms of remobilisable N. The reduction by 50% in soluble protein was more rapid during senescence induced by N-starvation compared to natural senescence. This first decline in the N-pool corresponded to mobilisation of easily mobilised N compounds (N storage, soluble proteins) which occurs without metabolic disruption. Rapidity of this degradation in N-deprived plants could be explained by an increase in proteolytic activities concomitant with a significant decrease in BnD22 transcript levels during the first step of remobilisation. Protease inhibitors could be involved in regulation of protease

activities. Interestingly, the duration between the event sequence and leaf abscission was longer in response to N-starvation (250°C.d) than in natural condition (190°C.d). This second phase of N remobilisation, called N recycling, corresponded to degradation of components of the N pool that are difficult to mobilise. These original data reveal that initiation of leaf senescence in N-starvation occurred earlier, but that N recycling was also longer compared to natural leaf senescence, suggesting a difference in the mechanism of N-mobilisation. This hypothesis was reinforced by the fact that residual amounts of N in fallen leaves of N-deprived plants ($2.02 \pm 0.15 \text{ mg.laminae}^{-1}$) were lower than in control plants ($2.65 \pm 0.11 \text{ mg.laminae}^{-1}$; Figure VI-8). The greater duration between the date of 50% soluble protein reduction and the date of abscission in N-deprived plants could explain the lower final residual N amount in this treatment compared to control plants. The reduction of the second half of these soluble proteins occurred during 224°C.d and 274°C.d in control and N-deprived plants, respectively (Figure VI-8).

Cellular proteins are extensively degraded during leaf senescence and this correlates with an up-regulation of proteolytic activities. A biochemical method of detection revealed that protease activities at pH 5 were induced during leaf senescence in both treatments when decreases were observed in soluble protein and the expression of the *BnD22* gene encoding a protease inhibitor. Ilami *et al.* (1997) have shown that old leaves of oilseed rape exhibited great protease activity at pH 5. However, the timing and the rate of protein degradation associated with senescence were modulated by the effects of N-starvation. According to the event sequence in Figure VI-8, protease activities were increased 2.5-fold, 183°C.d before leaf abscission in control plants whereas the value was 236°C.d in N-deprived plants. Moreover, hydrolysis of proteins to free amino acids depends on the actions of several endo- and exopeptidases (Hortensteiner and Feller, 2002). Three protease activities were detected at pH 5 in natural and N-induced senescing leaves. The 76 kDa protease was already present at day 0, suggesting that this protease exists constitutively. The activity of this protease increased when leaf senescence occurred. In both treatments, two other proteases, at 99 and 101 kDa, were induced when protease activities increased significantly and when the amount of proteins decreased (Figure VI-4). This suggested an important role for these proteases at later stages of leaf senescence. In this study it is probable that the proteases detected at pH 5 are located mainly in vacuoles (Huffaker, 1990). In both treatments, a difference in the timing of commonly induced proteases suggests that the pathways regulating senescence vary in different situations. However, such different senescence-inducing factors may all converge on a common degradative pathway involving the same hydrolytic enzymes. In a recent study,

Martinez *et al.* (2007) have shown that during natural senescence and drought induced-senescence wheat leaves, some cysteine proteases activities pH 5 at 36, 39, 42 and 46 kDa corresponding to proteins localised in vacuole, increased. These results also implied that vacuole proteases might play an important role in cellular degradation during leaf senescence. Moreover, most of the senescence-related protease genes identified in the last few years encode cysteine proteases (Buchanan-Wollaston, 1997). In some species, cysteine protease transcripts detected in young leaves became more abundant during senescence when developmental stages were defined by leaf yellowing in aubergine (Xu and Chye, 1999), and in tomato (Drake *et al.*, 1996). In oilseed rape, transcripts of the *SAG12* gene encoding a cysteine protease increased when the amount of proteins and the chlorophyll content started to decrease. *SAG12* is expressed from early stages of senescence (25% loss of chlorophyll) in *Arabidopsis* (Lohman *et al.*, 1994) and in *Brassica napus* (Noh and Amasino, 1999). Using proteomics studies (Chapter V), this protein has also been identified at the ultimate stage of leaf senescence in oilseed rape, which suggests a crucial role in protein mobilisation during the final phase of senescence.

The second group of N-remobilisable compounds are amino acids. In both treatments, the amount of total amino acid was reduced by 50%, 30°C.d after the 50% decline in initial soluble proteins (Figure VI-8). In our study, the total quantity of amino acids in old leaves that had lost 50% of their chlorophyll (6 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW) was similar to the quantity found in old leaves of oilseed rape (11 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW; Tilsner *et al.*, 2005) and of crop plants such spinach (5 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW; Reins *et al.*, 1991) and maize (5-15 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW; Lohaus *et al.*, 1998). The levels of individual amino acids also declined in a similar manner to the total amino acid content. In mature leaves, glutamate was the most abundant amino acid accounting for 36% of the total, followed by aspartate (25%) and serine (12%, Table VI-I). These results are consistent with those reported by Tilsner *et al.* (2005) in oilseed rape. The amounts and the composition of the amino acid pool during leaf senescence did not differ in either treatment, with the exception of GABA after 794°C.d⁻¹. GABA metabolism is related to glutamate metabolism (Bown and Shelp, 1997) and it is possible that GABA plays a role in buffering extremes of glutamate concentration during leaf senescence (Masclaux *et al.*, 2000). Accumulation of GABA could be (i) involved in production of organic acids used for energy production (Bown and Shelp, 1997) and/or (ii) a stimulator of ethylene biosynthesis which is known to accelerate leaf senescence (Smart, 1994). High glutamine amounts were also present in fallen leaves suggesting that a pool of amino acids was not exported before leaf abscission. In fact, glutamine and asparagine represent the major form of nitrogen transported

in canola (Feller and Fisher, 1994), but asparagine is the more efficient form of nitrogen transport compared to glutamine (Seiffert *et al.*, 1999). The lower asparagine and glutamine amounts during leaf senescence imply that these amino acids are phloem loaded and not accumulated. It has been shown that in senescing leaves of oilseed rape (0-500 μg chlorophyll.g⁻¹ FW), glutamine accounted 45% in petiole phloem sap (Finneman and Schojerring, 2000). The key enzyme responsible for the synthesis of glutamine is glutamine synthetase (GS), which converts glutamate to glutamine. In *Brassica napus* it has been shown that the GS gene and protein were induced after onset of leaf senescence (Ochs *et al.*, 1999; Chapter V). Induction of GS during leaf senescence has also been shown in rice (Kamachi *et al.*, 1991), tobacco (Masclaux *et al.*, 2000), potato (Teixera *et al.*, 2005), and *Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2008). In addition, the enzyme responsible for the synthesis of asparagine is also induced during leaf senescence (Herrera-Rodriguez *et al.*, 2005). The hypothesis of efficient phloem loading was also reinforced by following expression of the amino acid transporter, BnAAP1, during leaf senescence. *BnAAP1* is an amino acid permease, which is non-specific for amino acid transport, and was shown to increase in senescing leaves when total amino acids declined (Figure VI-5). The similar levels of total amino acids in the fallen leaves of both treatments suggests that oilseed rape leaves are able to efficiently export excess N-reduced compounds. This confirms the previous results of Tilsner *et al.* (2005). It is likely that N mobilisation in control leaves could be limited by protein degradation (in terms of proteases and/or duration of proteolysis) and not by the phloem-loading step. Studies of other amino acid permeases such BnAAP2, whose transcript levels increased from mature to old leaves (Tilsner *et al.*, 2005), could be also analysed in order to validate this hypothesis.

In conclusion, the present results indicate that the event sequence during leaf senescence was quite similar under adequate N mineral conditions or in response to nitrate starvation. However, mineral N starvation provoked a rapid remobilisation of available soluble proteins and resulted in premature initiation of leaf senescence. Consequently, N recycling processes occurred earlier leading to increases in the duration of proteolysis and export of amino acids up to the point of leaf abscission. Moreover, under N starvation, protease activities increased compared to those observed under adequate mineral N conditions. The low residual amount of N observed in fallen leaves of N-deprived plants could be explained by a rapid remobilisation of soluble proteins combined with premature senescence, which in turn leads to an increase in the duration and intensity of processes related to N recycling. This result suggests that imposing N stress on mature leaves enhances the rate of N remobilisation and recycling. One strategy to improve oilseed rape nitrogen efficiency might be to extend the period of N

mobilisation before leaf abscission occurs. In *Arabidopsis*, Diaz *et al.* (2008) have shown that the level of N mobilised from leaf to leaf during the vegetative phase of rosette growth was higher in early senescing lines than in late senescing lines. Study of early senescing varieties of oilseed rape could provide new information about senescence in order to discover helpful tools to screen genotypes on their ability to manage N remobilisation.

Acknowledgements. The authors would like to thank Ms. Marie-Paule Henry for her valuable help in N analysis, and Nathalie Noiraud-Romy for her help in amino acid transporters analysis. The authors also wish to acknowledge Dr. Olivier Sordet (Laboratory of Molecular Pharmacology, NIH/NCI, Bethesda, MD, USA) for kind revision of this manuscript. This work was supported by a Ph. D. grant for Marie Desclos from INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, France) and the Conseil Régional de Basse-Normandie.

CHAPITRE VII

Discussion générale et perspectives

CHAPITRE VII

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Malgré une tendance à la baisse des quantités moyennes d'engrais azotés apportés sur ces dix dernières années, la fertilisation azotée représente un coût financier important (29% des charges opérationnelles en 2005 ; source CETIOM) pour les producteurs de colza. En effet, les coûts de production du colza sont sensibles aux évolutions des prix des engrais azotés, eux-mêmes fortement dépendants du marché pétrolier. De plus, le colza est une culture paradoxale dans la mesure où le solde entre les apports en intrants azotés au sein de la parcelle et l'azote contenu dans les graines est relativement élevé. Cette faible efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) devient une préoccupation majeure des améliorateurs du colza dont les objectifs visent actuellement à sélectionner des variétés utilisant mieux leur azote (N) et/ou capables d'atteindre un niveau de production satisfaisant tout en ayant des besoins en N minéral plus faibles que les variétés actuelles. Récemment, la société Arcadia Biosciences¹ a développé des colzas génétiquement modifiés dont les transformations génétiques réalisées sont inconnues. Selon un communiqué de presse émis par la société, des essais aux champs ont démontré que ce colza pouvait maintenir un rendement normal avec 50% d'engrais azotés en moins, ou conduire à des rendements accrus de 15% avec la quantité habituelle d'engrais. Une étude d'impact de la culture de ces colzas transgéniques a montré une amélioration du bilan environnemental (Strange *et al.*, 2006). L'ensemble de ces travaux démontre qu'il existe des voies d'amélioration des performances agronomiques du colza y compris en situation de bas intrants azotés.

Etant donné qu'il est largement admis que la faible EUA du colza est liée à un défaut de vidage du N foliaire, il apparaît que la réduction des apports azotés concomitant à un maintien - voire une augmentation - des rendements actuels de la culture de colza nécessitera l'obtention de variétés capables d'optimiser les processus de remobilisation du N foliaire au cours du développement végétatif (Aerts et Chapin, 2000; Yasamura *et al.*, 2007). Cette remobilisation du N foliaire, majoritairement associée à la dégradation des protéines (Hörtensteiner et Feller 2002; Zimmerman et Zentgraf, 2005), nécessite une fine coordination entre les processus de protéolyse se produisant dans les feuilles sénescentes (tissus source) et la demande ainsi que l'utilisation du N au niveau des tissus puits. Cette coordination est

¹ Société située à Davis en Californie (USA ; [www. arcadiabio.com/media/press_040307Canola.pdf](http://www.arcadiabio.com/media/press_040307Canola.pdf)).

d'autant plus importante dans le cas où les plantes sont soumises à divers stress perturbant les relations source/puits tel qu'une carence en N minéral. Dès lors, une meilleure compréhension des mécanismes de protéolyse dans les tissus source, ainsi que du comportement des tissus puits vis-à-vis du N remobilisé, est un pré requis pour l'optimisation de la remobilisation du N foliaire, et par conséquent de l'EUA.

Ces travaux de thèse avaient donc pour **objectif principal de mieux comprendre les mécanismes de remobilisation du N foliaire (i) en identifiant les processus physiologiques, protéomiques et moléculaires clés susceptibles de conduire à un meilleur recyclage du N et (ii) en déterminant l'impact de bas intrants azotés (carence ou privation en nitrate) sur ces processus**. Basé sur le postulat que des systèmes protéolytiques spécifiques et/ou des inhibiteurs de protéases seraient capables de moduler l'efficacité de remobilisation du N *via* la régulation du taux de protéolyse foliaire, ce travail de recherche doctorale a été conduit à l'échelle du rang foliaire tout en considérant les flux de N remobilisé au niveau plante entière (notamment grâce à l'utilisation de techniques de marquage par ^{15}N). La mise en place de dispositifs expérimentaux originaux couplant des approches physiologique, protéomique et moléculaire ont permis d'établir la chronologie des événements intervenant dans la remobilisation du N au cours de la sénescence foliaire et d'identifier les protéines les plus fortement impliquées dans les processus de remobilisation du N protéique.

Au cours de cette étude, l'implication de l'inhibiteur de protéase BnD22 dans la gestion du N remobilisé chez le colza a été mise en évidence. Dans la première partie de ce chapitre « Discussion », les principaux résultats concernant BnD22 seront brièvement rappelés. Les hypothèses sur les fonctions physiologiques potentielles de BnD22 et notamment sur la signification de l'accumulation de BnD22 dans les jeunes feuilles en réponse à une forte remobilisation du N des feuilles sénescentes seront abordées. Les perspectives liées à cet inhibiteur de protéases en terme d'amélioration de l'EUA seront également discutées.

Dans une seconde partie, la discussion portera sur les résultats de l'analyse protéomique en lien avec l'étude de la séquence d'évènements physiologiques et moléculaires associés à la remobilisation du N foliaire. L'ensemble des données obtenues lors de cette thèse a permis de proposer un schéma de synthèse des différents événements physiologiques, protéomiques et moléculaires intervenant au cours des phases ultimes de développement de la feuille de colza. Les perspectives qui peuvent être envisagées à la suite de l'étude du protéome de la remobilisation du N foliaire sont également discutées en vue de contribuer à la recherche de géotypes de colza plus efficaces vis-à-vis du N.

I. IMPLICATION D'UN INHIBITEUR DE PROTÉASES, BnD22, DANS LA GESTION DE L'AZOTE REMOBILISÉ

I.1 Le maintien de la croissance des jeunes feuilles de colza privé en nitrate est concomitant à l'accumulation de la protéine BnD22, un inhibiteur de protéases

L'utilisation de l'indicateur moléculaire de la sénescence (*SAG12/Cab*) a permis de mettre en évidence que, contrairement aux plantes témoins qui présentent une vitesse de sénescence constante, les feuilles de plantes privées en N présentent des vitesses de progression de la sénescence contrastées en fonction de la position nodale des feuilles (Chapitre IV.I):

- **les feuilles matures ou en phase de maturation** présentent une sénescence accélérée qui s'accompagne d'une mobilisation rapide du N foliaire,
- **les feuilles les plus jeunes** présentent un ralentissement de la sénescence couplé à un maintien de la croissance, du niveau de chlorophylles et de la teneur en protéines solubles de ces feuilles.

Au niveau des feuilles matures, les résultats obtenus en réponse à une privation en nitrate sont en accord avec les travaux de Smart *et al.* (1995) et Gombert *et al.* (2006). Conduite sur une durée de privation en nitrate de 21 jours (contre seulement 10 jours dans les travaux de Gombert *et al.*, 2006), notre étude a permis de révéler que, contrairement aux feuilles âgées, les feuilles jeunes apparues lors de la privation maintiennent un bon niveau de croissance. En effet, le maintien des teneurs en protéines solubles et en chlorophylles, au sein des jeunes feuilles, laisse supposer que ces rangs foliaires tentent de préserver leurs capacités photosynthétiques. Ces données indiquent qu'en réponse à une privation en N minéral, la gestion du N endogène est différente selon le statut source ou puits des feuilles vis-à-vis du N. Cela suggère l'existence d'une régulation très fine des mécanismes impliqués d'une part, dans la mobilisation du N dans les feuilles source qui entrent en sénescence et d'autre part, dans l'utilisation de cet azote remobilisé par les feuilles puits en croissance. Ainsi, il est probable que les mécanismes protéolytiques, qui sont très actifs dans les feuilles matures, soient fortement réfrénés au sein des jeunes feuilles apparues afin de leur permettre d'utiliser au mieux le N remobilisé à partir des feuilles source. Les inhibiteurs de protéases pourraient donc jouer un rôle central dans la régulation des activités protéolytiques au sein des jeunes feuilles.

En partant de cette hypothèse, la recherche d'inhibiteurs de protéases au niveau foliaire, a permis de détecter une activité anti-trypsique (TI : Trypsin Inhibitor) à 19 kDa chez des feuilles

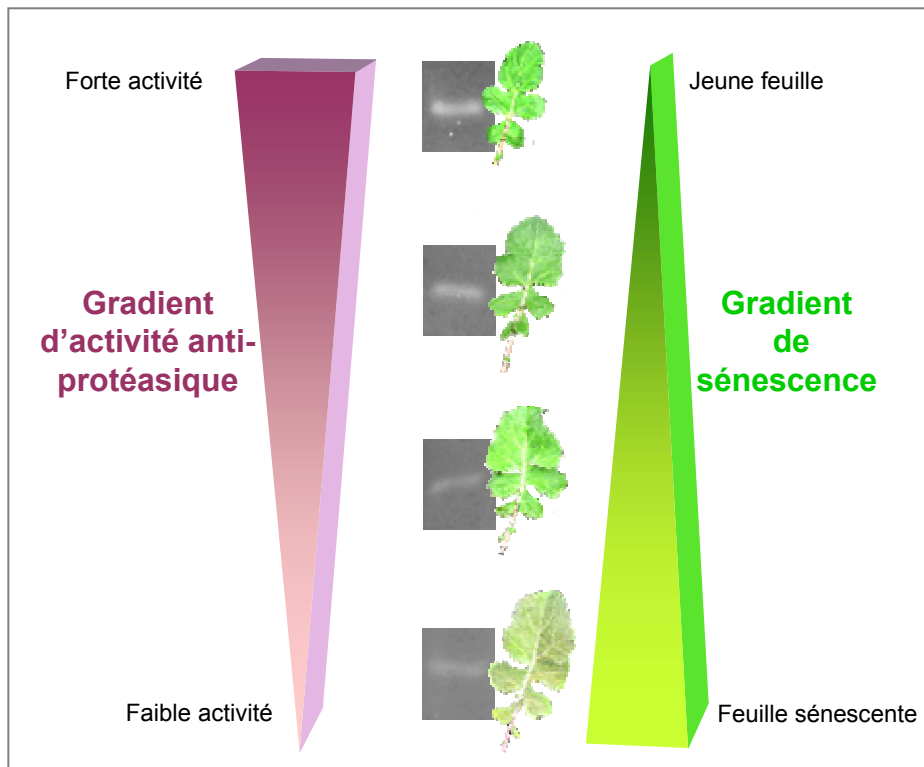


Figure VII-1 : Représentation schématique du gradient d'activité anti-protéasique et du gradient de sénescence. À côté de chacune des feuilles, l'activité anti-protéasique détectée sur gel 1-D est indiquée. L'activité anti-protéasique est visualisée sur le gel par une zone blanche sur fond noir. Plus la feuille est jeune, plus l'activité anti-protéasique est élevée. (Résultats Chapitre IV).

de colza privés ou non en nitrate (Chapitre IV.I). Quel que soit le traitement, cette **activité TI est d'autant plus forte que la feuille est juvénile** (Figure VII-1). Comparativement aux plantes témoins, l'activité TI des feuilles matures des plantes privées en nitrate chute rapidement. En revanche, l'activité TI détectée dans les jeunes feuilles des plantes privées en nitrate est, pendant les 17 premiers jours, toujours égale ou supérieure à celle détectée chez les plantes correctement alimentées en nitrate (témoin). Ces résultats sont en accord avec des travaux récents qui ont permis de mettre en évidence la présence d'une activité TI dans les premières feuilles vraies de colza âgées d'une dizaine de jours, suggérant une expression constitutive de cette protéine chez les jeunes feuilles (Cipollini et Bergelson, 2000).

L'identification de la protéine à activité TI a ensuite été conduite par comparaison de gels 2-D colorés au nitrate d'argent et de zymogrames 2-D. Cette stratégie a permis de démontrer que l'activité TI correspondait à une protéine de 19 kDa avec un pI de 5,1 (Chapitre IV.II). Le séquençage par ESI LC-MS/MS a montré que le spot à activité TI correspondait à **BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa), un inhibiteur putatif de protéases à sérine de type Kunitz**, précédemment mis en évidence dans les feuilles de colza présentant une tolérance au stress hydrique (Ilami *et al.*, 1997). **Cette étude est, à ce jour, la première (i) à mettre en évidence une activité TI après séparation en électrophorèse 2-D et (ii) à associer une activité TI à la protéine BnD22.** En effet, bien que partageant de fortes homologues avec des inhibiteurs de protéases de type Kunitz, les tests réalisés après purification, n'avaient jusqu'à présent jamais révélé l'activité TI de la protéine BnD22 (Ilami *et al.*, 1997). De plus, notre étude a montré que l'induction de l'expression du gène *BnD22* dans les jeunes feuilles de plantes privées en nitrate (ou traitées au MeJA, phytohormone capable d'accélérer la sénescence foliaire) concorde avec l'augmentation du niveau d'activité TI observé (Chapitre IV.II).

En résumé, par rapport aux plantes bien alimentées en nitrate, l'ensemble de ces données suppose que la privation en N minéral se traduit (Figure VII-1):

- dans les feuilles âgées, par une **accélération de la sénescence** et une **disparition rapide de BnD22**,
- dans les jeunes feuilles, par un **ralentissement de la sénescence** et une **accumulation de BnD22**.

Au vu de ces résultats, un certain nombre de fonctions peuvent être proposées pour BnD22.

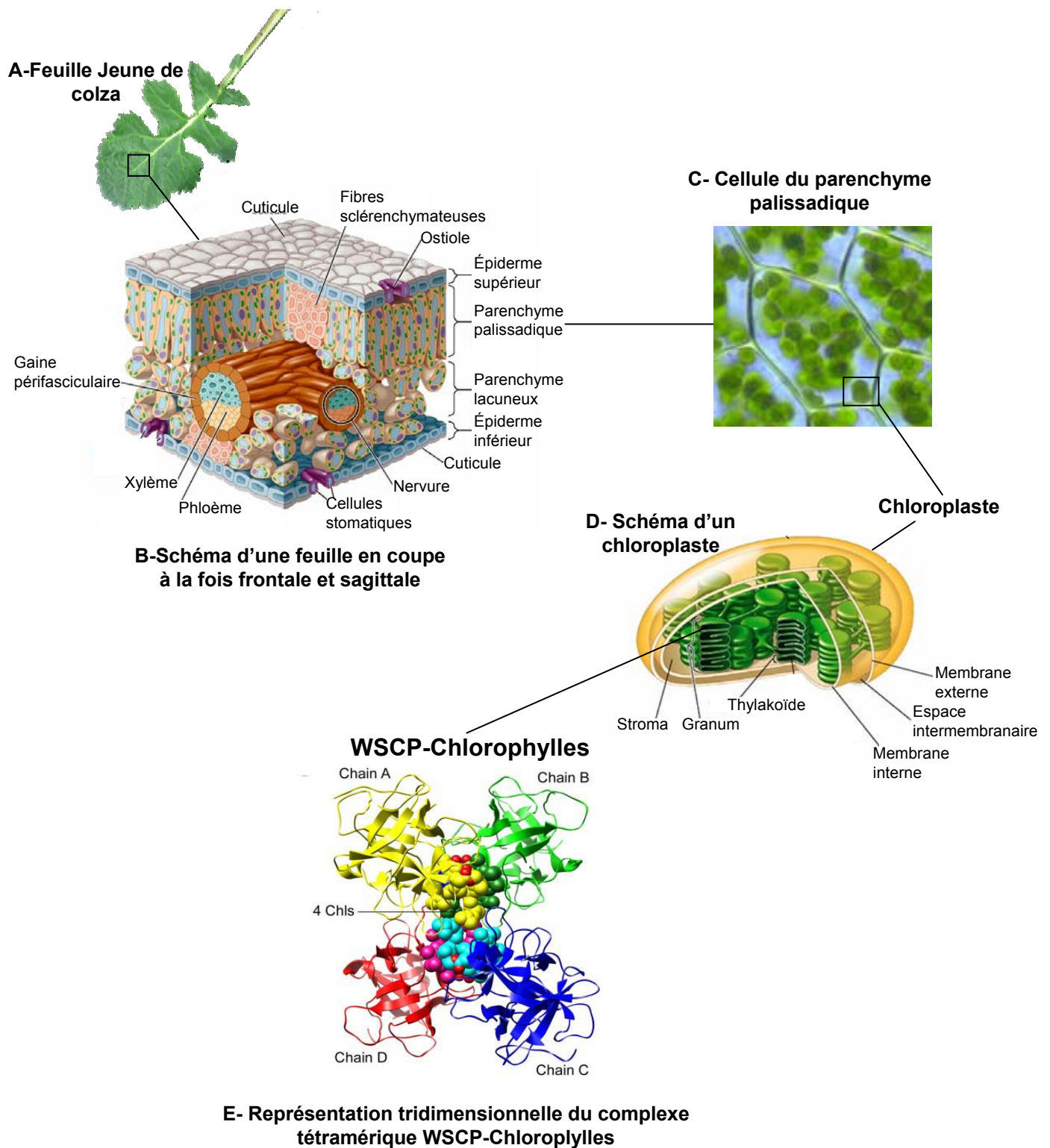


Figure VII-2 : Localisations tissulaire et cellulaire de la fonction WSCP de BnD22. (A) Feuille jeune de colza. (B) Représentation schématique d'une coupe frontale et sagittale de feuille jeune de colza. (C) Observation au microscope optique d'une cellule du parenchyme palissadique (D) Représentation schématique d'un chloroplaste présent au sein d'une cellule de parenchyme palissadique. (E) Représentation tridimensionnelle de la structure du complexe tétramérique WSCP-Chlorophylles (d'après Horigome *et al.*, 2007). Les 4 monomères de WSCP sont représentés en jaune (chain A), vert (Chain B), bleu (Chain C) et rouge (Chain D). Chain : Chaîne ; Chls : Chlorophylles.

I.2 Fonctions physiologiques de BnD22 dans les feuilles de colza

Tout d'abord, il est envisageable que cet inhibiteur de protéases puisse jouer **un rôle dans le contrôle de la protéolyse associé à la sénescence foliaire et dans le maintien de la jeunesse de la feuille**, tout particulièrement en situation de forte contrainte abiotique. La présence de ce type d'inhibiteurs de protéases pourrait expliquer, du moins partiellement, les défauts de mobilisation du N protéique dans certains rangs foliaires. L'ensemble de ces résultats est à rapprocher de travaux sur d'autres plantes qui évoquent l'intervention d'inhibiteurs de protéases à sérine et/ou à cystéine dans le contrôle de la protéolyse liée à la sénescence foliaire (Sugawara *et al.*, 2002 ; Shatters *et al.* 2004 ; Sin et Chye, 2004).

De plus, la protéine BnD22 est également connue chez le colza pour être une protéine de liaison aux chlorophylles (**WSCP : Water Soluble Chlorophyll binding Protein**). L'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre la WSCP de *Brassica oleracea* sur des westerns blots obtenus après 2-DE a permis d'identifier deux autres WSCPs chez *Brassica napus*. L'induction de WSCPs pose de nombreuses questions quant au rôle fonctionnel de ces protéines au sein des jeunes feuilles.

Appartenant aux WSCPs de la classe II propre aux Brassicacées, les protéines WSCPs identifiées sont capables de se lier aux chlorophylles *a* et *b* mais aussi aux chlorophyllides *a* et *b* (Nishio et Satoh, 1997; Schmidt *et al.*, 2003; Horigome *et al.*, 2007). Ainsi, il est généralement admis que le rôle de ces WSCPs dépend de la nature de la molécule avec laquelle elles se lient :

- une liaison aux chlorophyllides *a*, un intermédiaire de la synthèse des chlorophylles *a*, suppose **un rôle de BnD22/WSCP dans la régulation de la synthèse des chlorophylles** (Schmidt *et al.*, 2003; Reinbothe *et al.*, 2004).
- une liaison aux chlorophylles *a*, en formant un complexe tétramérique autour de 4 molécules de chlorophylles (Figure VII-2), protégerait la chlorophylle de la dégradation, suggérant **un rôle de BnD22/WSCP dans la photo-protection de la chlorophylle** (Schmidt *et al.*, 2003; Horigome *et al.*, 2007). Par voie de conséquence, cette action retarde l'apparition des ROS issus de la dégradation des chlorophylles.

Les études présentées du Chapitre IV montrent que la protéine BnD22 est accumulée en réponse à une contrainte nutritionnelle azotée. Toutefois, l'induction de BnD22 a également été observée en réponse à d'autres contraintes abiotiques telles que les stress salin et hydrique (Downing *et al.*, 1992 ; Reviron *et al.*, 1992 ; Ilami *et al.*, 1997). La forte accumulation de

BnD22 en réponse au MeJA (Chapitre IV) suppose également un rôle important de cette protéine en tant que protéine de défense lors d'attaques par des agents pathogènes (Heath *et al.*, 1997). En effet, cette activité inhibitrice de protéases pourrait contribuer aux processus de défense en inhibant les protéases des insectes et des organismes phytopathogènes dans le but de limiter leur développement et leur pouvoir pathogène. Ces données suggèrent donc que l'accumulation de la protéine BnD22 dans les jeunes feuilles ainsi que la double fonction WSCP/TI pourrait intervenir dans la protection des tissus juvéniles en maintenant l'intégrité des protéines et les capacités photosynthétiques en réponse aux contraintes abiotiques et biotiques.

La présence de BnD22, une protéine à double fonction WSCP/TI, en réponse à diverses contraintes pose un certain nombre d'interrogations sur ses rôles physiologiques et permet d'envisager un certain nombre de perspectives pouvant contribuer à optimiser l'EUA du colza.

I.3 Perspectives de recherche concernant le rôle de BnD22/WSCP dans la gestion du N remobilisé et conséquences sur l'EUA du colza

Notre étude a montré que la protéine BnD22 s'accumule au sein des tissus juvéniles, tout particulièrement lorsque la sénescence de la plante est accélérée soit par une privation en N, soit par un traitement au MeJA. D'autre part, les résultats obtenus dans le Chapitre VI montre que l'augmentation de l'activité protéolytique et la diminution des quantités de protéines apparaissent lorsque le niveau d'expression du gène *BnD22* est réprimé. La présence de cet inhibiteur pourrait être un moyen de contrôler la dégradation des protéines en modulant l'activité protéolytique. Toutefois, son mécanisme d'action ainsi que son(ses) substrat(s) est(sont) encore inconnu(s). D'un point de vue fondamental, il serait donc particulièrement intéressant :

- d'identifier les protéases cibles de cet inhibiteur *via* la technique Double Hybride. La caractérisation des protéines cibles apporterait de nouveaux éléments sur les protéases susceptibles d'intervenir dans la remobilisation du N ainsi que leur régulation.
- de déterminer si la levée d'inhibition des inhibiteurs de protéases a un rôle important au cours du processus de remobilisation du N. On peut d'ailleurs supposer que le ratio « inhibiteurs de protéases/protéases » jouera un rôle important dans la régulation de la sénescence foliaire.

De plus, étant donné la spécificité des anticorps dirigés contre la protéine BnD22, la localisation tissulaire et cellulaire de cette protéine pourrait être effectuée sur des coupes de jeunes tissus foliaires de colza traité au MeJA. Cette approche permettrait d'apporter des informations déterminantes sur une éventuelle spécificité tissulaire ou cellulaire et de répondre aux questions suivantes :

- BnD22 est-elle spécifiquement accumulée dans des tissus particulièrement préservés lors de la sénescence comme, par exemple, les tissus conducteurs essentiels au transport des éléments issus de la dégradation ?
- Au niveau cellulaire, cet inhibiteur de protéases est-il présent au sein des chloroplastes ou de vacuoles dans lesquelles seraient également stockées des protéases ?

Quand une feuille se comporte comme un organe puits, les inhibiteurs de protéases et/ou WSCP tels que la protéine BnD22 s'accumulent pour favoriser le maintien de la croissance. Selon Habekotté (1997), l'augmentation simultanée des capacités sources et puits de la plante pourrait améliorer efficacement le rendement. En effet, une augmentation des capacités photosynthétiques conduit à une accumulation accrue de composés azotés et carbonés (Ping *et al.*, 2003), disponibles lors des processus de remobilisation massive, notamment lors du remplissage des grains. Actuellement, l'une des préoccupations majeures des sélectionneurs consiste à privilégier, chez certaines cultures, le phénotype «stay-green» caractérisé par un retard de sénescence associé à un maintien de l'activité photosynthétique. La recherche de mutants possédant ce phénotype a été réalisée chez des espèces fourragères et de grande culture telles que la fétuque (Bachmann *et al.*, 1994 ; Fang *et al.*, 1998), le pois (Thomas *et al.*, 1996) le riz (Cha *et al.*, 2002) ou le blé (Spano *et al.*, 2003). Chez les deux premiers mutants cités, la persistance des teneurs en pigments chlorophylliens au sein des feuilles ne s'accompagne d'aucune modification des événements métaboliques liés à la sénescence, comme par exemple la dégradation des protéines ou l'induction du gène *SAG12* (Bachmann *et al.*, 1994 ; Fang *et al.*, 1998 ; Thomas *et al.*, 1996). En revanche, chez *Arabidopsis*, un mutant *stay-green ore4-1* peu sensible aux signaux environnementaux ou hormonaux comme la plupart des mutants de sénescence, s'est révélé particulièrement intéressant (Woo *et al.*, 2002). Ce mutant manifeste une sénescence tardive qui se caractérise par un retard de l'apparition du jaunissement des feuilles, de la dégradation des chlorophylles et de l'induction du gène *SAG12*.

Des études réalisées sur des mutants de maïs, de sorgho et de soja ont révélé que le retard de sénescence conduisait à une amélioration des rendements (Rajcan et Tollenaar, 1999 ; Borell *et al.*, 2000 ; Kumudini *et al.*, 2002).

Il a été montré que des lignées d'*Arabidopsis* et de maïs, présentant une sénescence retardée, remobilisaient mieux leur N (Diaz *et al.*, 2005 ; Martin *et al.*, 2005). Schulte auf'm Erley *et al.* (2007) supposent que l'amélioration du rendement chez des colzas cultivés en conditions de fertilisation azotée limitante implique (i) un fort contenu en N dans les jeunes feuilles jusqu'au stade floraison, (ii) un retard de sénescence foliaire et (iii) de fortes capacités photosynthétiques en dépit des faibles intensités lumineuses reçues durant le stade végétatif. A moyen terme, il serait donc pertinent d'étudier le niveau d'accumulation de BnD22 chez des variétés présentant des vitesses contrastées de mobilisation du N foliaire. Ces données permettraient de montrer s'il existe une corrélation entre le niveau d'accumulation de cette protéine et l'EUA. Actuellement, dans le cadre de programmes de recherche Genoplante (projets ARCOLE² et GENERGY³), l'étude des niveaux de transcrits de BnD22 est en cours d'analyse chez différentes variétés de colza.

Certains travaux ont également montré que les phénotypes « stay-green » présenteraient des rendements augmentés (ou identiques aux plantes témoins) lorsqu'ils sont soumis à des stress environnementaux tels qu'une contrainte hydrique (Borell *et al.*, 2000 ; Kumudini *et al.*, 2002 ; Rivero *et al.*, 2007). Par exemple, chez le tabac, Rivero *et al.* (2007) ont montré qu'un retard de la chute des feuilles contribue à une baisse du rendement de seulement 12% dans des conditions d'apport en eau diminuée de 70%. Ces résultats suggèrent que l'amélioration des rendements *via* des phénotypes « stay-green » est probablement due à une résistance accrue de ces plantes à diverses contraintes environnementales.

La protéine BnD22 a été identifiée chez des jeunes feuilles de colza soumis à une contrainte hydrique (Reviron *et al.*, 1992). De plus, nos travaux révèlent la présence de BnD22 chez des jeunes feuilles de colza privées en N présentant un retard de sénescence et un maintien des contenus en chlorophylles. Dans ce contexte, il serait intéressant de réaliser des expériences de transgénèse et de mutagenèse dirigée visant respectivement à sur-exprimer et à réprimer l'expression de la protéine BnD22 chez des colzas afin de préciser le rôle fonctionnel de cette protéine dans les processus de résistance à un ensemble de stress abiotiques voire biotiques. Ainsi, il est probable que des plantes sur-exprimant la protéine BnD22, présenteraient un phénotype de type « stay-green », caractérisé par un rythme d'émission de nouvelles feuilles plus lent (feuilles moins nombreuses) et/ou une chute des feuilles retardée.

²ARCOLE : Efficacité de la nutrition azotée du colza de printemps : identification de cibles de sélection.

³GENERGY : Improvement of the oil yield of the rapeseed crop in the context of the biofuel production

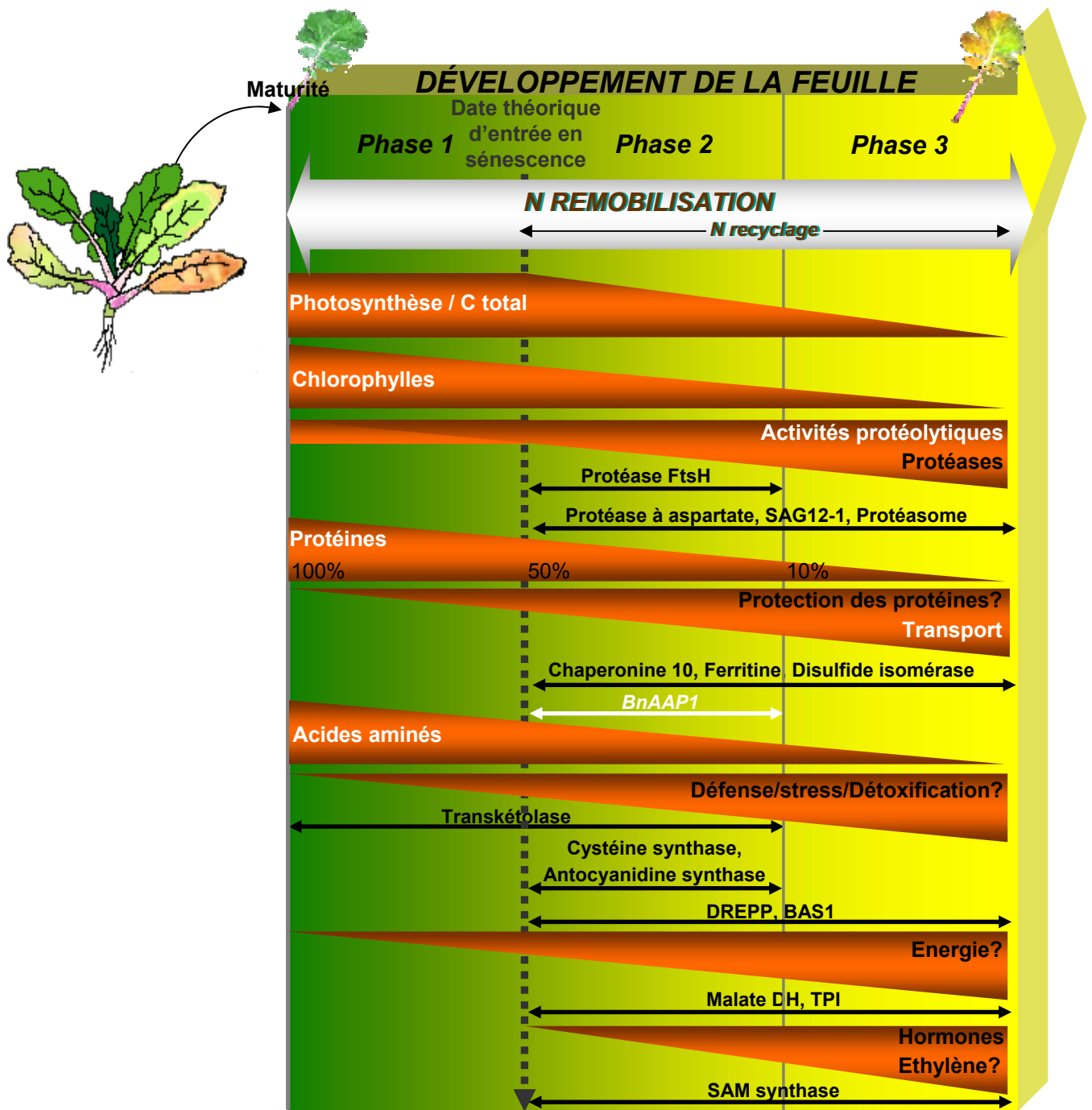


Figure VII-3 : Schéma de synthèse remplaçant les évènements physiologiques, biochimiques et moléculaires associés à l'azote d'un rang foliaire de colza, de sa maturité à son abscission. Schéma réalisé à partir des données obtenues dans les Chapitres V et VI. La date théorique d'entrée en sénescence, déterminée par les gènes *SAG12/Cab*, est représentée par une flèche en pointillés. Les trois phases déterminées dans le chapitre V sont remplacées en fonction de la date théorique d'entrée en sénescence ainsi que de l'évolution des protéines. Les phases 2 et 3 correspondent aux processus de recyclage de l'azote. L'évolution et le niveau de la photosynthèse, du C total, des chlorophylles, des activités protéolytiques, des protéines, et des acides aminés sont représentés au cours du développement. Les protéines d'intérêt identifiées sont mentionnées (flèches noires). Les protéines caractérisées à l'issue de l'analyse protéomique sont remplacés (flèches) dans les différentes phases de développement de la feuille en fonction de leur groupe fonctionnel : protéases, protection des protéines, transport, défense/stress/détoxification, métabolisme énergétique, hormones. BAS1 : 2-Cys peroxiredoxine BAS1, BnAAP1 : Transporteur d'acides aminés, DH : Déshydrogénase, SAG12 : Protéase à cystéine induite spécifiquement pendant la sénescence, SAM : S-adenosylméthionine, TPI : Triose phosphate isomérase.

La présence de protéines telles que BnD22, en tant qu'inhibiteur de protéases ou WSCP, peut jouer un rôle important dans le maintien du contenu en azote et/ou des capacités photosynthétiques. Cette double fonction pourrait contribuer à améliorer de manière significative l'EUA. Toutefois, même si les inhibiteurs de protéases jouent un rôle important dans la régulation du processus de sénescence, ils ne sont certainement pas les seuls à être impliqués. En effet, les protéases impliquées dans la dégradation des protéines foliaires sont également suspectées d'intervenir dans le processus de régulation de la sénescence. Toutefois, à ce jour, les protéines et plus particulièrement les systèmes protéolytiques impliqués dans la mobilisation du N foliaire sont encore mal connus. Ainsi, un des objectifs de ce travail de thèse a consisté à étudier les modifications du protéome de la feuille associées aux événements physiologiques, biochimiques et moléculaires qui se produisent au cours de la sénescence séquentielle.

II. RÉGULATION DE LA REMOBILISATION DE L'AZOTE AU COURS DE LA SÉNESCENCE FOLIAIRE

Les données obtenues au cours de cette thèse (Chapitres V et VI) ont permis de réaliser un schéma de synthèse rendant compte de la chronologie des différents événements physiologiques, biochimiques et moléculaires intervenant au cours de la remobilisation de l'azote foliaire (Figure VII-3).

II.1 Chronologie des d'événements physiologiques, moléculaires et protéomiques associés au processus de sénescence foliaire

Les résultats présentés dans les Chapitres V et VI ont permis d'établir la chronologie des événements physiologiques, moléculaires, biochimiques associés au processus de remobilisation du N (N total, activités protéolytiques, protéines, acides aminés et protéines associées induites) et de la sénescence foliaire (C total, chlorophylles et capacités photosynthétiques, protéines associées induites) (Figure VII-3). La confrontation des résultats de ces 2 études indépendantes a été rendu possible grâce à *SAG12/Cab*, l'indicateur moléculaire de la sénescence foliaire récemment développé chez le colza par Gombert et al. (2006). Comme nous l'avons décrit en détails dans le Chapitre III, le changement du niveau

de transcrits de ces deux gènes est utilisé pour déterminer la date théorique d'entrée en sénescence d'un rang foliaire. A partir de ce point de repère, on peut alors se demander :

- à quels évènements (spécifiquement liés à la remobilisation de N et à la sénescence) est associée cette date d'entrée en sénescence ?
- quels sont les évènements majeurs qui sont modifiés avant et après cette date?
- quel est l'impact d'une privation en N minéral sur la séquence et la chronologie de ces évènements ?

Notre étude a permis de caractériser plus finement le rôle de cet indicateur au cours du processus de mobilisation du N. La discussion concernant les évènements liés à la sénescence sera donc divisée en deux parties. Les évènements associés à la remobilisation du N avant la date théorique d'entrée en sénescence seront décrits dans un premier temps. Cette phase est caractérisée par la dégradation des composés azotés rapidement et préférentiellement mobilisables (nitrate, acides aminés, protéines solubles) sans conduire à d'importantes perturbations métaboliques. Dans un second temps, les évènements se produisant pendant la phase de recyclage du N c'est-à-dire correspondant à la remobilisation des composés azotés difficilement mobilisables, car pour une grande majorité associés aux structures cellulaires (membranes, paroi) seront abordés.

II.1.1 La remobilisation de l'azote avant la date théorique d'entrée en sénescence

Cette phase est délimitée du stade de maturité de la feuille à la date théorique d'entrée en sénescence (Figure VII-3). Dans les conditions non limitantes en nitrate, cette phase est caractérisée par une diminution de 50% du N total et de 40% des contenus initiaux en chlorophylles. La chute des quantités des deux principaux pools de réserves N facilement mobilisables (protéines solubles et acides aminés) également observée pendant cette phase, explique la diminution du N total. La dégradation des protéines solubles lors de cette phase peut, en partie, être expliquée par le niveau constitutif de l'activité protéolytique. La détection de ces activités par zymogrammes 1-D a permis d'identifier qu'une (ou plusieurs) protéine(s) à 76 kDa étai(en)t à l'origine de cette activité protéasique. L'analyse protéomique révèle que la dégradation de la protéine foliaire majoritaire, la RuBisCO, suit la dégradation des protéines totales (données non présentées). De nombreuses études ont tenté de comprendre les mécanismes de dégradation de cette protéine (Yoshida et Minamikawa 1996 ; Minamikawa *et al.*, 2001 ; Chiba *et al.*, 2003). Récemment, Ishida *et al.* (2008) ont montré que la RuBisCO et les autres protéines du stroma pouvaient être mobilisées vers les vacuoles grâce au processus d'autophagie sans que cela se manifeste par une dégradation des chloroplastes. En effet, il

semblerait que les membranes de l'enveloppe chloroplastidiale gardent leur intégrité assez tardivement durant le processus de sénescence.

Toutefois, cette phase est également caractérisée par un maintien des capacités photosynthétiques et des quantités de C total. Certaines protéines telles que la protéine transkétolase présentent un niveau d'abondance élevé, suggérant la mise en place de systèmes de protection cellulaire au début du processus de sénescence (Lois *et al.*, 1998). La transkétolase est une enzyme catalysant la synthèse d'un précurseur des isoprénoïdes impliqués dans la synthèse des hormones, des pigments chlorophylliens et des transporteurs d'électrons (Lois *et al.*, 1998). Cette enzyme peut également être à l'origine de la synthèse de précurseurs de thiamine (vitamine B1), un cofacteur nécessaire à l'activité de certaines enzymes telles que la pyruvate déshydrogénase, une enzyme clé du métabolisme énergétique (Jacob-Wilk *et al.*, 1997).

En réponse à une privation en N, la date d'entrée théorique en sénescence est beaucoup plus précoce, et la phase de remobilisation des réserves N facilement mobilisables dure beaucoup moins longtemps (110°C.J) comparativement à ce qui a pu être observé chez des plantes cultivées en présence d'une fertilisation N non limitante (témoins) (300°C.J). La précocité de la date théorique d'entrée en sénescence déterminée par l'indicateur moléculaire *SAG12/Cab* rend donc parfaitement compte (i) de l'accélération de l'initiation de la sénescence foliaire en conditions de privation ou carence azotée (Gombert *et al.*, 2006) mais également (ii) d'une mobilisation rapide des réserves N. La mobilisation rapide des protéines solubles chez des feuilles de colza privé en N peut s'expliquer par l'augmentation significative des activités protéolytiques comparativement aux plantes témoins. Les zymogrammes 1-D permettent également de montrer que cette induction des activités protéolytiques n'est pas due à la mise en place de protéases spécifiques, mais à une augmentation de l'activité des protéases existantes. L'induction de ces activités protéolytiques et la diminution des quantités de protéines pourraient être également liées à une chute du niveau d'inhibiteur de protéases tels que BnD22 (cf. § I.3).

Les capacités photosynthétiques chutent très rapidement en réponse à la privation en N. Des mesures de conductance stomatique ont montré que cette diminution de la photosynthèse est pour partie attribuable à une fermeture précoce des stomates en réponse à la privation en N minéral (données non présentées). Ces résultats sont en accord avec ceux observés chez la laitue et le blé de printemps (Broadley *et al.*, 2000 ; Shangguan *et al.*, 2000). Une corrélation entre les capacités photosynthétiques et la conductance stomatique a été montrée chez le

tournesol, le sorgho et le blé (Cechin et Fumis, 2004 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Del poso *et al.*, 2007).

La diminution de la capacité photosynthétique conduit à une réduction de la production des photoassimilats (Feller et Fischer 1994). Au cours de notre étude, les quantités de C total des feuilles de colza privé en N, augmentent de 25% après 4 jours de traitement (c'est-à-dire quelques jours avant que la sénescence commence). Par rapport à la baisse des capacités photosynthétiques et des teneurs en chlorophylles, les quantités de C total diminuent plus tardivement. Cette augmentation des quantités de C total est observée très précocement et peut s'expliquer par une accumulation des sucres dans les cellules foliaires. Wingler *et al.* (2004) ont montré que, lors d'une privation en N, l'induction de la sénescence foliaire était plus importante chez des plantes d'*Arabidopsis* cultivées sur un milieu enrichi en glucose. De plus, l'effet inhibiteur de l'accumulation des sucres sur la photosynthèse (Pego *et al.*, 2000) pourrait expliquer cette diminution plus précoce des activités photosynthétiques. Les observations faites sur feuille de colza interrogent donc sur l'implication des sucres dans la régulation du processus de sénescence.

II.1.2 La remobilisation de l'azote de la date théorique d'entrée en sénescence jusqu'à l'abscision

La phase de remobilisation du N observée après la date théorique d'entrée en sénescence correspond à la remobilisation du reste des composés N solubles (facilement mobilisables) et au recyclage des composés N des organites cellulaires, dont la mobilisation est plus difficile car nécessitant une dégradation préalable des structures cellulaires (membranes, paroi). Elle regroupe la phase intermédiaire (Phase 2) et la phase terminale (Phase 3) de la sénescence (Figure VII-3). Elle débute à la date théorique d'entrée en sénescence et est associée à de nombreux changements biochimiques et métaboliques.

En conditions limitantes en N minéral, la séquence des principaux évènements associés à la sénescence et la remobilisation du N est similaire à celle observée en condition de sénescence naturelle. Pic *et al.* (2002) ont également montré que des feuilles de pois soumis ou non à un faible stress hydrique possédaient des séquences d'évènements macroscopiques, biochimiques et moléculaires similaires. Etant donné que la privation en N accélère l'initiation de la sénescence, cette phase de recyclage débute beaucoup plus tôt comparativement à une sénescence naturelle. Chez les feuilles de colza privé en N, cet évènement conduit donc à une durée de recyclage plus importante que chez les feuilles de colza témoin. Ces différences de durée de recyclage du N foliaire pourraient expliquer la faible quantité de N résiduel lors d'une privation en N.

➤ **La sénescence entraîne une réduction des capacités photosynthétiques et des perturbations du métabolisme énergétique**

Les capacités photosynthétiques et les quantités de C total diminuent plus tardivement que les teneurs en chlorophylles (Figure VII-3). Le maintien des quantités de C total pourrait s'expliquer par des teneurs endogènes en sucres solubles, principalement glucose et fructose, qui augmentent transitoirement durant la sénescence foliaire. Cette accumulation de sucres a été montrée chez de nombreuses espèces (soja, maïs, tabac, *Arabidopsis*, ricin, orge ; Noodén *et al.*, 1997 ; Wingler *et al.*, 1998 ; Masclaux *et al.*, 2000 ; Stressman *et al.*, 2002 ; Jongebloed *et al.*, 2004 ; Parrot *et al.*, 2005) et pourrait contribuer à fournir des substrats directement utilisables pour alimenter le métabolisme énergétique au niveau des mitochondries, organites dont l'intégrité est maintenue jusqu'à des stades tardifs de sénescence (Quirino *et al.*, 2000; del Rio *et al.*, 2003 ; Yoshida, 2003).

Cependant, à terme, la réduction des capacités photosynthétiques contraint la cellule à produire de l'énergie en utilisant des substrats autres que glucidiques, comme par exemple des acides gras issus de la dégradation des lipides membranaires. Les produits de dégradation de ces métabolites obtenus après β -oxydation et cycle du glyoxylate au niveau des glyoxysomes, sont utilisés au niveau du cycle de Krebs, et permettent d'alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale aboutissant à la production d'ATP.

Notre étude protéomique a montré l'induction d'enzymes telles que la triose phosphate isomérase (TPI ; Figure VII-3), impliquée dans la glycolyse (Nicolas *et al.*, 2004), et la malate déshydrogénase (Figure VII-3) à l'origine de la synthèse d'oxaloacétate pour la production d'ATP (Pistelli *et al.*, 1992). L'ensemble de ces résultats montre que l'entrée en sénescence se traduit par l'induction d'enzymes clés du métabolisme énergétique nécessaires à la synthèse d'ATP. Ceci suggère que la sénescence foliaire provoque une réorientation du métabolisme cellulaire afin d'assurer la production d'énergie nécessaire au bon fonctionnement des enzymes hydrolytiques. De plus, il est possible que le maintien du métabolisme énergétique fasse intervenir des systèmes de défense permettant de préserver certains organites, comme par exemple les mitochondries.

➤ **L'entrée en sénescence s'accompagne de l'induction de protéines impliquées dans la réponse aux stress**

Notre étude protéomique a permis d'identifier la présence de certaines protéines associées aux mécanismes de défense, de réponse au stress, de détoxification au cours de la sénescence foliaire. En effet, la présence de la transkétolase, la DREPP, l'anthocyanidine synthase, la déshydroascorbate réductase, la cystéine synthase et la 2-cys peroxirédoxine BAS1 (Figure

VII-3) supposent la mise en place de système de protection et de détoxication. La transkétolase et la DREPP sont des protéines de réponse au stress (Kawamura et Uemura, 2007 ; Jacob-Wilk *et al.*, 1997). La déshydroascorbate réductase, la cystéine synthase et la 2-cys peroxirédoxine BAS1 (Figure VII-3) contribuent à lutter contre les stress oxydatifs *via* la production d'antioxydants tels que l'ascorbate, le glutathion (May *et al.*, 1998 ; Baier *et al.*, 2000 ; Chen et Gallie, 2006). Il est important de noter que la dégradation des chlorophylles entraîne une augmentation des ROS capable de provoquer d'importantes perturbations métaboliques (Mittler *et al.*, 2004). Ces ROS sont de puissants oxydants responsables de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, lipides,...) qui peuvent affecter considérablement les mécanismes cellulaires. La mise en place de l'ensemble de ces mécanismes de défense pourrait contribuer à une meilleure efficacité du recyclage du N en préservant la fonctionnalité de certains tissus foliaires et/ou compartiments cellulaires.

Les protéines impliquées dans les phénomènes de repliement nécessaire à la conformation de nombreuses protéines semblent avoir un rôle important dans le processus de sénescence foliaire. En effet, l'étude protéomique a révélé la présence de protéines chaperones : la ferritine, la chaperonine 10 et la disulfide isomérase (Figure VII-3). Ces protéines sont connues pour intervenir dans le repliement des protéines (Wang *et al.*, 2004 ; Wadahama *et al.*, 2007). Il est possible que ces protéines contribuent au maintien de la fonctionnalité de protéines diverses et plus particulièrement de certaines protéases.

➤ **Les stades tardifs de la sénescence foliaire s'accompagnent de l'induction de protéines impliquées dans la synthèse des phytohormones**

Les mécanismes de sénescence sont tout particulièrement sous la dépendance de certaines phytohormones ou de balance hormonale (Thomas et Stoddart, 1980). La présence de la protéine S-adénosylméthionine (SAM) synthase (Figure VII-3) pose de nombreuses questions quant à la synthèse d'éthylène au cours du recyclage du N. En effet, la SAM synthétase catalyse la synthèse de SAM, un précurseur de la biosynthèse de l'éthylène (Yang et Hoffman, 1984). Chez plusieurs espèces, l'application exogène d'éthylène déclenche les processus associés à la sénescence tels que la dégradation des chlorophylles et des protéines (Mattoo et Aharoni, 1988). La présence accrue de la SAM synthase au cours des phases 2 et 3 du recyclage du N (Figure VII-3) suggère que la synthèse d'éthylène pourrait accélérer le processus de sénescence foliaire. De plus, la 12-oxophytodienoate réductase, une enzyme intervenant dans la biosynthèse du JA, a également été identifié à des stades tardifs de la sénescence foliaire (He *et al.*, 2002). Etant donné que le JA est connu pour accélérer le

processus de remobilisation du N, ce résultat suppose l'intervention de cette phytohormone au cours de la sénescence.

➤ **Le recyclage du N au cours de la sénescence se fait de manière coordonnée via l'induction de systèmes protéolytiques spécifiques et de l'expression de transporteurs des produits de protéolyse.**

La dégradation des protéines et le transport des acides aminés durant cette phase de recyclage du N, caractérisée par la dégradation des composés difficilement mobilisables constituent des étapes importantes du vidage en N des feuilles. En effet, la dégradation de ces protéines foliaires difficilement mobilisables par des protéases spécifiques pourrait expliquer l'augmentation brutale des activités protéolytiques totales. En plus de l'activité protéolytique à 76 kDa, les zymogrames 1-D ont permis d'identifier l'apparition de deux nouvelles activités protéolytiques à 99 et 101 kDa, concomitante à l'augmentation des activités protéolytiques totales. L'identification des protéases apporterait de nouvelles informations. Chez les plantes privées en N, la dégradation des protéines fait intervenir les mêmes protéases qu'en situation non limitante en N. Récemment, Martinez *et al.* (2007) ont également montré l'intervention des mêmes protéases au cours de la sénescence de feuilles de blé soumis ou non à un stress hydrique. Toutefois, il semblerait que la mise en place plus précoce des systèmes protéolytiques contribue à un meilleur vidage en N des feuilles.

Cependant, notre analyse protéomique apporte certaines informations sur les protéases impliquées au cours du recyclage du N. La protéase FtsH semble intervenir seulement au début de cette phase alors que la protéase à aspartate, le protéasome et la protéase à cystéine, SAG12-1, sont présents tout au long de la sénescence (Figure VII-3). La protéase FtsH est connue pour intervenir dans la dégradation des protéines associées aux membranes thylakoïdiennes durant la sénescence foliaire chez des plantes d'*Arabidopsis* (Lindahl *et al.*, 2000; Zeliko *et al.*, 2005). La présence de FtsH suggère un rôle dans la dégradation des protéines du PSII comme cela a été suggéré par Schiltz *et al.* (2004). L'ensemble de ces données, combinées à celles du § II.1.1, suggèrent donc une dégradation des chloroplastes en deux temps : (1) une dégradation de la protéine majoritaire, la RuBisCO, ainsi que des autres protéines du stroma sans perte d'intégrité membranaire des chloroplastes grâce au processus d'autophagie (Ishida *et al.*, 2008), (2) une perte de l'intégrité membranaire des chloroplastes via la mise en place de systèmes protéolytiques tels que la protéase FtsH.

La protéase à aspartate a déjà été identifiée au cours du processus de sénescence chez *Brassica napus* (Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997), mais sa (ou ses) cible(s) est (sont)

inconnue(s). L'induction de la sous-unité beta 1 du protéasome lors de l'analyse protéomique suppose l'implication protéolytique du protéasome au cours du recyclage du N. Cette voie protéolytique est suspectée d'avoir un rôle au cours de la sénescence par le fait que certains gènes codant des protéines du système ubiquitine protéasome 26S ont un niveau d'expression qui augmente au cours de la sénescence (Park *et al.*, 1998 ; Gepstein *et al.*, 2003). La protéine à cystéine, SAG12-1, est la protéine la plus fortement induite au cours de la sénescence foliaire à des stades tardifs. Chez le colza, deux gènes *SAG12* homologues ont été caractérisés, *BnSAG12-1* et *BnSAG12-2* (Noh et Amasino, 1999). Le gène *BnSAG12-1* présente un haut niveau d'expression pendant la sénescence, tout comme le gène *SAG12* chez *Arabidopsis*, alors que l'expression du gène *BnSAG12-2* est beaucoup plus faible. Une activité protéase à cystéine de type SAG12 a été décelée dans des compartiments émergents appelés Senescence-Associated Vacuoles (SAVs ; Otegui *et al.*, 2005). L'étude de mutants *sag12* chez *Arabidopsis* a montré que la sous-expression de ce gène conduit à une croissance et une sénescence identiques à celles observées chez des plantes de type sauvage (Otegui *et al.*, 2005). Ces observations ne remettent pas en cause la contribution de SAG12 dans les processus de protéolyse associée à la sénescence et suggèrent que d'autres protéases ont probablement compensé l'absence de *SAG12*. Dans notre étude, le fait que le niveau d'abondance de la protéine SAG12-1 soit augmenté d'un facteur 13 suggère un rôle très important de cette protéase à cystéine dans les phases ultimes de recyclage du N protéique chez les feuilles sénescentes du colza.

La dégradation des protéines génère des pools d'acides aminés, transportés par la suite vers les organes puits *via* le phloème. Notre étude montre que les quantités d'acides aminés diminuent au cours du recyclage du N (Figure VII-3). Cette diminution est concomitante à une forte accumulation de transcrits codant des transporteurs d'acides aminés de type BnAAP1 (Figure VII-3). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Tilsner *et al.* (2005) chez des feuilles sénescentes de colza. Même si ces résultats doivent être confirmés pour d'autres transporteurs d'acides aminés, il semble que le chargement des acides aminés du phloème n'est pas le facteur limitant de la remobilisation d'azote dans les feuilles de colza.

Réalisés à différentes échelles (physiologique, biochimique, protéomique, moléculaire), les travaux rassemblés dans ce manuscrit de thèse ont permis de progresser de manière significative dans l'identification, la compréhension et la chronologie des principaux processus impliqués dans la remobilisation de l'azote des feuilles de colza touchées par la

sénescence séquentielle (stade rosette). Néanmoins, un certain nombre d'interrogations demeurent. Parmi les questions qui restent en suspens, on peut relever celles-ci :

- Existe-t-il d'autres protéines impliquées dans la remobilisation de l'azote foliaire ?
- Les modifications du protéome sont-elles les mêmes dans les feuilles qui sénescent au stade rosette et à des stades plus avancés du cycle de développement (montaison, floraison) ?
- Les modifications du protéome observées sur les feuilles sénescentes de la variété de colza Capitot sont-t-elles généralisables à d'autres variétés ?
- Quels sont les facteurs de régulations de la mobilisation du N foliaire ?

Ce travail de recherche doctoral ouvre donc de nouvelles perspectives de recherche sur la caractérisation des processus de remobilisation de l'azote foliaire et permet d'envisager de nouvelles pistes d'investigations concernant les voies d'amélioration de l'EUA.

II.2 Perspectives

II.2.1 Perspectives liées à la caractérisation et la régulation des événements biochimiques, protéomiques et moléculaires intervenant dans la remobilisation de l'azote foliaire

- Notre analyse protéomique a été focalisée sur les protéines dont l'abondance augmentait de manière significative au cours de phases plus ou moins avancées de sénescence induite par une carence ou une privation en azote minéral (Chapitre V). **Cette analyse du protéome pourrait être élargie à l'étude des protéines préférentiellement dégradées et aux protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations/déphosphorylations.** De plus, une étude cinétique du protéome foliaire sur des pas de temps courts (tous les 4 jours) au lieu de 7 jours (comme effectué dans notre première étude présentée § V) permettrait (i) de vérifier les résultats obtenus au cours de la première étude protéomique et (ii) d'identifier potentiellement d'autres protéines spécifiquement impliquées dans le phénomène de remobilisation du N. A plus long terme, une étude du protéome foliaire de variétés de colza présentant des vitesses de remobilisation du N contrastées pourrait être envisagée afin de déterminer les modifications du protéome permettant d'expliquer les différences variétales en termes de capacités de vidage de l'azote foliaire. De plus, coupler ces études du protéome à des études complémentaires des

modifications du transcriptome permettrait d'avoir accès à une meilleure compréhension des processus liés à une remobilisation efficace du N foliaire.

- Les zymogrammes présents au sein du Chapitre VI ont permis de monter l'augmentation de l'activité protéolytique observée à pH 5 et la présence d'activités protéolytiques à différents poids moléculaires. Il serait également intéressant d'analyser l'évolution des activités protéolytiques à pH 7,5, sachant que les travaux d'Ilami *et al.* (1997) ont montré une augmentation des activités protéolytiques aux pH 5 et 7,5 dans les feuilles sénescences de colza. De plus, l'identification des protéases (protéase à cystéine, à sérine, à aspartate...) à l'origine de ces activités apporterait de nouvelles informations concernant le processus de protéolyse associée à la sénescence. La comparaison de gels 1-D colorés au nitrate d'argent avec les zymogrammes permettrait de déterminer les bandes protéiques correspondantes. Le séquençage de ces bandes au LC MSMS pourrait être utilisé pour identifier les protéases cibles, à conditions que celles-ci soient en quantité suffisante.
- De nombreuses études ont montré une accumulation transitoire des glucides en début de sénescence foliaire (Noodén *et al.*, 1997 ; Wingler *et al.*, 1998 ; Masclaux *et al.*, 2000 ; Stressman *et al.*, 2002 ; Jongebloed *et al.*, 2004 ; Parrot *et al.*, 2005). De plus, une augmentation des quantités de C total chez les plantes privées en N a été observée au début du processus de remobilisation du N (Chapitre VI). Un dosage des glucides (glucose, fructose, saccharose) au cours des phases précoces de la sénescence permettrait de savoir si cette augmentation de C total est due à une accumulation des glucides et d'évaluer le rôle de ces composés carbonés dans les processus de régulation de la sénescence foliaire.

II.2.2 Pistes à envisager pour l'amélioration de l'EUA chez le colza

Pour améliorer l'EUA du colza d'hiver, une attention toute particulière doit être portée sur l'amélioration du vidage des feuilles en azote, lesquelles peuvent chutées avec des niveaux d'azote résiduel relativement élevé notamment au stade végétatif. A partir du modèle de répartition du N établi sur colza par Malagoli *et al.* (2005b), il a été montré qu'une augmentation significative (+15%) de la teneur en N dans les graines ou du rendement était observée suite à une réduction de la teneur résiduelle (scénario S1) des feuilles du bas du couvert (égal à 1%) ou à un prolongement de leur durée de vie (scénario S3) (Malagoli *et al.*, 2005b).

Une voie de progrès résiderait donc dans la sélection de variétés de colza capables de restituer peu de N au sol. Pour cela, la durée de la période de recyclage de l'azote semble être un trait physiologique important. Les différentes études réalisées au sein de cette thèse conduisent à émettre l'hypothèse que « des colzas efficaces en N pourraient être caractérisés par (i) des feuilles qui stockent plus de N au cours de leur phase de croissance et (ii) des feuilles sénescentes qui se vident mieux en N ». L'étude de la mobilisation de l'azote au sein d'un rang foliaire mature privé ou non en azote a révélé que la conjonction d'une sénescence précoce, d'une protéolyse rapide, et d'une augmentation de la durée et de l'intensité du recyclage du N, conduisait à de faibles niveaux en N résiduel au sein des feuilles chutées (Chapitre VI).

- **A court terme/ moyen terme**, ces résultats seront à confirmer sur un autre rang foliaire afin de savoir s'il existe une corrélation entre la durée de recyclage du N et les teneurs en N résiduel des feuilles chutées. Puisque la date théorique d'entrée en sénescence, déterminée par les gènes *SAG12/Cab*, marque le point de départ de la période de recyclage et que la chute de la feuille correspond à la fin de la phase de recyclage, il sera facile d'en déduire la durée de recyclage du N et de déterminer le niveau de corrélation de ce paramètre avec la quantité de N résiduel. Une fois la corrélation établie, l'étude de la variabilité génotypique pourrait être conduite en se basant sur les gènes *SAG12/Cab*. Cet indicateur moléculaire pourrait donc être un outil important dans la sélection variétale. Par la suite, il serait alors intéressant de réaliser des analyses protéomiques chez plusieurs variétés possédant des EUA contrastées afin de vérifier si ces différences sont associées à des modifications du protéome (cf. paragraphe précédent II.2.1). En effet, existe-il des protéines (notamment des protéases) spécifiques chez les variétés performantes en termes de mobilisation de l'azote ? L'induction plus précoce de ces protéines (ou protéases) explique-t-elle cette différence de mobilisation ? Une approche par mutagenèse dirigée pourrait également être réalisée chez le colza afin de déterminer l'importance de ces protéines dans le processus de mobilisation de l'azote foliaire.
- **A long terme**, la caractérisation de protéines spécifiquement impliquées dans la remobilisation du N grâce à l'étude protéomique pourrait aboutir à une stratégie « protéines candidates » visant à identifier des QTL de l'EUA. La variation génétique de l'expression des protéines pourrait être mise en relation avec la variation des caractères phénotypiques. Cette approche serait basée sur l'identification de protéines dont les

variations de quantités auraient une influence sur l'EUA. Il est en effet possible de cartographier les Quantitative Trait Loci (QTL) des protéines (Damerval *et al.*, 1994). Ces QTL appelés Protein Quantity Loci (PQL) auraient une influence sur la quantité de protéines dans les feuilles et dans des conditions environnementales données. Si la variation de la quantité d'une protéine a une influence sur l'EUA alors les PQL de cette protéine sont aussi des QTL de l'EUA.

Il est possible qu'il existe, d'ores et déjà, une variabilité génotypique importante au niveau des capacités de recyclage de l'azote foliaire chez le colza d'hiver. La recherche de variétés, capables de remobiliser fortement et régulièrement l'azote des parties végétatives au profit de la graine, permettrait de réduire la quantité de N des résidus foliaires de culture de colza.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A**dam Z., Clarke A.K. (2002). Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends Plant Sci.* **7**, 451-456.
- Aerts R., Chapin F.S.** (2000). The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* **30**, 402-407.
- Ahsan N., Lee D.G., Lee S.H., Kang K.Y., Bahk J.D., Choi M.S., Lee I.J., Renaut J., Lee B.H.** (2007). A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiologia Plantarum* **131**, 555-570.
- Allen J.F., Forsberg J.** (2001). Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends. Plant. Sci.* **6**, 317-326.
- Aloni R., Schwalm K., Langhans M., Ullrich C.I.** (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **216**, 841-853.
- Andrews S.C., Arosio P., Bottke W., Briat J.F., von Darl M., Harrison P.M., Lahlere J.P., Levi S., Lobreaux S., Yewdall S.J.** (1992). Structure, function, and evolution of ferritins. *J. Inorg. Biochem.* **47**(3-4), 161-174.
- Annamalai P., Yanagihara S.** (1999). Identification and characterization of a heat-stress induced gene in cabbage encodes a Kunitz type protease inhibitor. *J. Plant Physiol.* **155**, 226-233.
- Avice J.C.** (1996). Mobilisation des réserves azotées et carbonées chez *Medicago sativa* L. : étude par marquage ¹³C et ¹⁵N, caractérisation des protéines de réserve du pivot et relation avec le potentiel de repousse après une coupe. Thèse de Doctorat, Université de Caen, France, 135p.
- Avice J.C., Ourry A., Lemaire G., Boucaud J.** (1996). Nitrogen and carbon flows estimated by ¹⁵N and ¹³C pulse-chase labelling during regrowth of Alfalfa. *Plant Physiol.* **112**, 281-290.
- B**achmann A., Fernández-López J., Ginsburg S., Thomas H., Bouwcamp J.C., Solomos T., Matile P. (1994). *Stay-green* genotypes of *Phaseolus vulgaris* L.: chloroplast proteins and chlorophyll catabolites during foliar senescence. *New Phytol.* **126**, 593-600.
- Baier M., Dietz K.J.** (1997). The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J.* **12**(1), 179-90.

- Baier M., Ströher Noctor G., Foyer C.H., Dietz K.J.** (2000). Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzyme associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. *Plant Physiol.* **120**, 823-832.
- Balibrea Lara M.E., Gonzales Garcia M.C., Fatima T., Ehneß R., Lee T.K., Proels R., Tanner W., Roitsch T.** (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell* **16**, 1276-1287.
- Balint T., Rengel Z., Allen D.** (2008). Australian canola germplasm differs in nitrogen and sulphur efficiency. *Australian Journal of Agricultural Research* **59**, 167-174.
- Bartling D., Seedorf M., Schmidt R.C., Weiler E.W.** (1994). Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6021-6025.
- Bate N.J., Rothstein S.J., Thompson J.E.** (1991). Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis-specific genes during leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **42**, 801-811.
- Batt T., Woolhouse H.W.** (1975). Changing activities during senescence and sites of synthesis of photosynthetic enzymes in leaves of the Labiate, *Perilla frutescens* (L.) Britt. *J. Exp. Bot.* **26**, 569-579.
- Baumeister W., Walz J., Zühl F., Seemüller E.** (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-380.
- Beauclair P., Jacquet A.** (2003). Manuel simplifié d'utilisation de l'analyseur de photosynthèse LI-6400 (LICOR, Lincoln, Nebraska, USA). *Cahier Technique I.N.R.A.* **49**, 43-59.
- Beers E.P., Woffenden B.J., Zhao C.S.** (2000). Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* **44**, 399-415.
- Bevan M., Bancroft I., Bent E., Love K., Goodman H., Dean C., Bergkamp R., Dirkse W., Van Staveren M., Stiekema W., et al.** (1998). Analysis of 19 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **391**, 485-488.
- Beyenbach K.W., Wiczorek H.** (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* **209**, 577-589.
- Bhalerao R., Keskitalo J., Sterky F., Erlandsson R., Björkbacka H., Birve S.J., Karlsson J., Gardeström P., Gustafsson P., Lundeberg J., Jansson S.** (2003). Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiol.* **131**, 430-442.
- Bhalla P.L., Dalling M.J.** (1986). Endopeptidase and carboxypeptidase enzymes of vacuoles prepared from mesophyll protoplasts of the primary leaf of wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* **122**, 289-302.

- Blake M.S., Johnston K.H., Russell-Jones G.J., Gotschlich E.C.** (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry* **13**, 6175-179.
- Blum H., Beier H., Gross H.J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gel. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Borell A.K., Hammer G.L., Henzell R.G.** (2000). Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought. II. Dry mater production and yield. *Crop Sci.* **40**, 1037-1048.
- Bown A.W., Shelp B.J.** (1997). The metabolism and functions of γ -aminobutyric acids. *Plant Physiol.* **115**, 1-5.
- Bradford M.M.** (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-54.
- Braun H.P., Schmitz U. K.** (1995). Are the core proteins of the mitochondrial bc(1) complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 171– 175.
- Broadley M.R., Escobar-Outierrez, Burns, A., Burns I.G.** (2000). What the effect of nitrogen deficiency on growth components of lettuce? *New Phytol.* **147**, 519-526.
- Brouquisse R., Masclaux C., Feller U., Raymond P.** (2001). Protein hydrolysis and nitrogen remobilisation in plant life and senescence. In : *Plant nitrogen*, P. Lea and J.F. Morot-Gaudry, eds (INRA, Springer-Verlag), pp 275-293.
- Brugière N., Dubois F., Masclaux C., Sangwan R.S., Hirel B.** (2000). Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta* **211**, 519-527.
- Buchanan-Wollaston V.** (1994). Isolation of cDNA clones that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific methallothionein-like protein. *Plant physiology* **105**, 313-319.
- Buchanan-Wollaston V.** (1997). The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **48**, 181-199.
- Buchanan-Wollaston V., Ainsworth C.** (1997). Leaf senescence in *Brassica napus*: Cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Molecular Biology* **33**, 821-834.
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navapbour S., Page T., Pink D.** (2003). The molecular analysis of leaf senescence a genomic approach. *Plant Biotech. J.* **1**, 3-22.

- Buchanan-Wollaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K., Leaver C.J.** (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **42**, 567-585.
- Cha K.W., Lee Y.J., Koh H.J., Lee B.M., Nam Y.W., Paeck N.C.** (2002). Isolation, characterization, and mapping of the stay-green mutant in rice. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 526-532.
- Cechin I., Fumis T.F.** (2004). Effect of nitrogen supply on growth and photosynthesis of sunflower plants grown in the greenhouse. *Plant Sci.* **166**, 1379-1385.
- Chan J., De Lumen B.O.** (1982). Properties of trypsin inhibitor from winged bean (*Psophocarus tetragonolobus*) seed isolated by affinity chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **30**, 42-46.
- Chen H.C., Klein A., Xiang M., Backhaus R., Kuntz M.** (1998). Drought- and wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein. *Plant J* **14**, 317-326.
- Chen H.J., Huang L.T., Yap M.N., Lee R.H., Huang Y.J., Cheng M.C., Chen S.C.G.** (2002). Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato. *Plant Cell Physiol.* **43**, 984-991.
- Chen H.J., Hou W.C., Liu J.S., Yang C.Y. Huang D.J., Lin Y.H.** (2004). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding asparaginyl endopeptidase from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) senescent leaves. *J. Exp. Bot.* **55**, 825-835.
- Chen H.J., Huang D.J., Hou W.C., Liu J.S., Lin Y.H.** (2006). Molecular cloning and characterization of granulin-containing cysteine protease SPCP3 from sweet potato (*Ipomoea batatas*) senescent leaves. *J. Plant Physiol.* **163**(8), 863-876.
- Chen Z., Gallie D.R.** (2006). Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol.* **142**, 775-787.
- Chiba A., Ishida H., Nishizawa N.K., Makino A., Tadahiko M.** (2003). Exclusion of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* **44**, 914-921.
- Chichkova S., Arellano J., Vance C.P., Hernández G.** (2001). Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH-glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content. *J. Exp. Bot.* **52**, 2079-2087.
- Cipollini D.F., Bergelson J.** (2000). Environmental and developmental regulation of trypsin inhibitor activity in *Brassica napus*. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 1411-1422.

- Cipollini D.F., Sipe M.** (2001). Jasmonic acid treatment and mammalian herbivory differentially affect chemical defenses and growth of wild mustard (*Brassica kaber*). *Chemoecology* **11**, 137-143.
- Close T.J.** (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* **97**, 795–803.
- Coffeen W.C., Wolpert T.J.** (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell* **16**, 857-873
- Colnenne C., Meynard J.M., Reau R., Justes E., Merrien A.** (1998). Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter oilseed rape. *Ann. Bot.* **81**, 311-317.
- Coque M., Martin A., Veyrieras J.B., Hirel B., Gallais A.** (2008). Genetic variation for N remobilization and postsilking N-uptake in a set of maize recombinant inbred lines. 3. QTL detection and coincidences. *Theor. Appl. Genet.* **117**(5), 729-747.
- Coupe S.A., Sinclair B.K., Weston L.M., Heyes J.A., Eason J.R.** (2003). Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *J. Exp. Bot.* **54**, 1045-1056.
- Creelman R.A., Mullet J.E.** (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4114-4119.
- Creelman R.A., Mullet J.E.** (1997). Oligosaccharides, Brassinolides, and Jasmonates: Nontraditional Regulators of Plant Growth, Development, and Gene Expression. *Plant Cell* **9**, 1211-1223
- Crété P., Caboche M., Meyer C.** (1997). Nitrate reductase expression is regulated at the post-transcriptional level by the nitrogen source in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **11**, 625-634.
- Dai N., Schaffer A., Petreikov M., Shalak Y., Giller Y., Ratner K., Levine A., Granot D.** (1999). Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell* **11**, 1253-1266.
- Damerval C., Maurice A., Josse J.M., de Vienne D.** (1994). Quantitative trait loci underlying gene product variation – a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics* **137**, 289-301.
- De Bellis L., Picciarelli P., Pistelli L., Alpi A.** (1990). Localization of glyoxylate-cycle marker enzymes in peroxisomes of senescent leaves and green cotyledons. *Planta* **180**, 435-439.
- Dejoux J.F., Recous S., Meynard J.M., Trinsoutrot I., Leterme P.** (2000). The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant Soil* **218**, 257-272.

- Del poso A., Perez P., Gutierrez D., Alonso A., Morcuende R., Martinez-Carrasco R.** (2007). Gas exchange acclimation to elevated CO₂ in upper-sunlit and lower-shaded canopy in wheat grown in field chambers. *Environ. Exp. Bot.* **53**, 371-380.
- Del Rio L.A., Sandalio L.M., Altomare D.A., Zinlinskas B.A.** (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J.Exp.Bot.* **54**, 923-933.
- Delorme V.G.R., McCabe P.F., Kim D.J., Leaver C.** (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol.* **123**, 917-927.
- Desclos M., Dubousset L., Etienne P., Bonnefoy J., Lecahérec F., Satoh H., Ourry A., Avice J.C.** (2008). A proteomic profiling approach to reveal a novel role of BnD22 (*Brassica napus* drought 22 kD)/Water Soluble Chlorophyll binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiology* **147**, 1830–1844.
- Dessi P., Rudhe C., Glaser E.,** (2000). Studies on the topology of the protein import channel in relation to the plant mitochondrial processing peptidase integrated into the cytochrome bc1 complex. *The Plant Journal* **24**(5), 637-644.
- Diaz C., Purdy S., Christ A., Morot-Gaudry J.F., Wingler A., Masclaux-Daubresse C.** (2005). Characterization of news markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*: a metabolic profiling approach. *Plant Physiol.* **107**, 207-213.
- Diaz C., Lemaître 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 nitrogen nutrition. *Plant Physiol.* **147**(3), 1437-1449.
- Diepenbrock W.** (2000). Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Field crop research* **67**, 35-49.
- Diop N.N., Kidric M., Repellin A., Gareil M., d'Arcy-Lameta A., Pham Thi A.T., Zuily-Fodil Y.** (2004). A multicystatin is induced by drought stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS letters* **577**(3), 545-50.
- Djennane S., Chauvin J.E., Meyer C.** (2002). Glasshouse behaviour of eight transgenic potato clones with a modified nitrate reductase under two fertilization regimes. *J. Exp. Bot.* **53**, 1037-1045.
- Doelling J.H., Walker J.M., Friedman E.M., Thompson A.R., Viestra R.D.** (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **277**, 33105-33114.
- Dombrowski J.E.** (2003). Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Plant Physiology* **132**, 2098-2107.

- Dominguez F., Cejudo F.J.** (1995). Pattern of endoproteolysis following wheat grain germination. *Physiol. Pant.* **95**, 253-259.
- Downing W.L., Mauxion F., Fauvarque M.O., Reviron M.P., Devienne D., Vartanian N., Giraudat J.** (1992). A *Brassica-napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water-stress in leaves, not in seeds. *The Plant Journal* **2**, 685-693.
- Drake R., John I., Farrell A., Cooper W., Schuch W., Grierson D.** (1996). Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* **30**, 755-767.
- Dreccer M.F., Grashoff C., Rabbinge R.** (1997). Source-sink ratio in barley (*Hordeum vulgare* L.) during grain filling: Effects on senescence and grain protein concentration. *Field Crops Research* **49**, 269-277.
- Dreccer M.F., Schapendonk A.H.M, Salfer G.A., Rabbinge R.** (2000). Comparative response of wheat and oilseed rape to nitrogen supply: absorption and utilisation efficiency of radiation and nitrogen during the reproductive stage determining yield. *Plant Soil* **220**, 189-205.
- E**tienne P. (2001). Régulation de l'expression du gène *tc17*, codant une sous-unité β_1 de protéasome, au cours de la mise en place des réactions de défense des plantes. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, 263p.
- Etienne P., Desclos M., Le Gou L., Gombert J., Bonnefoy J., Maurel K., Le Dily F., Ourry A., Avice J.C.** (2007). N-protein mobilisation associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Functional Plant Biology* **34**, 895-906.
- Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P., Suty L.** (2000). Induction of *tc17*, a gene encoding a β -subunit of proteasome, in tobacco plants treated by elicitors, salicylic ac or hydrogen peroxide. *FEBS Letters* **446**, 213-218.
- F**ang Z., Bouwcamp J., Solomos T. (1998). Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* **49**, 503-510.
- Farmer E.E., Ryan C.A.** (1992). Octadecanoid precursor of jasmonic acid activates the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**, 129-134.
- Feller U.** (1986). In *Plant Proteolytic Enzymes II*, MJ Dalling ed. CRC Press, Cleveland, OH, p. 49.
- Feller U., Fischer A.** (1994). Nitrogen metabolism in senescing leaves. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 241-273.

- Finneman J, Schjoerring J.** (2000). Post-translocational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *The Plant Journal* **24**, 171-184.
- Fisher A., Brouquisse R., Raymond P.** (1998). Influence of senescence and of carbohydrate levels on the pattern of leaf proteases in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Physiol. Plant.* **102**, 385-395.
- Foyer C.H. and Noctor G.** (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* **146**, 359-388.
- Fukuda H.** (2000). Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* **44**, 245-253.
- Gakh, O., Cavadini, P., Isaya, G.,** (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 63-77.
- Gallais A., Hirel B.** (2004). An approach of the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *J. Exp. Bot.* **55**, 295-306.
- Gallardo K., Firnhaber C., Zuber H., Héricher D., Belghazi M., Henry C., Küster H., Thompson R.** (2008). A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 2165-2179.
- Gan S., Amasino R.** (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Gan S., Amasino R.** (1997). Making sense of senescence, molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.* **113**, 313-319.
- Gao X.P., Wang X.F., Lu Y.F., Zhang L.Y., Shen Y.Y., Liang Z., Zhang D.P.** (2004). Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves. *Plant, Cell and Environment* **24**, 497-507
- Garbarino J.E., Oosumi T., Belknap W.R.** (1995). Isolation of a polyubiquitine promoter and its expression in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* **109**, 1371-1378.
- García-Hernandez M., Davies E., Baskin T., Staswick P.E.** (1996). Association of plant p40 protein with ribosomes is enhanced when polyribosomes form during periods of active tissue growth. *Plant Physiol.* **111**, 559-568.
- Genschik P., Criqui M.C., Parmentier Y., Derevier A., Fleck J.** (1998). Cell cycle – dependent proteolysis in plants. Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* **10**, 2063-2076.
- Gepstein S., Sabehi G., Carp M.J., Hajouj T., Neshor M.F., Yariv I., Dor C., Bassani M.** (2003). Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J.* **36**, 629-642.

- Gharahdaghi F., Weinberg C.R., Meagher D.A., Imai B.S., Mische S.M.** (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**, 601-605.
- Ghasempour H.R., Anderson E.M., Gianello R.D., Gaff D.F.** (1998). Growth inhibitor effects on protoplasmic drought tolerance and protein synthesis in leaf cells of the resurrection grass, *Sporobolus stapfianus*. *Plant Growth Regulation* **24**, 179-183
- Giegé P., Heazlewood J.L., Roessner-Tunalli U., Millar A.H., Fernie A.R., Leaver C.J., Sweetlove L.J.** (2003). Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *The Plant Cell*, **15**, 2140-2151.
- Gillet B., Beyly A., Peltier G., Rey P.** (1998). Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination. *Plant J.* **16**, 257-262.
- Glazebrook J.** (1999). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**(4), 280-286.
- Golldack D., Popova O.V., Dietz K.J.** (2002). Mutation of the matrix metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Biol. Chem.* **277**(7), 5541-5547.
- Gombert J., Etienne P., Ourry A., Le Dilly F.** (2006). The enlargement of expression of the *SAG12* gene displays a gradation of leaf senescence along the axis of *Brassica napus* L. whole plant. *J. Exp Bot.* **57**, 1949-1956.
- Good A.G., Johnson S.J., De Pauw M., Carroll R.T., Savidov N., Vidmar J., Lu Z., Taylor G., Stroehrer V.** (2007). Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Czi. J. Bot.* **85**, 252-262.
- Good A.G., Shrawat A.K., Muench D.G.** (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science* **9**, 597-605.
- Gosh S., Mahoney S.R., Penterman J.N., Pierson D., Dumbroff E.B.** (2001). Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus* senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 777-784.
- Gould K.S., McKelvie J., Markham K.R.** (2002). Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell Environ.* **25**, 1261-1269.
- Grbic V. And Bleeker A.B.** (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **8**, 595-602.
- Gregersen P.L., Holm P.B.** (2007). Transcriptomic analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotech. J.* **5**, 192-206.

- Griffin T.J., Gygi S.P., Ideker T., Rist B., Eng J., Hood L., Aebersold R.** (2002). Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 323-333.
- Groover A., Jones A.M.** (1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology* **119**, 375-384.
- Guerrero F.D., Jones J.T., Mullet J.E.** (1990). Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* **15**, 11-26.
- Guevara M.G., Daleo G.R., Oliva C.R.** (2001). Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiologia Plantarum* **112**, 321-326.
- Guo F.Q., Crawford N.M.** (2005). *Arabidopsis* Nitric Oxide Synthase 1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and ark-induced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436-3450.
- Guo Y., Cai Z., Gan S.** (2004). Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell Environ.* **27**, 521-549.
- Guo Y., Gan S.** (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant J.* **46**(4), 601-612.
- Guseynova I.M., Sueleymanov S.Y., Aliyev J.A.** (2006). Protein composition and native state of pigments of thylakoid membrane of wheat genotypes differently tolerant to water stress. *Biochemistry* **71**, 173-177.
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R.** (1999b). Correlation between protein study and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1720-1730.
- H**abash D.Z. Massiah A.J., Rong H.L., Wallsgrave R.M., Leigh R.A. (2001). The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Ann. Appl. Biol.* **138**, 83-89.
- Habekotté B.** (1997). Options for increasing seed yield of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a simulation study. *Field Crops Research* **54**, 109-126.
- Hanaoka H., Noda T., Shirano Y., Kato T., Hayashi H., Shibata D., Tabata S., Ohsumi Y.** (2002). Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiol.* **129**, 1181-1193.
- Hanfrey C., Fife M., Buchanan-Wollaston V.** (1996). Leaf senescence in *Brassica napus*: Expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **30**, 597-609.
- He P., Osaki M., Takebe M., Shinano T., Wasaki J.** (2005). Endogenous hormones and expression of senescence-related genes in different senescent types in maize. *J. Exp. Bot.* **56**, 117-1128.

- He Y.H., Fukushige H., Hildebrande D.F., Gan S.** (2002). Evidence supporting a role for jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiol.* **128**, 876-884.
- He Y.H., Gan S.S.** (2002). A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **14**, 805-815.
- Heath I., McDonald G., Christeller J.T., Lee M., Bateman K., West J., van Heesjwick R., Anderson M.A.** (1997). Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. *J. Insect. Physiol.* **43**, 833-842.
- Hebeler R., Oeljeklaus S., Reidegeld K.A., Eisenacher M., Stephan C., Sitek B., Stühler K., Meyer H.E., Sturre M.J.G., Dijkwel P.P., Warscheid B.** (2008). Study of early leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by quantitative proteomics using reciprocal ¹⁴N/¹⁵N-labeling and difference gel electrophoresis. *Molecular and Cellular Proteomics* **7**(1), 108-120.
- Hensel L.L., Grbic V., Baumgarten D.A., Bleecker A.B.** (1993). Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 553-564.
- Herrera-Rodriguez M.B., Maldonado J.M., Pérez-Vicente R.** (2005). Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. *J. Plant Physiol.* **163**(10), 1061-1070.
- Hinderhofer K. and Zentgraf U.** (2001). Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Plant.* **213**, 469-473.
- Hirel B., Phillipson B., Murchie E., Suzuki A., Kunz C., Ferrarios S., Limami A., Chaillou S., Delans E., Brugière N., Chaumont-Bonnet M., Foyer C., Morot-Gaudry J.F.** (1997). Manipulating the pathway of ammonium assimilation in transgenic non-legumes and legumes. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **160**, 283-290.
- Hirel B., Le Gouis J., Ney B., Gallais A.** (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J. Exp. Bot.* **58**, 2369-2387.
- Hoch W.A., Singaas E.L., McCown B.H.** (2003). Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiol.* **133**, 1296-1305.
- Hocking P., Randall P., DeMarco D.** (1997). The response of dryland canola to nitrogen fertilizer: partitioning and mobilization of dry matter and nitrogen, and nitrogen effects on yield components. *Field Crops Research* **54**, 201-220.
- Holwerda B.C., Rogers J.C.** (1992). Purification and characterization of aleurain. *Plant Physiol.* **99**, 848-855.

- Horigome D., Satoh H., Itoh N., Mitsunaga K., Oonishi I., Nakagawa A., Uchida A.** (2007). Structural Mechanism and Photoprotective Function of Water-soluble Chlorophyll-binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **282** (9), 6525–6531.
- Horn M., Patankar A.G., Zavala J.A., Wu J., Dolecková-Maresová L., Vujtechová M., Mares M., Baldwin I.T.** (2005). Differential elicitation of two processing proteases controls the processing pattern of the trypsin proteinase inhibitor precursor in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol.* **139**, 375-388.
- Hörtensteiner S., Feller U.** (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* **53**, 927-937.
- Hörtensteiner S., Vicentini F., Matile P.** (1995). Chlorophyll breakdown in senescent cotyledons of rape, *Brassica napus* L.: enzymatic cleavage of pheophorbide *a in vitro*. *New phytol.* **129**, 237-246.
- Huang S., Cerny R.E., Bhat D.S., Brown S.M.** (2001). Cloning of an Arabidopsis patatin-like gene, *STURDY* by activation T-DNA tagging. *Plant Physiology* **125**, 573-584.
- Huang Y.J., To K.Y., Chiang W.J., Suen D.F., Grace Chen S.C.** (2001). Cloning and characterization of leaf senescence up-regulated genes in sweet potato. *Physiol. Plant.* **113**, 384-391.
- Huffaker R.C.** (1990). Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol.* **116**, 199-231.
- Humbeck K., Krupinska K.** (1996). Does the Clp protease play a role during senescence-associated protein degradation in barley leaves? *J. Photochem. Photobiol.* **36**, 321-326.
- Humbeck K., Quast S., Krupinska K.** (1996). Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell Environ* **19**, 337-344.
- Ilami G., Nespoulous C., Huet J.C., Vartanian N., Pernollet J.C.** (1997). Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochemistry* **45**, 1-8.
- Ishida H., Anzawa D., Kokubun N., Makino A., Mae T.** (2002). Direct evidence for non enzymatic fragmentation of chloroplastic glutamine synthetase by reactive oxygen species. *Plant Cell Env.* **25**, 625-631.
- Ishida H., Nishimori Y., Shimizu S., Makino A., Mae T.** (1997). The large subunit of ribulose-1,5-biphosphate/oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16 kDa polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.* **38**, 471-479.
- Ishida H., Yoshimoto K., Izumi M., Reisen D., Yano Y., Makino A., Ohsumi Y., Hanson M.R., Mae T.** (2008). Mobilization of Rubisco and stromal-localized fluorescent proteins

of chloroplasts to the vacuole by an *ATG* gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.* **148**(1), 142-155.

- J**ackowski S., Kacprzak K., Jansson S. (2001). Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heteromers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II (LCHII). *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 340-345.
- Jacob-Wilk D., Goldschmidt E.E., Riov J., Sadka A., Holland D.** (1997). Induction of a Citrus gene highly homologous to plant and yeast thi gene involved in thiamine biosynthesis during natural and ethylene-induced fruit maturation. *Plant Mol. Biol.* **35**, 661-666.
- Jauh G.Y., Philips T.E., Rogers J.C.** (1999). Tonoplast intrinsic proteins isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* **11**, 1867-1882.
- Jebanathirajah J.A., Coleman J.R.** (1998). Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta*, **204**, 177-182.
- Jiang C.Z., Rodermel S.R., Shibles R.M.** (1993). Photosynthesis, rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. *Plant Physiol.* **101**, 105-112.
- Jiang H., Li M., liang N., Yan H., Wei Y., Xu X., Liu J., Xu Z., Chen F., Wu G.** (2007). Molecular cloning and function analysis of the stay-green gene in rice. *Plant J.* **52**, 197-209.
- Jiang J.F., Han Y., Xing L.J., Xu Y.Y., Xu Z.H., Chong K.** (2006). Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. *Toxicon.* **47**, 133-9.
- Jiang W.B., Lers A., Lomaniec E., Aharoni N.** (1999). Senescence-related serine protease in parsley. *Phytochemistry* **50**, 377-382.
- Jimenez A., Hernandez J.A., Pastori G., Del Rio L.A., Sevilla F.** (1998). Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxysome in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* **118**, 1327-1335.
- Jongebloed U., Szederkenyi J., Hartig K., Schobert C., Komor E.** (2004). Sequence of morphological and physiological events during natural ageing of a castor bean leaf: sieve tube occlusions and carbohydrate back-up precede chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* **120**, 338-346.
- Junk G.A., Svec M.J.** (1958). Nitrogen isotope abundance measurements. *US Atom. Ener.Comm.*, Office of Technical Information ISC-1138.

- Kamachi K., Yamaya T., Hayakawa T., Mae T.** (1991). A role for glutamine synthetase in the remobilisation of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* **99**, 1481-1486.
- Kamh M., Wiesler F., Horst W.J.** (2005). Root growth and N-uptake activity of oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars differing in nitrogen efficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **168**, 130-137.
- Kang S.G., Choi J.H., Suh S.G.** (2002). A leaf-specific 27 kDa protein of potato kunitz-type proteinase inhibitor is induced in response to abscisic acid, ethylene, methyl jasmonate, and water deficit. *Mol Cells* **13**, 144-147.
- Kappers I.F., Jordi W., Maas F.M., Stoop G.M., van der Plas L.H.W.** (1998). Gibberellin and phytochrome control senescence in alstroemeria leaves independently. *Physiol Plant.* **103**, 91-98
- Kato Y., Murakami S., Yamamoto Y., Chatani H., Kondo Y., Nakano T., Yokota A., Sato F.** (2004). The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta* **220**, 97-104.
- Kaup M.T., Froese C.D., Thompson J.E.** (2002). A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol.* **129**, 1616-1626.
- Kawamura Y., Uemura M.** (2003). Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation. *Plant J.* **36**(2), 141-54.
- Keech O., Pesquet E., Ahad A., Askne A., Nordvall D., Vodnala S.M., Tuominen H., Hurry V., Dizengremel P., Gardeström P.** (2007). The different fates of mitochondria and chloroplasts during dark-induced senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant, Cell and Environment* **30**, 1523-1534.
- Kessler A., Baldwin I.T.** (2002). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **53**, 299-328.
- Kieffer P., Dommes J., Hoffmann L., Hausman J.F., Renaut J.** (2008). Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* **8**, 2514-2530.
- Kim C.S., Kwak J.M., Nam H.G., Kim K., Cho B.H.** (1994). Isolation and characterization of two cDNAs that are rapidly induced during wound response of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **13**, 340-343.
- Kim D.J., Smith S.M.** (1994). Expression of a single encoding microbody NAD-malate dehydrogenase during glyoxysome and peroxysome development in cucumber. *Plant Mol. Biol.* **26**, 423-434.

- Kim H.U., Wu S.S.H., Ratnayake C., Huang H.A.C.** (2001). *Brassica rapa* has three genes that encode proteins associated with different neutral lipids in plastids of specific tissues. *Plant Physiol.*, **126**, 330-341.
- Kim K., Kim I.H., Lee K.Y., Rhee S.G., Stadtman E.R.** (1988). The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* **263**, 4704-4711.
- Kimura M., Yamamoto Y.Y., Seki M., Sakurai T., Sato M., Abe T., Yoshida S., Manabe K., Shinozaki K., Matsui M.** (2003). Identification of Arabidopsis genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. *Photochem. Photobiol.* **77**, 226–233.
- Kimura Y., Watanabe T., Kimura M., Maeda M., Murata Y., Fujiyama K.** (2008). Salt-adaptation of Tobacco BY2 cells induces change in glycoform of N-glycans: enhancement of exo- and endo-glycosidase activities by salt adaptation. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **72**, 512-522.
- Kinoshita T., Yamada K., Hiraiwa N., Hara-Nishimura I.** (1999). Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *Plant J.* **19**, 43-53.
- Koag M.C., Fenton R.D., Wilkens S., Timothy J.C.** (2003). The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol.* **131**, 309–316.
- Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M.** (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* **10**, 379-384.
- Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuji H., Shinozaki K.** (1993). Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **129**, 175-182.
- Korthout H.A., Berecki G., Bruin W., van Duijn B., Wang M.** (2000). The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in cell plants. *FEBS lett.* **475**(2), 139-144.
- Koumoto Y., Tsugeki R., Shimada T., Mori H., Kondo M., Hara-Nishimura I., Nishimura M.** (1996). Isolation and characterization of a cDNA encoding mitochondrial chaperonin 10 from *Arabidopsis thaliana* by functional complementation of an *Escherichia coli* groES mutant. *The Plant Journal*, **10**(6), 1119-1125.
- Kramell R., Atzorn R., Schneider G., Miersch O., Bruckner C., Schmidt J., Sembdner G., Parthier B.** (1995). Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *J. Plant Growth Regul.* **14**, 29-36.
- Kumudini S., Hume D.J., Chu G.** (2002). Genetic improvement in short-season soybeans. *Crop Sci.* **42**, 141-145.

- Labate M.T., Ko K., Ko Z.W., Pinto L.S., Real M.J., Romano M.R., Barja P.R., Granell A., Frisco G., Van Wijk K.J., Brugnoli E. Labate C.A.** (2004). Constitutive expression of pea Lhcb 1-2 in tobacco affects plant development, morphology and photosynthetic capacity. *Plant Mol. Biol.* **55**(5), 701-714.
- Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the heat bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam E., del Pozo O.** (2000). Caspase like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* **44**(3), 417-428.
- Lam E., Pontier D., del Pozo O.** (1999). Die and let live-programmed cell death in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 502-507.
- Lam H.M., Coschigano K.T., Oliviera I.C., Oliviera M.R., Coruzzi G.M.** (1996). The molecular genetics of nitrogen assimilation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **47**, 569-593.
- Lawlor D.W.** (2002). Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *J. Exp. Bot.* **53**, 789-799.
- Lee A.G.** (2000). Membrane lipids : it's only a phase. *Curr. Biol.* **10**, R377-R379.
- Lee D.G., Ahsan N., Lee S.H., Kang K.Y., Bahk J.D., Lee I.J., Lee B.H.** (2008). A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics* **7**, 3369-3383.
- Lee D.W., O'Keefe J., Holbrook N.M., Field T.S.** (2003). Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecol. Res.* **18**, 677-694.
- Lequeu J., Simon-Plas F., Fromentin J., Etienne P., Petitot A.S., Blein J.P., Suty L.** (2005). Proteasome comprising a beta1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS letters* **579**, 4879-4886.
- Leterme P.** (1988). Croissance et développement du colza d'hiver : les principales étapes. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*, CETIOM-INRA, Paris, pp 23-33.
- Li Q., Bettany A.J.E., Donnison I., Griffiths C.M., Thomas H., Scott I.M.** (2000). Characterization of a cysteine protease cDNA from *Lolium multiflorum* leaves and its expression during senescence and cytokin treatment. *Bioch. Biophys. Act.* **1492**, 233-236.
- Li R.J., Hua W., Lu Y.T.** (2006). *Arabidopsis* cytosolic glutamine synthetase AtGLN1;1 is a potential substrate of AtCRK3 involved in leaf senescence. *Bioch. Biophys. Res. Com.* **342**, 119-126.
- Li J., Wu X-D., Hao S-T., Wang X-J., Ling H-Q.** (2008). Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics* **8**, 2299-2311.

- Lim O.L., Kim H.J., Nam H.G.** (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 115-136
- Lim Y.S., Cha M.K., Uhm T.B., Park J.W., Kim K., Kim I.H.** (1993). Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 273-280.
- Lindahl A.J., Spetea C., Hundal T., Oppenheim A.B., Adam Z., Andersson B.** (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* **12**, 419-431
- Liu L., Zhou Y., Zhou G., Ye R., Zhao L., Li X., Lin Y.** (2008). Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. *Plant Mol. Biol.* **67**, 37-55.
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lohaus G., Bueker M., Hussmann M., Soave C., Heldt H.W.** (1998). Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagines in the Illinois low protein and Illinois high protein strains in maize. *Planta* **205**, 181-188.
- Lohman K.N., Gan S., John M.C., Amasino R.M.** (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **92**, 322-328.
- Lois L.M., Campos M., Putra S.R., Danielsen K., Rohmer M., Boronat A.** (1998). Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2105-2110.
- Loudet O., Chaillou S., Camilleri C., Bouchez D., Daniel-Vedele F.** (2002). Bay-0xShahdara recombinant inbred line population: a powerful tool for the genetic dissection of complex traits in *Arabidopsis*. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 1173-84.
- Lu Q., Wen X., Lu C., Zhang Q., Kuang T.** (2003). Photoinhibition and protection in senescent leaves of field-grown wheat plants. *Plant Physiol. Chem.* **41**, 749-754.
- Malagoli P., Lainé P., Le Deunff E., Rossato L., Ney B., Ourry A.** (2004). Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv capitot during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology* **134**, 388-400.
- Malagoli P., Lainé P., Rossato L., Ourry A.** (2005a). Dynamic of nitrogen uptake and mobilisation in field grown winter oilseed rape from stem extension to harvest I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation with leaf fall and their residual N. *Annals of Botany* **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}N -labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany* **95**, 1187-1198
- Manetas Y., Grammatikopoulos G., Kyparissis A.** (1998). The use of portable, non-destructive, SPAD-502 (Minolta) chlorophyll meter with leaves of varying trichome density and anthocyanin content. *J. Plant Physiol.* **153**, 513-516
- Martin A., Belastegui-Macadam X., Quilleré I., Floriot M., Valadier M.H., Pommel B., Andrieu B., Donnison I., Hirel B.** (2005). Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. *New Phytologist* **167**, 483-492.
- Martin T., Oswald O., Graham I.A.** (2002). *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon: nitrogen availability. *Plant Physiol.* **128**, 472-481.
- Martinez D.E., Bartoli C.G., Grbic V., Guamet J.J.** (2007). Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *J. Exp. Bot.* **58**, 1099-1107.
- Masclaux C., Quilleré I., Gallais A., Hirel B.** (2001). The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Ann. Appl. Biol.* **138**, 69-81.
- Masclaux C., Valadier M.H., Brugière N., Morot-Gaudry J.F., Hirel B.** (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**, 510-518.
- Masclaux-Daubresse C., Carrayole E., Valadier M.H.** (2005). The two nitrogen mobilization- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* **221**, 580-588.
- Masferrer A., Arró M., Manzana D., Schaller H., Fernández-Busquets X., Moncaleán P., Cunillera N., Boronat A., Ferrer A.** (2002). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *Plant J.* **30**, 123-132.
- Massey A.C., Zhang C., Cuervo A.M.** (2006). Chaperones-mediated autophagy in aging and disease. *Current Topics in Developmental Biology* **73**, 205-235.
- Matile P.** (1982). Protein degradation. In *Nucleic Acids and proteins in Plants I* (Boulter D. and Parthier B. eds). New York, Springer-Verlag, pp. 169-188.
- Matile P.** (1992). Chloroplast senescence. In : *Crop photosynthesis : spatial and temporal determinants*, N.R. Baker and H. Thamas, eds (Elsevier), pp 413-440.
- Matson P., Lohse K.A., Hall S.J.** (2002). The globalization of nitrogen deposition: consequences for terrestrial ecosystems. *Ambio.* **31**, 113-119.

- Mattoo A.K., Aharoni N.** (1988). Ethylene and plant senescence. In : *Senescence and aging in plants*, (Nooden L.D. and Leopold A.C. Eds.), *Academic Press*, San Diego, 241-281.
- Mechin V., Consoli L., Le Guilloux M., Damerval C.** (2003). An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3**, 1299-1302.
- Mendham N.J., Salisbury P.A.** (1995). Physiology: crop development, growth and yield. In *Production and utilization of Brassica Oilseeds*, D.S. Kimber et D.I. Mc Gregor eds, CAB International, Oxford, pp 11-63.
- Merrien A., Pouzet A.** (1988). Principaux facteurs limitant les rendements du colza d'hiver dans les conditions françaises. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*, CETIOM-INRA, Paris, pp 16-22.
- Merrien A., Palleau J.P., Maisonneuve C.** (1988). Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. In *Physiologie et élaboration du rendement du colza*, CETIOM-INRA, Paris : pp 34-46.
- Miao Y., Laun T.M., Smykowski A., Zentgraf U.** (2007). Arabidopsis MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant Mol. Biol.* **65**, 63-76.
- Miao Y., Laun T.M., Zimmermann P., Zentgraf U.** (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **55**, 853-867.
- Miao Y., Zentgraf U.** (2007). The antagonist function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *Plant Cell* **19**, 819-830.
- Michaud D.** (1998). Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. *Analytica Chimica Acta* **372**, 173-185.
- Mikkelsen M.D., Larsen Petersen B., Glawischnig E., Bøgh Jensen A., Andreasson E., Halkier B.A.** (2003). Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signalling pathways. *Plant Physiol.* **131**, 298-308.
- Minamikawa T., Toyooka K., Okamoto T., Hara-Nishimura I., Nishimura M.** (2001). Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma* **218**, 144-153.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**, 490-498.
- Moncilovic I., Ristic Z.** (2007). Expression of chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, in two lines of maize with contrasting tolerance to heat stress during early stages of plant development. *J Plant Physiol.*, **164**(1), 90-9.

- Monje O., Bugbee B.** (1992). Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *Hort. Science* **27**, 69-71.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X., Hwang I., Jones T., Sheen J.** (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**, 332–336.
- Morot-Gaudry J.F., Orsel M., Diaz C., Daniel-Vedele F., Masclaux-Daubresse C.** (2006). Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes : intérêt pour le colza. *Oléagineux, Corps gras et Lipides* **13**, 393-402.
- Morris K.A.A.H., Mackerness S., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Buchanan-Wollaston V.** (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* **23**, 677-685.
- Mosolov V.V., Valueva T.A.** (2005). Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **41**, 227-246.
- Murakami S., Kondo Y., Nakano T., Sato F.** (2000). Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Lett.* **468**, 15-18.
- Murgia I., Vazzola V., Tarantino D., Cellier F., Ravet K., Briat J.F., Soave C.** (2007). Knock-out of ferritin *AtFer1* causes earlier onset of age-dependent leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 898-907.
- Nakabayashi K., Ito M., Kiyosue T., Shinozaki K., Watanabe A.** (1999). Identification of clp genes expressed in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol.* **40**, 504-514.
- Navabpour S., Morris K., Allen R., Harrison E.S., Mackerness A.H., Buchanan-Wollaston V.** (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **54**, 2285-2292.
- Nicolas L.T., Heazlewood J.L., Day D.A., Millar A.H.** (2004). Lipoic acid-dependent oxidative catabolism of α -keto acids in mitochondria provides evidence for branched chain amino acid catabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**, 838-848.
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D.** (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **56**, 2907-2914.
- Nieri B., Canino S., Versace R., Alpi A.** (1998). Purification and characterization of an endoprotease from alfalfa senescent leaves. *Phytochemistry* **49**, 643-649.
- Nishio N., Satoh H.** (1997). A Water-Soluble Chlorophyll Protein in Cauliflower May Be Identical to BnD22, a Drought-Induced, 22 Kilodalton Protein in Rapeseed. *Plant Physiology* **115**, 841-846.

- Noctor G., Foyer C.H.** (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**, 249-279.
- Noh Y.S., Amasino R.M.** (1999). Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus* L. *Plant Mol. Biol.* **41**, 195-206.
- Noodén L.D., Guamet J.J., John I.** (1997). Senescence mechanisms. *Physiol. Plant.* **101**, 746-753.
- Noodén L.D., Hillsberg J.W., Schneider M.J.** (1996). Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiol. Plantarum* **96**, 491-495.
- Noodén L.D., Kahanak G.M., Okatan Y.** (1979). Prevention of monocarpic senescence in soybeans with auxins and cytokinins: an antidote for self destruction. *Science* **206**(4420), 841-843.
- Noquet C.** (2003). Mise en réserve d'azote sous forme de protéines de réserve des organes végétatifs (VSP) chez *Medicago sativa* L. et *Brassica napus* L. : principaux facteurs de régulation. Thèse de Doctorat, Université de Caen, France, 151p.
- Noquet C., Avice J.C., Rossato L., Beauclair P., Henry M.P., Ourry A.** (2004). Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. *Plant Science* **166**, 1007-1018.
- O'Donnell P.J., Calvert C., Atzorn R., Waternac C., Leyser H.M.O., Bowles D.J.** (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**, 1914-1918.
- Oleksyn J., Zytkowskiak R., Reich P.B., Tjoelker M.G., Karolewski P.** (2000). Ontogenetic patterns of leaf CO₂ exchange, morphology and chemistry in *Betula pendula* trees. *Trees.* **14**, 271-281.
- Oliveira I.C., Brears T., Knight T., Clark S., Coruzzi G.** (2002). Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. *Plant Physiol.* **129**, 1170-1180.
- Oh S.A., Park J.H., Lee G.I., Paek K.H., Park S.K., Nam H.G.** (1997). Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**(3), 527-535.
- Ono K., Terashima I., Watanabe A.** (1996). Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. *Plant Cell Physiology* **37**, 1083-1089.
- Ortega J.L., Roche D., Sengupta-Gopalan C.** (1999). Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase. *In vitro* and *in vivo* studies. *Plant Physiol.* **119**, 1483-1495.
- Osaki M., Shirai J., Shinano T., Tadano T.** (1995). N-15-Allocation of (NH₄)-N-¹⁵N and (NO₃)-N-¹⁵N to Nitrogenous Compounds at the Vegetative Growth Stage of Potato Plants. *Soil Science and Plant Nutrition* **41**, 699-708.

Otegui M.S., Noh Y.S., Martinez D.E., Vila Petroff M.G., Staehelin A., Amasino R.M., Guiamet J.J. (2005). Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J.* **41**, 831-844.

Pak C., van Doorn W.G. (2005). Delay of Iris flower senescence by protease inhibitors. *New phytologist* **165**, 473-480.

Paliyarth G., Droillard M.J. (1992). The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Physiol. Biochem.* **30**, 789-812.

Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., Del Rio L.A. (2002). Plant proteases, protein degradation and oxydative stress: role of peroxysome. *Plant Physiol. Bioch.* **40**, 521-530.

Palmieri M.C., Sell S., Huang X., Scherf M., Werner T., Durner J., Lindermayr C. (2008). Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J. Exp. Bot.* **59**(2), 177-186.

Panchuk I.I., Zentgraf U., Volkov R.A. (2005). Expression of the *Apx* gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **222**, 926-932.

Paris S., Wessel P.M., Dumas R. (2002). Overproduction, purification, and characterization of recombinant Aspartate Semialdehyde dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expression and Purification* **24**, 99-102

Park J.H., Oh S.A., Kim Y.H., Woo H.R., Nam H.G. (1998). Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **37**, 445-454.

Park S.Y., Yu J.W., Park J.S., Li J., Yoo S.C., Lee N.Y., Lee S.K., Jeong S.W., Seo H.S., Koh H.J., Jeon J.S., Park Y., Paek N.C. (2007). The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *The Plant Cell* **19**, 1649-1664.

Parrott D.L., McInnerney K., Fellers U., Fischer M. (2007). Steam-girdling of barley (*Hordeum vulgare*) leaves leads to carbohydrate accumulation and accelerated leaf senescence, facilitating transcriptomic analysis of senescence-associated genes. *New phytol.*, **156**, 56-59.

Parrot D.L, Yang L., Shama L., Fischer A.M. (2005). Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon “feast” conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta* **132**(1), 67-80.

Pastori G.M., Del Rio L.A. (1997). Natural senescence of pea leaves: an activated oxygen-mediated function for peroxysomes. *Plant Physiol.* **113**, 411-418.

Paul M.J., Driscoll S.P. (1997). Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant Cell Environ.* **20**, 110-116.

- Pego J.V., Kortstee A.J., Huijser C., Smeekens S.C.M.** (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* **51**, 407-416.
- Peña-Cortés H., Willmitzer L., Sánchez-Serrano J.J.** (1991). Abscisic acid mediates wound induction but not developmental-specific expression of the proteinase inhibitor II gene family. *Plant Cell* **3**, 963-972.
- Pérez-Rodríguez J., Valpuesta V.** (1996). Expression of glutamine synthetase genes during natural senescence of tomato leaves. *Physiol. Plant.* **97**, 576-582.
- Pham X.H., Reddy M.K., Ehtesham N.Z., Matta B., Tuteja N.** (2000). A DNA helicase from *Pisum sativa* is homologous to translation initiation factor and stimulates topoisomerase I activity. *Plant J.* **24**, 219-229.
- Philpott M., Gould K.S., Lim C., Ferguson L.R.** (2004). In situ and in vitro antioxidant activity of sweet potato anthocyanins. *J. Agr. Food. Chem.* **52**, 1511-1513.
- Pic E., de la serve B.T., Tardieu F., Turc O.** (2002). Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiol.* **128**, 236-273.
- Picton S., Barton S.L., Bouzayen M., Hamilton A.J., Grierson D.** (1993). Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.* **3**, 469-481.
- Pierik R., Tholen D., Poorter H., Visser E.J., Voesenek L.A.** (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* **11**, 176-183.
- Ping H.E., Osaki M., Takebe M., Shinano T.** (2003). Comparison of whole system of carbon and nitrogen accumulation between two maize hybrids differing in leaf senescence. *Photosynthetica* **41**(3), 399-405.
- Pistelli L., Perata P., Alpi A.** (1992). Effect of leaf senescence on glyoxylate cycle enzyme activities. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 723-729.
- Polverari A., Molesini B., Pezzotti M., Buonauro R., Marte M., Delledonne M.** (2003). Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**(12), 1094-1105.
- Pourtau N., Jennings R., Pelzer E., Pallas J., Wingler A.** (2006). Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in *Arabidopsis*. *Planta* **224**, 556-568.
- Pourtau N., Marès M., Purdy S., Quentin N., Ruël A., Wingler A.** (2004). Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta* **219**, 765-772.
- Prochazkova D., Sairam R.K., Srivastava G.C., Singh D.V.** (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci.* **161**, 765-771.

Prochazkova D., Wilhelmova N. (2004). Changes in antioxidative protection in bean cotyledons during natural and continuous irradiation-accelerated senescence. *Biologia Plantarum* **48**, 33-39.

Pružinská A., Tanner G., Aubry S., Anders I., Moser S., Müller T., Ongania K.H., Robatzek S. and Somssich I.E. (2002). A new member of *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* **28**, 123-133.

Pružinská A., Tanner G., Aubry S., Anders I., Moser S., Müller T., Ongania K.H., Krautler B., Youn Y.J., Liljegren S.J., Hortensteiner S. (2005). Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. *Plant Physiol.* **139**, 52-63.

Quilleré I., Dufossé C., Roux Y., Foyer C.H.F., Caboche M., Morot-Gaudry J.F. (1994). The effects of deregulation of NR gene expression on growth and nitrogen metabolism of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *J. Exp. Bot.* **45**, 1205-1211.

Quirino B.F., Normanly J., Amasino R.M. (1999). Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol. Biol.* **40**, 267-278.

Quirino B.F., Noh Y.S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* **5**, 278-282.

Raines C.A., Lloyd J.C., Willingham N.M., Potts S., Dyer T.A. (1992). cDNA and gene sequences of wheat chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase reveal homology with fructose-1,6-bisphosphatases. *Eur. J. Biochem.* **205**(3), 1053-1059.

Rajcan I., Tollenaar M. (1999). Source:sink ratio and leaf senescence in maize: I. Dry matter accumulation and partitioning during grain filling. *Field Crops Res.* **60**, 245-253.

Rakwal R., Komatsu S. (2000). Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis. *Electrophoresis* **21**, 2492-2500.

Rathke G.W., Behrens T., Diepenbrock W. (2006). Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **117**, 80-108

Ray S., Mondal W.A., Choudhuri M.A. (1993). Regulation of leaf senescence, grain filling and yield of rice by kinetin and abscissic acid. *Physiologia Plantarum* **59**, 343-346.

Reinbothe C., Satoh H., Alcaraz J.P., Reinbothe S. (2004). A Novel Role of Water-Soluble Chlorophyll Proteins in the Transitory Storage of Chlorophyllide. *Plant Physiology* **134**, 1355-1365.

- Riens B., Lohaus G., Heineke D., Heldt H.W.** (1991). Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol.* **97**, 227-233.
- Ren G., An K., liao Y., Zhou X., Cao Y., Zhao H., Ge X., Kuai B.** (2007). Identification of a novel chloroplast protein AtNYE1 regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **144**, 1429-1441.
- Reviron M.P., Vartanian N., Sallantin M., Huet J.C., Pernollet J.C., De Vienne D.** (1992). Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* Leaves. *Plant Physiology* **100**, 1486-1493.
- Richard S., Morency M-J., Drevet C., Jouanin L., Séguin A.** (2000). Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Mol. Biol.*, **43**, 1-10.
- Richardson M.** (1991). Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: P.M. Dey and J.B. Harborne, Editors, *Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids* vol. **5**, Academic Press, New York (1991), pp. 259–305.
- Riis B., Rattan S.I.S., Clark B.F.C., Merrick W.C.** (1990). Eukaryotic proteins elongation factors. *Trends Biol. Sci.* **15**, 420-424.
- Rivero R.M., Kojima M., Gepstein A., Sakakibara H., Mittler R., Gepstein S.** (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *PNAS* **104**, 19631-19636.
- Robatzek S., Somssich I.E.** (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* **16**, 1139-1149.
- Roberts D.R., Thompson J.E., Dumbroff E.B., Gepstein S., Mattoo A.K.** (1987). Differential changes in the synthesis and steady-state levels of thylakoid proteins during bean leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **9**, 343-353.
- Roberts I.N., Passeron S., Barneix A.J.** (2006). The two main endoproteases present in dark-induced senescent wheat leaves are distinct subtilisin-like proteases. *Planta* **224**, 1437-1447.
- Rossato L., Lainé P., Ourry A.** (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble proteins patterns. *J. Exp. Bot.* **52**, 1655-1663.
- Rossato L., Le Dantec C., Lainé P., Ourry A.** (2002a). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the cycle: identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *J. Exp. Bot.* **53**, 265-275.
- Rossato L., Macduff J.H., Lainé P., Le Deunff E., Ourry A.** (2002b). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *J. Exp. Bot.* **53**, 1131-1141.

Rousseaux M.C, Hall A.J, Sanchez R.A. (2000). Basal leaf senescence in a sunflower (*Helianthus annuus*) canopy: responses to increased R/FR ratio. *Physiologia Plantarum* **110**, 477-482.

Ryan C.A. (1990). Protease inhibitor in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual. Review of Phytopathology* **28**, 425-449.

Salvucci M.E. (2008). Association of Rubisco activase with chaperonin-60b: a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. *J. Exp. Bot.* **59**, 1923-1933.

Sanan-Mishra N., Pham X.H., Sopory S.K., Tuteja N. (2005). Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield. *PNAS* **102**(2), 509-514.

Sanchez-Hernandez C., Martinez-Gallardo N., Guerrero-Rangel A., Valdes-Rodriguez S., Delano-Frier J. (2004). Trypsin and alpha-amylase inhibitors are differentially induced in leaves of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) in response to biotic and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* **122**, 254-264.

Sarosh B.R., Meijer J. (2007). Transcriptional profiling by cDNA-AFLP reveals novel insights during methyl jasmonate, wounding and insect attack in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* **64**, 425-438.

Satoh H., Nakayama K., Okada M. (1998). Molecular Cloning and Functional Expression of a Water-soluble Chlorophyll Protein, a Putative Carrier of Chlorophyll Molecules in Cauliflower. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 30568–30575.

Satoh H., Uchida A., Nakayama K., Okada M. (2001) Water-soluble chlorophyll protein in brassicaceae plants is a stress-induced chlorophyll-binding protein. *Plant Cell Physiology* **42**(9), 906-911.

Schiltz S., Gallardo G., Huart M., Negroni L., Sommerer N., Burstin J. (2004). Proteome reference maps of vegetative tissues in *Pisum sativum*: an investigation of nitrogen mobilisation from leaves during seed filling. *Plant Physiol.* **135**, 2241-2260.

Schjoerring J.K., Bock J.G.H., Gammelvind L., Jensen C.R., Mogensen V.O. (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.

Schmidt K., Fufezan C., Krieger-Liszkay A., Satoh H., Paulsen H. (2003). Recombinant water-soluble chlorophyll protein from *Brassica oleracea* var. Botrys binds chlorophyll derivatives. *Biochemistry* **42**, 7427-7433.

Schulte auf'm Erley G., Wijaya K.A., Ulas A., Becker H., Wiesler F., Horst W.J. (2007). Leaf senescence and N uptake parameters as selection traits for nitrogen efficiency of oilseed rape cultivars. *Physiologia Plantarum* **130**, 519-531.

- Shangguan Z.P., Shao M.A., Dyckmans J.** (2000). Nitrogen nutrition and water stress effects on leaf photosynthetic gas exchange and water use efficiency in winter wheat. *Environ. Exp. Bot.* **44**, 141-149.
- Shatters R.G., Bausher M.G., Hunter W.B., Chaparro J.X., Dang P.M., Niedz R.P., Mayer R.T., McCollum T.G., Sinisterra X.** (2004). Putative protease inhibitor gene discovery and transcript profiling during fruit development and leaf damage in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Gene* **326**, 77-86.
- Simeonova E., Garstka M., Koziol-Lipinska J., Mostowska A.** (2004). Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programme cell death during mesophyll leaf senescence. *Protoplasma* **223**, 143-153.
- Sin S.F., Chye M.L.** (2004). Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta* **219**, 1010-1022.
- Sirover M.A.** (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1432**, 159-184.
- Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., del Pozo O., Martin G.B., Klessig F.** (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplastic carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in hypersensitive defence response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 11640-11645.
- Smart C.M.** (1994). Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**, 419-448.
- Smart C.M., Hosken S.E., Thomas H., Greaves J.A., Blair B.G., Schuch W.** (1995). The Timing of maize leaf senescence and characterization of senescence-related cDNAs. *Physiologia Plantarum* **93**, 673-682.
- Smith M.W., Ito M., Miyawaki M., Sato S., Yoshikawa Y., Wada S., Maki H., Nakagawa H., Komamine A.** (1997). Plant 21D7 protein, a nuclear antigen associated with cell division, is a component of the 26S proteasome. *Plant Physiol.* **113**, 281-291.
- Snedden W.A., Fromm H.** (2001). Calmodulin as a versatile signal transducer in plants. *New phytol.* **151**, 36-66.
- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A.** (1999). The involvement of cysteine protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* **11**, 431-443.
- Solomos T.** (1988). Respiration in senescing plant organs: its nature, regulation, and physiological significance. In Noodén LD, Leopold AC, eds, Senescence and aging in plants. *Academic Press*, San Diego, pp 112-146.
- Spano G., Di Fonzo N., Perrotta C., Platani C., Ronga G., Lawlor D.W., Napier J.A., Shewry P.R.** (2003). Physiological characterization of “stay-green” mutants in durum wheat. *J. Exp. Bot.* **54**, 1415-1420.

- Srivalli B., Bharti S., Khanna-Chopra R.** (2001). Vacuole cysteine proteases and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase degradation during monocarpic senescence in cowpea leaves. *Photosynthetica* **39**, 87-93.
- Strange A., Park J. Bennett R., Phipps R.** (2006). The use of life-cycle assesement to evaluate the environment impacts of growing genetically modified, nitrogen use efficient canola. *Plant Biotechnol. J.* **6**(4), 337-345.
- Stressman D., Miller A., Spalding M., Rodermel S.** (2002). Regulation of photosynthesis during *Arabidopsis* leaf development in continious light. *Photosynth. Res.* **72**, 27-37.
- Sugawara H., Shibuya K., Yoshioka T., Hashiba T., Satoh S.** (2002). Is a cysteine proteinase inhibitor involved in the regulation of petal wilting in senescing carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers? *Journal of Experimental Botany* **53**, 407-413.
- Suty L., Lequeu J., Lançon A., Etienne P., Petitot A.S., Blein J.P.** (2005). Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of « plant defense proteasomes ». *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **35**, 637-650.
- Svecnjak Z., Rengel Z.** (2006). Nitrogen utilization efficiency in canola cultivars at grain harvest. *Plant and Soil* **283**, 299-307.
- Swidzinski J.A., Leaver C.J., Sweetlove L.J.** (2004). A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochemistry* **65**, 1829-1838.
- Sykorrova B., Kueresova G., Daskalova S., Trckova M., Hoyerova K., Raimanova I., Motyka V., Travnickova A., Elliott M.C., Kaminek M.** (2008). Senescence-induced ectopic expression of the *A. tumefaciens ipt* gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield. *J. Exp. Bot.* **59**, 377-387.
- Sylvester-Bradley R., Makespace R.J.** (1984). A code for stages of development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Aspects of Applied Biology* **6**, 399-419.
- T**ang D., Christiansen K.M., Innes R.W. (2005). Regulation of plant disease resistance, stress response, cell death, and ethylene signalling in *Arabidopsis* by the EDR1 protein kinase. *Plant Physiol.* **138**(2), 1018-1026.
- Tang Y., Wen X., Lu C.** (2005). Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 193-201.
- Teixera J., Pereira S., Canovas F., Salema R.** (2005). Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. Cv. Désirée) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and remobilization. *J. Exp. Bot.* **54**, 663-671.

- Thayer S.S., Choe H.T., Rausser S. Huffeker R.C.** (1988). Characterization and subcellular localization of aminopeptidases in senescing barley leaves. *Plant Physiol.* **87**, 894-897.
- Thimann K.V., Tetley R.R., Thanh T.V.** (1974). The metabolism of oat leaves during senescence. II. Senescence in leaves attached to the plant. *Plant physiol.* **54**, 859-862.
- Thoenen M., Herrmann B.** (2007). Senescence in wheat leaves: is a cysteine endopeptidase involved in the degradation of the large subunit of Rubisco? *Acta Physiol. Plant.* **29**, 339-350.
- Thomas H., Schellenberg M., Vicentini F., Matile P.** (1996). Gregor Mendel's green and yellow pea seeds. *Bot. Acta.* **109**, 3-4.
- Thomas H., Stoddart J.L.** (1980). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 83-111.
- Thompson J.E., Hopkins M.T., Taylor C., Wang T.W.** (2004). Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implication for plant growth and development. *Trends Plant Sci.* **9**(4), 174-179.
- Tian Q., Stepaniants S.B., Mao M., Weng L., Feetham M.C., Doyle M.J., Yi E.C., Dai H., Thorsson V., Eng J., Goodlett D., Berger J.P., Gunter B., Linseley P.S., Stoughton R.B., Aebersold R., Collins S.J., Hanlon W.A., Hood L.E.** (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell. Proteomics* **3**, 960-969.
- Tilsner J., Kassner N., Struck C., Lohaus G.** (2005). Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* **221**, 328-338.
- Tittonel E.D., Chaput J.P., Letoublon F., Bonnot O.** (1988). Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. In *Physiologie et élaboration du rendement Colza*, CETIOM Editions, Paris, pp 68-72.
- Tommasini L., Svensson J.T., Rodriguez E.M., Wahid A., Malatrasi M., Kato K., Wanamaker S., Resnik J., Close T.J.** (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Funct. Integr. Genomics* **8**(4), 387-405.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Natl. Acad. Science* **76**, 4350-4354.
- Tsuchiya T., Ohta H., Okawa K., Iwamatsu A., Shimida H., Masuda T., Takamiya K.I.** (1999). Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *PNAS.* **96**, 15362-15367.
- Ueda T., Seo S., Ohashi Y., Hashimoto J.** (2000). Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Mol. Biol.* **44**, 649-657.

- V**an der Graaff E., Schwacke R., Schneider A., Desimone M., Flugge U.I., Kunze R. (2006). Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* **141**, 776-792
- Van der Hoorn R.A, Jones J.D.** (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Biol.* **7** (4), 400-407.
- Van Doorn W.G., Woltering E.J.** (2008). Physiology and molecular biology of petal senescence. *J.Exp. Bot.* **59**, 453-480.
- Vilardell J., Goday A., Freire M.A., Torrent M., Martinez M.C., Torne J.M., Pages M.** (1990). Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Molecular Biology* **14**, 423-432.
- Vincent R., Fraisier V., Chaillou S., Limami M.A., Deléens E., Phillipson B., Douat C., Bouttin T.P., Hirel B.** (1997). Overexpression of a soybean gene encoding a cytosolic glutamine synthase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta* **201**, 424-433.
- Vishnevetsky M., Ovadis M., Itzhaki H., Vainstein A.** (1997). CHRC, encoding a chromoplast-specific carotenoid-associated protein, is an early gibberellic acid-responsive gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 24747-24750.
- Vitousek P.M., Aber J.D., Howarth R.W., Likens G.E., Matson P.A., Schindler D.W., Schlesinger W.H., Tilman D.G.** (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle. *Ecological Appl.* **7**, 737-750.
- Vranova E., Inze D., Van Breusegem F.** (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **53** (372), 1227-1236.
- W**adahama H., Kamauchi S., Ishimoto M., Kawada T., Urade R. (2007). Protein disulfide isomerase family proteins involved in soybean protein biogenesis. *FEBS* **274**, 687-703.
- Wang K.L., Li H., Ecker J.R.** (2002). Ethylene biosynthesis and signalling networks. *Plant Cell* **14**, 131-151.
- Wang W., Scali M., Vignani R., Spadafora A., Sensi E., Mazzuca S., Cresto M.** (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24**, 2369-2375.
- Wang W., Vincour B., Shosevov O., Altman A.** (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* **9**, 244-252.
- Wang X., Yang P., Gao Q., Liu X., Kuang T., Shen S., He Y.** (2008). Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta* **228**, 167-177.

- Weaver L.M., Gan S.S., Quirino B., Amasino R.M.** (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Molecular Biology* **37**, 455-469.
- Weaver L.M., Amasino R.M.** (2001). Senescence is induced individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiol.* **127**(3), 876-886.
- Wiedemuth K., Müller J., Kahlau A., Amme S., Mock H.P., Grzam A., Hell R., Egle K., Beschow H., Humbeck K.** (2005). Successive maturation and senescence of individual leaves during barley whole plant ontogeny reveals temporal and spatial regulation of photosynthetic function in conjunction with C and N metabolism. *J. Plant Physiol.* **162**, 1226-1236.
- Wilmouth R.C., Turnbull J.J., Welford R.W.D., Clifton I.J., Prescott A.G., Schofield C.J.** (2002). Structure and Mechanism of Anthocyanidin Synthase from *Arabidopsis thaliana*, *Structure* **10**, 93-103.
- Wilson K., Mc Manus M., Gordon M., Jordan TW.** (2002). The proteomics of leaf senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* (L.). *Proteomics* **2**, 1114-1122.
- Wingler A., Marès M., Pourtau N.** (2004). Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist* **161**, 781-789.
- Wingler A., Purdy S., MacLean J.A., Pourtau N.** (2006). The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **57**, 391-399.
- Wingler A., von Schaewen A., Leegood R.C., Lea P.J., Quick W.P.** (1998). Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiol.* **116**, 329-335.
- Woo H.R., Goh C.H., Park J.H., Teysseidier B., Kim J.H., Park Y.I., Nam H.G.** (2002). Extended leaf longevity in the *ore4-1* mutant of *Arabidopsis* with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *Plant J.* **31**, 331-340.
- Xin Z.Y., Yhou X., Pilet P.E.** (1997). Level changes of jasmonic, abscissic, and indole-3yl-acetic acids in maize under desiccation stress. *J. Plant Physiol.* **151**, 120-124.
- Xiong Y., Contento A.L. Bassham D.C.** (2005). AtAPG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **42**, 535-546.
- Xu L., Zheng S, Zheng L., Wang X.** (1997). Promoter analysis and expression of a phospholipase D gene from *Ricinus communis* L. *Plant Physiol.* **115**, 387-395.
- Xu F.X., Chye M.L.** (1999). Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. *Plant J.* **17**, 321-327.

- Yamada K., Matsushima R., Nishimura M.I., Hara-Nishimura I.** (2001). A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* **127**, 1626-1634.
- Yamauchi Y., Ejiri Y., Tanaka K.** (2002). Glycation by ascorbic acid causes loss of activity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase and its increased susceptibility to proteases. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1334-1341.
- Yamaya T., Obara M., Nakajima H., Sasaki S., Toshihiko H., Sato T.** (2002). Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling. *J. Exp. Bot.* **53**, 917-925.
- Yang J.C., Zhang J.H., Wang Z.Q., Zhu Q.S., Liu L.J.** (2003). Involvement of abscissic and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant Cell Environ.* **26**, 1621-1631.
- Yang S.F., Hoffman N.E.** (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 155-159.
- Yang S.H., Berberich T., Sano H. and Kusano T.** (2001). Specific association of transcripts of *tbzF* and *tbz17*, tobacco genes encoding basic region leucine zipper-type transcriptional activators, with guard cells of senescing leaves and/or flowers. *Plant Physiol.* **127**, 23-32.
- Yasumura Y., Hikoraka K., Hirose T.** (2007). Nitrogen resorption and protein degradation during leaf senescence in *Chenopodium album* grown in different light and nitrogen conditions. *Funct. Plant Biol.* **34**, 409-417.
- Ye Z.Z., Rodriguez R., Tran A., Hoang H., De Los Santos D. Brown S., Vellanoweth R.L.** (2000). The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **158**, 115-127.
- Yeh K.W., Chen J.C., Lin M.I., Chen Y.M., Lin C.Y.** (1997). Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam): A tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. *Plant Molecular Biology* **33**, 565-570.
- Yoon H.K., Kim S.G., Kim S.Y., Park C.M.** (2007). Regulation of leaf by NTL9-mediated osmotic stress signalling in *Arabidopsis*. *Mol. Cells* **25**, 438-445.
- Yoshida S.** (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 79-84.
- Yoshida T., Minamikawa T.,** (1996). Successive amino-terminal proteolysis of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *Eur. J. Biochem.* **238**, 317-324.
- Yuasa K., Maeshima M.** (2000). Purification, properties, and molecular cloning of a novel Ca^{2+} binding protein in radish vacuoles. *Plant Physiol.* **124**, 1063-1078.

- Zavaleta-Mancera H., Franklin K., Ougham H., Thomas H., Scott I.** (1999a). Regreening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids. *J. Exp. Bot.* **50**, 1683-1689.
- Zelisko A., García-Lorenzo M., Jackowski G., Jansson S., Funk C.** (2005). AtFtsH6 is involved in the degradation of the light harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *PNAS* **102**, 13699-13704.
- Zelisko A., Jackowski G.** (2004). Senescence-dependent degradation of Lhcb3 is mediated by a thylakoïd membrane-bound protease. *J. Plant Physiol.* **161**, 1157-1170.
- Zhang P., Wang F., Zhang L.F., Rui Z., Xu L.L.** (2007). Endopeptidase isoenzyme characteristics in *Cucumis sativus* leaves during dark-induced senescence. *J. Integr. Plant Biol.* **49**, 507-514.
- Zhao C., Wang J., Cao M., Zhao K., Shao J., Lei T., Yin J., Hill G.G., Xu N., Liu S.** (2005). Proteomic changes in rice leaves during development of field-grown rice plants. *Proteomics* **5**, 961-972.
- Zimmermann P., Zentgraf U.** (2005). The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters* **10**, 515-535.

Résumé - Plante de grande culture, le colza (*Brassica napus* L.) présente une faible efficacité d'utilisation de l'azote (EUA) due à une mauvaise remobilisation de l'azote (N) au cours de la sénescence foliaire. Afin de caractériser les mécanismes clés susceptibles d'améliorer l'EUA, les objectifs visaient à identifier les processus physiologiques, protéomiques et moléculaires impliqués dans la remobilisation du N au cours de la sénescence foliaire et de déterminer l'impact de bas intrants azotés sur ces processus.

Les jeunes feuilles de colzas privées en nitrate présentent un ralentissement de la sénescence concomitant à l'accumulation d'un inhibiteur de protéases correspondant à BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa), une protéine capable de se lier aux chlorophylles. La double fonction de BnD22 interviendrait dans la protection des tissus juvéniles en maintenant l'intégrité des protéines et la capacité photosynthétique en réponse aux stress abiotiques.

L'analyse des événements physiologiques et protéomiques associés à la remobilisation du N et à la sénescence foliaire a montré l'implication de protéines du métabolisme énergétique, de réponse aux stress et de protéolyse. Une protéase chloroplastidiale FtsH, une protéase à aspartate, une sous-unité du protéasome et une protéase à cystéine SAG12 sont successivement induites au cours de la sénescence. La privation en N accélère l'entrée en sénescence mais n'affecte pas la séquence des événements. Le faible niveau de N résiduel observé dans les feuilles chutées de colzas privés en N s'explique par la conjonction d'une sénescence précoce, d'une protéolyse rapide, et d'une augmentation de la durée et de l'intensité du recyclage du N.

Title - Physiological and proteomic modifications associated with nitrogen leaf remobilization during sequential senescence in oilseed rape (*Brassica napus* L.).

Abstract - *Brassica napus* L. (oilseed rape) is an important crop plant with low nitrogen use efficiency (NUE) due to a weak remobilization of nitrogen (N) during leaf senescence. In order to characterize the key processes able to improve the NUE, the objectives were to identify the physiological, proteomics and molecular events implied in N remobilization during leaf senescence, and to determine whether low mineral N availability impact on these events.

Young leaves of nitrate-deprived plants presented a delay of senescence concomitant with the accumulation of a trypsin inhibitor corresponding to BnD22 (*Brassica napus* Drought 22 kDa), a protein capable of binding chlorophylls. The dual function of BnD22 could be involved in the protection of younger tissues by maintaining protein integrity and photosynthesis capacity in response to abiotic stresses.

The analysis of proteomics and physiological events associated with N remobilization and leaf senescence revealed the involvement of proteins acting in energy metabolism, plant stress response and proteolysis. A chloroplastidial protease FtsH, an aspartic protease, a proteasome subunit and a cysteine protease SAG12 were successively induced during leaf senescence. The N starvation led to accelerate the onset of leaf senescence but did not affect the sequence of events. The weak level of residual N observed in fallen leaves of oilseed rape deprived in N was explained by the premature senescence, the faster proteolysis, and the increase of duration as well as intensity of N recycling.

Mots clés :

Indexation rameau : Azote, Colza, Plantes-Développement, Physiologie végétale, Protéomique, Feuilles, Antipeptidases.

Indexation libre : Efficacité d'utilisation de l'azote, Flux de ^{15}N , Sénescence foliaire, Indicateur moléculaire de sénescence, Protéolyse.

Discipline : Biologie Végétale et Animale

Laboratoire :

UMR INRA-UCBN 950 Écophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition N, C, S
Université de Caen Basse-Normandie
Esplanade de la Paix
14032 Caen Cedex
