Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Caractérisation et explicitation des modifications des signatures ionomiques des végétaux induites par différentes carences minérales

Présentée et soutenue par
GALATEA COURBET

Thèse soutenue le 27/01/2022 devant le jury composé de		
MME JULIETTE LEYMARIE	Professeur des universités, Université Paris-Est Créteil (UPEC)	Rapporteur du jury
M. JEREMY LOTHIER	Maître de conférences HDR, UNIVERSITE ANGERS UFR SCIENCES	Rapporteur du jury
MME JULIE BOUDET	Maître de conférences, Université Clermont Ferrand 1 Auvergne	Membre du jury
MME MARIE-PASCALE PRUD'HOMME	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. ALAIN OURRY	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. PHILIPPE ETIENNE	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par ALAIN OURRY et PHILIPPE ETIENNE, Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

Remerciements

Pour un doctorant, une thèse est l'aboutissement d'un travail de recherches, d'analyses et d'interprétations, sur un sujet original, qui lui tient à cœur. C'est une aventure passionnante, mais semée d'embûches, s'inscrivant dans la durée et qui participe à une transformation personnelle et professionnelle de « soi ». De nombreuses personnes se sont trouvées sur mon chemin initiatique et je souhaiterai, dans ces quelques lignes, les remercier.

Je tiens à remercier la directrice de l'UMR INRAE-UCN 950 EVA, Marie-Pascale Prud'homme et son directeur adjoint Philippe Lainé, qui m'ont accueillie avec gentillesse et bienveillance dans leur laboratoire.

Mes remerciements au Pr. Juliette Leymarie et au Dr. Jérémy Lothier pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi qu'au Dr. Julie Boudet et au Pr. Marie-Pascale Prud'homme d'en être examinatrices.

Il est temps désormais de remercier chaleureusement les personnes qui m'ont le plus guidée dans ce travail, mes deux directeurs de thèse, Alain Ourry et Philippe Etienne. Merci à vous pour votre disponibilité, votre engagement et vos enseignements, en matière d'analyses et d'interprétations scientifiques. Cela m'a aidée à développer mon sens critique. Dans ces remerciements, je soulignerai également la complémentarité de vos compétences qui a permis de diriger cette thèse vers des chemins différents, mais tout en gardant son essence originelle, afin d'en extraire sa substantifique moelle ! J'espère faire bon usage, dans un futur très proche, des connaissances que vous m'avez transmises. Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Jacques Trouverie qui, même s'il n'était pas officiellement mon encadrant, a su m'accompagner, toujours avec bonne humeur et gentillesse, dans des réflexions pertinentes et complexes, notamment dans mes analyses de données transcriptomiques et métabolomiques.

Je tiens à remercier les membres du projet EAUPTIC qui ont partagé avec moi leurs connaissances, leurs conseils, leurs compétences et leur motivation. Merci à Sylvain Pluchon, Mustapha Arkoun, Anne Maillard, Bastien Billot, Lun Jing, Florence Cruz, Alain Ourry, Philippe Etienne, Jacques Trouverie, Sylvain Diquélou, Jean-Christophe Avice, Sophie Brunel-Muguet, Aurélia Lornac, Marion Prudent, Christophe Salon, Barbara Pivatot, mais également mes deux

collègues doctorants Aurélien D'Oria et Cécile Jacques, qui ont embarqué sur le navire « EAUPTIC bonheur la chance » en même temps que moi.
Aurélia, ton accompagnement et ta participation au début de ma thèse, m'ont permis de démarrer mon travail plus sereinement et de m'intégrer plus facilement au laboratoire. Mes sincères remerciements pour le rôle essentiel et bénéfique (et oui, tel un élément du ionome fonctionnel) que tu as joué.

Merci à Julie, Anne-Françoise, Magalie, Josiane, Olivier, Bénédicte et l'ancienne équipe PLATIN' (Fanny, Frédérine, Jehane et Josette) qui ont partagé avec moi leur temps et leur énergie. Sans vos compétences et interventions respectives, ce travail n'aurait pas donné autant de fruits. Anne-Françoise, merci pour ta disponibilité et ton attention en serre. Julie, merci pour ton travail minutieux et ta bonne énergie qui dynamise une journée. Josette, merci d'avoir partagé avec moi ton esprit bourguignon, qui m'a permis de me sentir au laboratoire, un peu plus comme chez moi !

Merci à tous les membres du laboratoire EVA que je n'ai pas encore eu le plaisir de citer, Annette, JB, Servane (pour ces conseils pertinents et fort utiles en matière de statistique), Emma, les deux Sophie, Frédéric et Frédérik, Nathalie, Jean-François, Philippe, Julien.

Merci à la bonne humeur des doctorants avec qui j'ai partagé le bureau de la « Doc Team » et dont la devise était : « Le progrès des sciences est l'ouvrage du temps et de la hardiesse de l'esprit » (Voltaire). Ainsi, je remercie Hanh, Charlotte, Lethicia , Momo, Victor, Aurélien et Jérémy. Je vous souhaite plein de bonheur et de réussite !
Hanh, je tiens de tout mon cœur à te remercier pour ton amitié, ton dynamisme et tes encouragements. Je garderai en mémoire nos longues conversations téléphoniques pendant les week-ends. Notre synergie dans les épreuves, riche en émotions, de la thèse, nous a permis de tenir le cap !
Je tiens également à remercier, tous les anciens doctorants (Maxence, Émilie, Cylia), les ingénieurs (Emmanuelle, Raphaël, Lucie) et les stagiaires (Lucile, Valentin, Paul, Thibaut) que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours de ces trois ans.

Enfin, je remercie les personnes qui ont été et seront toujours les piliers de ma réussite. C'est grâce à votre dévouement, votre présence, vos encouragements, votre soutien, votre amour et votre foi en moi, que tout ceci a été possible. A mes parents, toujours de bons conseils et à ma sœur, pour son écoute et ses éclats de rires, c'est grâce à vous que j'ai pu garder l'esprit clair et me

souvenir que : « Science sans Conscience n'est que ruine de l'Âme. » (Rabelais). Merci à toute ma famille et belle-famille ! Je remercie tout particulièrement la personne qui prend le plus de place dans ma vie et dans mon cœur, mon Antoine d'amour, que j'ai rencontré en faisant ma thèse au laboratoire EVA. Ce manuscrit est le premier chapitre de notre conte de fées et je sais que tu es bien parti pour écrire le deuxième. Je ferai de mon mieux pour t'accompagner dans les joies et surtout, les méandres de la thèse, aussi sereinement et courageusement que tu l'as fait pour moi.

Table des matières

CHAPITRE I INTRODUCTION GENERALE **1**

CHAPITRE II SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **5**

I. La production agricole de colza et de blé **6**
1. Généralités sur le colza 6
1.1. Son cycle de développement 6
1.2. Les multiples usages du colza en tant qu'oléoprotéagineux 7
2. Les généralités sur le blé tendre 8
2.1. Le cycle de développement 8
2.2. Les usages du blé tendre dans l'alimentation humaine et animale 9

II. Les éléments minéraux requis pour la croissance et le fonctionnement des végétaux **10**
1. Le ionome fonctionnel 10
1.1. Éléments essentiels ou bénéfiques à la croissance et au développement des végétaux 11
1.2. Mécanismes d'absorption des éléments essentiels chez les végétaux 11
1.2.1. Les macroéléments 12
1.2.1.1. L'azote (N) 13
1.2.1.2. Le magnésium (Mg) 15
1.2.1.3. Le phosphore (P) 16
1.2.1.4. Le soufre (S) 16
1.2.1.5. Le potassium (K) 17
1.2.1.6. Le calcium (Ca) 18
1.2.2. Les microéléments et éléments bénéfiques 18
1.2.2.1. Le bore (B) 19
1.2.2.2. Le chlore (Cl) 20
1.2.2.3. Les cations divalents 20
1.2.2.4. Le molybdène (Mo) 21
1.2.2.5. Le sodium (Na) 22
1.2.2.6. Le silicium (Si) 23
1.2.2.7. Le sélénium (Se) 24
2. Remobilisation des éléments minéraux 24

III. Symptômes visuels et réponses ionomiques, physiologiques et moléculaires à une carence minérale **26**
1. Symptômes visuels des carences nutritionnelles et mécanismes associés 26
2. Réponses adaptatives à une carence minérale 28
2.1. Stimulation et orientation de la croissance racinaire 28
2.2. Induction des gènes codant des transporteurs racinaires 29
2.3. Remobilisation des réserves 30
3. Modifications du ionome lors de carences minérales 32
3.1. Interactions entre éléments impliquant les mécanismes d'absorption racinaire 32
3.2. La sélectivité du cadre de Caspary pour le transfert des éléments vers les parties aériennes 33
3.3. Interactions entre éléments à l'échelle de nœuds métaboliques 34

3.4. La composition du ionome est-elle spécifique d'une carence ? Vers la notion de signature ionomique 35
3.5. Composition ionomique et réponses transcriptomiques lors d'une carence nutritionnelle 35

IV. Objectifs de la thèse 38

CHAPITRE III RESULTATS 40
I. Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* Subjected to Macronutrient Deprivation 43
1. Introduction 43
2. Materials and Methods 45
2.1. Plant Material and Growth Conditions 45
2.1.1. Growth Conditions of Oilseed Rape and Wheat 45
2.1.2. Growth of *Arabidopsis* Lines 46
2.2. Element Analysis by Mass Spectrometry and Calculations 46
2.3. Statistical Analysis 46
3. Results 46
3.1. Biomass Production During 10 Days of Macronutrient Deprivation 46
3.2. Species-Specific Ionome 48
3.3. Relative Root Nutrient Amounts Under Macronutrient Deprivation 48
3.4 Plant Mineral Nutrient Net Uptake and Relative Tissue Contents Under Deprivation 49
4. Discussion 52
5. Conclusion 55

II. Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* Exposed to Micronutrient or Beneficial Nutrient Deprivation and Predictive Sensitivity of the Ionomic Signatures 61
1. Introduction 62
2. Materials and Methods 63
2.1. Plant Material and Growth Conditions 63
2.2. Elemental Content Analysis and Calculations 64
2.3. RNA Extraction, Reverse Transcription (RT), and Quantitative PCR (q-PCR) Analysis 64
2.4. Statistical Analysis 64
3. Results 66
3.1. Root and Shoot Biomass 66
3.2. Relative Root Nutrient Content Under Micronutrient and Beneficial Nutrient Deprivation 66
3.3. Relative Net Uptake of Mineral Nutrients and Their Concentration in Plant Tissues 66
3.4. Plasticity and Specificity of the Ionome Composition When Exposed to Mineral Nutrient Limitation 68
4. Discussion 72
4.1. The Ionome Discriminates Species, Tissues and Most Nutrient Deficiencies 72
4.2. Leaf Ionomic Signatures Are Determined by Specific Crosstalks, Some Known, Some Still Unknown 75
5. Conclusion 76

III. Comparative Omics Analysis of *Brassica napus* Roots Subjected to Six Individual Macronutrient Deprivations Reveals Deficiency-Specific Genes and Metabolomic Profiles 85
1. Introduction 85
2. Results 87

2.1. A 10-Day Single Macronutrient Deprivation Had Minor Effects on Biomass and Photosynthetic Activity 87
2.2. Overview of the Root Transcriptome of Brassica napus Deprived of N, Mg, P, S, K, or Ca for 10 Days 87
2.3. Functional Classification of DEGs for Each Macronutrient Deprivation in Roots of Brassica napus 88
2.4. Identification and Functional Classification of DEGs Specific to a Single Macronutrient Deprivation 91
2.5. Metabolic Profiling of Individual Macronutrient Deprivations 94
3. Discussion 96
3.1. Macronutrient Deprivations Led to Profound Transcriptomic and Metabolomic Modifications in Roots 97
3.2. Identification of Sets of DEGs and Metabolomic Profiles Specific to Each Macronutrient Deprivation 98
3.3. Towards Molecular Indicators to Discriminate Macronutrient Deficiencies 99
4. Material and Methods 100
4.1. Plant Material and Growth Conditions 100
4.2. RNA Extraction, Reverse Transcription and Q-PCR Analyses 100
4.3. Transcriptomic Analysis by RNA-Sequencing (RNA-Seq) 101
4.4. RNA-Seq Bioinformatic Analysis 102
4.5. Element Analysis by Mass Spectrometry and Uptake Calculation 102
4.6. Untargeted Metabolic Profiling Using UPLC-MS/MS 102
4.7. Statistical Analysis 103

CHAPITRE IV DISCUSSION GENERALE 111

I. Mise au point d'une solution nutritive permettant d'obtenir une composition élémentaire comparable entre les plantes cultivées en conditions contrôlées et en conditions de plein champ 112

II. Application des carences nutritionnelles chez le colza (*Brassica napus*) et le blé (*Triticum aestivum*) 113

III. La composition ionomique est caractéristique de l'espèce végétale, mais aussi, du tissu considéré 114

IV. Les carences nutritionnelles conduisent, en impactant la barrière casparienne et les mécanismes de remobilisation, à des modifications du ionome. 115

V. De nombreuses interactions entre éléments sont mises en évidence lors de carences nutritionnelles 116

VI. Interactions entre éléments et détermination de signatures ionomiques de carences 119

VII. Une analyse transcriptionnelle pour mieux comprendre les interactions nutritionnelles 120

VIII. Analyse comparative des transcriptomes racinaires de colzas carencés en macroéléments : vers la notion d'indicateurs moléculaires de carences nutritionnelles. 123

IX. Identification des gènes et des métabolites spécifiques à chacune des 6 carences en macroéléments 124

CHAPITRE V PERSPECTIVES 126

I. Perspectives de recherches au niveau fondamental 127

1. Finaliser le développement d'une solution nutritive permettant d'obtenir une composition ionomique proche entre plantes cultivées en hydroponie ou au champ. 127
2. Caractériser d'autres interactions ionomiques 128
3. Développer un outil moléculaire de diagnostic de carences nutritionnelles au niveau foliaire 128

II. Perspectives de développement : préciser la signature ionomique de carences nutritionnelles et identifier les signatures ionomiques d'autres facteurs abiotiques 129

Références bibliographiques 131

Abréviations

- A -

AAP : Amino Acid Permeases

ABA : acide abscissique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AMT : Ammonium Transporter

APS : Adenosine 5'-phosphosulfate

APR : APS reductase

ARNm : Acide ribonucléique messager

atg : Autophagy-related gene

ATP : Acide adénosine-triphosphorique

ASN : Asparagine

AVT : Transporteur vacuolaire d'acide aminé

- B -

$B(OH)_3$: Acide borique

BOR : Boron transporter

- C -

CaM : Calmoduline

CBL : Calcineurin B-like

CDPK : Calcium dependent protein kinase

CIPAN : Cultures Intermédiaires Pièges A Nitrate

CIPK : CBL-interacting protein kinase

CLC : ChLoride Channel

CO_2 : Dioxyde de carbone

COPT : Copper transporter

COS : Sulfure de carbonyle

Cnx : Cofactor for Nitrate reductase and Xanthine dehydrogenase

cPMP : cyclic pyranopterin monophosphate

CS : Cysteine Synthase

Cys : Cystéine

- D -

DACC : Depolarization-Activated Cation Channels

DEG : Differentially Expressed Gene

DMAS : Acide désoxymuginéique synthase

DMS : Diméthylsulfure

DUR : Urea active transporter

DiT : Transporteur de dicarboxylate

- E -

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

EMAG : Esters Méthyliques d'Acides Gras

EMHV : Esters Méthyliques d'Huile Végétale

EUN : efficience d'usage nutritionnelle

EVA : Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S.

- F -

FACE : Free Air CO_2 Enrichment

FRO : Ferrique oxidase

- G -

GO : gene ontology

GS-GOGAT : Glutamine synthétase/Glutamate synthase

Gly : Glycine

GTP : Guanosine triphosphate

- H -

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

$H_2PO_4^-$ /HPO_4^{2-} : Ion dihydrogénophosphate

H_2S : Sulfure d'hydrogène

HACC : Hyperpolarization-Activated Cation Channels

HAK / HKT: High-Affinity K^+ Transporters

HATS : High-Affinity Transport System

- I -

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

IRT : Iron Regulated Protein

- K -

K_2O : Oxyde de potassium

KIG : Known Ionomic Genes

KO : Knockout

KT : K^+ transporter

- L -

LATS : Low-Affinity Transport

LCT : Low-affinity Cation Transporter

LHT1 : Lysine/Histidine Transporter 1

Lis : Lower silicon transpoorter

- M -

MA : Phytosidérophores de la famille de l'acide muginéique

MEP : Méthyl ammonium perméase

Met : Méthionine

MGT : Magnesium transporter

MoCo : Cofacteur à molybdène

MoO_4^{2-} : Molybdate

MOT1 : MOlybdenum Transporter 1

MPT : Molybdopterin

MTP : Metal Tolerance Proteins

MPT–AMP : Adenylated MPT

- N -

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$: Heptamolybdate d'ammonium

N_2 : Diazote

N_2O : Oxyde nitreux

NA : Nicotianamine

NAAT : Nicotianamine aminotransférase

NAS : Nicotianamine synthase

NaCl : Chlorure de sodium

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogen

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAXT : Transporteur d'excrétion de nitrate

NH_3 : Ammoniac

NH_4^+ : Ammonium

NIP : Nodulin-26-like intrinsic proteins

NO_3^- : Nitrate

NPF : Nitrate/Peptide Family

NRAMP : Natural Resistance Associated Macrophage Protein

NRT : Nitrate transporter

NSCC : Canaux cationiques non sélectifs

- O -

$O_2.^-$: Superoxyde

OAS : O-acétyl-sérine

OPT : Oligopeptide transporter

- P -

P_2O_5 : Pentoxyde de phosphore

PAPS : Phosphoadénosine phosphosulfate

PEZ : Phenolics efflux zero

pH : Potentiel hydrogène

PHT : Phosphate transporter

Pi : Phosphate inorganique

PLS-DA : Partial Least-Squares Discriminant Analysis

ppm : partie par million (10^{-6})

PR : Pathogenesis related Proteins

ProT, transporteur de proline et de glycine-bétaïne

- R -

RG-II : Rhamnogalacturonane de type II

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

- S -

S^{2-} : Ion sulfure

SAG : Senescence-Associated Genes

SAM : S-adenosylmethionine

SAT : Serine acetyl transferase

SAV : Sénescence Associated Vacuoles

SDG : Senescence-Down regulated Genes

Se^{2-} : Sélénide

SeCys : Sélénocystéine

SeMet : Sélénométhionine

SeO_3^{3-} : Sélénite

SeO_4^{2-} : Sélénate

$Si(OH)_4$: Acide silicique

SiO_2 : Dioxyde de silicium

SKOR : Stelar K^+ Outward Rectifier

SL : Selenocysteine lyase

SLAC/SLAH : Slow Anion Channel associated homologs

SO : Sulfite oxydase

SO_2 : Dioxyde de soufre

SO_3^{2-} : Sulfite

SO_4^{2-} : Sulfate

SOS1 : Salt Overly Sensitive 1

SULTR : Sulfate transporter

- T -

TOM1 : Transporter of Mugeic acid

TOR : Target of Rapamycin

- U -

UmamiT : Transporteur d'acides multiples

UPS : Perméase d'uréide

- V -

VIC : Voltage-Independant Channels

VIP : Variable Importance of Projection

VO_4^{3-} : Vanadate

VPT : Vacuolar Phosphate Transporter

- W -

WT : Wild Type

- X -

XRF : X-Ray Fluorescence

- Y -

YS-YSL : Yellow Strip-YS like

- Z -

ZIP : Zinc-regulated transporter

Chapitre I

Introduction Générale

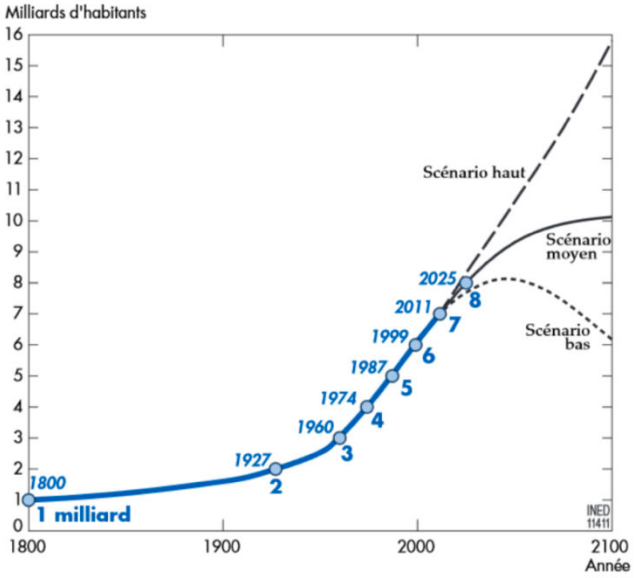


Figure I. 1 : Évolution de la population mondiale depuis 1800 et les différentes projections jusqu'en 2100 (Leménager *et al.,* 2016)

Tableau I. 1 : Apports en engrais azotés et phosphatés en kt en France entre 2016 et 2019 (données Eurostat)

	2016	**2017**	**2018**	**2019**
Engrais azotés	2 221	2 248	2 142	2 131
Engrais phosphatés	192	187	191	182

Depuis plusieurs décennies, face à une constante progression de la population mondiale (Fig I. 1) et de la demande alimentaire, l'agriculture s'est orientée vers une production intensive et à haut rendement, impliquant l'apport d'intrants, notamment azotés (FAO, 2019). Par exemple, en France entre 2016 et 2019, les apports en engrais azotés furent en moyenne de 2 185,5 kt, contre seulement 188 kt d'apports phosphatés (Tab I. 1, Eurostat). Néanmoins, si l'augmentation de l'utilisation d'engrais a permis d'augmenter la production agricole, cela s'est fait au détriment de l'environnement. En effet, l'utilisation massive d'engrais azotés a entrainé l'épuisement des réserves d'éléments nutritifs, car usuellement l'exportation des éléments par les récoltes n'est pas compensée par une fertilisation équivalente ou un enfouissement des résidus de culture. Selon la littérature, 20 éléments sont essentiels à la croissance et au développement des plantes et doivent être acquis en quantité suffisante ; azote (N), magnésium (Mg), phosphore (P), soufre (S), potassium (K), calcium (Ca), le bore (B), chlore (Cl), manganèse (Mn), fer (Fe), nickel (Ni), cuivre (Cu), zinc (Zn) et molybdène (Mo), sodium (Na), silicium (Si), aluminium (Al), vanadium (V), cobalt (Co) et sélénium (Se). L'agriculture intensive a également entrainé la dégradation des propriétés physicochimiques des sols (par exemple, dégradation des terres, érosion et modification du pH des sols), la pollution des nappes phréatiques *via* le lessivage de nitrate (Fig I. 2) et le rejet de gaz à effet de serre tel que l'oxyde nitreux (N_2O) (Fig I. 3 ; Eagle *et al.,* 2017 ; Institute of Applied Ecology, 2021). Les changements climatiques de plus en plus importants ont également des répercussions majeures sur la nutrition des plantes et les choix alimentaires de certaines populations. En effet, les changements climatiques induisent des périodes de sécheresse (Fig I. 4), des inondations et des tempêtes, qui peuvent limiter la disponibilité alimentaire et exposent les populations des pays les plus pauvres à la dénutrition (FAO, 2016). Il a été estimé qu'environ 60% des sols cultivés souffrent de problèmes limitant la croissance des végétaux, notamment par le biais de carences nutritionnelles (Schjoerring *et al.,* 2019). Pour pallier cela, les plantes vont mettre en place différentes stratégies et mécanismes pour optimiser l'acquisition des éléments minéraux tels que ; (i) la modification de l'architecture racinaire, (ii) la sécrétion d'exsudat racinaire au sein de la rhizosphère, (iii) la régulation à la hausse de l'expression des gènes codant des transporteurs plus ou moins spécifiques d'éléments et (iv) les processus de remobilisation des éléments (qui peuvent être associés à la sénescence et à l'autophagie) dépendant du stade de développement des plantes. La quantité des éléments dans les organes des plantes va largement être modulée par la mise en place de ces mécanismes, eux-mêmes influencés par l'intensité et la durée des limitations des éléments. Aussi, un des aspects majeurs actuels de la nutrition des plantes, mais également animale et humaine, est de préserver la fertilité des sols, leur permettant de fournir des nutriments au bon moment et en bonne quantité pour les plantes en croissance (Johnston et Bruulsema, 2014 ; Withers *et al.,* 2018 ; Schjoerring *et al.,* 2019).

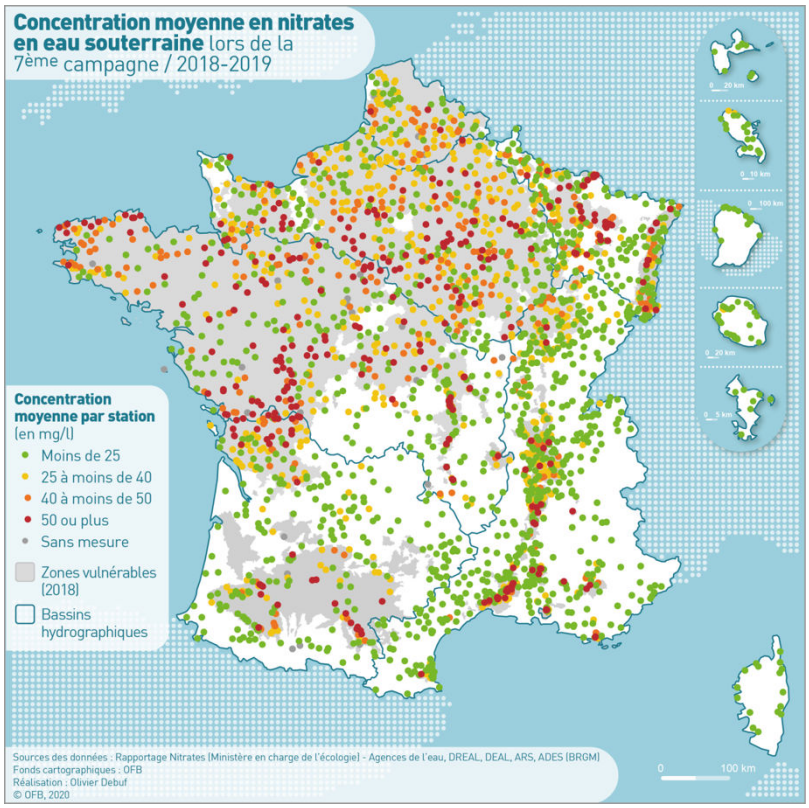


Figure I. 2 : Carte des concentrations moyennes en nitrate (mg/L) dans les eaux souterraines en 2018/2019 en France (progamme-nitrate.gouv)

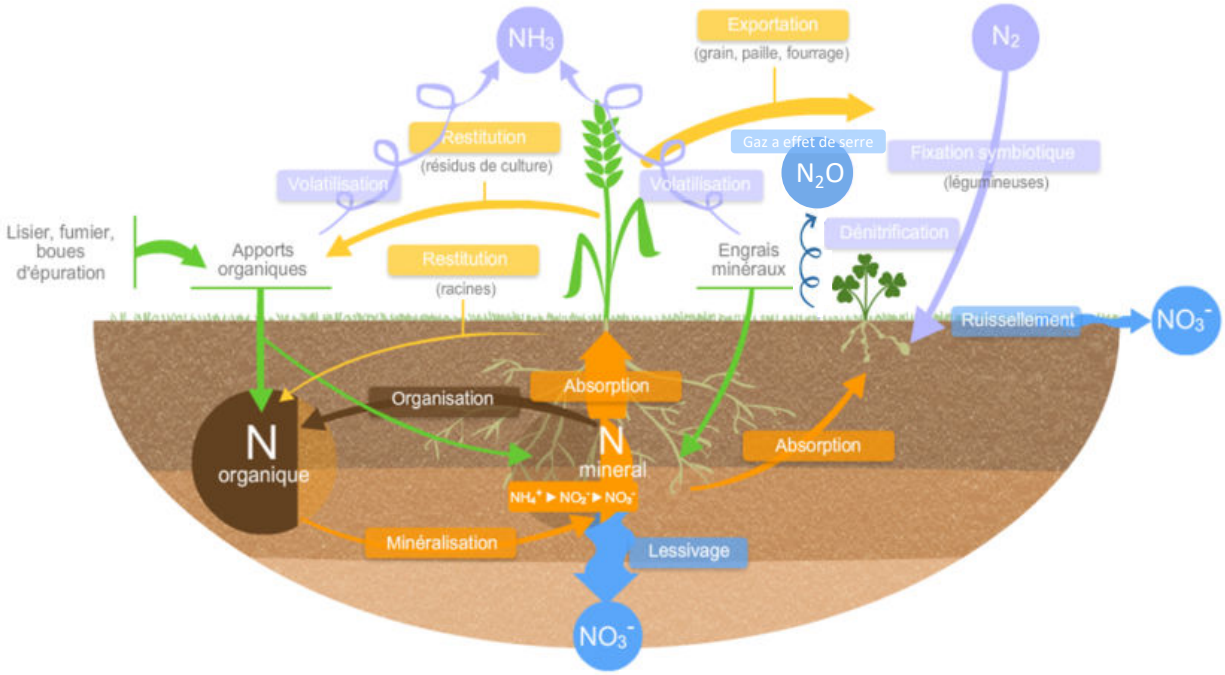


Figure I. 3 : Cycle de l'azote au sein d'une parcelle agricole (progamme-nitrate.gouv)

Cependant, améliorer la fertilisation et en conséquence le rendement et la qualité des produits agricoles, nécessitent une compréhension préalable des mécanismes physiologiques et moléculaires régulant l'absorption, l'assimilation et la remobilisation des éléments, c'est-à-dire, appréhender les mécanismes sous-jacents à une meilleure efficience nutritionnelle. Ceux-ci peuvent être mis en avant par des approches « omiques » telles que la ionomique, portant sur l'étude des éléments minéraux, par exemple l'accumulation de Mn, Co, Zn, et Cd dans les plantes carencées en Fe (Baxter, 2009). Ces approches « omiques » peuvent être complétées par des études agronomiques (Hirel *et al.,* 2011). En effet, l'amélioration de la disponibilité de l'azote dans le sol et/ou son absorption, son assimilation et sa remobilisation par les végétaux peuvent également être améliorées par le développement d'engrais éco-innovants aux propriétés biostimulantes, issus de substances naturelles. En agronomie, l'efficience d'usage nutritionnelle (EUN) est un paramètre utilisé pour évaluer la capacité des végétaux à utiliser les éléments minéraux (souvent l'azote) prélevés pour produire de la biomasse (Congreves *et al.,* 2021). Dans le cas de l'azote, elle est définie comme la quantité de masse sèche produite par unité d'azote prélevée dans le sol (Hirose, 2011). L'EUN est modulée par un ensemble d'interactions physiologiques et environnementales, qui sont spécifiques au génotype d'une espèce donnée et propres aux tissus et organes considérés. Aussi, il est indispensable d'étudier une large gamme de génotypes couvrant la diversité génétique d'une culture, avant de retenir une variété comme efficace. De plus, certains éléments minéraux pourraient être considérés comme des biostimulants, permettant de limiter les pertes de rendement et de maintenir, dans une certaine mesure, la qualité nutritionnelle des produits récoltés, lorsque les végétaux doivent faire face à des conditions de stress abiotiques. A titre d'exemple, le silicium, l'un des éléments minéraux les plus abondants sur terre, peut être utilisé en tant qu'élément bénéfique stimulant la défense des plantes soumises à des stress biotiques ou abiotiques. Plusieurs études ont déjà mis en avant le rôle du silicium dans la réduction des effets des stress nutritionnels, hydriques, salins, thermiques ou liés à des pathogènes fongiques et insectes (Ma, 2004 ; Hashemi *et al.,* 2010 ; Yavaş et Ünay, 2017 ; Haddad *et al.,* 2018 ; Song *et al.,* 2021). Ce rôle bénéfique est probablement dû à la polymérisation du silicium sous la cuticule et dans les parois cellulaires pour former une barrière mécanique (Song *et al.,* 2021) et rendre les tissus plus résistants (Ma, 2004). Le silicium a également la capacité de retarder la sénescence des feuilles pour atténuer les dommages associés à une privation en N (Haddad *et al.,* 2018).

Cette thèse a été réalisée au sein de l'UMR INRAE-UCN 950 EVA et financée par le projet FUI EAUPTIC. L'objectif global du projet est d'apporter des solutions aux perturbations de la

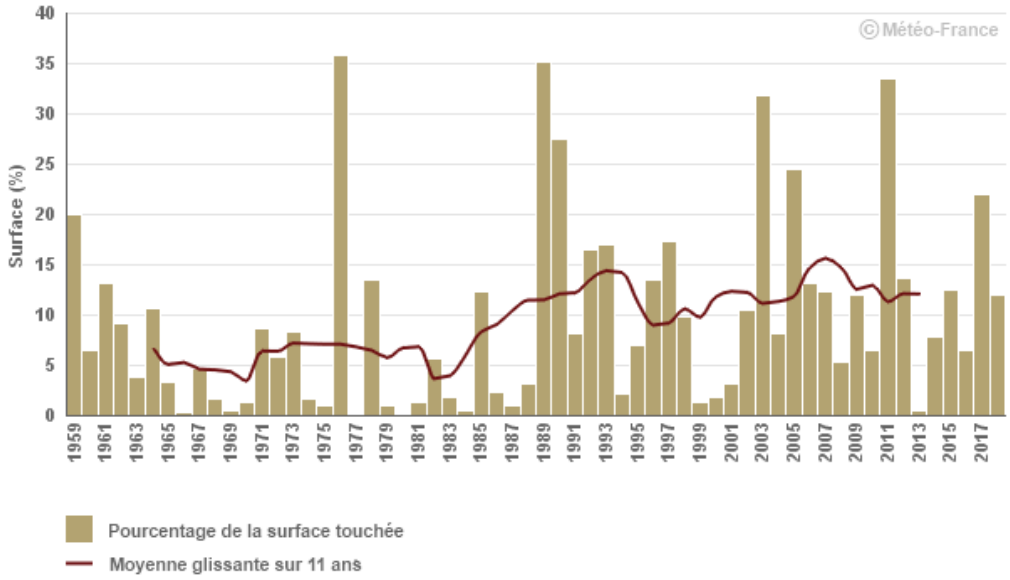


Figure I. 4 : Pourcentage de la surface annuelle de la France métropolitaine touchée par la sécheresse depuis 1959 (Météo-France).

nutrition minérale résultant de stress abiotiques afin d'assurer une productivité agricole compétitive et plus respectueuse de l'environnement. Trois espèces d'importance agronomique ont été sélectionnées pour conduire les travaux de recherches répartis entre les différents partenaires (*Brassica napus* et *Triticum aestivum* à Caen, *Pisum sativum* à l'INRAE de Dijon). Ma contribution, utilisant les 2 premières espèces, a donc porté sur l'identification des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la réponse aux carences en éléments minéraux. Pour ce faire, deux stratégies ont été mises en place :

✓ Étudier les effets des carences nutritionnelles chez le colza et le blé, à la fois sur la modification des signatures ionomiques, l'absorption minérale et les interactions entre éléments.

✓ Combiner des analyses transcriptomiques et métabolomiques effectuées sur des racines de *Brassica napu*s soumises à six privations individuelles en macronutriments, afin d'identifier des réponses similaires ou spécifiques à chaque privation en macronutriment, avant tout effet sur la croissance ou toute réponse phénotypique visuelle. A l'issue de cet objectif, le développement d'indicateurs élémentaires et moléculaires permettant de diagnostiquer une carence précoce en un élément et ainsi offrir de nouvelles opportunités pour la gestion de la fertilisation minérale, sera discuté.

Chapitre II

Synthèse bibliographique



Figure II. 1 : Planche botanique de *Brassica napus*

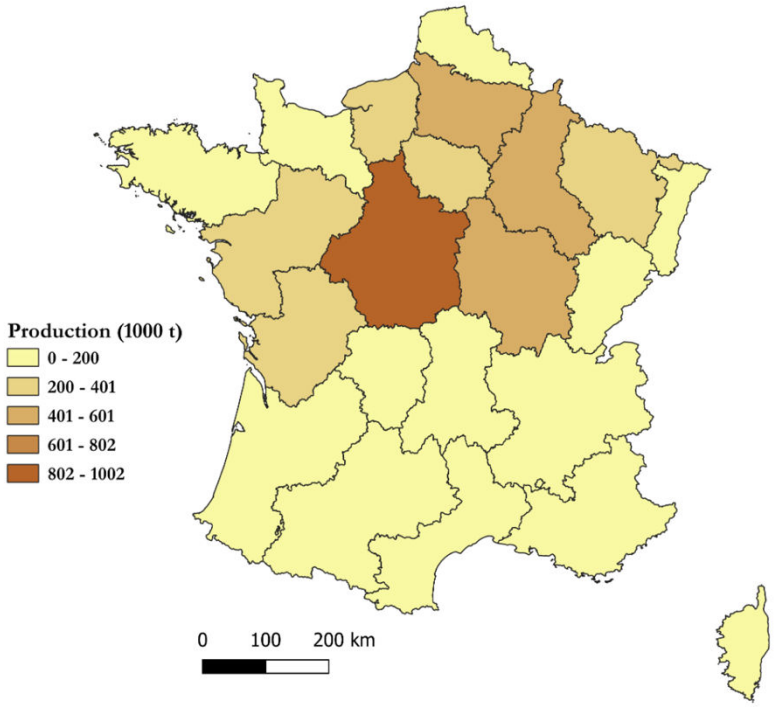


Figure II. 2 : Production de graines de colza et de navette d'hiver en 2018 par région en France métropolitaine (données Eurostat, carte réalisée avec le logiciel QGIS).

I. La production agricole de colza et de blé

1. Généralités sur le colza

1.1. Son cycle de développement

Le colza (*Brassica napus*) est une espèce annuelle appartenant à la famille des Brassicacées qui regroupe des espèces comportant une inflorescence en grappe avec des fleurs actinomorphes tétramères, composées de quatre pétales libres en croix et six étamines, puis de fruits secs déhiscents appelés siliques (Fig II. 1 ; Hervé Sauquet, Tela-Botanica). Le nom Brassica aurait été donné par Pline l'Ancien afin de désigner plusieurs espèces de choux (Gledhill, 2008).

Le colza, *Brassica napus* L. (AACC, 2n=4x=38), est une espèce allopolyploïde issue du croisement entre le chou (*Brassica oleracea*, CC, 2n=2x=18) et la navette (*Brassica napa*, AA, 2n=2x=20), faisant de lui une espèce tétraploïde (Florilège ; Chèvre *et al.,* 2016). Ce croisement remonterait à 7500 ans av. J.-C. et serait apparu sur le pourtour du bassin méditerranéen (Chalhoub *et al.,* 2014).

D'après d'anciens textes, l'utilisation du colza perdure depuis 2000 à 1500 ans av. J.-C, mais ce n'est qu'à partir du XVIIIe siècle que son exploitation grandit en Europe et principalement en Scandinavie, Flandres et Allemagne (Terres Univia). En France, la culture se développe dans le Nord autour des années 1750 et 1850 et s'étend sur le territoire en partant des Flandres (Techno-Science). Aujourd'hui, la culture du colza concerne l'ensemble du territoire français (Fig II. 2) et occupe environ 1 357 943 ha de terre agricole. Ainsi, entre 2016 et 2020, la culture de colza a occupé environ 11,7 % de la surface agricole occupée par les grandes cultures, ce qui la place en quatrième place derrière le blé tendre (41,7%), le riz (16,4%) et le maïs (12,3%). Le rendement moyen est de 32 quintaux.ha^{-1} et la production moyenne de graines avoisine les 5 millions de tonnes.an^{-1} (FranceAgriMer de 2020). Aux niveaux européen et mondial, le colza est l'une des 2 oléaprotéagineuses les plus cultivées derrière le soja et sa production de graines avoisine 20 et 60 millions de tonnes.an^{-1} dans le monde (fopoleopro).

De nos jours, de nombreuses variétés de colza ont vu le jour. Ces variétés se répartissent en deux grands groupes : le colza de printemps, qui a un cycle de 120 à 150 jours sans période de vernalisation au champ pour déclencher la floraison (James, 2018) et le colza d'hiver se caractérisant par un cycle plus long (250 à 310 jours), nécessitant une période de vernalisation de plusieurs semaines à des températures inférieures ou égales à 5°C (zéro végétatif du colza) (Fig II. 3). Le colza a un cycle de développement long comprenant deux grandes phases de croissance : une phase végétative et une phase reproductive. Pendant la phase végétative, le colza développe de nouvelles

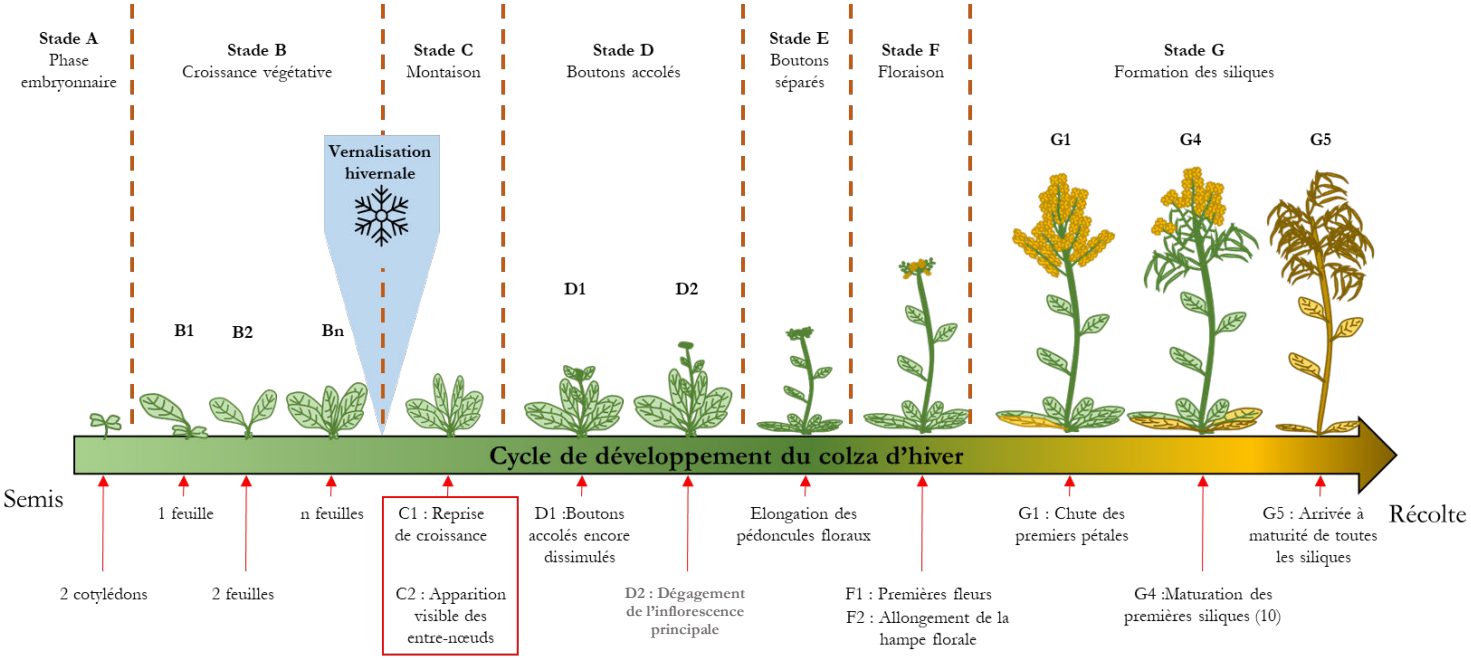


Figure II. 3 : Cycle de développement du colza d'hiver (inspiré de Bengtsson, 2013 ; Terre inovia)

Tableau II. 1 : Composition en acides gras des graines de colza (d'après Velasco et Becker, 1998 ; Spasibionek, 2006)

		Pourcentage du total d'acide gras
Acides gras insaturés	Acide oléique	46,8% ± 21,7%
	Acide linoléique (ω6)	19,5% ± 7,6%
	Acide linolénique (ω3)	8,7% ± 3,2%
	Acide eicosénoïque	6,2% ± 6%
	Acide érucique	11,4% ± 15,2% (hors variété 00)
Acides gras saturés	Acide palmitique	4% ± 0,7%
	Acide stéarique	1,4% ± 0,4%
	Acide arachidique	0,5%
	Acide béhénique	0,2%

parties aériennes, allant de la formation des cotylédons à la formation de la rosette. La phase reproductrice est quant à elle initiée à la montaison et s'achèvera à la maturation des graines.

1.2. Les multiples usages du colza en tant qu'oléoprotéagineux

Le colza est un oléoprotégineux cultivé principalement pour ses graines riches en matière grasse (environ 43% de la matière sèche) dont la trituration permet d'obtenir d'une part, de l'huile dédiée à l'alimentation humaine sous forme d'huile de colza et d'autre part, des résidus riches en protéines, appelés tourteaux, utilisés pour l'alimentation animale (Geay et *al.*, 1975 ; Barbour et Sim, 1991 ; Gomes et *al.*, 1995 ; Brandon et *al.*, 2006). L'huile de colza obtenue par trituration est riche en acide gras polyinsaturés (Tab II. 1) et notamment en ω6 (acide linoléique) et en ω3 (acide linolénique) avec un rapport entre ces deux acides gras généralement proche de 2 (Barth, 2007), ce qui en fait une huile d'excellente qualité pour l'alimentation humaine. En effet, selon un rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), tout aliment avec un rapport ω6/ω3 inférieur à 5 est considéré comme bénéfique pour la santé humaine, en permettant de prévenir notamment certaines maladies cardiovasculaires (Jahreis et Schäfer, 2011 ; Thiyam-Holländer et *al.*, 2012). Le tourteau coproduit lors de la production d'huile, du fait de sa forte teneur en protéines (environ 34% de la matière sèche, Fig. II. 4) présente une valeur nutritionnelle très intéressante pour l'alimentation animale (Arvalis-infos). Cependant, l'huile de colza était à l'origine très riche en acide érucique (ω9), un acide gras mono insaturé supposé néfaste pour la santé animale et humaine (EFSA) dont les proportions étaient généralement comprises entre 28 à 48% des acides gras totaux dans les variétés ancestrales. Dans les années 60-70 (Stefansson et *al.*, 1961, Morice, 1979), suite à la découverte au Canada de variétés possédant naturellement de faibles teneurs en acide érucique, de nouvelles variétés plus pauvres (appelées variétés 0) en cet acide gras ont été sélectionnées. Un peu plus tard, dans les années 80, de nouvelles variétés dites « double 0 (00) » ont été créées dans le but de produire des graines à faibles teneurs en acide érucique et en glucosinolates, des composés largement présents dans les tourteaux et connus pour entrainer des désordres physiologiques majeurs chez les animaux (Bourdon, 1986 ; Tripathi et Mishra, 2007).
Outre ces débouchés dans l'alimentation humaine et animale, il existe d'autres débouchés pour la culture de colza, comme la production de biocarburant. En effet, l'huile de colza est également riche en Esters Méthyliques d'Huile Végétale (EMHV) qui, après trans-estérification en présence de méthanol, aboutit à la synthèse d'Esters Méthyliques d'Acides Gras (EMAG) rentrant dans la composition du biodiesel. Il peut être souligné que l'extraction d'huile de colza pour la filière biocarburant et la synthèse d'EMAG qui lui est associée, s'accompagnent de coproduits tels que les tourteaux ou le glycérol qui peuvent être valorisés respectivement pour l'alimentation animale et les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Ministère de la transition écologique, 2021).

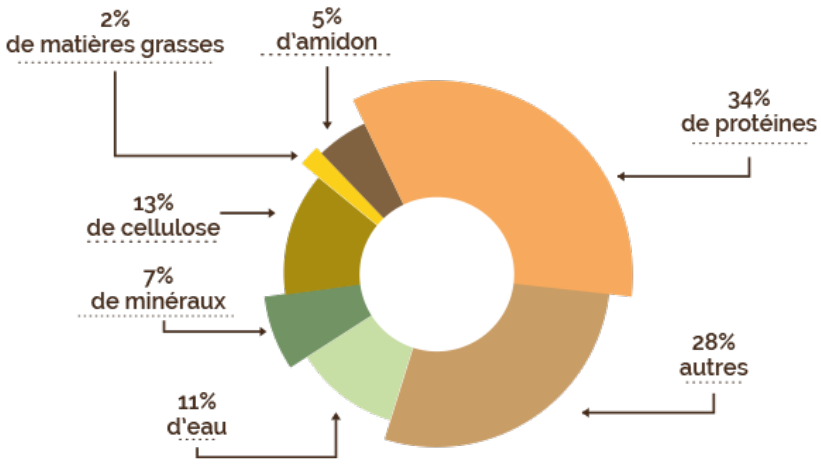


Figure II. 4 : Composition du tourteau de colza (Terres Univia)

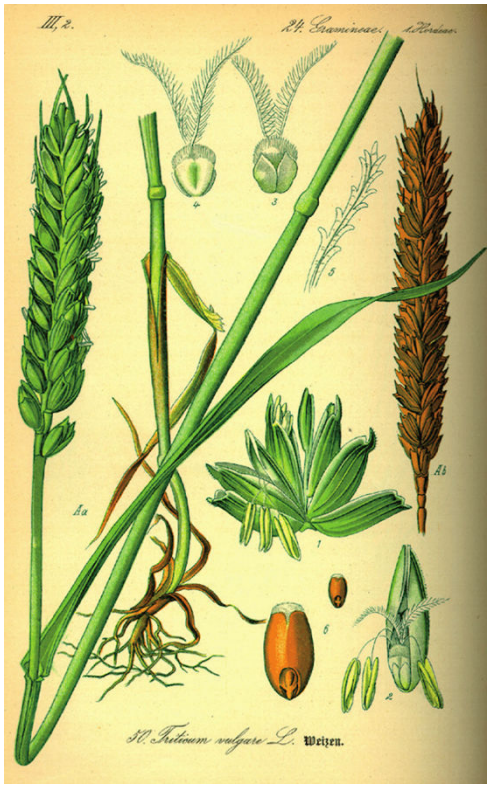


Figure II. 5 : Planche botanique de *Triticum aestivum*

Enfin, du fait de ses fortes capacités à absorber le nitrate, le colza fait partie des plantes utilisées comme « Cultures Intermédiaires Pièges A Nitrate (CIPAN) » (Pilorgé *et al.,* 2006 ; Valantin-Morison et Meynard, 2008 ; Chambre d'Agriculture Bourgogne, 2012). Ainsi, utilisé comme plante d'interculture lors de la période automno-hivernale, le colza permet de limiter les pertes d'N par lessivage des sols nus ou à couvert éparse (Pilorgé *et al.,* 2006). De plus, l'enfouissement du colza cultivé en interculture sera également bénéfique pour la culture suivante (notamment céréalière) puisque la décomposition de ses organes végétatifs riches en glucosinolates, conduit à l'émission de composés soufrés efficaces pour lutter contre de nombreux pathogènes, tels que le piétin-échaudage, la fusariose et la rouille (Terre Inovia).

2. Les généralités sur le blé tendre

2.1. Le cycle de développement

Le blé tendre (*Triticum aestivum*) est une espèce annuelle appartenant à la famille des Poacées. Ses inflorescences sont constituées d'épillets enveloppés dans deux glumes, où sont logés les grains. Chaque graine est ensuite enveloppée dans deux glumelles nommées paléole (glumelle supérieure) et lemme (glumelle inférieure). Les épillets du blé tendre contiennent généralement deux ou trois fleurs fertiles. Néanmoins, les épillets des blés tendres présentent une grande diversité d'aspects en raison du grand nombre de variétés créées en agriculture depuis plusieurs années (Fig II. 5).

Le blé est une espèce hexaploïde issue d'une double hybridation. Le premier croisement serait intervenu il y a 500 000 ans entre *Triticum urartu* et une espèce proche d'*Aegilops speltoides* afin de donner *Triticum dicoccoides*, qui une fois domestiquée par l'homme engendra *Triticum turgidum*, un blé tétraploïde. Le second croisement eut lieu avec le passage de la vie nomade à sédentaire des anciens hommes, il y environ 10 000 ans, entre l'hybride *Triticum turgidum* et *Aegilops tauschii*, pour donner le blé tendre, auparavant appelé épeautre. La base génétique de cette nouvelle espèce a par la suite, été enrichie durant l'Antiquité, par les échanges commerciaux de blé entre la Grèce et Rome. En France, au XVIe siècle apparait une spécialisation de la culture de blé tendre (ou épeautre) dans les régions de la Beauce, de la Brie, du nord de la France et de la Haute-Auvergne.

De nos jours, il existe plus de 350 variétés de blé tendre susceptibles d'être utilisées en agriculture et dont le cycle de développement s'étend sur 8 à 9 mois. La culture du blé tendre est généralement mise en place entre octobre et juillet de l'année suivante (Fig. II. 6). Il est préconisé de ne pas semer le blé tendre après le mois de janvier, car cette espèce nécessite une période de vernalisation qui peut commencer dès la germination. La durée de la période de vernalisation nécessaire à la montaison, varie selon la variété de blé considérée. Par exemple la variété Bagou a besoin de seulement 30 jours de températures froides (entre 3 et 10°C), tandis que la variété Caphorn nécessitera environ 50 jours (Chambre d'agriculture Gers, 2009 ; Arvalis-infos). D'un

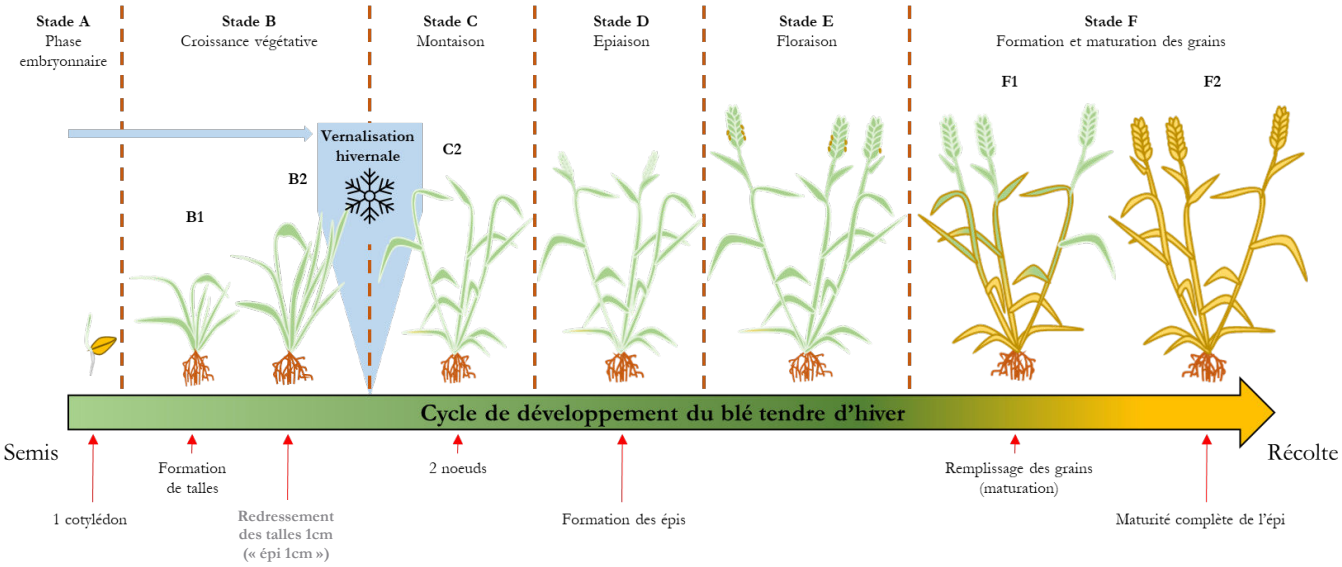


Figure II. 6 : Cycle de développement du blé tendre (inspiré de Zadoks *et al.,* 1974 ; Arvalis-Institut du végétal, 2016 ; Vivescia, 2021)

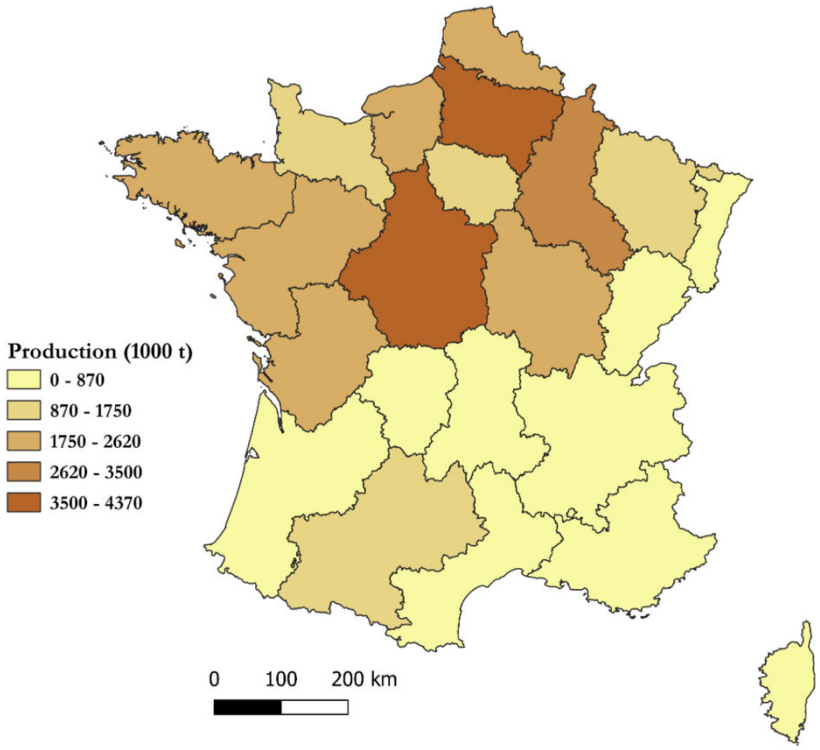


Figure II. 7 : Production de blé tendre et d'épeautre en 2018 par région en France métropolitaine (données Eurostat, carte réalisée avec le logiciel QGIS).

point de vue pratique, les exploitants agricoles considèrent que la montaison du blé débute à partir du stade repère dit « épi 1 cm » (Perspectives Agricoles, 2014). La récolte des grains a lieu entre juin et juillet, les pailles sont soit broyées, soit laissées sur place avant stockage sous forme de bottes ou de ballots.

2.2. Les usages du blé tendre dans l'alimentation humaine et animale

La filière céréalière française accorde depuis plusieurs années un grand intérêt à la qualité du grain de blé (FranceAgrimer, 2013). Celui-ci est composé en moyenne par rapport à la matière sèche d'un taux de protéines (albumines, globulines, gliadines, gluténines) de 12%, de 2 à 4% de lipides et de 70% d'amidon.

Le blé tendre est la céréale la plus produite en France et représente jusqu'à 50% de la production céréalière française (Caussade-Semences). En 2018 et 2019, les quatre régions les plus productrices furent les Hauts-de-France (20% de la production nationale), le Grand-Est (15%), le Centre -Val de Loire (13 %) et la Normandie (11 %) (Fig II. 7). La France est le premier producteur européen de blé avec une production totale d'environ 37 millions de tonnes par an (et un rendement moyen de 75 quintaux.ha^{-1}) dont la moitié est destinée au marché intérieur et l'autre moitié à l'exportation vers les pays européens limitrophes (Belgique, Italie, Hollande etc.) ou des pays tiers (Chine, Algérie, Maroc, Cuba, Afrique de l'ouest, Yémen, etc.) (Terre-net).

Les usages du blé tendre français dépendent de la teneur en protéines (et de la qualité) de ses grains. Ainsi, les grains de blé avec des teneurs protéiques supérieures ou égales à 9% de la matière sèche, sont généralement utilisés pour la panification et la biscuiterie. En France, la culture du blé tendre occupe environ 5 millions d'hectares, dont 90% sont cultivés avec des variétés panifiables (FranceAgrimer, 2013). A titre d'exemple, en 2018, environ 2,9 Mt de blé tendre ont été transformées et envoyées dans des industries de panification. La transformation du grain en farine est un procédé essentiellement mécanique. La séparation des différentes parties qui constituent le grain s'appelle « la mouture » et consiste en un enchainement de 3 étapes répétées autant de fois que nécessaire pour obtenir de la farine.

Lorsque la teneur en protéines des grains est inférieure à 9% de la matière sèche, le blé considéré comme non panifiable est utilisé en amidonnerie, dans l'alimentation animale (grains et pailles) et/ou la production de bioéthanol. Concernant la production de bioéthanol, les variétés de blé tendre utilisées sont celles présentant à la fois une faible teneur en protéines et une forte teneur en amidon dans leurs grains. Il est intéressant de noter que la création de cette filière bioéthanol a conduit, lors des dernières décennies, au développement de nouvelles pratiques culturales visant à augmenter la taille des grains et à diminuer leur teneur en protéines (Debiton, 2010).

Ainsi, le colza et le blé sont des espèces de grandes cultures ayant de multiples usages, néanmoins, elles sont toutes deux très demandeuses en fertilisants, afin d'obtenir de hauts rendements combinés à une bonne qualité des produits récoltés.

II. Les éléments minéraux requis pour la croissance et le fonctionnement des végétaux

Outre le carbone fixé par photosynthèse, l'oxygène capté dans l'atmosphère grâce à la respiration et l'eau absorbée au niveau racinaire, les plantes vasculaires doivent absorber, à partir de la solution du sol, de nombreux autres éléments minéraux (macro et microéléments, éléments bénéfiques) nécessaires à leur croissance et/ou leur permettant de mieux résister aux contraintes abiotiques auxquelles elles sont confrontées. La nutrition végétale regroupe l'ensemble des processus nécessaires à l'absorption racinaire de ces éléments minéraux présents dans le milieu environnant et à leur assimilation et/ou leur stockage dans la plante où ils participent au maintien de la croissance, du développement et de la reproduction.

1. Le ionome fonctionnel

La notion de ionome a été développée par Lahner *et al.* (2003) afin de regrouper en un seul terme tous les éléments constitutifs d'un organisme, c'est-à-dire le métallome (les métaux et métalloïdes) et les non métaux. Ainsi, le ionome peut être défini comme la composition en éléments minéraux d'un organisme ou d'un tissu (Baxter *et al.*, 2008). Le développement de la ionomique définie comme l'étude du ionome selon Baxter *et al.* (2008), fut une étape clef dans la compréhension de la nutrition minérale végétale et des mécanismes physiologiques mis en place, notamment lors de stimuli environnementaux (Salt, 2004). En effet, selon ces auteurs, la composition du ionome refléterait assez précisément l'état physiologique d'un organisme en réponse à des conditions environnementales données. L'analyse du ionome a été facilitée par des technologies d'analyses élémentaires à haut débit, reposant sur une transformation préalable de l'échantillon à analyser en aérosol *via* un plasma d'argon couplé avec un spectromètre permettant une identification des ions, soit par leur masse (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), soit par détection optique (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry). Une autre technique (XRF, X-Ray Fluorescence) repose sur l'analyse par réflexion des rayons X et autorise la quantification d'un certain nombre d'éléments. Cette dernière technique peut par ailleurs être complémentaire de l'ICP-MS puisqu'elle permet l'analyse d'éléments (notamment Cl, Al et Si) non quantifiables par spectrométrie de masse. Ce concept de ionome, développé depuis une quinzaine d'années, permet une approche plus globale de la

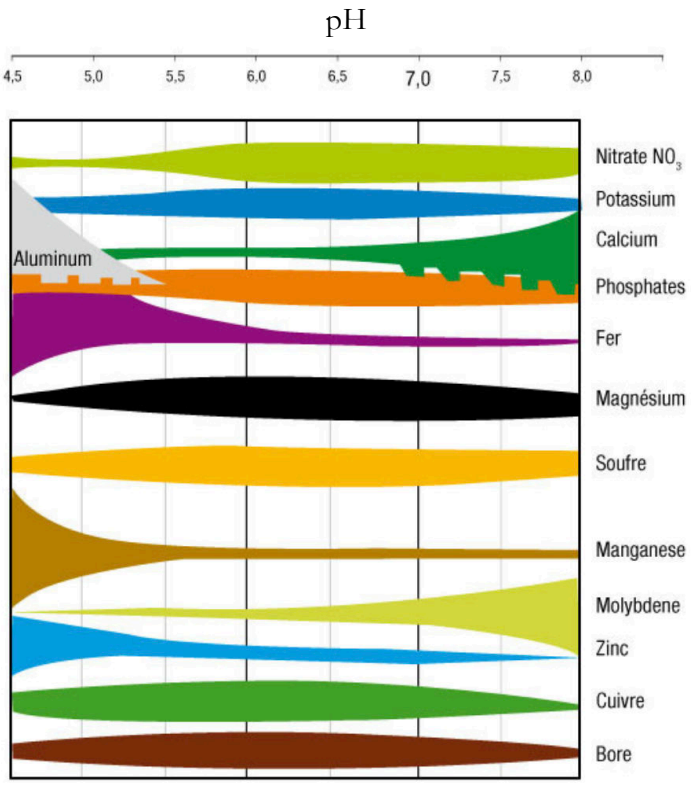


Figure II. 8 : Diagramme d'assimilabilité des éléments minéraux par les végétaux en fonction du pH selon Truog (1948) (unifa).

Tableau II. 2 : Répartition des apports d'engrais azoté pour la culture de blé tendre (inspiré d'Arvalis-infos, 2020)

Apport total	**Sortie d'hiver**	**Avant le début de montaison**	**Fin montaison – début épiaison**
Dépendant du rendement souhaité, de la variété, du sol, des cultures précédentes, de la région.	Jusqu'à 40 $kg.ha^{-1}$ Limiter l'apport	$2^{ème}$ apport (après soustraction des apports à la sortie d'hiver et à la fin de montaison – début épiaison)	$3^{ème}$ apport

nutrition minérale et en particulier des interactions entre différents éléments, alors que la majorité des travaux antérieurs ne prenaient en compte que l'analyse individuelle de quelques éléments. À ce jour, les études ionomiques ont permis de montrer que parmi tous les éléments du tableau périodique, 20 d'entre eux sont potentiellement requis par les végétaux et constituent ainsi leur ionome fonctionnel (Williams et Salt, 2009).

1.1. Éléments essentiels ou bénéfiques à la croissance et au développement des végétaux

Les plantes ont besoin d'éléments minéraux « essentiels » pour assurer leur croissance et leur développement. Ces éléments « essentiels » répondent à trois caractéristiques établies par Arnon et Stout en 1939 : (1) ils sont indispensables à l'achèvement du cycle de vie, (2) ils sont non remplaçables par d'autres éléments, et (3) ils sont directement impliqués dans le métabolisme des plantes. A notre connaissance, 14 éléments essentiels répondent à ces règles et peuvent à leur tour être divisés en deux catégories : les macroéléments (azote (N), magnésium (Mg), phosphore (P), soufre (S), potassium (K) et calcium (Ca)) retrouvés à des teneurs importantes dans les tissus végétaux (> 0,1% de la masse sèche) et les microéléments (bore (B), chlore (Cl), manganèse (Mn), fer (Fe), nickel (Ni), cuivre (Cu), zinc (Zn) et molybdène (Mo)) dont les teneurs sont inférieures à 0,1% de la masse sèche. Récemment, cette classification en macro et microéléments basée sur les teneurs tissulaires a cependant été partiellement remise en cause par Colmenero-Flores *et al.* (2019). Ainsi, ces auteurs suggèrent un changement de paradigme concernant le chlore jusqu'ici classé parmi les microéléments et qui pourrait être défini comme un macroélément bénéfique, en raison de sa teneur élevée chez certaines espèces, comme *Nicotiana tabacum*.

D'autres éléments considérés comme non essentiels, et nommés « éléments bénéfiques » (sodium (Na), silicium (Si), aluminium (Al), vanadium (V), cobalt (Co) et sélénium (Se)) composent également le ionome fonctionnel. Le rôle de cette troisième catégorie est de favoriser la croissance de certaines espèces végétales (Marschner, 2012) ou de leur apporter une meilleure tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Les teneurs des tissus végétaux en éléments bénéfiques sont en général faibles (souvent inférieures au ppm), sauf pour le Si, qui peut s'accumuler de façon importante chez certaines espèces comme les Equisetaceées où la teneur en Si peuvent atteindre jusqu'à 10% de matière sèche (Heather *et al.,* 2007).

1.2. Mécanismes d'absorption des éléments essentiels chez les végétaux

L'absorption des éléments par le système racinaire dépend de leur disponibilité dans le sol, elle-même conditionnée par des facteurs physiques, chimiques et biologiques propres à chaque milieu (Genot *et al.,* 2009). Par exemple, le pH influence parfois la biodisponibilité des éléments

Tableau II. 3 : Répartition des apports d'engrais PK pour la culture de blé tendre assolé selon les réserves du sol et la fertilisation passée pour un objectif de rendement de 80 $q.ha^{-1}$ (COMIFER, 2009 ; Unifa)

Réserves du sol	**Peu pourvu**		**Bien pourvu**		**Excellement pourvu**	
Apport ($kg.ha^{-1}$)	Aucun depuis 2 ans	Régulier	Aucun depuis 2 ans	Régulier	Aucun depuis 2 ans	Régulier
P_2O_5	83	68	52	0	0	0
P	36	30	23	0	0	0
K_2O	48	48	40	0	0	0
K	40	40	33	0	0	0

Tableau II. 4 : Répartition des apports d'engrais azoté pour la culture de colza d'hiver en fonction de la dose totale à apporter, sans excéder 100 $kg.ha^{-1}$ en un seul apport (inspiré de COMIFER, 2012 et Terres-Inovia, 2020)

Apport total ($kg.ha^{-1}$)	**Reprise de végétation (stades C1 – C2)**	**Début de montaison (stades C2 – D1)**	**Boutons accolés (stades D1 – D2)**	**Boutons séparés (stade E)**
< 100 (en 1 ou 2 apports)			< 100	
		1er apport	2nd apport	
100 à 170		60 à 80	Reste à apporter*	
> 170	40 à 50 (COMIFER) 40 à 60	Reste à apporter* (après soustraction des apports à la reprise de végétation et aux boutons séparés)		50 à 70 (COMIFER) 40 à 60

* La période d'apport diffère en fonction de la région considérée.

Tableau II. 5 : Répartition des apports d'engrais PK pour la culture de colza d'hiver selon les réserves du sol et la fertilisation passée pour un objectif de rendement de 35 $q.ha^{-1}$ (inspiré de COMIFER, 2009 et Unifa)

Réserves du sol	**Peu pourvu**		**Bien pourvu**		**Excellement pourvu**	
Apport ($kg.ha^{-1}$)	Aucun depuis 2 ans	Régulier	Aucun depuis 2 ans	Régulier	Aucun depuis 2 ans	Régulier
P_2O_5	163	97	66	44	35	0
P	71	42	29	19	15	0
K_2O	66	48	36	24	0	0
K	55	40	30	20	0	0

minéraux dans le sol. Plus le pH est acide, plus la disponibilité et l'absorption de certains éléments tels que le Mo et le Ca, sont limitées (Fig. II. 8). Un pH du sol proche de la neutralité ou légèrement acide, correspond donc à une valeur optimale pour la majorité des éléments requis. Les éléments minéraux sont généralement absorbés par des transporteurs racinaires sous formes ioniques solubilisées dans le sol. Dans le cas où les éléments minéraux sont complexés à des composés argilo-humiques ou nécessitent une minéralisation de composés organiques, leur absorption par les plantes nécessitera, le plus souvent, l'intervention d'exsudats racinaires et/ou l'activité de bactéries rhizosphériques. Ainsi, l'homéostasie des teneurs en éléments minéraux dans les tissus est étroitement régulée et dépend de l'absorption des nutriments par des transporteurs racinaires, plus ou moins spécifiques de l'élément transporté.

1.2.1. Les macroéléments

Comme nous l'avons abordé précédemment, l'agriculture intensive et les aléas climatiques conduisent à un appauvrissement en ressources minérales des sols. Pour pallier ce phénomène, il est nécessaire d'apporter des macroéléments essentiels, tels que l'N, le P et le K, en raison de leurs rôles primordiaux dans le métabolisme des plantes et de leurs effets positifs sur le rendement et la qualité des produits agricoles. D'une manière assez générale, toutes les plantes de grandes cultures sont exigeantes en N, macroélément qui une fois absorbé sera assimilé et participera à la synthèse de macromolécules majeures (par exemple ; protéines, chlorophylles) et en fin de cycle de développement, sera transféré vers les grains afin de garantir leur teneur en protéines et leur qualité. Par exemple, les céréales telles que le blé sont relativement peu exigeantes en P et K, mais présentent des besoins assez élevés en N, qui seront couverts notamment par des apports fractionnés de fertilisants N (Tab II. 2 et II. 3). Les oléoprotéagineux, comme le colza, ont également de forts besoins en N. Le colza absorbe de l'N tout au long de sa croissance. Après floraison, la remobilisation des réserves contenues dans les tissus végétatifs matures permettra le transfert et l'accumulation d'N dans les grains (Tab II. 4 et II. 5 ; Sinaj *et al.,* 2017). En revanche, l'N n'est pas le seul macroélément fortement absorbé par cette plante de grande culture. En effet, comme de nombreuses Brassicacées, le colza présente également de forts besoins en S (de l'ordre de 30 kg de S ha^{-1}), afin d'assurer un bon rendement (Abdallah *et al.,* 2010), mais également une bonne qualité protéique des tourteaux, en favorisant la synthèse de protéines soufrées (les napines notamment) dans les graines (D'Hooghe *et al.,* 2014).

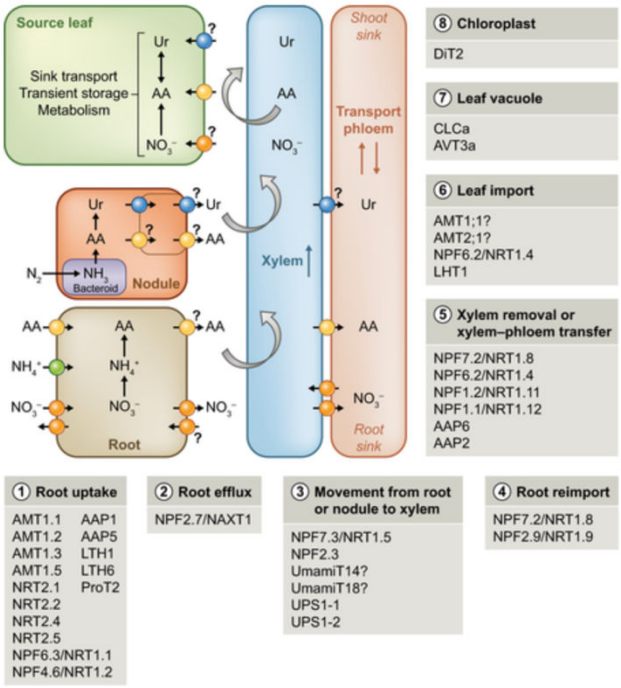


Figure II. 9 : Représentation schématique de l'absorption, du chargement, du déchargement dans le xylème ou le phloème de l'N. Les transporteurs de NO_3^- (cercle orange), d'NH_4^+ (cercle vert), d'urée (Ur ; cercle bleu) et d'acides aminés (AA ; cercle jaune) caractérisés chez *Arabidopsis*, sont impliqués dans (1) l'absorption de l'N, (2) l'efflux racinaire, (3) la translocation de l'N de la racine ou du nodule vers le xylème et le chargement du xylème, (4) la réimportation racinaire, (5) le déchargement du xylème et le transfert xylème-phloème, (6) l'importation dans les cellules du mésophylle de la feuille, (7) le stockage dans les vacuoles de la feuille ou (8) l'importation dans les chloroplastes.
AAP, perméase d'acide aminé ; AMT, transporteur d'ammonium ; AVT, transporteur vacuolaire d'acide aminé ; CLC, canal de chlorure ; DiT, transporteur de dicarboxylate ; LHT, transporteur de type lysine/histidine ; NAXT, transporteur d'excrétion de nitrate ; ProT, transporteur de proline et de glycine-bétaïne ; UmamiT, transporteur d'acides multiples habituels ; UPS, perméase d'uréide.
(Tegeder et Masclaux-Daubresse, 2018)

1.2.1.1. L'azote (N)

L'N est l'un des éléments majeurs pour le développement des plantes, notamment parce qu'il est essentiel à la synthèse de macromolécules telles que les acides nucléiques, les acides aminés (et donc les protéines), ainsi que les chlorophylles impliquées dans des processus métaboliques essentiels. Dans ce sens, l'N affecte positivement l'élaboration du rendement et la qualité des produits récoltés. Les plantes absorbent préférentiellement l'N du sol sous forme minérale *i.e.* le nitrate (NO_3^-), l'ammonium (NH_4^+), et dans une moindre mesure, sous forme de composés organiques tels que l'urée, des acides aminés et des petits peptides.

L'absorption de l'N nitrique du sol par les racines fait intervenir plusieurs systèmes de transports présentant soit une forte (HATS : High-Affinity Transport System) soit une faible (LATS : Low-Affinity Transport) affinité pour le nitrate. Ces transports nécessitent un apport d'énergie couplé à un gradient électrochimique de protons. Si le premier gène codant un transporteur de nitrate (*NRT1.1* aussi appelé *NPF6.3*) a été identifié en 1993 par Tsay *et al.,* ces 2 dernières décennies ont conduit à l'identification de quatre familles de gènes (*NRT1* ou *NPF*, *NRT2*, *CLC*, et *SLAC1/SLAH*) codant des transporteurs de nitrate chez les végétaux (Fan *et al.,* 2017), impliqués dans l'absorption racinaire, mais aussi, dans son chargement ou son déchargement dans les vaisseaux du xylème ou des vacuoles (Fig II. 9).

Au sein de la famille de transporteurs NPF permettant l'absorption de nitrate, 53 membres ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Pellizzaro, 2017). Ces membres sont divisés en 8 sous-groupes dont les plus importants sont les sous-groupes 2 et 5. Le sous-groupe 2 comprend 14 gènes codant des transporteurs NPF, caractérisés uniquement chez *Arabidopsis*. Parmi eux, 4 membres ont été caractérisés comme intervenant dans le transport du nitrate, *AtNPF2.7*, *AtNPF2.9*, *AtNPF2.12* et *AtNPF2.13*. Le sous-groupe 5 est celui le plus représenté chez les plantes supérieures, cependant un seul membre a été identifié chez *Arabidopsis*, *AtNPF5.2*, un transporteur de di- et tri-peptides (Karim *et al.,* 2005 ; Pellizzaro, 2017). La famille NRT2 comporte 17 membres chez le colza (Tong *et al.,* 2020) et 46 membres chez le blé (Li *et al.,* 2021), contre seulement 7 chez *Arabidopsis*. Chez le colza, seuls les gènes codant les transporteurs *Bn*NRT2.1, *Bn*NRT2.2a et *Bn*NRT2.4a sont préférentiellement exprimés dans les tissus racinaires et apparaissent largement impliqués dans l'absorption du nitrate.

Une fois absorbé par les racines, le nitrate peut être stocké transitoirement dans la vacuole des cellules racinaires et/ou exporté par les vaisseaux du xylème vers les feuilles (le transporteur NRT1.5 est responsable du chargement du xylème en nitrate, tandis que NRT1.8 est responsable de son déchargement) pour y être soit stocké, soit réduit en NH_4^+ (*via* la nitrate réductase et la nitrite réductase), afin d'entrer dans la synthèse des acides aminés (Orsel, 2004 ; Han *et al.,* 2016).

Chez *Arabidopsis*, la famille des canaux chlorure (CLC) comprend 7 membres, parmi lesquels, la protéine CLCa localisée dans le tonoplaste serait un antiport $2NO_3^-/H^+$, jouant ainsi un rôle clef dans l'accumulation de NO_3^- dans la vacuole. La famille SLAC/SLAH comprend quant à elle 5 membres, SLAC1, SLAH1, SLAH2, SLAH3 et SLAH4 (Fan *et al.,* 2017). SLAH2 facilite probablement le transport de NO_3^- des racines vers les feuilles.

Le transport racinaire d'ammonium, seconde source d'N minérale majeure pour les plantes, est quant à lui assuré par des « Ammonium Transporter » (AMT) (Fig II. 9 ; Tegeder et Masclaux-Daubresse, 2018). Deux familles de gènes codant ces transporteurs sont présentes chez les plantes vasculaires, il s'agit de la famille AMT1 et MEP (méthyl ammonium perméase ; AMT2) (McDonald et Ward, 2016). Les AMT1 sont aussi bien retrouvés chez des espèces monocotylédones telles que le riz (OsAMT1.1 ; Yang *et al.*, 2015), le blé tendre (TaAMT1.1, TaAMT1.2 et TaAMT1.3 ; Li *et al.*, 2017 ; Ijato, 2021) et le maïs (ZmAMT1.1 et ZmAMT1.3 ; Zhao *et al.*, 2018), que chez des espèces dicotylédones telles qu'*Arabidopsis* (AtAMT1.1, AtAMT1.2, AtAMT1.3 et AtAMT1.5 ; Yuan *et al.*, 2007), la tomate (LeAMT1.1 et LeAMT1.2 ; Mayer *et al.*, 2006) et le haricot (PvAMT1.1 ; Ortiz-Ramirez *et al.*, 2011). Le fonctionnement des transporteurs AMT1 reste encore débattu aujourd'hui, certaines études tendent à montrer qu'il s'agirait d'un uniport NH_4^+ (Scherzer *et al.*, 2013 ; Yang *et al.*, 2015), tandis que d'autres suggèrent un mécanisme de symport NH_4^+/H^+ (Neuhäuser et Ludewig, 2014 ; Neuhäuser *et al.*, 2014). Comme pour les AMT1, le fonctionnement des AMT2 est encore mal connu. Néanmoins, selon Giehl *et al.* (2017), AMT2.1 contribuerait modérément à l'absorption racinaire de NH_4^+ et fonctionnerait principalement dans la translocation de NH_4^+ des racines vers les feuilles. Le NH_4^+ est ensuite rapidement assimilé (risque de toxicité en cas d'accumulation) *via* l'activité des enzymes dont la GS-GOGAT (glutamine synthétase/glutamate synthase) et aboutit à la synthèse d'acides aminés tels que le glutamate et la glutamine.

Les plantes sont également capables d'absorber de l'azote sous forme organique. L'urée, libérée par les animaux, peut être absorbée par les plantes par diffusion à travers la membrane plasmique, grâce à des aquaporines et/ou au transporteur d'urée DUR3, présents dans la membrane plasmique des cellules racinaires (Buoso *et al.*, 2021). Ce transporteur est un HATS (Nacry *et al.*, 2013), qui a été retrouvé chez des monocotylédones comme le maïs (ZmDUR3 ; Zanin et *al.*, 2014 ; Buoso et *al.*, 2021) et le riz (OsDUR3 ; Beier et Kojima, 2020), et des dicotylédones telles que le colza (BnDUR3 ; Arkoun et *al.*, 2012) et *Arabidopsis thaliana* (AtDUR3 ; Kojima et *al.*, 2007). DUR3 permet également de médier le transport interne de l'urée (Witte, 2011). Une fois absorbée, l'urée est hydrolysée par des uréases qui libèrent du NH_4^+ (Arkoun et *al.*, 2012) qui sera alors assimilé. Enfin, les protéines présentes dans le sol peuvent être dégradées par des micro-organismes ou des exsudats racinaires (Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2008) en peptides ou acides aminés absorbables par

les plantes. Deux types de transporteurs racinaires d'acides aminés ont été très étudiés (Näsholm *et al.*, 2009). Il s'agit du « lysine/histidine transporter 1 » (LHT1 ; Svennerstam *et al.,* 2008) et des « amino acid permeases » (AAP), dont deux représentants, AAP1 (Lee *et al.*, 2007) et AAP5 (Svennerstam *et al.*, 2008), se situent au niveau de l'épiderme racinaire. Les transporteurs LHT1 et AAP1 permettent le passage des acides aminés acides et neutres, tandis que AAP5 permet l'absorption de la lysine et de l'arginine, deux acides aminés basiques (Näsholm *et al.*, 2009). Une fois absorbés, ces acides aminés participent à la synthèse protéique.

1.2.1.2. Le magnésium (Mg)

Le Mg est un macroélément qui intervient dans le maintien des activités enzymatiques, telles que les H^+/ATPase, les kinases et les polymérases, et dans la stabilisation de la conformation de macromolécules (Guo *et al.,* 2016), telle que dans la constitution du noyau tétrapyrrolique des chlorophylles (Tang et Luan, 2017). Ainsi, le Mg est un élément essentiel pour l'activité photosynthétique des végétaux, ce qui explique qu'environ 25% du Mg total soit alloué aux chloroplastes (de Bang *et al.*, 2020). Le Mg participe également à la stabilisation de l'association des ribosomes lors de la synthèse protéique.

Les transporteurs de la famille MGT sont capables de transporter plusieurs cations divalents, tels que Ni^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} et Mg^{2+}. Néanmoins, les MGT semblent présenter une affinité supérieure pour le Mg^{2+} en raison d'un motif tripeptide conservé (Gly-Met-Asn) situé à la fin du premier domaine transmembranaire des transporteurs (Knoop *et al.,* 2005). Ce tripeptide est responsable de la spécificité des transporteurs pour le Mg^{2+} puisqu'une mutation en son sein, entraine une inhibition de l'absorption du Mg^{2+} (Knoop *et al.,* 2005). Chez *Arabidopsis*, le transport racinaire de Mg semble être médié principalement par MGT6, un transporteur à haute affinité pour le Mg, dont l'expression racinaire augmente lorsque la concentration en Mg diminue dans le sol (Tang et Luan, 2017). Chez le riz, Chen *et al.* (2012) ont montré que l'absorption racinaire de Mg serait médiée par OsMGT1, un autre transporteur de la famille des MGT.

Après avoir été absorbé par les racines, le Mg^{2+} est chargé dans le xylème pour un transport longue distance des racines vers les parties aériennes (Tang et Luan, 2017). Chez *Arabidopsis*, le Mg^{2+} est alors alloué soit aux chloroplastes grâce au transporteur AtMGT10, soit au réticulum endoplasmique grâce aux transporteurs AtMGT4 et 7, ou encore, stocké dans la vacuole grâce à l'intervention des transporteurs AtMGT2 et 3 (de Bang *et al.,* 2021). Pour le riz, ce sont les transporteurs OsMGT3 et 9 qui permettront l'entrée du Mg^{2+} dans les chloroplastes (Tian *et al.,* 2021).

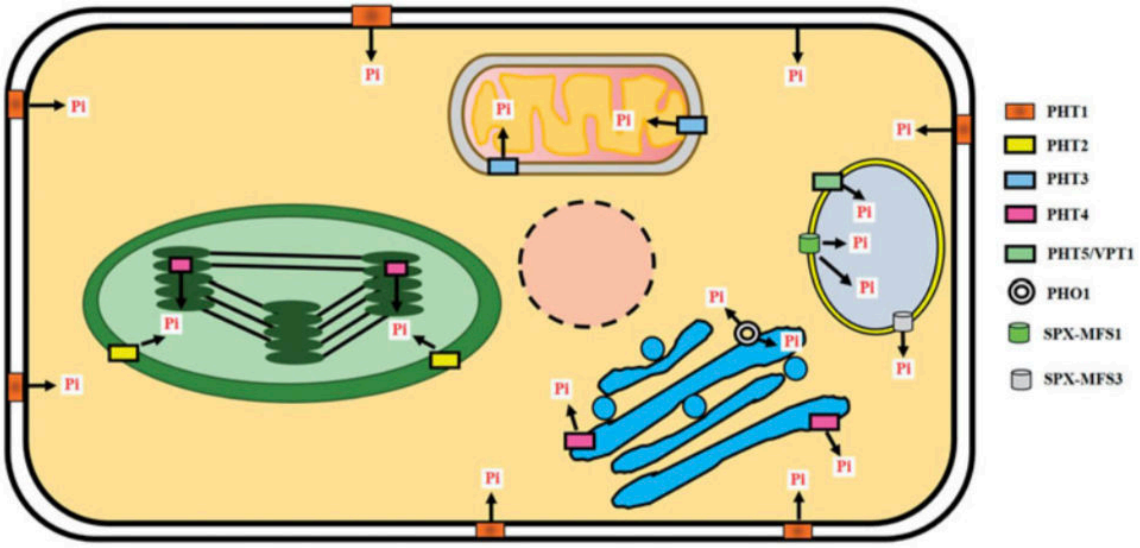


Figure II. 10 : Localisation subcellulaire des transporteurs des sous-familles PHT1 à PHT4. Les PHT1 sont localisés dans la membrane plasmique, les PHT2 dans le chloroplaste, les PHT3 dans la mitochondrie et les PHT4 à la fois dans le chloroplaste et l'appareil de Golgi. PHT5/vacuolar phosphate transporter 1 (VPT1) et SPX-MFS1 localisés dans la membrane vacuolaire médient l'exportation de Pi du cytosol vers les vacuoles. A l'inverse, SPX-MFS3 est impliqué dans l'exportation de Pi des vacuoles vers le cytosol. (Roch *et al.,* 2019)

1.2.1.3. Le phosphore (P)

Le P entre dans la structure de biomolécules centrales pour le métabolisme des plantes, telles que l'ATP (acide adénosine-triphosphorique), le NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), les acides nucléiques, les phospholipides et les sucres-phosphates (Roch *et al.,* 2019). De ce fait, ce macroélément est notamment impliqué dans le métabolisme énergétique et la biosynthèse des protéines et des lipides, la transpiration et la photosynthèse (Kuo *et al.,* 2018 ; Michigami *et al.,* 2018 ; Roch *et al.,* 2019).

Les transporteurs de la famille des PHT sont les transporteurs de P les plus étudiés, en raison de leurs rôles majeurs dans l'absorption racinaire de phosphate inorganique (Pi : $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-}) du sol par les racines et de sa translocation au sein de la plante (Smith *et al.,* 2003 ; Wan *et al.,* 2017 ; Roch *et al.,* 2019). Cette famille de transporteurs est divisée en 4 sous-familles (PHT1, PHT2, PHT3 et PHT4) en fonction de leurs différences fonctionnelles et de leur localisation subcellulaire (Fig II. 10 ; Wan *et al.,* 2017). Chez *Arabidopsis*, il existe 9 membres de la sous-famille PHT1 situés dans la membrane plasmique, parmi lesquels AtPHT1.1 et AtPHT1.4 sont des transporteurs présentant une forte affinité pour le P, jouant un rôle majeur dans l'acquisition de Pi (Smith *et al.,* 2003 ; Shin *et al.,* 2004 ; Li *et al.,* 2019), comme le montre la réduction de plus de 50% de l'absorption de Pi chez le double mutant *pht1;1⊿4⊿*, par rapport au type sauvage (Shin *et al.,* 2004).

Le P absorbé est ensuite chargé dans le xylème par le transporteur PHO1, puis le P peut être alloué, par exemple, aux mitochondries grâce aux transporteurs de la sous-famille PHT3 pour permettre la synthèse d'ATP ou être stocké dans les vacuoles *via* les transporteurs VPT1 (PHT5/vacuolar phosphate transporter 1) (Fig II. 10 ; Roch *et al.,* 2019).

1.2.1.4. Le soufre (S)

Le S est quantitativement le 4ème élément le plus important pour les plantes après l'azote, le phosphore et le potassium. Dans la biosphère, le soufre circule essentiellement sous forme de sulfure d'hydrogène (H_2S), de diméthylsulfure (DMS), de sulfure de carbonyle (COS) ou de dioxyde de soufre (SO_2) (Aussignargues, 2012). Dans les sols bien drainés, le S est principalement présent sous forme de sulfate assimilable par les végétaux. Depuis le début des années 1980, les émissions de dioxyde de soufre d'origine anthropique ont fortement chuté, entrainant une diminution des dépôts atmosphériques de soufre sur les terres agricoles (Lewandowska et Sirko, 2008). En conséquence, la carence en soufre dans les sols constitue l'un des problèmes majeurs de l'agriculture actuelle (Filipek-Mazur *et al.,* 2019). Dans ce contexte, la culture de colza, espèce particulièrement exigeante en S, est classiquement fertilisée avec des apports importants de soufre (de l'ordre de 30

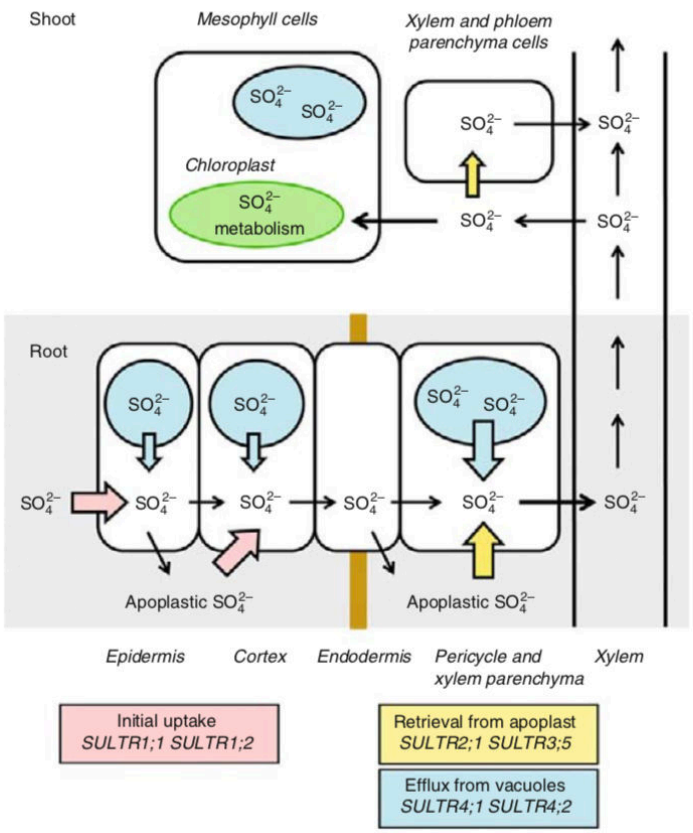


Figure II. 11 : Assimilation et translocation du sulfate dans les plantes. L'absorption du sulfate est assurée par les transporteurs SULTR1;1 et SULTR1;2 (flèches roses), le transport de sulfate est réalisé par SULTR2;1 et SULTR3;5 (flèches jaunes), et le transport vacuolaire de sulfate par SULTR4;1 et SULTR4;2 (flèches bleues) (Takahashi, 2010).

à 35 kg de S.ha^{-1}) afin d'optimiser le rendement et la qualité des produits récoltés (Dubousset *et al.,* 2010 ; D'Hooghe *et al.,* 2014).

Le sulfate est un composant essentiel pour la biosynthèse des acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), de la S-adenosylmethionine (SAM), des clusters Fe-S indispensables à certaines enzymes telles que la xanthine déshydrogénase et l'aldéhyde déshydrogénase (Courbet *et al.,* 2019) et aussi un donneur de groupements méthyl pour de nombreuses réactions biochimiques. Le sulfate (SO_4^{2-}) du sol est absorbé par des transporteurs racinaires présentant une forte affinité pour le sulfate, SULTR1.1 et SULTR1.2, localisés dans la membrane plasmique des poils absorbants (Fig II. 11 ; Takahashi *et al.,* 2010 ; Dubousset *et al.,* 2009 ; Kimura *et al.,* 2019). Une fois absorbé, le S est chargé dans le xylème grâce au transporteur SULTR2.1 pour permettre son transfert jusqu'aux feuilles. Selon Li *et al.* (2020), SULTR2.1 peut être aidé dans cette fonction par SULTR3.5 chez *Arabidopsis* (Fig II. 11). Le sulfate est ensuite réduit en sulfite (SO_3^{2-}) puis en S^{2-} pour être combiné à de l'acétyle-CoA et conduire à la synthèse de cystéine, de méthionine, de glutathion et SAM (Droux, 2004). Dans le cas où l'absorption de S est supérieure aux capacités de réduction et d'assimilation de la plante, le sulfate peut être stocké dans les vacuoles grâce à l'intervention de transporteurs tonoplastiques de sulfate et notamment SULTR4.1 et SULTR4.2 (Fig II. 11 ; Zuber *et al.,* 2010).

1.2.1.5. Le potassium (K)

Chez les végétaux, le K est impliqué dans l'osmorégulation et constitue un cofacteur nécessaire au fonctionnement de certaines activités enzymatiques (Leigh *et al.,* 1984 ; Cushman, 2001). Celui-ci est absorbé par les plantes sous forme de cation monovalent principalement grâce à la famille des transporteurs HAK/KUP/KT, notamment AtHAK5 chez *Arabidopsis* (Fig II. 12 ; Wang et Wu, 2017). Une fois absorbé, le K^+ est chargé dans le xylème (Fig II. 12) par un transporteur KUP7 (Wang et Wu, 2017) ou un canal SKOR (Stelar K^+ Outward Rectifier) de la famille des « Shaker family K^+ channel » et transporté dans le phloème par AKT2 (Pilot *et al.*, 2003 ; Drechsler *et al.*, 2015) ou encore AKT3 (Marten *et al.*, 1999). Ainsi, le K est impliqué dans la régulation de l'ouverture des stomates ou encore l'activation de certaines enzymes telles que la pyruvate kinase (Nieves-Cordones *et al.*, 2016). Cette activation consiste en une liaison sélective du K^+ à l'enzyme pour stabiliser sa structure et permettre ainsi une meilleure fixation du substrat (Nieves-Cordones *et al.*, 2016).

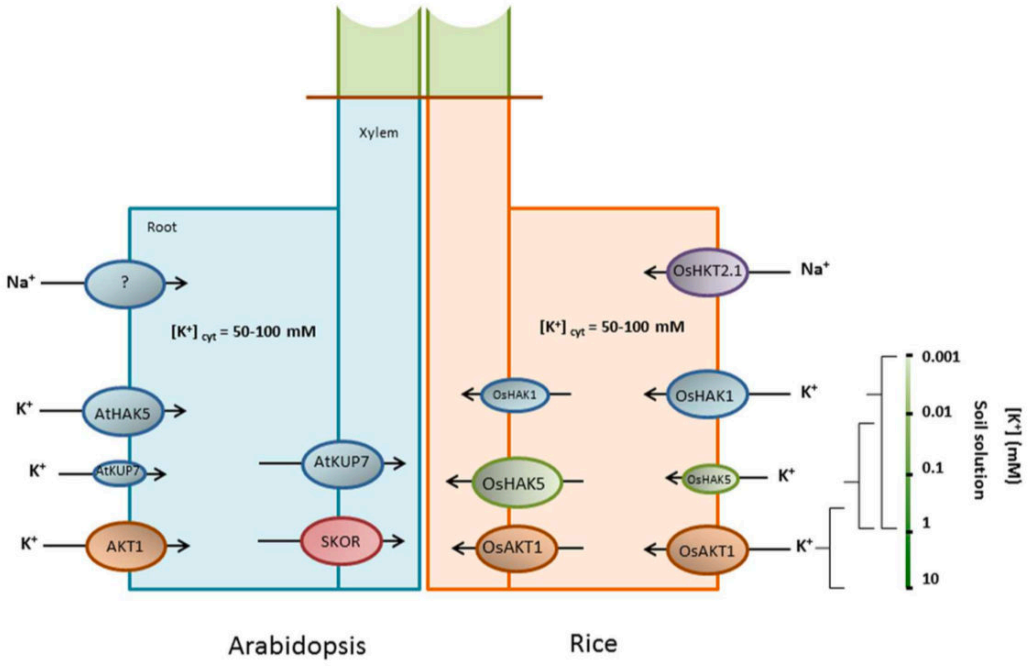


Figure II. 12 : Absorption et translocation du potassium chez *Arabidopsis* et le riz. AtHAK5 et AKT1 sont les principaux transporteurs impliqués dans l'absorption du K^+ chez *Arabidopsis*. AtKUP7 (membre de la famille KT/HAK/KUP) est également impliqué dans l'absorption de K^+. Le chargement de K^+ dans le xylème est principalement médié par SKOR et AtKUP7. Chez le riz, les fonctions de AtHAK5 et AKT1 sont remplies par les homologues OsHAK1 et OsAKT1. De plus, OsHAK5, contribue partiellement à l'absorption de K^+, mais à des concentrations plus élevées que OsHAK1 (Nieves-Cordones *et al.,* 2016)

1.2.1.6. Le calcium (Ca)

Le Ca est un macroélément important pour la stabilité de la paroi cellulaire en favorisant la réticulation des résidus carboxyliques des pectines (Hepler *et al.,* 2010). En outre, la principale fonction du Ca réside dans sa capacité à servir de second messager cellulaire, dans de nombreux processus physiologiques tels que la réponse des plantes aux stress (Thor, 2019). A titre d'exemple, lors d'une attaque par un agent pathogène, le signal calcique (influx cellulaire de Ca) est induit par des éliciteurs de réactions de défense (Manzoor *et al.,* 2012). Ce signal est ensuite interprété par différents ensembles de protéines, telles que des protéines de type calmoduline (CaM), des protéines de type B de la calcineurine (CBL), des protéines kinases interagissant avec les CBL (CIPK : CBL-interacting protein kinase), ainsi que des kinases dépendantes du Ca^{2+} (CDPK : calcium dependent protein kinase), afin de déclencher les réactions de défense des plantes (Thor, 2019 ; Barth, 2020 ; Liu *et al.,* 2021) et notamment l'augmentation de l'expression des gènes codant des protéines de défense telles que les « Pathogenesis related (PR) Proteins » (Kaur *et al.,* 2017).

Plusieurs canaux perméables au Ca^{2+} localisés dans les racines sont responsables de l'absorption de ce macroélément. Ces canaux peuvent être classés selon leurs propriétés électrophysiologiques ; les canaux activés par la dépolarisation (DACC), les canaux activés par l'hyperpolarisation de la membrane plasmique (HACC) et les canaux indépendants du voltage (VIC) (Miedema *et al.,* 2008 ; Thor, 2019). Une fois absorbé, le Ca^{2+} est transporté à travers l'apoplaste ou alors *via* des canaux Ca^{2+} localisés dans les bandes casparienne (c'est-à-dire une structure imperméable et sélective déposée sur les cellules de l'endoderme racinaire et composée de subérine et de lignine) vers le xylème, pour être transféré vers les parties aériennes (White, 2001 ; Sharma *et al.,* 2017).

1.2.2. Les microéléments et éléments bénéfiques

Les microéléments sont requis par les plantes en faible quantité, malgré leurs rôles essentiels dans de nombreux processus biologiques (la photosynthèse, la respiration, la structure de protéines, la défense des plantes…). Les éléments bénéfiques sont quant à eux non indispensables à la croissance et au développement des plantes, mais leur présence permet de favoriser la croissance ou d'apporter une meilleure tolérance aux stress biotiques et abiotiques.

La malnutrition humaine est considérée comme un problème majeur de santé publique (Stein, 2010). Globalement, plus des deux tiers de la population mondiale ont un régime alimentaire déficient en plusieurs microéléments essentiels. Par exemple, la population mondiale est déficiente en fer et zinc à 60 et 30 %, respectivement (White et Broadley, 2009). Pour y remédier, plusieurs

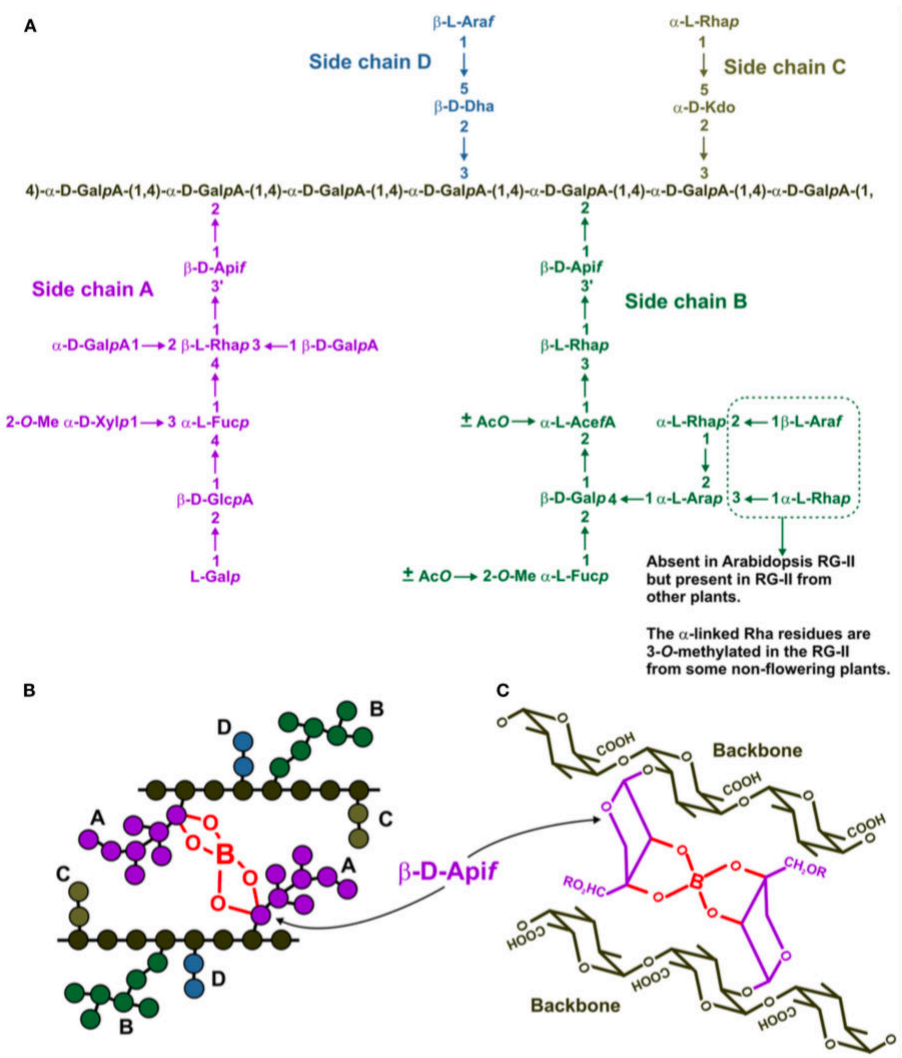


Figure II. 13 : Structure du rhamnogalacturonane de type II (RG-II) nécessitant du bore. (A). Celui-ci est composé d'un squelette de 7 résidus GalA et des chaînes latérales. (B) Représentation schématique de la réticulation de deux molécules de RG-II. (C) Réticulation du diester de borate. (Bar-Peled *et al.,* 2012)

études ont proposé différentes solutions, telles que la sélection variétale (Frison *et al.,* 2011), la supplémentation minérale (Wakeel *et al.,* 2018) ou la biofortification (White et Broadley, 2009), qui consistent à augmenter la teneur en nutriments et leur disponibilité dans les plantes consommées dans l'alimentation humaine. Selon la revue de White et Broadley (2009), deux principales stratégies agronomiques pourraient permettre l'augmentation de la teneur en microéléments et éléments bénéfiques dans les tissus comestibles ; l'utilisation d'engrais minéraux, ou une augmentation de la solubilisation et de la mobilisation des minéraux dans les sols. Par exemple, la fertilisation du sol avec du bore (B) a permis une augmentation du rendement du colza d'environ 46%, dû à l'augmentation du nombre de graines par silique et du nombre de siliques par plante et augmenterait également la teneur de cet élément dans les graines de colza (Yang *et al.,* 2009). Cependant, l'augmentation de la teneur en B dans les grains se fait au détriment de la teneur en Zn et en Fe (Jankowski *et al.,* 2016). Aussi, la fertilisation combinée de B avec d'autres microéléments, pourrait pallier à ce déséquilibre observé au niveau de la qualité nutritionnelle des graines.

Le recensement de plusieurs études par Artyszak (2018) met en avant les effets bénéfiques du silicium sur le rendement et la qualité des produits récoltés. Par exemple, chez le riz, Ma et Takahashi (2002) ont montré qu'une fertilisation silicique de 135 $kg.ha^{-1}$ se traduit par une augmentation de panicules par hectare (48 400 à 50 300) et *in fine* par une augmentation de rendement de 7,01 $t.ha^{-1}$ à 8,23 $t.ha^{-1}$. Laîné *et al.* (2019), montrent que le colza fertilisé avec 160 N $kg.ha^{-1}$ couplé à un apport de Si a une meilleure conservation de ses feuilles vertes (jusqu'au stade de la floraison), une augmentation de biomasse, un meilleur rendement et une teneur en Fe des graines plus élevée. En dépit des effets positifs d'un apport en microéléments et éléments bénéfiques, ceux-ci sont encore largement sous-représentés dans la fertilisation des grandes cultures.

1.2.2.1. Le bore (B)

L'un des rôles physiologiques principaux du B est la réticulation du polysaccharide pectique rhamnogalacturonan II localisé dans les parois cellulaires primaires (Fig II. 13 ; Miwa et Fujiwara, 2010 ; Bar-Peled *et al.,* 2012). Cet élément intervient également dans la régulation du transport des sucres dans les plantes (Shireen *et al.,* 2018). En tant que microélément, le B est généralement requis en faible quantité par les plantes, même s'il existe des espèces cultivées (betterave sucrière et luzerne), qui tolèrent des concentrations plus élevées en B dans l'eau d'irrigation, allant jusqu'à 4 $mg.L^{-1}$ (Brdar-Jokanovic, 2020). Le B est le seul élément minéral absorbé par les plantes sous forme neutre (acide borique ($B(OH)_3$) par diffusion facilitée et par des transporteurs actifs (les NIP (nodulin-26-like intrinsic proteins) et les BOR (boric acid/borate transporter)) (Miwa et Fujiwara,

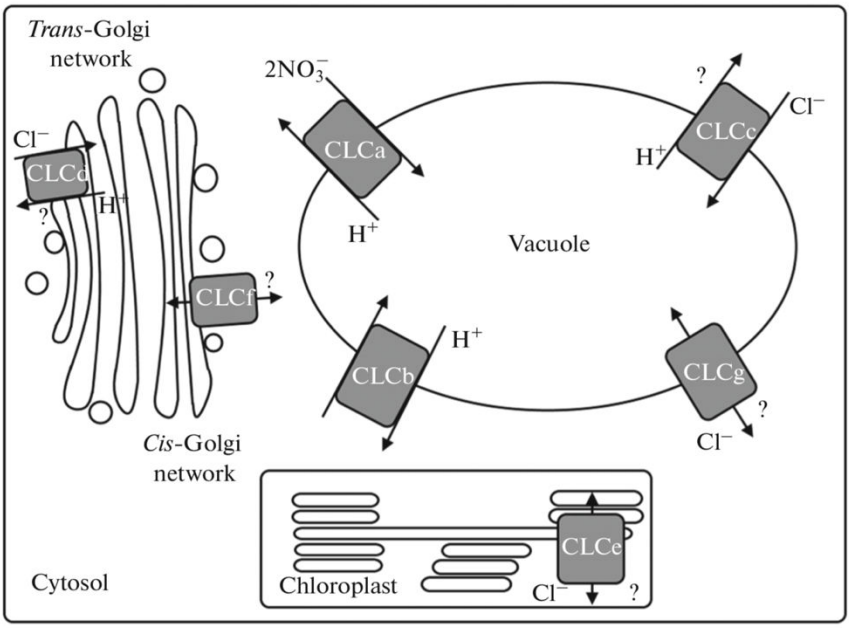


Figure II. 14 : Localisation subcellulaire des transporteurs de Cl de la famille CLC chez *Arabidopsis* (Nedelyaeva *et al.,* 2020)

2010). Une fois absorbé, le B est ensuite chargé dans le xylème grâce au transporteur BOR1 (Takano *et al.,* 2002).

1.2.2.2. Le chlore (Cl)

Le Cl est un microélément essentiel requis par les plantes à une teneur variable selon les espèces végétales, allant de 0,2 à 2% de matière sèche, pour une croissance optimale (Colmenero-Flores *et al.,* 2019). Cet élément est impliqué dans l'osmorégulation (Marschner, 2012) et le développement du système racinaire (Colmenero-Flores *et al.*, 2019). Il permet la régulation de la turgescence des cellules végétales, principalement dans les cellules de garde des stomates ou dans les tissus en croissance (Geilfus, 2017, 2018). Pendant l'ouverture des stomates, les ajustements de la teneur en Cl^- ont une fonction similaire à celle du malate dans les cellules de garde, en venant contrebalancer l'excès de charges positives liées à l'influx de potassium. Ainsi, l'accumulation de Cl^-, de K^+ et de malate dans les cellules de garde augmente leur osmolarité, favorisant ainsi une entrée d'eau par osmose, qui provoque l'ouverture des stomates (Hetherington *et al.*, 2001 ; Roelfsema et Hedrich, 2005 ; Geilfus, 2017, 2018 ; Colmenero-Flores *et al.*, 2019).

La famille de transporteurs la plus connue, responsable du transport et de la régulation de l'homéostasie de l'ion Cl^- au sein de la plante, est la famille des CLC (ChLoride Channel), qui comprend des canaux anioniques et des antiports d'anions/protons (Nedelyaeva *et al.,* 2020). Chez *Arabidopsis*, 7 CLC sont localisés dans des membranes intracellulaires, telles que celles du tonoplaste (AtCLCa, AtCLCb, AtCLCc, et AtCLCg), des thylakoïdes (AtCLCe) et de l'appareil de Golgi (AtCLCd et AtCLCf) (Fig II. 14 ; Wu et Li, 2019 ; Nedelyaeva *et al.,* 2020). Comme indiqué précédemment, la sélectivité ionique des transporteurs CLC n'est pas limitée aux Cl^- ; ceux-ci et plus particulièrement le transporteur AtCLCa, étant également impliqué dans le transport du nitrate (NO_3^-) du cytosol vers la vacuole (Nguyen, 2012).

1.2.2.3. Les cations divalents

Le Mn, le Fe, le Ni, le Cu et le Zn sont des métaux absorbés sous forme de cations divalents. Ils interviennent dans de nombreux processus essentiels tels que la photosynthèse (Alejandro *et al.,* 2020), la respiration (Kumar *et al.,* 2021), la défense des plantes (Cabot *et al.,* 2019), la voie de signalisation de l'éthylène (Yruela, 2009), mais aussi la structure de protéines et d'enzymes (Tripathi *et al.,* 2018).

Malgré son abondance dans la croute terrestre, le Fe est peu soluble et difficilement absorbable par les plantes. Aussi, deux stratégies d'acquisition du Fe, appelées stratégies I et II, ont été développées par les plantes. La stratégie I est employée chez toutes les plantes supérieures, à

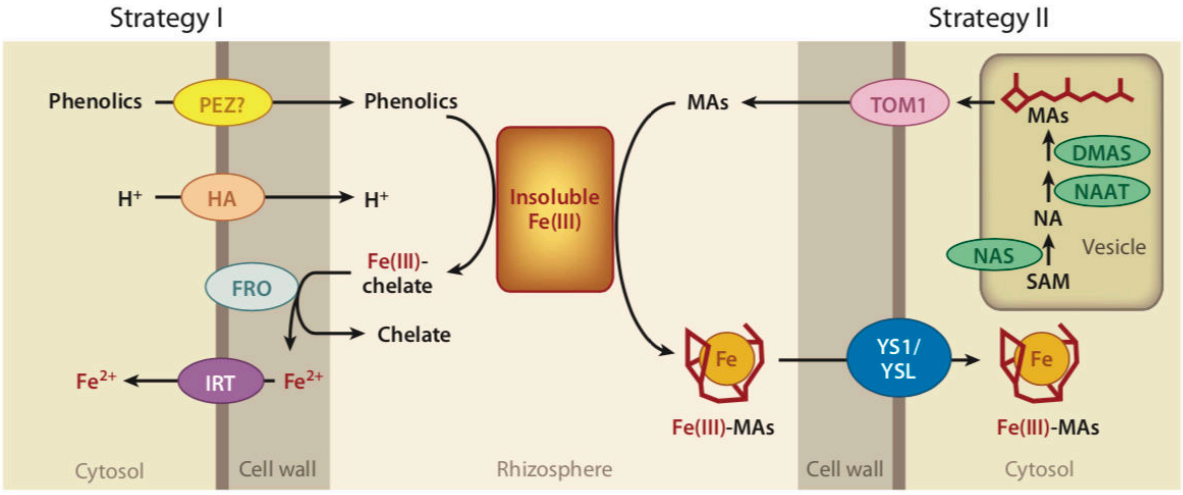


Figure II. 15 : Représentation schématique des deux différentes stratégies d'acquisition du fer par les plantes supérieures.
DMAS, acide désoxymuginéique synthase ; FRO, oxydase ferrique-chélate réductase ; HA, H^+-ATPase ; IRT, transporteur régulé par le fer ; MAs, phytosidérophores de la famille de l'acide muginéique ; NA, nicotianamine ; NAAT, nicotianamine aminotransférase ; NAS, nicotianamine synthase ; PEZ, Phenolics efflux zero; SAM, S-adénosyl-L-méthionine ; TOM1, transporteur des phytosidérophores de la famille de l'acide muginique 1 ; YS1/YSL, Yellow Stripe 1/Yellow Stripe 1-like (Kobayashi et Nishizawa, 2012)

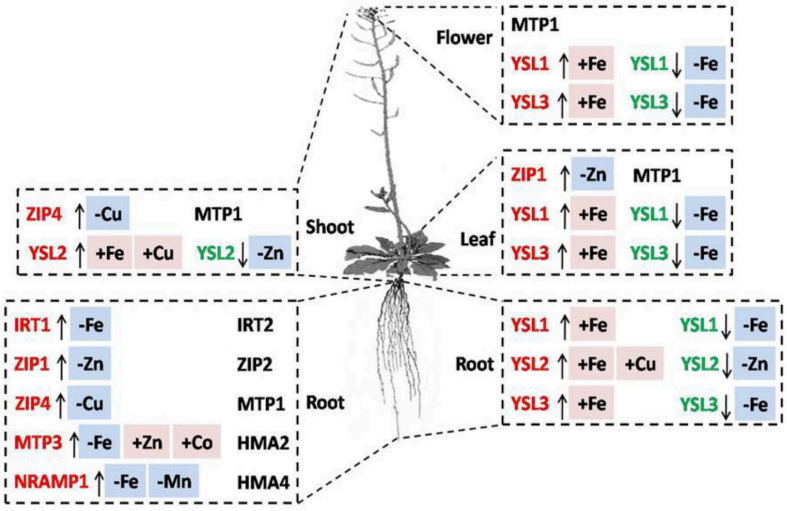


Figure II. 16 : Niveau d'expression des gènes codant pour les transporteurs de cations divalents de type ZIP, MTP, NRAMP et YSL chez *Arabidopsis* en conditions de carences nutritionnelles. ↑ indique que le niveau d'expression du gène est régulé à la hausse, tandis que ↓ indique que les gènes sont régulés à la baisse par les différentes carences en éléments (-) ou lorsque les éléments sont en quantité suffisante (+)
ZIP, ZRT-IRT-like proteins ; MTP, metal tolerance proteins ; NRAMP, natural resistance-associated macrophage protein, YSL ; yellow stripe-like (Ding *et al.,* 2017).

l'exception des Poacées qui utilisent la stratégie II (Fig II. 15 ; Kobayashi et Nishizawa, 2012 ; Tripathi *et al.,* 2018). La stratégie I (Fig II. 15) consiste en la réduction du Fe^{3+} par l'acidification de la rhizosphère, résultant d'une excrétion racinaire de H^+ et la sécrétion de chélateurs. La réductase ferrique oxydase (FRO) localisée dans la membrane plasmique des cellules racinaires permet ensuite la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+}. Ce dernier sera ensuite absorbé (Bauer et Bereczky, 2003), par exemple, par le transporteur racinaire IRT1, appartenant à la famille ZIP. Il peut être noté que, bien qu'impliqué dans le transport de Fe^{2+}, IRT1 est également un transporteur aspécifique impliqué dans l'absorption racinaire d'autres cations divalents tels que le Cu, le Mn, le Zn et probablement le Co (Nishida *et al.,* 2011, Cao *et al.,* 2019). Concernant la stratégie II, elle consiste à sécréter grâce à la protéine TOM1 (transporteur des phytosidérophores de la famille de l'acide muginéique 1), des chélateurs de Fe nommés phytosidérophores, dans la rhizosphère. Les phytosidérophores chélatent le Fe sous forme Fe^{3+}, avant d'être pris en charge par les transporteurs de la famille YS-YSL (Yellow Strip-YS like) (Wairich *et al.,* 2019). Le Fe^{3+} est ensuite réduit en Fe^{2+} dans les cellules racinaires. Certains auteurs suggèrent qu'il est également possible que les phytosidérophores participent à l'absorption du Ni, Cu et Zn (Puschenreiter *et al.,* 2017).

Les familles de transporteurs de métaux les plus connues sont les familles OPT, NRAMP et ZIP (Fig II. 16 ; Ding *et al.,* 2017). Les transporteurs YSL, appartenant à la famille OPT, sont impliqués dans l'absorption des métaux par les racines, leur transport sur de longues distances à travers le phloème et la translocation des métaux vers les graines en développement. A titre d'exemples, la famille NRAMP assure le transport du Mn à travers la membrane plasmique, alors que ceux appartenant à la famille des transporteurs ZIP interviennent majoritairement dans l'absorption du Zn. Par exemple, chez le riz, les transporteurs OsZIP4, OsZIP5, et OsZIP8 sont localisés dans la membrane plasmique et sont impliqués dans l'entrée de Zn dans la cellule. Chez *Arabidopsis*, cette fonction est assurée par le transporteur AtZIP2 (Ajeesh *et al.,* 2020). Le Cu peut également être transporté depuis la solution du sol grâce à des transporteurs appartenant à la famille COPT (Copper Transporter). Chez *Arabidopsis*, 6 membres composent la famille COPT et sont situés au niveau de la membrane plasmique (COPT1, COPT2 et COPT6), ou dans les membranes internes (COPT3 et COPT5) (Sanz *et al.,* 2019). A notre connaissance, la localisation subcellulaire de COPT4 est encore mal connue.

1.2.2.4. Le molybdène (Mo)

Le Mo est un métal entrant chez les végétaux, dans la composition du cofacteur à molybdène (encore appelé facteur MoCo) nécessaire au bon fonctionnement de certaines enzymes telles que la nitrate réductase, la sulfite oxydase et la xanthine déshydrogénase (Rana *et al.,* 2020)

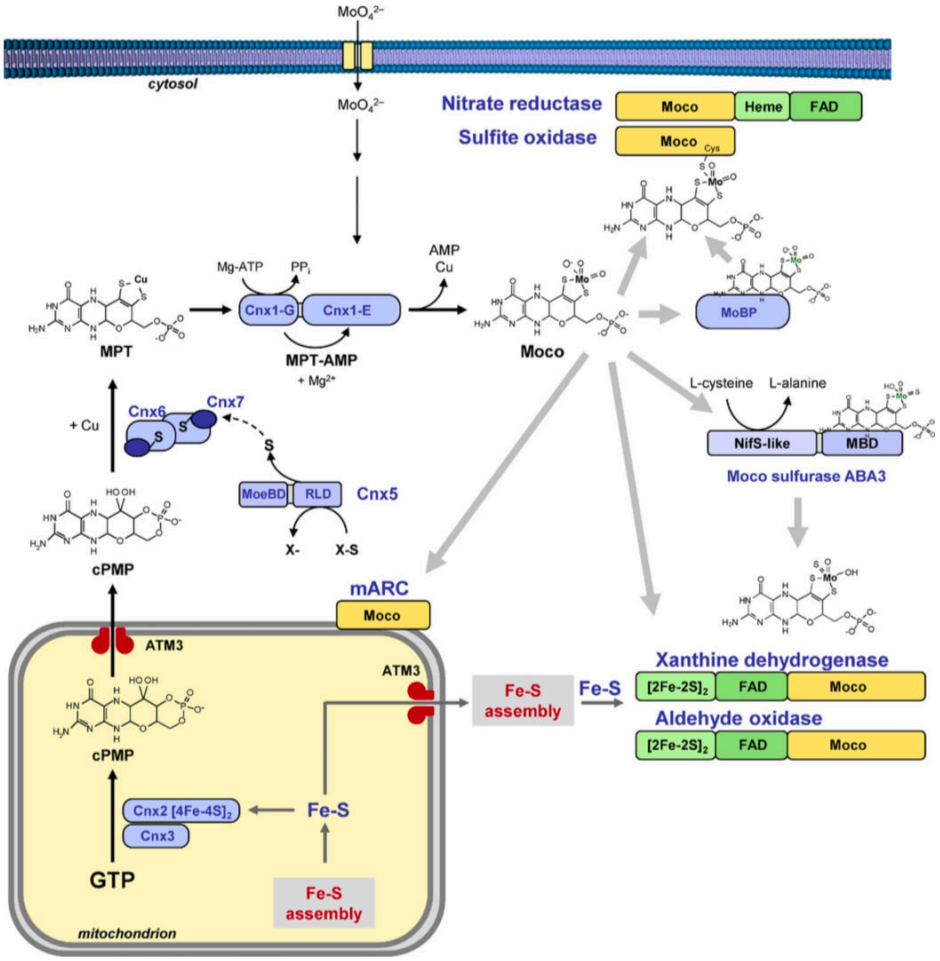


Figure II. 17 : Biosynthèse et allocation du cofacteur de molybdène (MoCo) chez les végétaux cPMP, cyclic pyranopterinmonophosphate ; Cnx, Cofactor for Nitrate reductase and Xanthine dehydrogenase ; GTP, guanosine triphosphate ; MPT, molybdopterin ; MPT–AMP, adenylated MPT (Mendel et Schwarz, 2011).

impliquées respectivement dans la réduction du nitrate, du sulfate et dans la dégradation des bases puriques. En raison du haut degré de similitude entre le SO_4^{2-}et le MoO_4^{2-}, le Mo est probablement absorbé sous forme de molybdate (MoO_4^{2-}) par les plantes *via* les transporteurs racinaires de sulfate SULTR1.1 et SULTR1.2. Une fois absorbé, le Mo peut être transporté dans la mitochondrie par MOT1 (MOlybdenum Transporter 1) qui présente une spécificité et une forte affinité pour le Mo (Vigani *et al.,* 2017). Selon Bittner *et al.* (2014), le seul processus connu nécessitant directement du molybdate par les plantes, est la biosynthèse du cofacteur à Mo (MoCo), qui est initiée dans les mitochondries et se termine dans le cytosol (Fig II. 17 ; Mendel et Schwarz, 2011).

1.2.2.5. Le sodium (Na)

Le Na est l'un des éléments bénéfiques les plus abondants dans le sol et il est principalement impliqué, tout comme le K, dans l'osmorégulation. Il existe peu de transporteurs connus spécifiques du Na. Les plus étudiés sont ceux intervenant dans la tolérance des plantes au stress salin et participant également au transport du K^+. En effet, la similarité physico-chimique du Na^+ et du K^+ serait à l'origine d'une compétition entre ces deux cations. Aussi, selon Raddatz *et al.* (2020), une concentration élevée de Na^+ dans les plantes peut provoquer des symptômes de carence en K^+ et perturber les processus physiologiques dépendant de cet élément, comme la synthèse des protéines et certaines réactions enzymatiques. Les transporteurs de la famille HAK, participant à l'absorption du K^+, pourraient également avoir un rôle majeur dans l'absorption de Na^+. C'est le cas, par exemple chez *Zea mays* où le gène codant le transporteur *ZmHAK4* est préférentiellement exprimé dans les racines (Raddatz *et al.,* 2020). De la même manière, les transporteurs de la famille HKT contribuent à l'absorption de Na^+ en tant que symporteurs de Na^+/K^+ ou uniporteurs de Na^+ en condition de stress salin. Les transporteurs HKT sont divisés en deux classes ; la classe I (HKT1) et la classe II (HKT2). HKT2 est retrouvée uniquement chez les monocotylédones et regroupe les transporteurs perméables à la fois au Na^+ et au K^+ (Fig II. 18 ; Raddatz *et al.,* 2020). Chez les dicotylédones, seule HKT1 permet la régulation de l'homéostasie du Na^+ (Rus *et al.,* 2001 ; Riedelsberger *et al.,* 2021). A l'inverse, chez *Hordeum vulgare*, une monocotylédone, le transporteur HKT2.1 contribue à la fois à l'absorption de K^+ en condition de stress salin, mais également à l'absorption de Na^+ pour l'ajustement osmotique. Enfin, le transporteur SOS1 (Salt Overly Sensitive 1) semble participer au transport intracellulaire du Na^+ et à son efflux vers le milieu extérieur, néanmoins son rôle exact est encore discuté dans la littérature (Fig II. 18 ; Kronzucker et Britto, 2011 ; Assaha *et al.,* 2017 ; El Mahi *et al.,* 2019 ; Raddatz *et al.,* 2020).

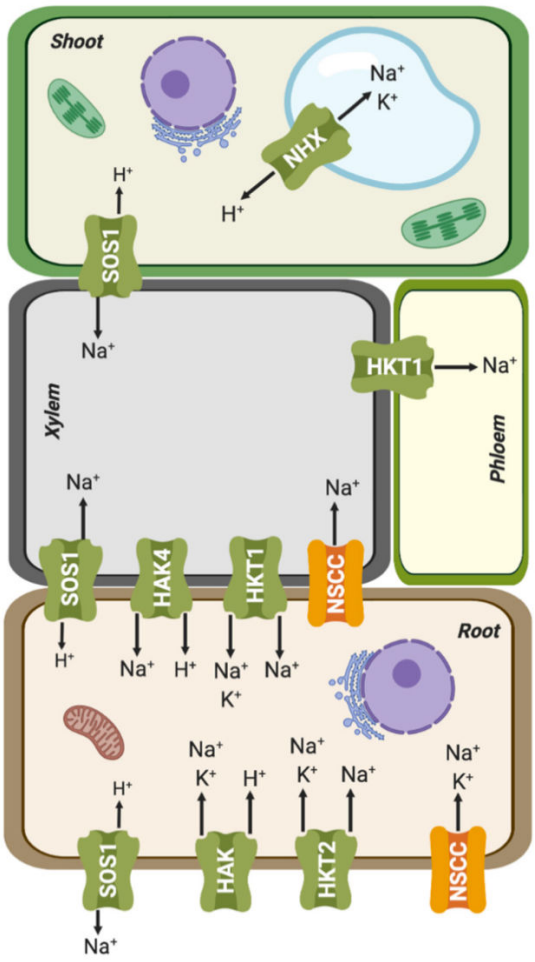


Figure II. 18 : Représentation schématique de l'absorption et de la translocation du Na^+ chez les plantes. La famille HKT (High-Affinity Potassium Transporters) est divisée en deux classes, les membres de la classe I (HKT1) sont omniprésents chez les plantes, principalement sélectifs pour le Na^+, et souvent impliqués dans la recirculation du Na^+ dans les tissus vasculaires, tandis que les membres de classe II (HKT2), sont trouvés exclusivement chez les monocotylédones et sont généralement perméables à la fois au Na^+ et au K^+. Une autre voie d'entrée du Na^+ dans les cellules végétales est les canaux cationiques non sélectifs (NSCC). Le Na^+ est ensuite chargé dans le xylème par le transporteur SOS1 (Salt-Overly-Sensitive 1) (Raddatz *et al.,* 2020).

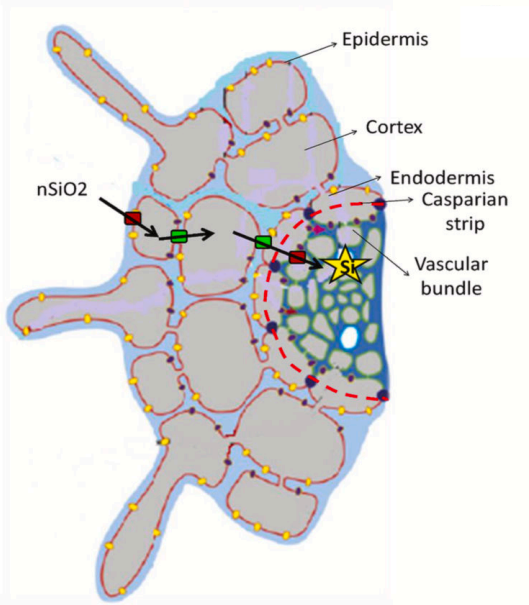


Figure II. 19 : Représentation schématique de l'absorption du Si et de son transport dans le xylème. Le transporteur Lsi1 est représenté par un rectangle rouge et le transporteur Lsi2 par un rectangle vert (Gaur *et al.,* 2020).

1.2.2.6. Le silicium (Si)

Le silicium est le deuxième élément le plus abondant sur terre, (It's Elemental), juste derrière l'oxygène. Le Si est retrouvé majoritairement sous la forme de dioxyde de silicium (SiO_2), couramment appelé silice, où un atome de silicium est relié à chaque atome d'oxygène par une double liaison. Il existe de nombreux « types » de silicates en fonction du nombre de complexes reliés (chaine de silicates) entre eux et des cations auxquels ils peuvent se lier. Bien que très abondant dans les sols, le Si est majoritairement présent sous forme de silice amorphe et seule une très faible proportion est disponible pour les végétaux sous forme d'acide monosilicique ($Si(OH)_4$. Une fois absorbé, le Si s'accumule au niveau pariétal sous forme de SiO_2-nH_2O amorphe solide ou sous forme de phytolithes, permettant aux plantes de mieux résister aux stress biotiques et abiotiques (Ma, 2004 ; Liang *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2017 ; Meunier *et al.,* 2018 ; Brahma *et al.*, 2020 ; Khan *et al.*, 2021). Par ailleurs, il a été montré qu'une bonne nutrition en Si permet de réduire la toxicité de certains éléments métalliques. Par exemple, le Si peut se combiner au Cd pour limiter sa translocation vers les parties aériennes ou les graines, atténuant ainsi la toxicité du Cd (Sarwar *et al.*, 2010).

Dans le règne végétal, toutes les plantes n'ont pas les mêmes capacités à accumuler le silicium. Hodson *et al.* (2005) ont compilé des données issues de 125 études afin d'étudier la teneur racinaire en Si de 735 espèces appartenant à des classifications phylogénétiques variées. Ainsi, ils ont pu montrer que les monocotylédones présentent de fortes teneurs en Si racinaire, tandis que les dicotylédones, comme les Brassicales, présentent de très faibles teneurs en Si. Cette forte variabilité serait due à la présence ou non de transporteurs spécifiques de Si. A titre d'exemple, chez le colza considéré comme un faible accumulateur de Si (teneur inférieure à 0,1 % de la matière sèche), il n'existe pas de transporteur spécifique de Si. *A contrario*, chez les espèces fortement accumulatrices de Si comme le blé ou le riz, l'absorption du Si par les racines, ainsi que sa translocation dans les organes de la plante font intervenir plusieurs transporteurs spécifiques de Si, appelés Lsi (Low silicon), qui sont des transporteurs de la famille des aquaporines de type NIP (nodulin 26-like intrinsic proteins). Chez le riz, Ma *et al.* (2006) ont mis en évidence le gène *OsLsi1* codant un transporteur NIP de Si, présent au niveau de l'endoderme et de l'exoderme des racines. Des gènes homologues à *Lsi1* codant des transporteurs ont été retrouvés chez 17 espèces végétales différentes (Vatansever *et al.,* 2017), comme chez l'orge (*HvLsi1* ; Yamaji *et al.,* 2012). OsLis1 permet l'absorption d'acide monosilicique (Mitani *et al.,* 2008), alors que OsLsi2, situé dans la membrane plasmique des cellules de la bande casparienne, permettrait le transport du Si dans l'apoplaste (Fig II. 19 ; Ma *et al.,* 2007 ; Gaur *et al.,* 2020). Une fois dans le xylème, le Si est transporté

vers les feuilles par le flux transpiratoire, puis par le transporteur Lsi6, responsable du déchargement du xylème (Lin *et al.,* 2019).

1.2.2.7. Le sélénium (Se)

Le Se est un élément bénéfique présent dans le sol sous différentes formes minérales telles que le sélénate (SeO_4^{2-}), la sélénite (SeO_2^{3-}) et la séléniде (Se^{2-}) ou encore sous forme organique (acides aminés séléniées) (Gupta et Gupta, 2017). Dans les plantes, il se trouve principalement sous forme d'acides aminés séléniés (sélénocystéine [SeCys] et sélénométhionine [SeMet]) (Schiavon et Pilon-Smits, 2017). Le Se participe à la régulation de la croissance, joue un rôle antioxydant (Pennanen *et al.*, 2002 ; Hernández-Hernández *et al.*, 2019 ; Fontagné-Dicharry *et al.*, 2020 ; Rady *et al.*, 2020) et serait impliqué dans la résistance aux stress abiotiques tels que la sécheresse (Rady *et al.*, 2020). A titre d'exemple, Hanson *et al.* (2003) ont montré que le Se améliorait la défense de la moutarde brune (*Brassica juncea*) contre une infection de champignons pathogènes et un invertébré, la Noctuelle exigüe (*Sporoptera exigua*).

Les transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire de sélénate ne sont pas encore connus. Cependant, le sélénate (SeO_4^{2-}) possèdent des propriétés physicochimiques similaires au sulfate (SO_4^{2}), aussi il est probable qu'il puisse être absorbé par les mêmes transporteurs (SULTR1.1 et SULTR1.2) présents dans la membrane plasmique des racines, à l'instar de ce qui a été observé pour le molybdate. Une fois absorbé, le Se est converti en sélénite, puis est combiné à l'OAS par la cystéine synthase pour former des acides aminés séléniés (SeCys et SeMet) (White, 2016), qui seront utilisés pour synthétiser des protéines séléniées.

Ainsi, une fois absorbés par la plante, les éléments minéraux sont, soit stockés sous forme ionique dans les vacuoles, soit incorporés dans des molécules organiques telles que les protéines, les acides nucléiques et les lipides. Au cours de la vie d'une plante, ces éléments sont destinés à être recyclés d'un organe source vers un organe puits en croissance. Ces processus de recyclage nécessitent une remobilisation des éléments qui fait intervenir, soit des transporteurs d'ions (cas des ions stockés dans les vacuoles), soit des processus plus complexes, nécessitant une dégradation des composés organiques (protéines par exemple) préalablement au chargement des produits de dégradation, dans le phloème et leur transfert vers l'organe puits.

2. Remobilisation des éléments minéraux

La remobilisation des éléments dépend de leur mobilité dans le phloème. Tous les macroéléments, à l'exception du Ca, ont une forte mobilité dans le phloème. Parmi les

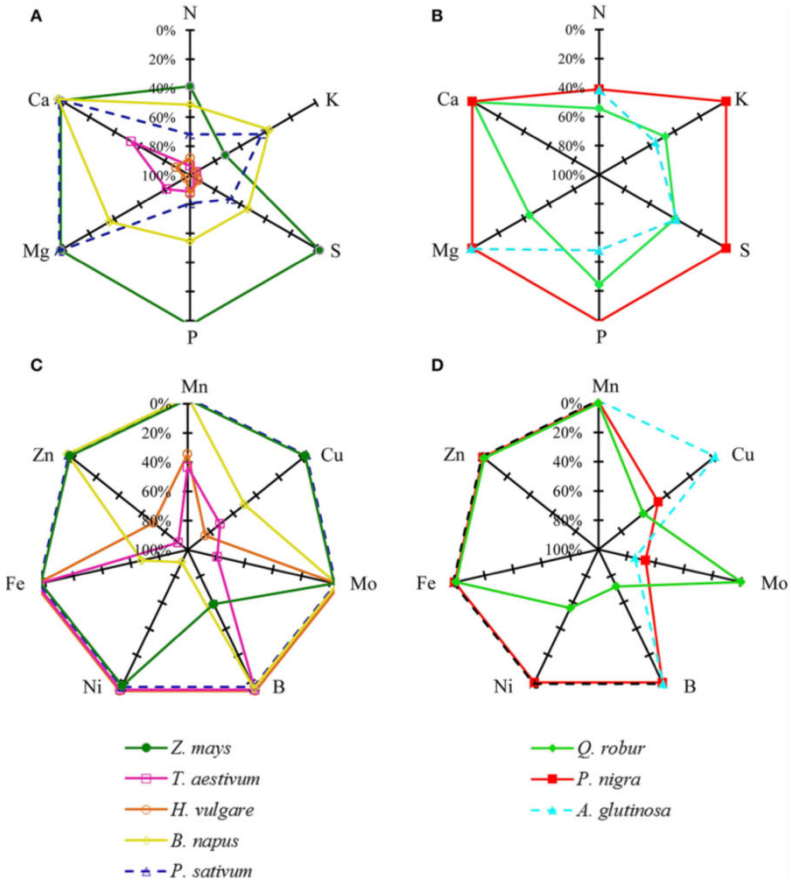


Figure II. 20 : Remobilisation apparente (en % du contenu maximal des feuilles mesuré au cours de leur développement) des macroéléments ; N, K, P, S, Ca, Mg (A, B) et des microéléments ; Zn, Fe, Mn, B, Ni, Cu et Mo (C et D) au cours de la sénescence foliaire chez cinq espèces cultivées : *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Horduem vulgare*, *Pisum sativum* et *Brassica napus* et trois espèces d'arbres : *Quercus robur*, *Populus nigra* et *Alnus glutinosa* (Maillard *et al.,* 2015).

macroéléments (Fig II. 20 ; Maillard *et al.,* 2015), l'N et le K sont toujours remobilisés durant la sénescence foliaire, cependant à des niveaux variables selon l'espèce considérée (l'N, par exemple, est remobilisé à plus de 90% chez l'orge et le blé, tandis qu'il l'est à moins de 40% chez le peuplier et le maïs). Les autres macroéléments tels que le Mg, le P, et le S sont en général stockés au niveau des feuilles et sont ensuite remobilisés vers les tissus en formation, les jeunes feuilles ou les graines, comme c'est le cas chez *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare Pisum sativum*, *Brassica napus*, *Quercus robur* ou *Alnus glutinosa* (Fig II. 20 ; Maillard *et al.,* 2015).

Bien que moins étudiés, il semble que les microéléments aient une mobilité dans le phloème plus modérée, voire très faible (par exemple pour le Mn). Leur remobilisation semble également variable selon les espèces considérées. A titre d'exemple, selon Maillard *et al.* (2015), le Cu est remobilisé chez *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Brassica napus*, *Quercus robur* et *Populus nigra*, tandis que le B est remobilisé uniquement chez *Zea mays* (Fig II. 20). Le Fe, le Zn et le Mo présentent la plus grande variation entre les espèces. *Brassica napus* et *Zea mays* sont incapables d'exporter le Zn et le Mo des feuilles, tandis que de manière générale, le Fe n'est pas remobilisé chez les Poacées et chez *Pisum sativum* (Fig II. 20).

Les deux éléments minéraux les moins mobiles dans le phloème sont le Ca et le Mn. Le Ca^{2+} très mobile dans le xylème est au contraire, très peu mobile dans le phloème en raison du pH élevé de ce tissu vasculaire (Liñero *et al.,* 2018). En revanche, il a été montré que dans certaines conditions, une remobilisation foliaire du Ca peut se produire chez *Glycine max* (Mauk et Noodén, 1992) et *Phaseolus vulgaris* (Biddulph *et al.,* 1959) après application d'éther diéthylique, de NaCl ou d'acide triiodobenzoïque, ou chez *Lycopersicum esculentum* suite à une brûlure locale (Malone *et al.,* 2002). De plus, Maillard *et al.* (2015 ; 2016) ont montré que le Ca pouvait être remobilisé depuis les feuilles matures chez *Triticum aestivum* et *Hordeum vulgare*, ainsi que chez *Brassica napus*, lors d'une carence en Ca, où il peut être remobilisé depuis les racines probablement par voie xylémique. Concernant le Mn, sur les 8 espèces végétales étudiées par Maillard *et al.* (2015), seuls *Triticum aestivum* et *Hordeum vulgare* semblent capables de remobiliser cet élément au niveau foliaire (Fig II. 20).

Malgré la forte mobilité de certains éléments dans le phloème, l'ampleur de leur remobilisation dépend également de l'importance de leur stockage préalable, de leurs formes de stockage dans les organes sources, ainsi que de l'intensité de la demande des organes puits. Enfin, l'existence de carences minérales (Maillard *et al.*, 2015) peut augmenter la remobilisation foliaire ou racinaire (Ca et Mn) de l'élément requis, ce qui permettra au végétal de maintenir sa croissance pendant quelques jours ou quelques semaines.

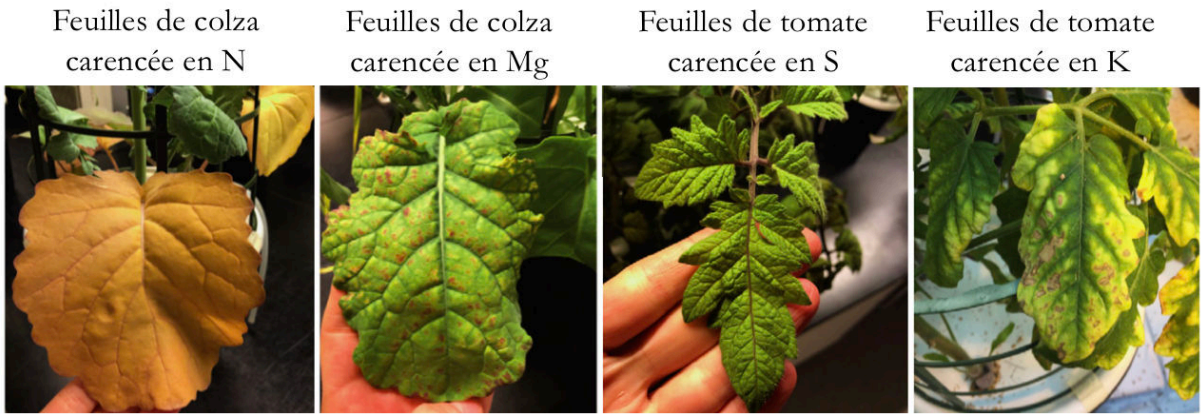


Figure II. 21 : Apparition de zones de chlorose et/ou de nécrose sur les feuilles matures de colza et de tomate soumises à des carences en macroéléments. (Photos de de Bang *et al.,* 2021)

III. Symptômes visuels et réponses ionomiques, physiologiques et moléculaires à une carence minérale

Lorsqu'un élément du ionome fonctionnel n'est pas présent en quantité suffisante dans le sol, les végétaux, organismes sessiles, peuvent être soumis à une carence nutritionnelle. Celle-ci peut être légère et transitoire ou si elle persiste, devenir grave et chronique. Des carences entrainent des symptômes visuels qui sont peu spécifiques et peu précoces puisqu'ils résultent d'effets à long terme se traduisant, comme nous le verrons, par diverses perturbations métaboliques. Toutefois, les végétaux peuvent mettre en place différentes stratégies impliquant des mécanismes physiologiques et moléculaires (croissance racinaire, stimulation de l'absorption racinaire, remobilisation éventuelle de réserves) pour y faire face (van Maarschalkerweerd & Husted, 2015) et maintenir dans une certaine mesure, leur croissance et leur développement. Tandis que les effets des carences minérales ont été étudiés depuis longtemps, cela ne fait qu'une décennie environ, que le développement de la ionomique, tant d'un point de vue technologique que conceptuel, a permis d'appréhender les effets d'une carence minérale donnée sur la nutrition minérale dans son ensemble, révélant de multiples interactions entre éléments du ionome fonctionnel.

1. Symptômes visuels des carences nutritionnelles et mécanismes associés

Chez les plantes supérieures, les carences sévères en nutriments sont généralement associées à des symptômes phénotypiques, tels que la chlorose des feuilles (Da Silva *et al.,* 2017), l'anthocyanose (de Bang *et al.,* 2021), la ramification des racines (Koné *et al.,* 2014) ou encore, plus généralement décrite, la réduction de la croissance des plantes (Tränkner *et al.,* 2016).

L'apparition de zones de chloroses et/ou de nécroses entre les nervures foliaires, en particulier chez les feuilles les plus anciennes, est un symptôme fréquent des plantes déficientes en éléments minéraux, notamment en macroéléments (Fig II. 21). Ce symptôme est dû à la diminution de la teneur en pigments photosynthétiques, en particulier des chlorophylles. Une forte corrélation existe entre le statut azoté des plantes et la biosynthèse des chlorophylles, *via* la voie GS/GOGAT (glutamine synthétase/glutamate synthase), puisque que le glutamate est le précurseur des tétrapyrroles cycliques qui forment la base du squelette de l'hème des chlorophylles. Aussi, une carence en N conduit à un défaut de synthèse et à une dégradation des chlorophylles, ce qui induit la chlorose des feuilles (de Bang *et al.,* 2021). Les chloroses observées chez les plantes déficientes en N ou en S sont assez similaires. Néanmoins, lors d'une carence en S, une chlorose intermédiaire peut également être observée. Celle-ci est semblable à la chlorose observée chez les plantes

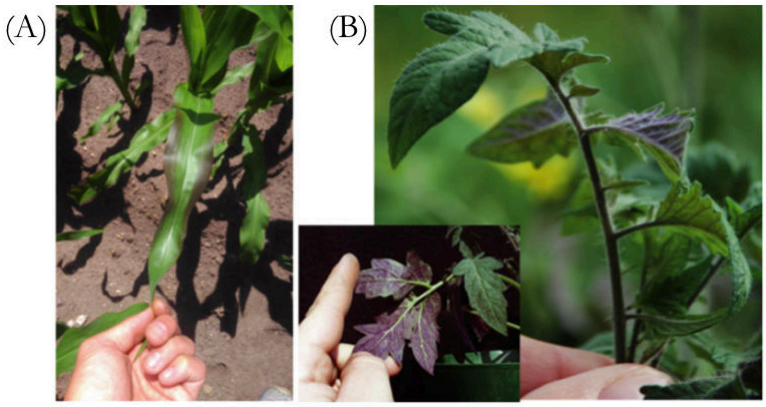


Figure II. 22 : Apparition d'anthocyanose sur les feuilles matures de maïs (A) et de tomate (B) soumises à une carence en P. (Photos de de Bang *et al.,* 2021)

carencées en Fe, qui résulte d'une diminution de la biosynthèse de l'acide δ-aminolévulinique et du protochlorophyllide, tous deux des précurseurs des chlorophylles (Muneer *et al.,* 2014). Cette similarité entre ces deux carences est probablement liée au fait que la stratégie II d'absorption du Fe utilisée par certaines plantes (blé, orge et maïs) est fortement altérée par la déficience en S (Courbet *et al.,* 2019). Autre exemple, une carence en Mg induit une altération de l'activité photosynthétique des plantes en limitant l'insertion de Mg^{2+} dans la protoporphyrine IX, un précurseur des chlorophylles (Ye *et al.,* 2019). Par ailleurs, chez les plantes carencées en P, un autre symptôme visuel se manifeste par l'apparition d'une coloration violacée aux niveaux foliaire et caulinaire. Cette coloration est la conséquence d'une accumulation d'anthocyanes (pigments de la famille des flavonoïdes) synthétisées sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique, puis stockées dans les vacuoles où le pH plus faible leur assure une protection contre l'oxydation. Ce symptôme, appelé anthocyanose, est notamment observé chez de nombreuses espèces végétales (par exemple, le maïs et la tomate, Fig II. 22) soumises à une carence en P. En outre, il est intéressant de noter que toutes les espèces végétales carencées en P ne développent pas d'anthocyanose, comme la pomme de terre, la betterave à sucre et le riz (de Bang *et al.,* 2021). La carence en Zn peut également induire l'accumulation d'anthocyanes au niveau des feuilles de chou rouge, de sorgho et de riz (Hajiboland et Amirazad, 2010). Actuellement, il est admis que les anthocyanes seraient impliquées dans la photoprotection des complexes photo-récupérateurs du photosystème II (de Bang *et al.,* 2021).

Ces dernières années, le développement d'outils portatifs utilisant des technologies d'imagerie basées sur la réflectance et la transmittance a rendu possible la mesure, de manière non destructive, de l'évolution des teneurs foliaires en chlorophylles, en anthocyanes ou en flavonoïdes, qui permettent d'affiner la détection de ces symptômes visuels (de Bang *et al.,* 2020). Cependant, ces symptômes et ces méthodes de détection présentent des limites en matière de précocité et de spécificité. Aussi, des méthodes de diagnostic basées sur le rôle fonctionnel des éléments ou sur la réponse transcriptomique à une carence nutritionnelle donnée, peuvent potentiellement être des outils plus spécifiques et plus précoces pour identifier les situations de carences minérales et permettre un meilleur pilotage de la fertilisation, afin de répondre aux besoins nutritionnels réels des cultures.

Pour faire face aux disponibilités fluctuantes en éléments minéraux dans la solution du sol (et notamment aux carences), les plantes ont développé différentes stratégies et mécanismes pour optimiser l'acquisition des éléments minéraux. Ainsi, en réponse aux carences élémentaires, il peut être observé des modifications de l'architecture racinaire, le plus souvent, couplées à l'induction de

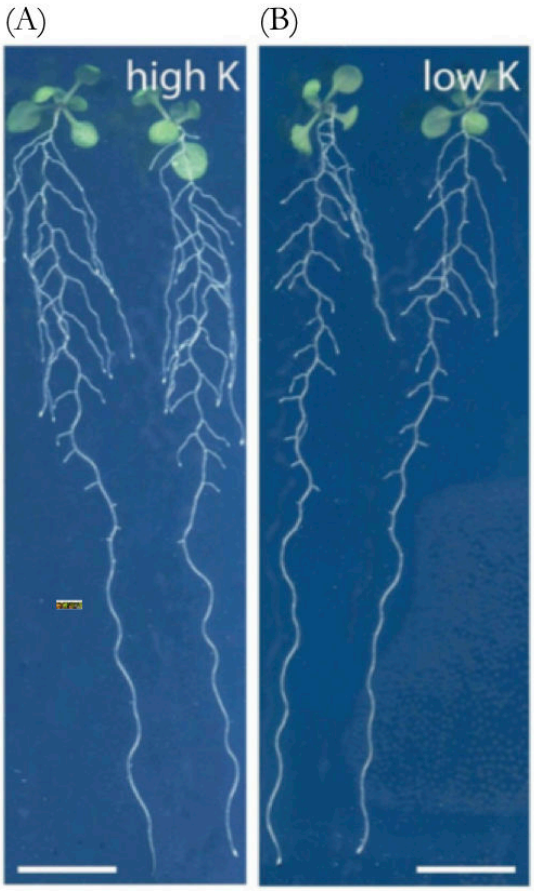


Figure II. 23 : Modification de l'architecture racinaire de plantes d'*Arabidopsis* âgées de 10 jours et cultivées sur un milieu (A) à forte disponibilité en K ou (B) à faible disponibilité en K. Une inhibition de la croissance des racines latérales en condition de carence en K est observée. Barres d'échelle : 1 cm (Sustr *et al.,* 2019).

gènes codant des transporteurs racinaires impliqués dans l'absorption d'un ou plusieurs d'éléments. Par ailleurs, l'exsudation racinaire de composés organiques, permettant d'augmenter la disponibilité de certains éléments minéraux dans le sol, constitue un autre mécanisme adaptatif mis en place par les plantes devant faire face à une (des) carence(s) minérale(s) (Vishwakarma *et al.*, 2020 ; More *et al.*, 2019). Enfin, en réponse à une carence minérale donnée, les plantes mettent généralement en place des processus de remobilisation de l'élément carencé (préalablement stocké sous formes minérales et/ou organiques) de leurs tissus végétatifs (puits) vers les organes en croissance (source), afin de maintenir leur développement et, *in fine*, la production de graines (Maillard *et al.,* 2015 ; Chen *et al.,* 2019).

2. Réponses adaptatives à une carence minérale

2.1. Stimulation et orientation de la croissance racinaire

Les racines primaires peuvent se ramifier et produire des racines latérales, qui peuvent à leur tour subir des ramifications (Cui *et al.,* 2018). Les racines primaires sont établies pendant l'embryogenèse, tandis que les racines latérales, qui proviennent des racines primaires, se développent de manière post-embryonnaire. Le nombre total de racines latérales produit par la plante dépend du comportement post-embryonnaire des racines latérales, qui est lui-même influencé par des facteurs externes tels que la disponibilité en éléments minéraux (Gruber *et al.,* 2013). Par exemple, chez *Arabidopsis*, une carence en K peut diminuer le nombre de racines latérales (Fig II. 23 ; Sustr *et al.,* 2019). Les poils absorbants sont quant à eux issus d'une différenciation de cellules épidermiques racinaires. Il existe trois types de formation de poils absorbants en fonction des espèces végétales (Fig. II. 24 ; Bibikova et Gilroy, 2002) : pour le Type I, toutes les cellules épidermiques sont susceptibles de former des poils absorbants, et pour les Types II et III, il existe des trichoblastes (cellules susceptibles de devenir des poils absorbants) et des atrichoblastes (cellules ne pouvant pas devenir des poils absorbants) (Fig. II. 24 ; Bibikova et Gilroy, 2002). Chez le Type II, le trichoblaste est le produit d'une division cellulaire asymétrique et chez le Type III, la différenciation produit des rangées de trichoblastes induisant des rangées de poils racinaires. Les Brassicacées, dont le colza, ont des racines utilisant le Type III, tandis que le blé, le riz et l'orge utilisent le Type II. La formation des poils absorbants peut être modifiée par de nombreux facteurs environnementaux, tels que la présence de phytohormones (auxine, acide abscissique, éthylène) ou la disponibilité en éléments minéraux dans la solution du sol (N, P, Mg, Fe, Zn) (Cui *et al.,* 2108 ; Shibata et Sugimoto, 2019). Par exemple, chez *Poncirus trifoliata* lors de faibles disponibilités en P, Ca et Mn, il a pu être observé une augmentation de la densité des poils racinaires sur la racine primaire, tandis que de faibles disponibilités en Mg, K et Fe ont entraîné une diminution de la densité des poils racinaires (Fig II. 25 ; Cao *et al.,* 2013).

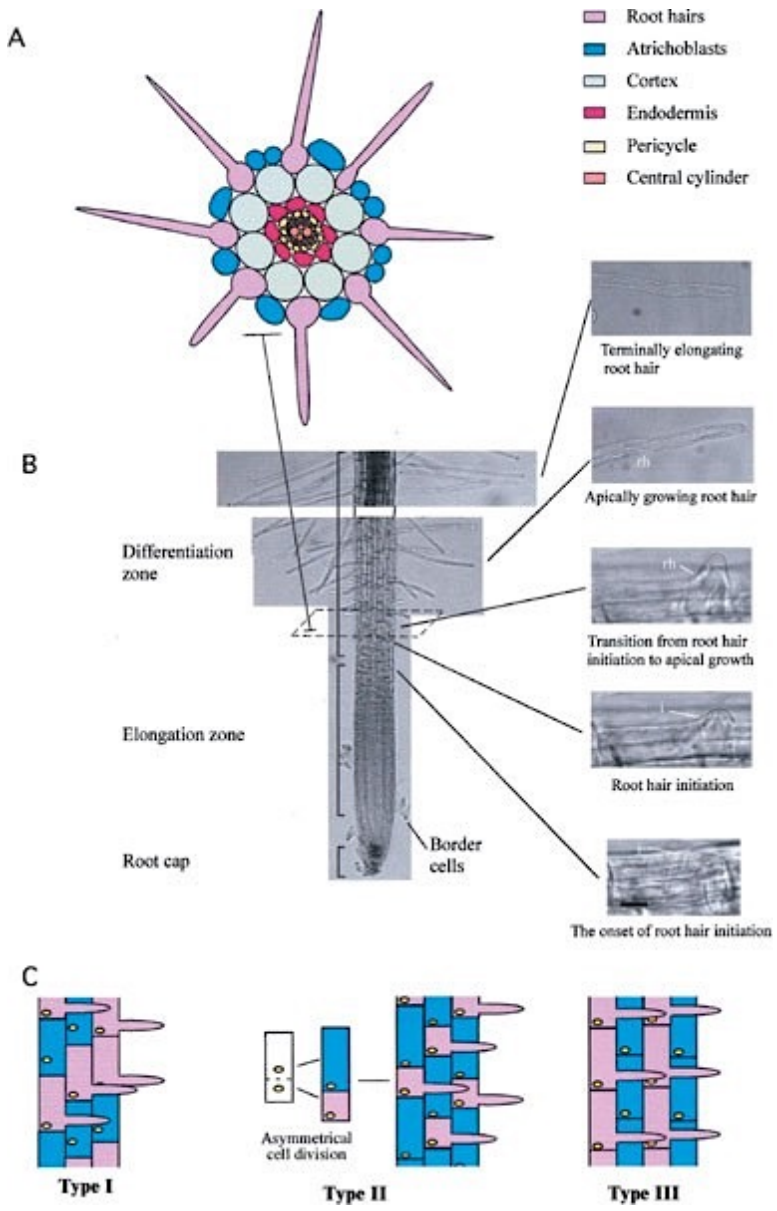


Figure II. 24 : Modèle de développement des poils racinaires. (A) Coupe transversale d'une racine primaire d'*Arabidopsis* montrant les relations spatiales entre les différentes cellules constituant la racine. (B) Images en champ clair de la racine primaire d'*Arabidopsis* montrant les zones de développement et la progression du développement d'un trichoblaste lors de l'émergence d'un poil racinaire, barre d'échelle = 10 µm. i-site d'initiation ; rh-cheveu racinaire. (C) Les trois types de la différenciation épidermique des cellules racinaires : Type I, n'importe quelle cellule peut former un poil racinaire ; Type II, le trichoblaste est le produit d'une division cellulaire asymétrique ; Type III, la différenciation produit des rangées de trichoblastes ou d'atrichoblastes. Violet, atrichoblaste ; bleu, trichoblaste (Bibikova et Gilroy, 2002).

2.2. Induction des gènes codant des transporteurs racinaires

L'augmentation de l'expression des gènes codant des transporteurs racinaires d'éléments minéraux a largement été observée en réponse à plusieurs carences nutritionnelles. D'une manière assez générale, l'expression racinaire des gènes codant les transporteurs racinaires impliqués dans l'absorption de l'élément carencé, est augmentée chez les plantes carencées. Par exemple, chez le colza, les gènes *BnNRT2.1*, *BnNRT2.2a* et *BnNRT2.4a* codant des transporteurs racinaires de nitrate, sont surexprimés lors d'une carence en N (Tong *et al.,* 2020). Chez le blé, les gènes *TaNRT2.1* et *TaNRT2.2* jouent tous deux un rôle essentiel lors d'une carence en N, *via* leur surexpression, sous le contrôle transcriptionnel du facteur de transcription TaWRKY20 (Zhang *et al.,* 2021). Li *et al.* (2019) ont montré que chez *Brassica napus*, 4 gènes orthologues au gène codant le transporteur de P d'*Arabidopsis AtPHT1.1* (*BnaPT3*, *BnaPT21*, *BnaPT25* et *BnaPT43*) voient leur expression fortement augmenter dans les racines de plantes cultivées en conditions de carence en P, comparativement aux plantes correctement alimentées en P. En cas de carence en S, l'induction des gènes *SULTR1.1* et *SULTR1.2*, codants des transporteurs impliqués dans l'absorption racinaire de sulfate (Rouached *et al.,* 2008 ; Kimura *et al.,* 2019), a été mise en évidence chez plusieurs espèces, telles que le colza (Maillard *et al.,* 2016), le blé (Shinmachi *et al.,* 2010) et le maïs (Huang *et al.,* 2018).

L'une des homéostasies minérales la plus étudiée en matière de régulation est celle du Fe. Chez les plantes, la régulation de la concentration en Fe est en partie assurée par le contrôle de l'absorption racinaire du Fe. Le transporteur 1 (IRT1) est un transporteur à haute affinité pour le Fe, fortement induit lors d'une carence en Fe. Toutefois, ce transporteur est aspécifique puisqu'il est également connu pour participer à l'absorption racinaire d'autres cations divalents tels que le Mn, le Zn et le Co. Ainsi, chez *Arabidopsis* carencé en Fe, l'augmentation de l'expression du gène *AtIRT1* conduit à une augmentation de l'absorption racinaire et à l'accumulation dans les feuilles de Mn, Zn et Co (Barberon *et al.,* 2011). De la même manière, l'expression du gène *ZmIRT1* est augmentée chez *Zea mays* cultivé en condition de carences en Fe et en Zn (Li *et al.,* 2013). La régulation à la hausse de l'expression d'*IRT1* lorsque les plantes sont soumises à une carence en Fe, met en évidence un réseau complexe de régulation, responsable des fluctuations des teneurs d'autres éléments dans les tissus végétaux.

L'exsudation racinaire de composés organiques est un autre mécanisme permettant d'augmenter la mobilité de certains nutriments et ainsi, de favoriser leur absorption par les plantes (Vishwakarma *et al.,* 2020 ; More *et al.*, 2019) en condition de carence nutritionnelle. Les racines des plantes sécrètent un large éventail de composés, qui varient considérablement en fonction du statut

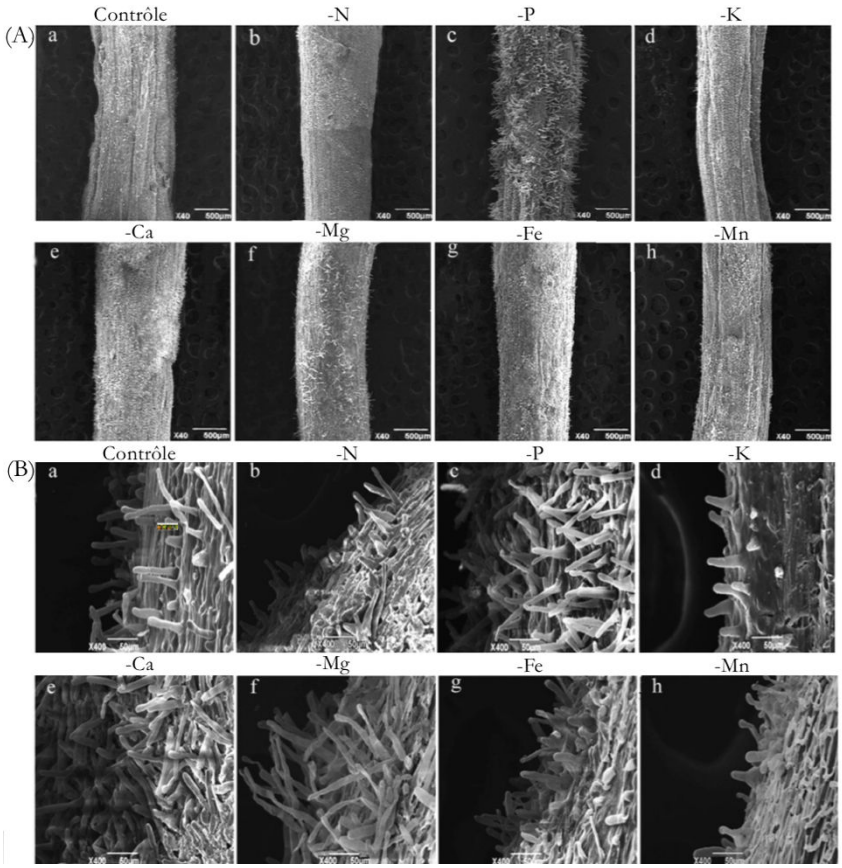


Figure II. 25 : Images de microscopie électronique à balayage de poils racinaires de racines primaires de plantules de *Poncirus trifoliata* après 30 jours de carences nutritionnelles et à 2 échelles d'observation : (A) x40, Bar=500 µm, (B) x400, Bar=50 µm). (a) plantes « témoin » ou soumises à des carences en –N(b), (c) –P, (d) –K, (e) –Ca, (f) –Mg, (g) –Fe, (h) –Mn (Cao *et al.,* 2013)

nutritionnel et du type de sol. Ainsi, la composition de ces exsudats racinaires dépend de la carence considérée. Par exemple, chez le maïs, les exsudats racinaires de plantes carencées en Fe contenaient plus de glutamate, de glucose, de ribitol et de citrate, par rapport à la carence en P, qui elle a stimulé la sécrétion d'acide c-aminobutyrique et d'hydrates de carbone (Carvalhais *et al.,* 2011). Cette stratégie permet aux plantes carencées d'améliorer l'acquisition de nutriments peu solubles dans le sol (Carvalhais *et al.,* 2011). Une limitation en P induit, par exemple, l'exsudation de H^+ pour acidifier la rhizosphère et permettre une meilleure disponibilité des formes de P présentes dans le sol, mais difficilement assimilables pas les plantes (Ludewig *et al.,* 2019).

2.3. Remobilisation des réserves

En réponse à une carence minérale modérée, le processus de remobilisation permet l'utilisation des éléments stockés majoritairement sous forme minérale (par exemple, SO_4^{2-}, K^+ et NO_3^-), en faisant intervenir des transporteurs vacuolaires (par exemple, SULTR4.1 et SULTR4.2 qui permettent l'efflux du SO_4^{2-} des vacuoles). Chez le colza soumis à une limitation en S, les réserves vacuolaires de SO_4^{2-} sont recyclées des feuilles vers les racines grâce à l'intervention de transporteurs de sulfate. Néanmoins, cette adaptation physiologique est efficace seulement sur une courte durée de déficience (Abdallah *et al.,* 2010). En effet, lors d'une carence en S sévère, lorsque toutes les réserves de sulfate sont épuisées, une dégradation de composés organiques et plus particulièrement des protéines soufrées par protéolyse, associée à la sénescence, intervient, afin de mobiliser des composés soufrés (acides aminés) des feuilles âgées, vers les organes en croissance (Abdallah *et al.,* 2010).

La remobilisation associée à la sénescence des feuilles, induite ou non par une carence minérale, permet le recyclage des nutriments et leur exportation depuis les feuilles âgées vers les organes en formation qui nécessitent de l'énergie et des nutriments (Guiboileau et Masclaux-Daubresse, 2012 ; Ricachenevsky *et al.,* 2013). La remobilisation foliaire de N, P et S au cours de la sénescence a été largement étudiée (Abdallah *et al.,* 2010 ; Da Ros et Mansfield, 2020 ; Alpuerto *et al.,* 2021) même si les mécanismes impliqués ont surtout été décrits pour l'N (Havé *et al.,* 2017 ; Nehe *et al.,* 2020 ; Sultana *et al.,* 2021). Par exemple, chez *Brassica napus*, en fonction du stade de développement considéré, deux types de sénescence sont évoqués ; la sénescence séquentielle intervenant essentiellement au stade végétatif et la sénescence monocarpique qui s'initie lors de la mise en place de l'appareil reproducteur. La sénescence séquentielle permet le recyclage de l'N des feuilles matures, en suivant un gradient acropète le long de la plante (Avice et Etienne, 2014 ; Jasinski *et al.,* 2021). La sénescence monocarpique, quant à elle, intervient à un moment où l'absorption racinaire de l'N minéral est généralement réduite et où le remplissage en N des graines génère une forte demande en N (Avice et Etienne, 2014).

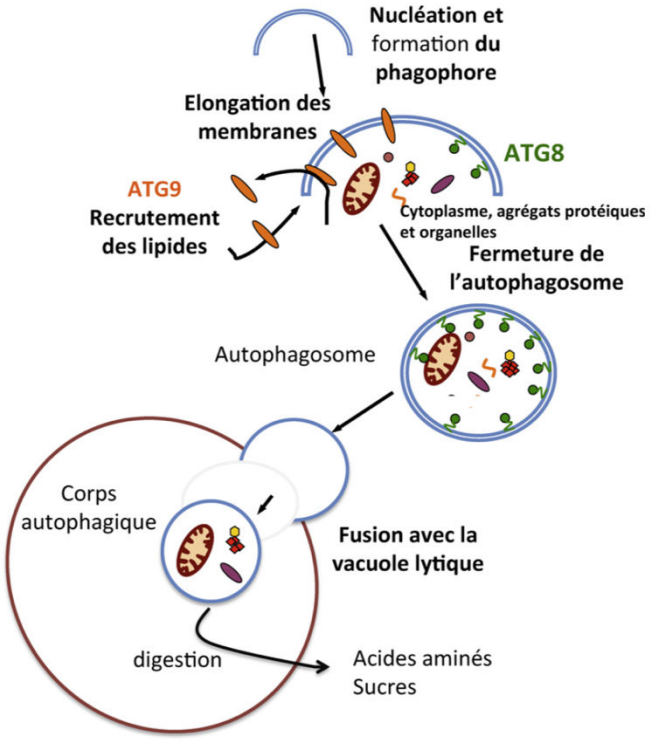


Figure II. 26 : Représentation schématique du processus autophagique. La formation du phagophore marque l'initiation de l'autophagie. L'élongation du phagophore fait intervenir la protéine ATG9. Peu à peu, des agrégats protéiques et des organites sont séquestrés dans la double membrane, qui en se refermant formera l'autophagosome. Cette étape fait intervenir ATG8. Une fois formé, la membrane externe de l'autophagosome vient fusionner avec la vacuole lytique. Les corps autophagiques ainsi que son contenu sont ensuite hydrolysés et les composés qui en résultent sont exportés vers le cytoplasme. (Guiboileau et Masclaux-Daubresse, 2012)

La sénescence est un processus naturel finement régulé, qui marque le stade ultime du développement d'un organe et qui participe au recyclage des nutriments au profit des jeunes organes en croissance. Au cours de ce processus, l'expression de deux catégories de gènes appelés « Senescence-Down regulated Genes » (SDG) et « Senescence-Associated Genes » (SAG) est fortement modulée. Le jaunissement des feuilles induit par la sénescence, s'accompagne d'une répression des gènes SDG codant le plus souvent des protéines associées à la photosynthèse et par l'induction de gènes SAG codant majoritairement des enzymes catalytiques, telles que des lipases, des nucléases et des protéases. Chez le blé carencé en N, une sénescence accélérée est associée à une dégradation rapide de protéines, permettant ainsi une remobilisation efficace de l'N vers les organes en croissance. Cette sénescence des feuilles drapeaux est corrélée à l'augmentation de l'expression du gène *SAG12* (Alpuerto *et al.,* 2021) codant une protéase à cystéine fortement impliquée dans la remobilisation de l'N (James *et al.,* 2018). D'un point de vue fonctionnel, même si les processus protéolytiques associés à la sénescence ne sont pas encore clairement établis, certaines études rapportent que la dégradation des protéines, aurait lieu au sein de la vacuole et/ou de petites vacuoles lytiques induites lors de la sénescence, appelées « Sénescence Associated Vacuoles » (SAV) (James *et al.,* 2018). D'autres études montrent que cette voie protéolytique vacuolaire serait complétée par un processus plus complexe, appelé autophagie (Avila-Ospina *et al.,* 2014 ; Havé *et al.,* 2016).

Chez les eucaryotes, l'autophagie est considérée comme un processus d'auto-nettoyage visant à éliminer du matériel cellulaire devenu indésirable, par exemple, des organites endommagés, des agrégats de protéines non fonctionnelles ou des composés toxiques. L'augmentation de l'activité autophagique pendant la sénescence des feuilles permet de maintenir la cellule en vie, tout en recyclant les nutriments (Havé *et al.,* 2016). L'autophagie peut être décrite comme comportant quatre étapes : initiation et formation du phagophore, élongation et fermeture du phagophore en autophagosome, fusion de l'autophagosome à la vacuole, et enfin, dégradation du corps autophagique (Fig II. 26). Chacune de ces étapes fait intervenir un ensemble de gènes *atg* (autophagy-related gene) codant des protéines ATG, la plus étudiée étant ATG8, une protéine essentielle à la fermeture de l'autophagosome.

Bien que la sénescence foliaire soit un processus majeur pour la remobilisation de l'N en particulier, lorsque la plante est soumise à des fluctuations de disponibilité en N, en cas de carences nutritionnelles, les processus autophagiques seraient essentiels à la dégradation des protéines et au remplissage en N des graines (Guiboileau et Masclaux-Daubresse, 2012). En effet, plusieurs études montrent que les mutants d'autophagie d'*Arabidopsis atg5-1* et *atg5-2* présentent un défaut de remobilisation d'N associé à un défaut de dégradation des protéines (Guiboileau et Masclaux-

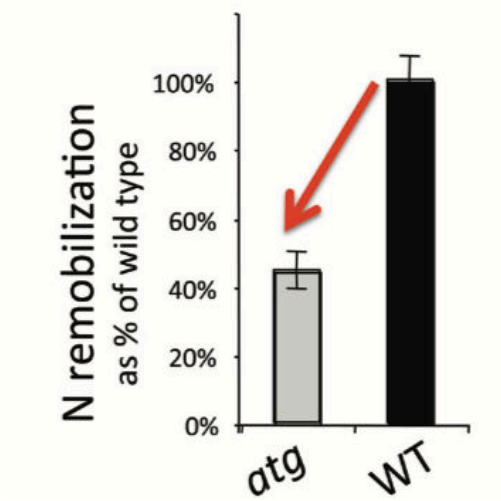


Figure II. 27 : Défaut de remobilisation de l'azote chez des mutants d'autophagie *atg*. L'efficacité de la remobilisation de l'N a été évaluée chez des mutant *atg* d'*Arabidopsis thaliana* et des plantes contrôles (WT : Wild Type) grâce à un marquage au ^{15}N. L'efficacité de remobilisation de l'N est largement réduite chez des mutants *atg* par rapport au WT. L'autophagie est impliquée dans environ 40% du flux de remobilisation du ^{15}N des feuilles vers les graines des plantes cultivées dans des conditions faibles en nitrate. Un défaut de l'activité autophagique ne bloque pas l'ensemble du flux de recyclage ou remobilisation de l'N. Il semble que d'autres voies de remobilisation restent actives chez ces mutants, suggérant que l'autophagie ne prend pas en charge la totalité de l'N remobilisé, et que la dégradation par autophagie est probablement sélective pour certaines sources d'azote (Avila-Ospina *et al.,* 2014).

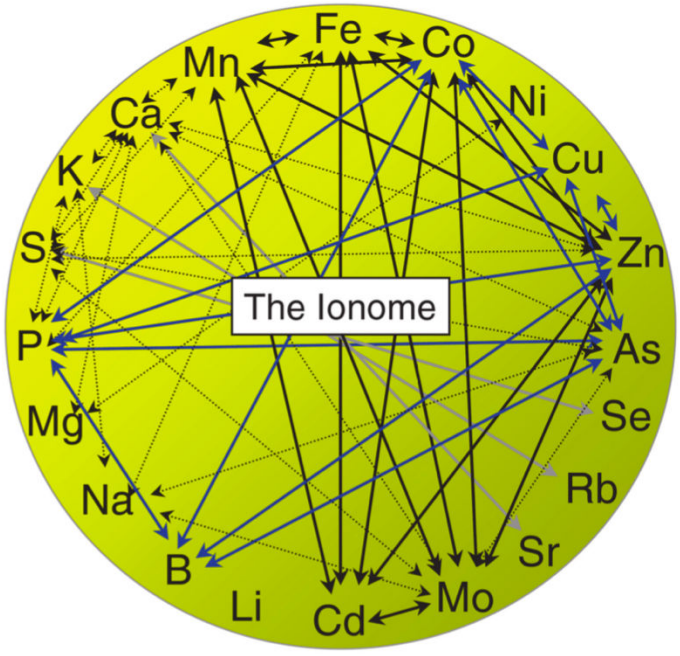


Figure II. 28 : Représentation schématique des interactions génétiques, physiologiques et chimiques entre les éléments chez les végétaux selon Baxter (2009). Le schéma ne fournit qu'une fraction des interactions possibles relevées dans la littérature. Les flèches indiquent les différentes interactions potentielles entre les éléments. Celles en noires indiquent les interactions avec le Fe, les flèches bleues, celles avec le P. Ces interactions ont été mises en évidence en mesurant le contenu élémentaire de plantes d'*Arabidopsis* cultivées avec différents apports de Fe ou de P, ou encore en utilisant des mutants déficients (perte de fonction de certains gènes). Les flèches grises indiquent quelques analogies chimiques entre éléments, comme celles existant entre le K et le Rb, le S et le Se ou le Ca et le Sr (Baxter *et al.,* 2009).

Daubresse *et al.,* 2012 ; Chen *et al.,* 2019). Par ailleurs, Avila-Ospina *et al.* (2014) estiment, grâce à l'utilisation de mutants d'autophagie d'*Arabidospis*, que 50% de l'azote foliaire serait remobilisé par ce mécanisme d'autophagie (Fig II. 27).

3. Modifications du ionome lors de carences minérales

L'analyse globale du ionome révèle des interactions multiples entre éléments. Par exemple une carence simple n'affecte pas seulement l'élément concerné, mais potentiellement d'autres éléments du ionome. Cette approche a permis à Baxter de proposer le concept de « social network of nutrients ». Par ailleurs, le schéma synthétique de Baxter *et al.* (2009) (Fig II. 28), compilant les données issues de nombreuses études, montre des interactions entre différents éléments du ionome fonctionnel, mais aussi avec des éléments non requis par le métabolisme. Présenter l'ensemble des interactions et mécanismes afférents potentiellement impliqués, est hors du cadre de cette analyse, néanmoins une vision globale illustrée par quelques exemples de mécanismes peut être proposée. De façon non exhaustive, cela concerne, i) les mécanismes d'absorption des éléments minéraux, ii) le cadre de Caspary qui exerce potentiellement un contrôle différencié sur la translocation des racines vers les feuilles, ou iii) certaines voies métaboliques ou nœuds métaboliques qui requièrent plusieurs éléments minéraux pour leur fonctionnement et/ou leur régulation. Nous verrons, par la suite, dans quelle mesure la composition ionomique d'une plante peut refléter son statut physiologique et potentiellement aboutir au concept de signatures ionomiques spécifiques de certaines carences minérales. Enfin, nous présenterons quelques exemples de réponses transcriptomiques aux carences nutritionnelles, ainsi que les résultats d'études récentes s'intéressant aux gènes ou aux groupes de gènes (Whitt *et al.,* 2020 ; Ali *et al.,* 2021) dont l'expression peut affecter la composition du ionome en réponse à des stress, notamment des carences minérales.

3.1. Interactions entre éléments impliquant les mécanismes d'absorption racinaire

Chez de nombreuses espèces végétales, telles qu'*Aradidopsis thaliana* (Aarabi *et al.,* 2020), *Brassica napus* (Maillard *et al.,* 2016) et *Triticum aestivum* (Shinmachi *et al.,* 2010), une limitation de la nutrition S s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs racinaires de sulfate, *SULTR1.1* et *SULTR1.2*, couplée à une augmentation de l'absorption et à l'accumulation de Mo et de Se. Ceci serait dû aux similarités physico-chimiques existant entre le SO_4^{2-}, le MoO_4^{2-} et le SeO_4^{2-}, et suggère qu'il peut exister une compétition entre ces anions divalents pour les mêmes transporteurs (Fig II. 29). Une fois absorbé le Mo entre dans la biosynthèse du MoCo, un cofacteur à Mo essentiel pour l'activité de la sulfite oxydase, catalysant l'oxydation du SO_3^{2-} en SO_4^{2} qui sera ensuite réduit et entrera, entre autres, dans la synthèse des protéines soufrées.

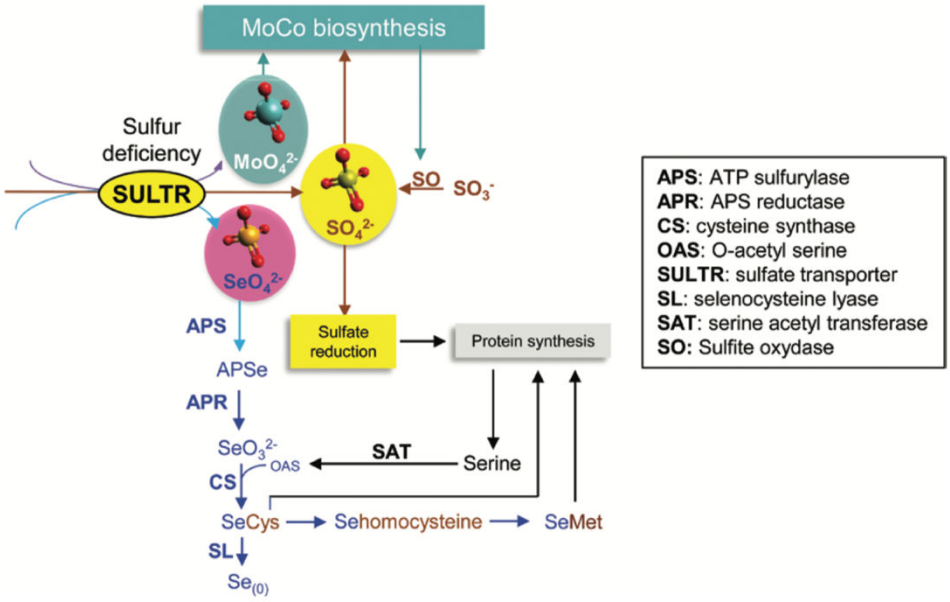


Figure II. 29 : Absorption potentielle du sulfate, du molybdate et du sélénate par les transporteurs racinaires de sulfate et assimilation du Se dans les acides aminés puis les protéines (Courbet *et al.,* 2019)

Tableau II. 6 : Absorptions relatives (% de l'absorption par les plantes témoins) d'éléments du ionome fonctionnel (N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mn, B, Mo et Na) chez le colza soumis à différentes carences nutritionnelles (-N, -K, -P-, -Ca, -Mg, -S, -Zn, -Cu, -Mn, -B, -Mo, ou -Fe). En vert, stimulation et en rouge, réduction de l'absorption relative. Les données sont sous forme de moyenne ± SE (n=16). Gradient de couleurs : les couleurs sombres, intermédiaires et claires indiquent des différences significatives entre les plantes témoins et les plantes carencées en un élément respectivement pour un niveau de significativité de p<0,001, p<0,01 et p<0,05. NS indique une absence de différence significative. Les interactions significatives à p<0,001 et correspondant à une augmentation d'au moins 150% de l'absorption, apparaissent en gras (Maillard *et al.,* 2016).

Deprivation	Changed the uptake of (as % of control plants):											
	N	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Cu	Mn	B	Mo	Na
–N	–	36.6 ± 2.02	28.3 ± 1.96	27 ± 1.99	37.4 ± 1.83	34.6 ± 1.78	29.0 ± 2.14	63.3 ± 8.05	14.7 ± 3.32	48.1 ± 2.89	19.6 ± 1.88	30.7 ± 1.12
–P	63.9 ± 2.34	–	31.9 ± 1.25	40.7 ± 1.33	49.6 ± 1.44	36.0 ± 1.33	46.1 ± 2.53	50.6 ± 2.78	26.1 ± 1.99	51.3 ± 2.51	23.4 ± 1.26	35.9 ± 1.74
–K	NS	122.3 ± 1.09	–	137.2 ± 2.11	141.2 ± 1.34	85.1 ± 1.02	144.0 ± 2.07	**226.4 ± 4.27**	137.4 ± 2.00	75.6 ± 1.12	65.7 ± 0.67	**846.7 ± 11.57**
–Ca	155.6 ± 1.96	118.2 ± 1.39	**154.5 ± 1.96**	–	**260.9 ± 3.24**	70.2 ± 0.83	118.1 ± 1.89	NS	61.7 ± 1.56	34.6 ± 1.11	28.1 ± 0.53	63.4 ± 1.18
–Mg	131.2 ± 1.7	131.4 ± 1.95	128.8 ± 1.37	116.1 ± 2.16	–	72.0 ± 1.04	**226.1 ± 5.13**	127.6 ± 2.08	**188.0 ± 3.78**	138.6 ± 2.5	135.6 ± 1.59	68.5 ± 1.01
–S	73.0 ± 2.36	NS	80.6 ± 3.22	131.5 ± 4.88	41.6 ± 1.64	–	NS	122.2 ± 4.42	71 ± 4.57	NS	**938.0 ± 36.29**	55.2 ± 1.33
–Zn	NS	**157.2 ± 4.29**	NS	124.3 ± 3.26	86.9 ± 1.48	NS	–	NS	**186.7 ± 6.79**	80.1 ± 2.88	**228.4 ± 4.04**	51.5 ± 0.88
–Cu	NS	NS	NS	NS	82.5 ± 2.38	NS	NS	–	NS	NS	**247.2 ± 5.42**	68.9 ± 2.98
–Mn	NS	112.3 ± 1.87	NS	125.3 ± 3.21	NS	113.9 ± 1.94	NS	NS	–	NS	**253.1 ± 4.26**	76.4 ± 1.71
–B	NS	NS	NS	132.4 ± 3.58	85.4 ± 1.86	NS	NS	NS	NS	–	**230.1 ± 7.85**	68.3 ± 1.40
–Mo	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	71.6 ± 1.77	NS	–	70.8 ± 1.40
–Fe	NS	NS	123.2 ± 1.94	114.9 ± 1.86	157.8 ± 3.29	**219.5 ± 5.46**	**337.5 ± 31.73**	**680.1 ± 9.31**	**214.5 ± 5.57**	116.8 ± 1.59	**419.1 ± 11.12**	126.6 ± 1.76

L'absorption du Mo n'est pas seulement augmentée par une limitation en S, mais également par des carences en B, Mn, Fe, Cu et Zn (Tab II. 6). Selon Maillard *et al.* (2016), ceci est la conséquence de différentes perturbations métaboliques : soit la perturbation directe du métabolisme du MoCo (le Cu et le Zn sont également nécessaires à sa biosynthèse), couplée à l'induction du gène codant le transporteur de molybdène MOT1 dans les carences en Cu et Zn, soit une perturbation du métabolisme du S, couplée à l'induction des gènes codant des transporteurs SULTR1.1 et SULTR1.2, dans les plantes carencées en S, B, Mn et Fe.

Les cations K^+ et Na^+ partagent plusieurs transporteurs, tels que HKT (high-affinity K^+ transporter), HAK (high-affinity K^+ transporters) et LCT (low-affinity cation transporter). HKT1, un transporteur à haute affinité pour le K^+, est en fait un symporteur Na^+: K^+ intervenant notamment dans la tolérance au stress salin et la limitation en K. A titre d'exemple, lors d'une carence en K, l'induction de ces transporteurs conduit à une absorption accrue de Na^+ qui permettrait de pallier, à court terme, au manque de K^+ en participant à sa place au processus d'osmorégulation (Riedelsberger *et al.,* 2021).

Ce même type d'interaction, conséquence de l'aspécificité de certains transporteurs racinaires, a été également rapporté pour certains cations divalents. En effet, IRT1 est un transporteur de Fe^{2+} capable de transporter d'autres cations divalents tels que le Mn^{2+}, le Cu^{2+} et le Zn^{2+} (Nishida *et al.,* 2011, Cao *et al.,* 2019). Ainsi, l'augmentation de l'expression d'IRT1 en réponse à une carence en Fe s'accompagne, par voie de conséquence, d'une augmentation l'absorption et d'une accumulation de ces cations divalents, pouvant entrainer une toxicité secondaire en certains de ces éléments, comme reporté pour le Zn par Shanmugam *et al.* (2013).

3.2. La sélectivité du cadre de Caspary pour le transfert des éléments vers les parties aériennes

Le cadre de Caspary est une structure plus ou moins imperméable composée de subérine et de lignine déposées par les cellules de l'endoderme racinaire (Naseer *et al.,* 2012), capable de bloquer le flux passif d'eau et des solutés dans l'apoplaste racinaire. Chez les plantes dicotylédones, la bande de Caspary est présente avec une couche de lignine dans les cellules de l'endoderme des racines (Naseer *et al.,* 2012) et divise l'apoplaste en deux parties, un apoplaste externe et un apoplaste interne. L'apoplaste externe est localisé entre les parois cellulaires du cortex et l'environnement, tandis que l'apoplaste interne contient la stèle centrale et le xylème (Olsen *et al.,* 2014). Chez les monocotylédones, une bande de Caspary supplémentaire est développée dans l'exoderme, entre le cortex et l'endoderme (Olsen *et al.,* 2014). Ainsi, les racines des monocotylédones sont divisées en trois apoplastes au lieu de deux, suggérant que le niveau de sélection des nutriments par les bandes casparienes est différent entre les monocotylédones et les

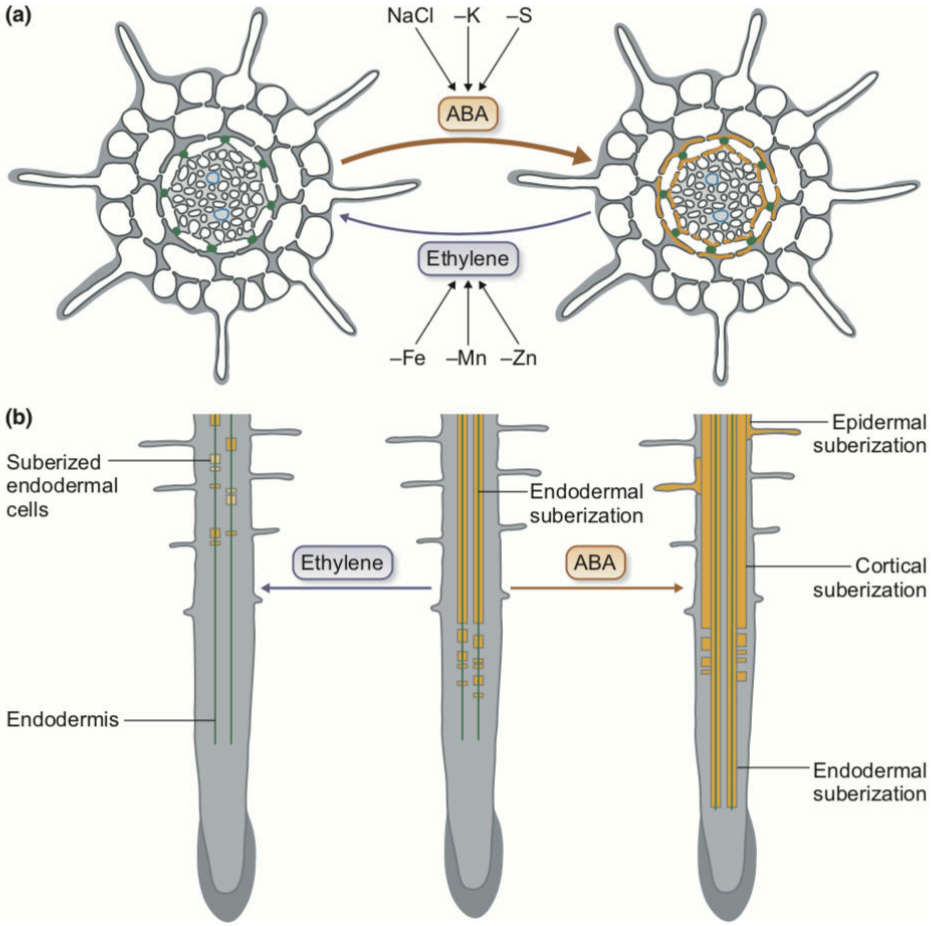


Figure II. 30 : Effets de l'acide abscissique (ABA) et de l'éthylène sur la subérisation du cadre de Caspary dans les racines d'*Arabidopsis*. (a) Effet des limitations en éléments minéraux (Fe, Mn, Zn, NaCl, et S) sur la subérisation du cadre de Caspary. (b) Présentation en vues longitudinales des effets de l'ABA et de l'éthylène sur la subérisation. (Barberon *et al.,* 2017)

dicotylédones. Par exemple, une modification de l'accumulation de subérine chez *Arabidopsis thaliana* et *Hordeum vulgare* entraîne des perturbations de l'absorption d'eau couplées à une diminution de l'accumulation de Ca, Mn et Zn dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Baxter, 2009) et une diminution de l'accumulation de Cl et Na dans les feuilles d'*Hordeum vulgare* (Knipfer *et al.,* 2021). Néanmoins, la structure de la barrière apoplastique dépend à la fois de l'espèce végétale et des nutriments présents dans l'environnement. En effet, des carences nutritionnelles peuvent influencer le niveau de subérisation de la bande de Caspary médié par deux hormones antagonistes, l'acide abscissique (ABA) et l'éthylène. L'ABA augmente la biosynthèse de la subérine, tandis que l'éthylène la diminue (Fig II. 30 ; Barberon *et al.,* 2016 ; 2017). Par exemple, les carences en Fe, Zn et Mn augmentent la production d'éthylène qui impacte négativement l'accumulation de subérine. A l'inverse, les carences en S et K augmentent la production d'ABA à l'origine d'une augmentation de la subérisation. Ainsi, cette subérisation accrue du cadre de Caspary perturbe la translocation des éléments, tels que le S, le K, le Ca, le Mn, le Fe et le Zn vers les feuilles par la voie apoplastique (Barberon *et al.,* 2016 ; Doblas *et al.,* 2017 ; Bao *et al.,* 2019).

3.3. Interactions entre éléments à l'échelle de nœuds métaboliques

Il existe une multitude d'étapes métaboliques qui nécessitent la présence conjointe de plusieurs éléments minéraux. Pour autant, la prise en compte de l'effet d'une perturbation de ces voies métaboliques sur la composition ionomique n'a été que peu abordée, sauf pour quelques cas particuliers, comme la synthèse du cofacteur à molybdène ou MoCo (Fig II. 31 ; Courbet *et al.,* 2019). Le Mo est absorbé sous forme de molybdate et est ensuite complexé par une ptérine pour former le MoCo. Le MoCo est considéré comme cofacteur indispensable pour tous les organismes et, chez les plantes, est essentielle au fonctionnement de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de l'N (nitrate réductase et nitrogénase), le catabolisme des purines (xanthine déshydrogénase) et la tolérance au dioxyde de soufre (sulfite oxydase) (Bittner, 2014). La synthèse du MoCo commence dans les mitochondries et en plus du Mo, nécessite la présence d'autres éléments minéraux tels que le Cu, le Fe, le S et le Zn (Courbet *et al.,* 2019). Selon Bittner (2014), des interactions entre le Mo et le Fe pendant la synthèse du Moco ont été observées chez le concombre (Vigani *et al.,* 2017). Chez cette plante, une carence en Fe entraine une augmentation des teneurs en cPMP (cyclic pyranopterin monophosphate) et en MoCo, ce qui suggère qu'une limitation en Fe affecte l'homéostasie du Mo dès la première étape de la biosynthèse du MoCo (Vigani *et al.,* 2017).

Autre exemple, une carence en Fe induit une augmentation significative de l'absorption de S, similaire à ce qui se passe lors d'une carence en S (Astolfi *et al.,* 2021). Ceci pourrait être lié au fait que le S et le Fe sont impliqués dans la synthèse des clusters Fe-S nécessaires au fonctionnement

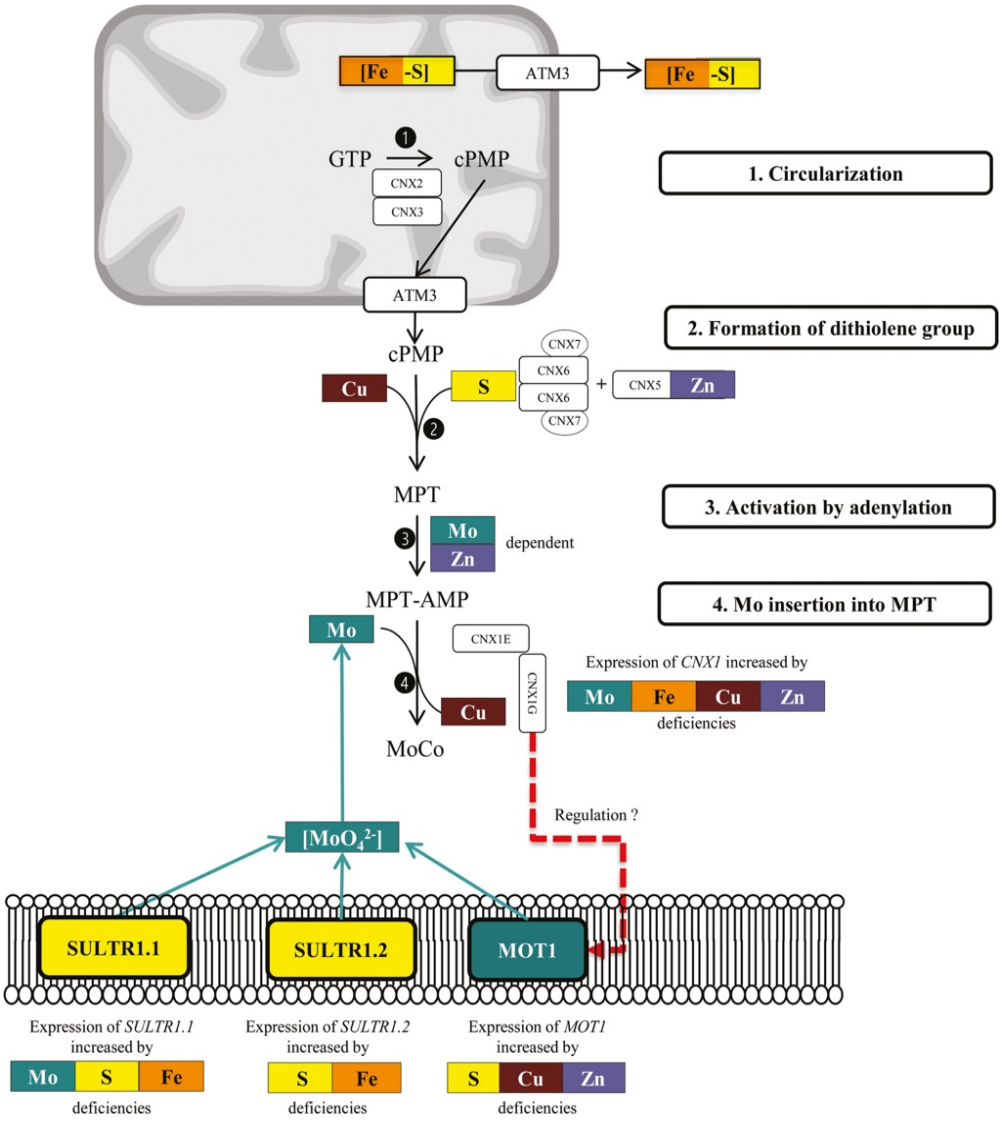


Figure II. 31 : Interactions entre S, Fe, Cu, Zn et Mo lors de la synthèse du cofacteur Mo (Moco). (1) Les protéines CNX2 et CNX3 permettent la conversion du GTP en cPMP, qui est exporté des mitochondries par le transporteur ATM3. (2) Dans le cytosol, la MPT synthase composée des sous-unités CNX6 et CNX7 transfère deux atomes de S au cPMP pour former la MPT. La MPT synthase est ensuite à nouveau sulfurée par la MPT synthase sulfurase (CNX5), qui contient un atome de Zn par monomère. A la fin de cette étape, un atome de Cu est lié à la MPT pour protéger le dithiolate réactif avant l'insertion de Mo. (3) La MPT est activée par adénylation pour former la MPT-AMP. Cette étape est Mo- et Zn-dépendante. (4) Dans la dernière étape, MPT-AMP est transféré au domaine CNX1-E, qui clive l'adénylate de MPT et catalyse ensuite l'insertion de Mo à la place de Cu pour former le Moco. ATM, transporteurs ABC de la mitochondrie ; cPMP, pyranoptérine monophosphate cyclique ; [Fe-S], cluster fer-soufre ; MOT, transporteur de molybdène ; MPT, molybdoptérine ; MPT-AMP, molybdoptérine adénylée ; SULTR, transporteur de sulfate (Courbet *et al.,* 2019).

de nombreuses protéines catalytiques, telles que la NADH déshydrogénase et la succinate déshydrogénase intervenant dans la chaine respiratoire mitochondriale (Courbet *et al.,* 2019).

3.4. La composition du ionome est-elle spécifique d'une carence ? Vers la notion de signature ionomique

L'analyse du ionome fonctionnel des plantes peut fournir des informations robustes sur les mécanismes physiologiques et moléculaires mis en place par les plantes pour faire face à des carences minérales (Baxter *et al.,* 2008 ; Maillard *et al.,* 2015 ; 2016 ; Courbet *et al.,* 2019) ou à d'autres stress abiotiques, comme la sécheresse (Etienne *et al.,* 2018) ou le stress salin (Wu *et al.,* 2013). Néanmoins, en dépit du développement récent des méthodes d'analyses du ionome, les connaissances sur les effets de ces stress sur la composition ionomique des végétaux restent encore parcellaires et peu nombreuses (Etienne *et al.*, 2018). Selon Baxter *et al.* (2008), diagnostiquer l'état physiologique de plantes soumises à des fluctuations environnementales spécifiques, est possible grâce à la détermination de signatures ionomiques. Ainsi, les variations du ionome fonctionnel lors de carences nutritionnelles individuelles, témoignent des interactions entre les éléments possédant des rôles biologiques ou des propriétés chimiques similaires (Baxter, 2015). Par exemple, chez *Brassica napus*, l'augmentation des concentrations foliaires en Cl, Fe, Cu, Mo et Se et la diminution d'N, Mg et K sont des changements du ionome fonctionnel résultant d'une limitation en S, qui sont susceptibles de définir la signature ionomique de cette carence (Fig II. 32 ; Courbet *et al.,* 2019).

Ainsi, une carence en macronutriments entraîne généralement de profondes modifications du contenu élémentaire des tissus végétaux, reflétant une modulation de l'absorption de plusieurs nutriments avec une modification correspondante sur la composition ionomique de la plante (Baxter et *al.*, 2008 ; 2009).

3.5. Composition ionomique et réponses transcriptomiques lors d'une carence nutritionnelle

Depuis quelques décennies, le séquençage du génome de nombreuses espèces et l'accès aux banques de données qui en résultent ont été favorisés l'émergence d'approches transcriptomiques, offrant l'opportunité d'avoir une vision plus intégrée des réponses des plantes à différentes carences nutritionnelles. Ainsi, des études réalisées chez de nombreuses espèces ont utilisé des approches transcriptomiques, afin de décrypter les changements métaboliques en réponse à une privation en un élément minéral unique. Ces travaux révèlent assez clairement, qu'une carence minérale donnée affecte non seulement l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme de l'élément carencé, mais aussi certains gènes codant des protéines impliquées dans d'autres

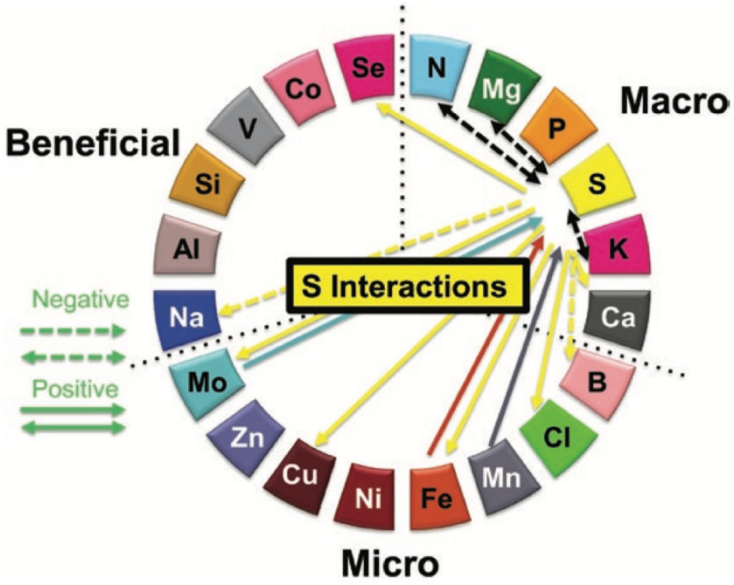


Figure II. 32 : Interactions entre le S et d'autres éléments du ionome fonctionnel mises en évidence lors de carences individuelles en éléments minéraux chez *Brassica napus*. Les interactions résultant d'une carence en S (indiquées par les flèches jaunes) entraînent une réduction (flèches en pointillé) ou une augmentation (flèches pleines) de l'absorption d'autres éléments. Les carences en Fe (en orange), Mo (en bleu) ou Mn (en gris) ont un effet positif sur l'absorption de S alors que les carences en N, Mg ou K (en noire) réduisent l'absorption du S (Courbet *et al.,* 2019).

métabolismes. A titre d'exemple, une carence en N de longue durée chez le blé dur, a révélé 3270 gènes différentiellement exprimés (DEG) dans les racines et principalement impliqués dans la biosynthèse de la spermine, le métabolisme de l'acide cinnamique, le transport transmembranaire des acides aminés et du fer (Curci *et al.,* 2017). Dans la feuille drapeau de blé, 470 DEG ont été régulés et interviennent dans la biosynthèse de la thiamine, la photorespiration, la chaîne de transport des électrons et la réponse au stimulus abiotique (Curci *et al.,* 2017).

L'application d'une carence en S chez *Arabidopsis thaliana*, a permis d'identifier 632 DEG dans les plantes privées en S, la plupart étaient associés à la voie d'assimilation du S, mais aussi, aux voies de biosynthèse des flavonoïdes, de l'auxine et du jasmonate (Nikiforova *et al.,* 2003). Toujours chez *Arabidopsis thaliana*, une privation de 28 h en Mg a induit une réponse transcriptomique différente entre les racines et les feuilles, avec seulement 20 gènes de réponse communs et un plus grand nombre de gènes modulés dans les racines (Hermans *et al.,* 2010). Chez *Citrus sinensis*, les mécanismes moléculaires affectés par une carence en Mg sont associés à la régulation du cycle cellulaire, la transduction du signal, la photosynthèse, le système antioxydant, mais également dans le contrôle de la phosphorylation (Yang *et al.,* 2019). De même, chez *Arabidopsis thaliana* carencé en P, plusieurs études ont montré que les niveaux de transcription des gènes codant les enzymes de dégradation des protéines sont surexprimés, tandis que les gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse des protéines sont réprimés (Wu *et al.,* 2003 ; Misson *et al.,* 2005 ; Huang *et al.,* 2008).

Les réponses transcriptionnelles des plantes induites lors de carences individuelles en K et Ca sont de loin les moins étudiées. Néanmoins, quelques études ont montré que la plupart des gènes affectés par la privation de K codent des enzymes principalement impliquées dans la biosynthèse des phytohormones, telles que l'auxine et le jasmonate, (Armengaud *et al.,* 2004 ; Ma *et al.,* 2012 ; Wang *et al.,* 2012). Enfin, un grand nombre de gènes (5588) est différentiellement régulé chez le riz privé en Ca pendant 14 jours. Ceux-ci interviennent dans les processus liés à la croissance et au développement, tels que le transport des ions, la transduction des signaux et la régulation de la transcription (Shankar *et al.,* 2014 ; Yang *et al.,* 2017).

Les effets des carences en microéléments et en éléments bénéfiques sur le transcriptome des plantes ont été moins étudiés que ceux induits par des carences en macroéléments. Néanmoins, certains changements dans le profil transcriptionnel des plantes ont déjà été déterminés, tels que l'induction des processus qui facilitent l'absorption et la translocation du Fe lors d'une carence en cet élément. En effet, dans des conditions de carence en Fe, de nombreuses familles de gènes de transporteurs sont régulées dans les feuilles et les racines. Par exemple, chez le blé, l'expression des gènes codant des transporteurs des familles OPT, NRAMP et ZIP est significativement augmentée

en réponse à la carence en Fe (Wang *et al.,* 2020), ce qui affecte l'absorption des autres éléments (cations divalents) tributaires de ces transporteurs. Autre exemple, le gène codant le facteur de transcription WRKY6 est induit au niveau de l'extrémité des racines des plantes carencées en B. Ainsi, il peut être suggéré que lors d'une carence en B, ce facteur de transcription puisse participer à la régulation de l'expression des gènes codant des protéines localisées à l'extrémité de la racine.

Selon Whitt *et al.* (2020), pour comprendre les mécanismes qui permettent l'adaptation des plantes à leur environnement, il est nécessaire d'identifier les gènes dont le rôle dans la composition ionomique peut être clairement établi. Ces auteurs ont ainsi pu proposer une liste de gènes candidats, appelés KIG (Known Ionomic Genes), dont l'implication peut être expérimentalement démontrée sur l'absorption, l'accumulation ou la distribution au sein de la plante d'un ou de plusieurs éléments minéraux. L'inscription d'un gène en tant que KIG sur cette liste requiert les critères suivants : (i) la fonction ou l'expression du gène peut être significativement modifiée chez un mutant (knockout ou surexpresseur), (ii) la teneur d'au moins un élément minéral est significativement altérée dans un des tissus, du (ou des) mutant(s) utilisé(s) et iii) ces études ont été publiées dans une revue à comité de lecture. Cette liste, essentiellement dérivée d'organismes modèles (*Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula*), est fortement enrichie en gènes codant des transporteurs ou des protéines impliquées dans l'accumulation d'éléments dans les parties aériennes, notamment dans l'accumulation de Fe et de Zn. Ainsi, Whitt *et al.* (2020) ont établi une première liste de 176 KIG identifiés chez 5 espèces (*Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Orysa sativa*, *Triticum aestivum* et *Zea mays*) et une seconde liste de 1588 orthologues, chez 10 espèces dont le niveau d'expression est associé à des modifications de l'absorption ou de l'accumulation de 23 éléments minéraux. Plus récemment, la revue bibliographique d'Ali *et al.* (2021) se focalise sur les progrès récents de la ionomique, qui couplée à d'autres approches « omiques », permettra selon eux, d'identifier des gènes ou des voies de régulation conditionnant la composition ionomique des végétaux et par voie de conséquence, leur résistance à différents stress biotiques et abiotiques. Selon ces mêmes auteurs, l'exploration de la variabilité génétique pour ces mécanismes devrait permettre à moyen terme de sélectionner des génotypes plus résistants aux contraintes.

La complexité des interactions entre éléments au sein des plantes, permet difficilement d'avoir une vision intégrée de l'ensemble des interactions nutritionnelles. En effet, les nutriments ne se comportent pas de façon indépendante, mais comme une combinaison de nutriments (Baxter, 2015). Cela s'explique par le fait, que de nombreux éléments possèdent des propriétés physico-chimiques similaires et sont connus pour interagir les uns avec les autres, ou alors, avoir des interactions comparables avec des molécules biologiques (Baxter, 2015). Pour comprendre ces

réseaux d'interactions multiples, il est donc nécessaire de considérer les éléments du ionome fonctionnel dans leur ensemble. Les études « omiques » ont fourni des données précieuses et relativement exhaustives à la communauté scientifique qui s'intéresse aux réponses des plantes aux carences en éléments minéraux. Néanmoins, en raison de la diversité des génotypes utilisés, des conditions de culture, des durées de traitement et de l'intensité des limitations appliquées, pour une espèce végétale donnée, il est particulièrement difficile, voire impossible, d'avoir une vision intégrée des réponses ionomiques et/ou transcriptomiques spécifiques de chaque carence minérale.

IV. Objectifs de la thèse

Les objectifs de ce travail de recherche doctorale ont été déterminés en fonction de l'analyse des connaissances issues de la bibliographie, mais aussi en fonction de son intégration dans le cadre du projet FUI EAUPTIC qui a permis le financement des différentes expérimentations et analyses requises, dans le cadre d'un consortium associant plusieurs partenaires. Plus précisément, les objectifs de ce travail de thèse a été (i) de caractériser le ionome fonctionnel du blé et du colza soumis à 18 carences nutritionnelles (6 macroéléments, 8 microéléments et 4 éléments bénéfiques) et récoltés avant tout effet significatif sur leur croissance afin de détecter les processus les plus précoces affectés par ces carences, et de mieux appréhender l'ensemble des interactions nutritionnelles sous-jacentes et (ii) d'étudier, chez le colza, les modifications transcriptomiques et métabolomiques en réponse à chacune des carences en macroéléments (conduites en même temps), afin d'identifier, *via* des approches comparatives, des groupes de gènes et/ou de métabolites communs à l'ensemble des carences, mais surtout des groupes de gènes/metabolites spécifiques de chaque carence qui, à terme, pourraient servir de base pour la mise au point d'outils de diagnostic de chaque carence nutritionnelle. Les résultats obtenus sont présentés dans le cadre de trois parties, correspondant chacune à un article publié :

✓ Le première partie de cette thèse présente les résultats obtenus chez le colza et le blé cultivés en hydroponie et soumis à 6 carences individuelles en macroéléments (-N, -Mg, -P, -S, -K, -Ca). Le premier objectif était de mettre en évidence les modifications ionomiques induites par ces carences, de les comparer entre elles et entre espèces. Le deuxième objectif visait à identifier toutes les interactions potentielles entre éléments, détectables avant toute réduction de la croissance, et d'en identifier dans la mesure du possible le ou les déterminismes. Pour ce faire, l'absorption nette de chaque nutriment, les contenus tissulaires en éléments et leur accumulation dans les racines ont été quantifiés et comparés aux plantes témoins. À notre connaissance, très peu d'études ont documenté les modifications du contenu du ionome en réponse à des carences individuelles en macroéléments chez des espèces contrastées et de grandes cultures. Aussi, ce travail a permis de mettre en évidence

la plasticité de la composition du ionome fonctionnel, lorsque les plantes sont exposées à des privations individuelles en macronutriments.

✓ La deuxième partie des résultats comprend également le colza et le blé comme espèces modèles. Le premier objectif fut de décrire les conséquences de 12 carences individuelles en microéléments et en éléments bénéfiques (-B, -Cl, -Mn, -Fe, -Ni, -Cu, -Zn, -Mo, -Na, -Si, -Co et -Se) sur la composition du ionome fonctionnel de chacune des deux espèces. A partir des données obtenues, le deuxième objectif a consisté à identifier les interactions élémentaires spécifiques ou similaires aux différentes espèces. Comme pour la première partie, et pour chaque élément du ionome fonctionnel, l'absorption nette, les contenus tissulaires et leur accumulation dans les racines ont été quantifiés et comparés aux plantes témoins. Enfin, le troisième objectif a été d'identifier les signatures ionomiques potentiellement spécifiques de chaque carence, en intégrant par ailleurs les données issues des expérimentations réalisées avec les carences en macroéléments (premier article), puis de les comparer entre les deux espèces végétales considérées.

✓ La dernière partie des résultats, basée uniquement sur *Brassica napus,* avait pour objectif de caractériser les réponses moléculaires pour chaque carence en macronutriments, en utilisant des analyses transcriptomiques et métabolomiques dans les racines, premier organe exposé à l'absence de disponibilité en macroéléments. Sur la base de ces données globales et en utilisant des analyses comparatives, le second objectif a consisté à établir des listes de gènes différentiellement exprimés et des profils métabolomiques spécifiques à chaque carence en macroéléments. Alors qu'il n'existe pas d'indicateurs moléculaires précis spécifiques de chaque carence en macroéléments chez *Brassica napus*, la possibilité d'utiliser ces groupes de gènes et/ou de métabolites spécifiques pour diagnostiquer précocement chaque carence nutritionnelle (*i.e.* avant toute altération de la croissance et/ou l'apparition de symptômes visuels), sera discutée.

Chapitre III

Résultats

Selon certaines études antérieures, la composition du ionome refléterait assez précisément l'état physiologique d'un organisme en réponse à des conditions environnementales données. Une expérimentation a donc été mise en place, afin de caractériser les modifications de la composition du ionome fonctionnel des différents organes de *Brassica napus* et de *Triticum aestivum* soumis à 6 carences individuelles en macroéléments, et ce, avant toute modification de la croissance des plantes. La comparaison du ionome de ces deux espèces, ainsi que la détermination de l'absorption nette des éléments minéraux, nous ont conduits à mettre en évidence de multiples interactions communes ou spécifiques aux deux espèces. Nous nous sommes ensuite focalisés sur de nouvelles interactions, afin d'identifier certains mécanismes potentiellement impliqués, *via* l'analyse de données issues de la Ionomic Hub ou bien encore à partir de l'analyse de mutants d'*Arabidopsis*.

Résultats majeurs : Après 10 jours de carence pour l'un des 6 macroéléments, la croissance des plantes était identique à celle des plantes témoins, probablement grâce à la remobilisation foliaire (N, P, K, S) ou racinaire (Mg et Ca) des éléments carencés. Ces carences ont révélé à l'échelle du ionome, de nombreuses interactions négatives et positives entre les éléments chez *Brassica napus* et *Triticum aestivum*. De manière générale, les carences en N ou en P ont un effet négatif sur l'absorption des autres nutriments, en raison de leur implication dans des mécanismes clefs, notamment la synthèse des protéines et de l'ATP. La carence en N a plus particulièrement induit une forte diminution de l'absorption du Na^+ chez ces deux espèces, suggérant que l'absorption et l'influx de NO_3^- et de Na^+ sont fonctionnellement liés. Cette hypothèse est soutenue par les analyses ionomiques de mutants KO *nrt1.1* et *nrt1.2* d'*Arabidopsis* issus de la Ionomic Hub. En effet, la diminution de la concentration de Na dans les feuilles de *nrt2.1* et au contraire, la concentration similaire ou augmentée de Na dans les feuilles chez *nrt1.1*, par rapport à la lignée parentale, suggèrent que le transporteur NRT2.1 est couplé à un antiporteur H^+/Na^+ et que l'augmentation de la concentration de Na dans les feuilles du mutant *nrt1.1* pourrait être la conséquence d'une augmentation compensatoire de l'expression de *NRT2.1*. Ainsi, le transporteur NRT1.1 modulerait seulement partiellement le transport de Na^+ dépendant du nitrate. D'autres interactions originales, mais positives, ont été mises en évidence, comme par exemple, la stimulation de l'absorption du V par les plantes cultivées en condition de carence en S. Celle-ci s'est produite conjointement à l'augmentation de l'absorption de Mo et du Se, interactions déjà décrites dans la littérature. Cette absorption accrue de Mo, Se et V est probablement le résultat d'une surexpression des transporteurs racinaires de sulfate, dont la faible spécificité autoriserait l'absorption de formes ioniques proches du sulfate. Cette hypothèse a été en partie confirmée par l'analyse ionomique de

mutants d'*Arabidopsis* dont les gènes codant les transporteurs racinaires de sulfate (*SULTR1.1* et *SULTR1.2*) ont été invalidés.

Ces résultats sont présentés dans un article, intitulé « Specificity and plasticity of the functional ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* subjected to macronutrient deprivation » et publié dans la revue Frontiers in Plant Science.

frontiers in Plant Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 02 February 2021
doi: 10.3389/fpls.2021.641648

Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* Subjected to Macronutrient Deprivation

Galatéa Courbet[1†], Aurélien D'Oria[1†], Aurélia Lornac[1], Sylvain Diquélou[1], Sylvain Pluchon[2], Mustapha Arkoun[2], Anna Koprivova[3], Stanislav Kopriva[3], Philippe Etienne[1] and Alain Ourry[1]**

[1] UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S, INRAE, Normandie Université, UNICAEN, Caen, France, [2] Laboratoire de Nutrition Végétale, Centre Mondial de l'Innovation Roullier Le groupe Roullier, Saint Malo, France, [3] Botanical Institute and Cluster of Excellence on Plant Sciences (CEPLAS), University of Cologne, Cologne, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:
Rafael Pérez-Vicente, University of Córdoba, Spain

Reviewed by:
Guangda Ding, Huazhong Agricultural University, China
Naoko Ohkama-Ohtsu, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan

***Correspondence:**
Alain Ourry
alain.ourry@unicaen.fr
Galatéa Courbet
galatea.courbet@unicaen.fr

† These authors have contributed equally to this work

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

Received: 14 December 2020
Accepted: 12 January 2021
Published: 02 February 2021

Citation:
Courbet G, D'Oria A, Lornac A, Diquélou S, Pluchon S, Arkoun M, Koprivova A, Kopriva S, Etienne P and Ourry A (2021) Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of Brassica napus and Triticum aestivum Subjected to Macronutrient Deprivation. Front. Plant Sci. 12:641648. doi: 10.3389/fpls.2021.641648

The composition of the functional ionome was studied in *Brassica napus* and *Triticum aestivum* with respect to the response of 20 elements under macronutrient deprivation. Analysis of relative root contents showed that some nutrients, such as Fe, Ni, Cu, Na, V, and Co, were largely sequestered in roots. After 10 days of deprivation of each one of these 6 macronutrients, plant growth was similar to control plants, and this was probably the result of remobilization from roots (Mg and Ca) or old leaves (N, P, K, S). Some tissue concentrations and net nutrient uptakes into roots were either decreased or increased, revealing multiple interactions (93 in wheat, 66 in oilseed rape) that were common to both species (48) or were species specific. While some interactions have been previously described (increased uptake of Na under K deficiency; or increased uptake of Mo and Se under S deficiency), a number of new interactions were found and some key mechanisms underlying their action have been proposed from analysis of *Arabidopsis* mutants. For example, nitrate uptake seemed to be functionally linked to Na(influx, while the uptake of vanadium was probably mediated by sulfate transporters whose expression was stimulated during S deprivation.

Keywords: ionome, nutrient deficiencies, nutrient interactions, oilseed rape, sodium, vanadium, wheat

HIGHLIGHTS

– The functional ionome is tissue and species specific and showed numerous crosstalks between nutrients in plants exposed to macronutrient deprivation. Some of the mechanisms behind this ionomic plasticity are discussed.

INTRODUCTION

Plants require "essential" mineral elements as defined by Arnon and Stout (1939) according three rules: (i) obligatory for life cycle completion; (ii) non replaceable by other elements;, and (iii) directly involved in plant metabolism. These nutrients are usually split into two categories:

macronutrients [nitrogen (N), magnesium (Mg), phosphate (P), sulfate (S), potassium (K), and calcium (Ca)] and micronutrients [boron (B), chlorine (Cl), manganese (Mn), iron (Fe), nickel (Ni), cupper (Cu), zinc (Zn), and molybdenum (Mo)], which are required in large (> 0.1% of dry weight) and low amounts (<0.1% of dry weight), respectively. Other nutrients that are non-essential, such as sodium (Na), silicon (Si), aluminum (Al), vanadate (V), cobalt (Co), and selenium (Se), can promote growth for some plant species and are also referred as "beneficial nutrients" (Marschner(eds), 2012). Plant growth and development depend on a balance between the essential mineral nutrients, which suggests the existence of numerous regulatory pathways for uptake, transport and storage in order to maintain plant requirements without excessive accumulation and the potential for toxicity (Williams and Salt, 2009; Andresen et al., 2018).

Plants, as sessile organism, have to cope with a constantly fluctuating mineral environment, and when facing macronutrient deficiencies, rely on different strategies to maintain growth and/or optimize root nutrient uptake. Indeed, Gojon et al. (2009) demonstrated that N, K, or S deficiencies in *Arabidopsis thaliana* are associated with an increase in the expression of a network of genes that modulate the quantity and activity of root transporters to improve the uptake of the missing macronutrient. However, in some instances it has been shown that a given mineral nutrient deficiency causes an induction of root-specific or non-specific transporters, and in the latter case they lead to an indirect uptake of other available nutrients. A few examples can be mentioned, such as members of the large chloride channel (CLC) family known to transport both chloride and nitrate (De Angeli et al., 2009). In the same way, crosstalk between Na^+ and K^+ uptake is also possible because non-selective cation uptake systems such as HKT1-type (high affinity potassium transporter), LCT1 (low-affinity cation transporter), or NSC (non-selective cation channels), are able to transport both Na^+ and K^+ and have also been identifiedin halophyte root cells (Schachtman and Liu, 1999). Sulfate (SO_4^{2-}), molybdate (MoO_4^{2-}), and selenate (SeO_4^{2-}) have also been considered as competitive anions for sulfate transporters (Shinmachi et al., 2010; Schiavon et al., 2012). In *Brassica napus (B. napus)*, the up-regulation of genes encoding root sulfate transporters (*Sultr1.1* and *Sultr1.2*) in S-deficient plants enhances the uptake of MoO_4^{2-} and SeO_4^{2-} and leads to an increase in the content of these nutrient in plant tissues (Maillard et al., 2016b). Recently, a broader description of the nutrient interactions occurring during S deficiency (Courbet et al., 2019) has highlighted other crosstalks such as between S and Fe in dinitrogen fixing species. Other examples, concerned S and Fe both required for Fe-S cluster synthesis or S, Fe, Cu, Mo, and Zn, which are required for Mo co-factor complex synthesis pathways. Other interactions between micronutrients have been reported, for example between Fe, Cu, Mn, and Zn (Grusak et al., 1999), for which root uptake can be mediated by an iron regulated transporter 1 (IRT1), and this will be the subject of a companion paper (D'Oria et al., 2020). Nevertheless, it is interesting to note that regulation of micronutrient uptake might also affect macronutrient availability. For example, Zn deprivation in barley led to an upregulation of the high-affinity P-transporter P (HVPT1 and HVPT2) allowing an increase in P uptake (Huang et al., 2000). Altogether, these studies suggest that in plants subjected to an imbalanced nutrient environment, interactions between nutrient uptake systems could be accompanied by nutritional interactions leading to large fluctuations in their internal elemental composition.

When plants are facing reduced availability of a given nutrient, remobilization of endogenous stores of the element is also an efficient way to sustain growth rates for several days or weeks, as previously described in *B. napus* plants cultivated under N (Girondé et al., 2015) or S (Abdallah et al., 2010; Girondé et al., 2014) deficiency. Usually, remobilization occurs during the vegetative stage from source organs (such as mature leaves) to support the active growth of emerging sink tissues such as young leaves (Malagoli et al., 2005; Abdallah et al., 2010). Macronutrients such as Mg, P, S, and K are remobilized from leaves in *B. napus* and *Triticum aestivum (T. aestivum)*, the latter being regarded as a highly efficient species for remobilization of most macro elements including, surprisingly, Ca (Maillard et al., 2015). Consequently, mineral remobilization, which is the process of redistributing mineral nutrients from one tissue to another, modifies the local concentration of elements. In the short term, most nutrients can be stored as organic (in proteins for example) or mineral forms in vacuoles (acting as buffer organelles between uptake and metabolic utilization) before being transported over long distances *via* conducting vessels (Peng and Gong, 2014). Except for Ca, macronutrients are considered to be highly mobile in either the xylem or phloem vessels (Etienne et al., 2018) and this enables remobilization and translocation to actively growing tissues to counterbalance transient reductions in root uptake. The processes involved in the remobilization of a given element are highly dependent on its form of storage (organic or inorganic) in plant tissues. As an example, proteins constitute the main form of N storage in many plant species, so remobilization of N requires numerous proteases that are associated with leaf senescence (Etienne et al., 2018; James et al., 2018). In contrast, S, which is mainly stored in the vacuole as SO_4^{2-}, requires an increase in the activity of tonoplastic SO_4^{2-} transporters for its remobilization.

Over the last decade, the spreading of new technologies (Baxter, 2009) such as inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) or mass inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS) have allowed the simultaneous and fast quantification of the content of nearly all mineral element in plant tissues [except (i) light elements such as N, C, H, O, and (ii) Cl]. Consequently, the concept of the ionome was developed and initially defined as "the mineral nutrient and trace element composition of an organism" but also as a "social network of mineral nutrients, controlled by a network of gene products critical for uptake, binding, transportation, and sequestration" (Baxter et al., 2008; Salt et al., 2008). It has subsequently been suggested that the ionomic composition of

Abbreviations: OLB, old leaf blades; OP, old petioles; YLB, young leaf blades; YP, young petioles.

plant tissues might serve as a tool to reveal plant physiological status (Baxter et al., 2008; Salt et al., 2008; Baxter, 2009; Pii et al., 2015).

To our knowledge, there are very few studies that have documented modifications of the ionome content in response to individual nutrient deficiencies in contrasting plant species. This study was conducted with hydroponically grown oilseed rape and wheat submitted to 18 unique nutrient deficiencies in order to assess ionomic modifications and map all potential mineral nutrient interactions that were detectable prior to any reductions in biomass. This work focused on macronutrient deprivation and highlights the most novel and significant ionomic modifications with reference to some possible underlying mechanisms that have been targeted with available *Arabidopsis* mutants. A companion paper (D'Oria et al., 2020) focuses on the interactions resulting from deprivation of micronutrients and beneficial nutrients, with identification of the specific ionomic signature for each mineral nutrient deprivation as a **Supplementary Objective**.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Growth Conditions of Oilseed Rape and Wheat

Oilseed rape (*B. napus* cv. Trezzor) and wheat (*T. aestivum* cv. Bagou) were grown in hydroponic conditions in a greenhouse (20°C day/15°C night) at the University Caen-Normandie (France) between February–March and April–May for oilseed rape and wheat, respectively. Seeds were germinated on perlite over demineralized water for 5 days in the dark and then placed under natural light for 2 days. After appearance of the first leaf corresponding to BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt, and CHemische Industrie) 11 stage, 10 seedlings were transferred to plastic tanks containing 10 L of nutrient solution with a composition based on the description of Maillard et al. (2015). In this study, the composition of the nutrient solution was adapted so as to obtain plant mineral compositions that were as close as possible to those of plants grown under field conditions (**Supplementary Data SD1**). To do so, the mineral compositions of *B. napus* leaves grown under hydroponic conditions (Maillard et al., 2015) were compared to the leaf mineral compositions of plants grown under field conditions (derived from the data of Sarda et al. (2013) and Maillard et al., 2016b, corresponding to 194 field plots randomly harvested in France). The nutrient solution contains: 1 mM KNO_3, 1.25 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.2 mM KH_2PO_4, 0.4 mM $MgSO_4$, 0.5 μM NaFe-EDTA, 50 μM NaFe-EDDHA, 10 μM H_3BO_3, 3 μM $MnSO_4$, 3 μM $ZnSO_4$, 0.7 μM $CuSO_4$, 0.008 μM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.1 μM $CoCl_2$, 0.15 μM $NiCl_2$, 0.9 mM $Si(OH)_4$, 0.5 mM $CaCl_2$, 0.1 mM KCl, 0.01 μM Na_2SeO_4, 0.1 mM K_2SO_4, and 0.2 mM Na_2SiO_3 buffered to pH 6.8 with 0.36 mM $CaCO_3$. Beneficial elements are usually required at very low levels, V and Al were not provided, assuming that the traces present in water were sufficient. This solution was continuously aerated and renewed to maintain optimal nutrition conditions whenever NO_3^- depletion reached thirty percent of the initial concentration according to daily NO_3^- measurements conducted with test strips (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Overall, when plant biomass and therefore growth were maximal, the nutrient solutions were changed every 2 days and every 5 days with younger plants. Natural light was supplemented with high-pressure sodium lamps (HPS 400 Watt, Hortilux Schréder, Monster, Netherlands) to obtain a mean photosynthetically active radiation (PAR) of 350 μmol photon s^{-1} m^{-2} at the top of the canopy during a 16 h (light)/8 h (dark) photoperiod.

Five replicates of two individual control plants were randomly harvested after 24 and 18 days of growth for oilseed rape and wheat, respectively. Fresh roots and leaves were separated, weighed and kept for further analysis. This harvest performed just before application of the macronutrient deprivation corresponded to day 0 (D_0) of the deprivation experiments. The remaining plants were then split into seven subsets. Aboveground tissues of each plant were labeled with a marker pen (on leaves and petioles for wheat and oilseed rape, respectively) in order to separate tissues that developed before (old leaf blades (OLBs) for both species and old petioles (OP) for oilseed rape) or during deficiencies (young leaf blades (YLBs) for both species and young petioles (YPs) for oilseed rape) in future harvests. Control plants (without nutrient deficiency) were cultivated with the complete nutrient solution described above. Each of the 6 other batches received a specific nutrient solution with a single element omitted: N, Mg, P, S, K, or Ca. The compositions of these nutrient solutions (containing the same amount of nutrients as the complete nutrient solution except for the omitted element) are provided in **Supplementary Data SD2**. Each deprived solution was buffered to pH 6.8 with a specific $CaCO_3$ concentration (**Supplementary Data SD2**) except for Ca-deprived solution where $CaCO_3$ was replaced with a 1 mM KOH solution. Control and deprived plants were harvested after 10 days (D_{10}). This duration of macronutrient deprivation was chosen in order to harvest the plants before any significant decline in growth and from preliminary experiments and according to Maillard et al. (2015) and Sorin et al. (2015). These studies, using oilseed rape grown under non-limiting nutrient conditions (i.e., relatively similar conditions to those used in this study), showed that plant growth was significantly reduced only after 14 days of S deprivation (Sorin et al., 2015), after 11 days of N deprivation and after 15 days of Mg, P, S, or K deprivations (Maillard et al., 2015). The maintenance of growth for more than 10 days of mineral nutrient deprivation was then explained by the ability of plant to mobilize internal mineral nutrient stores (that were plentiful as plants were previously grown under non-limiting supply) to sustain growth for such a relatively long period. Five replicates made up of two plants were randomly collected from the two available tanks and separated into old leaves (or old leaves and old petioles for oilseed rape), young leaves (or young leaves and young petioles for oilseed rape) and roots. The fresh weight of each tissue was determined and then separated in two homogenous aliquots. Then the samples were oven dried for 72 h at 70°C for dry weight determination and used for further elemental concentration quantification.

Growth of *Arabidopsis* Lines

Arabidopsis Columbia wild type (Col) and *sultr1.1* (SALK_093256) and *sultr1.2* (sel1-8; Shibagaki et al., 2002) mutants previously grown under high or low S conditions by Maillard et al. (2016b) were used for determination of their leaf V concentration. Briefly, Arabidopsis (Col or mutant lines) was grown for 17 days on agarose plates with a modified Long Ashton nutrient solution containing a high (0.75 mM) or low (0.075 mM) supply of sulfate. Plants were cultivated in a controlled environment room under a long day (16 h light/8 h dark cycle) at a constant temperature of 22°C, 60% relative humidity and a light intensity of 120 μE. s^{-1}. m^{-2}. Leaves were harvested, weighed, dried and ground for determination of their elemental composition.

Element Analysis by Mass Spectrometry and Calculations

Before element analysis, all dried samples were ground to a fine powder with 0.4 mm diameter inox beads using an oscillating grinder (Mixer Mill MM400, Retsch, Haan, Germany). For total N, 1.5 mg of fine powder were placed in tin capsules before analysis with an isotope-ratio mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester, United Kindgdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). Analysis of Cl, Si and Al was performed using a X-Ray-Fluorescence Spectrometer (XEPOS, Ametek, Berwyn, United States) from about 1 g of dry weight (DW). Cl, Si, and Al concentrations of plant samples were determined by reference to calibration curves established from international standards with known concentrations of Cl, Si, and Al.

All the remaining elements (Mg, P, S, K, Ca, B, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo, Na, Co, V, Se) were analyzed by high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS, Element 2^{TM}, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) as described by Maillard et al. (2016a). Briefly, 40 mg of dry powder were subjected to microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) with 1 mL of concentrated HNO_3, 250 μL of H_2O_2, 900 μL of ultrapure water and 10 μL of internal standard solutions of gallium and rhodium (10 and 2 μg L^{-1}, respectively). Thereafter, digested samples were diluted to 50 mL with ultrapure water to obtain a 2.0% (v/v) solution of nitric acid. Finally, this solution was filtered with a 0.45 μm Teflon filter. Quantification of each element was performed from calibration curves after being corrected from the recovery rate by subtracting the blank and using internal standards (Ga and Rh). In addition, the quality of mineralization and quantification was evaluated using certified reference plant material (*Citrus* leaves, CRM NCS ZC73018, Skylab, Metz, France).

The quantity of each element (Q) in a tissue (i)r at each harvest time (t) was calculated as follows:

$$Q\ E_{it}\ DW_{it} \quad (1)$$

Where E is the elemental concentration (ppm) and DW the dry weight (g).

Net uptake (NU) was calculated as the difference in the whole plant quantity (*i.e.*, sum of all tissue quantities) between D_0 and D_{10} as follows:

$$\mathrm{NU}\ \sum_{i\ 1}^{n} Q_{iD10\ or\ D22} - \sum_{i\ 1}^{n} Q_{iD0} \quad (2)$$

With n = 5 or n = 3 tissues for oilseed rape and wheat, respectively.

In this study and for each mineral nutrient, some results were expressed relative to control plant values as the following ratios for element concentration ($E_{deprived}/E_{control}$) or net uptake ($NU_{deprived}/NU_{control}$), while relative root nutrient content was calculated as the ratio of the root content/total plant content.

Statistical Analysis

Data were analyzed based on an experimental design that contained five independent replicates, each consisting of a pool of two individual plants, except at D_0 where four plants were needed to ensure enough material was available for analysis. The quantity (Q) (μg or mg) and elemental concentration (ppm) are given as the mean ± standard error (S.E) for n = 5. The NU corresponding to the difference in the whole plant quantity of each element between D_0 and D_{10} was calculated by considering all random combinations between two sets of 5 replicates and thus is given as the mean ± S.E. for n = 25.

Statistical analyses were performed using R software (version 3.5.1) (R Core Team, 2019) and RStudio (version 1.1.456) (RStudio Team, 2020). Significant difference in the means between control and deprived plants were determined using Student's *T*-test and differences among all treatments were established using one-way ANOVA and Tukey *post-hoc* tests.

Heatmap representations were generated using the heatmap.2 package and represent a color gradient for values relative to control content between 0.2 (red) and 5 (green). Blank cells in heatmaps correspond to non-significant variations in content or net uptake compared to control plants.

RESULTS

Biomass Production During 10 Days of Macronutrient Deprivation

Compared to control plants, very few macronutrient deprivations significantly affected the biomass of the plants (**Figure 1**). It was only the root biomass in oilseed rape (**Figure 1B**) that increased significantly under the -P treatment (1.44 ± 0.08 g.$plant^{-1}$ and 1.10 ± 0.04 for -P and control plants, respectively). In wheat, very little variation was observed in the whole biomass of the control plants (3.38 ± 0.09 g.$plant^{-1}$, i.e., CV = 5.8%) (**Figure 1C**), the -S and -K treatments significantly increased the aboveground by about 20% while only S deprivation increased significantly root biomass (**Figures 1A,B**). For most treatments, the increase in the individual tissue biomass did not lead to a significant increase in the biomass of the whole plant, except in wheat where the -S, -K, and -Mg treatments increased the total biomass relative to control (4.21 ± 0.15, 4.07 ± 0.16, 3.96 ± 0.21, and 3.38 ± 0.09 g.$plant^{-1}$ for

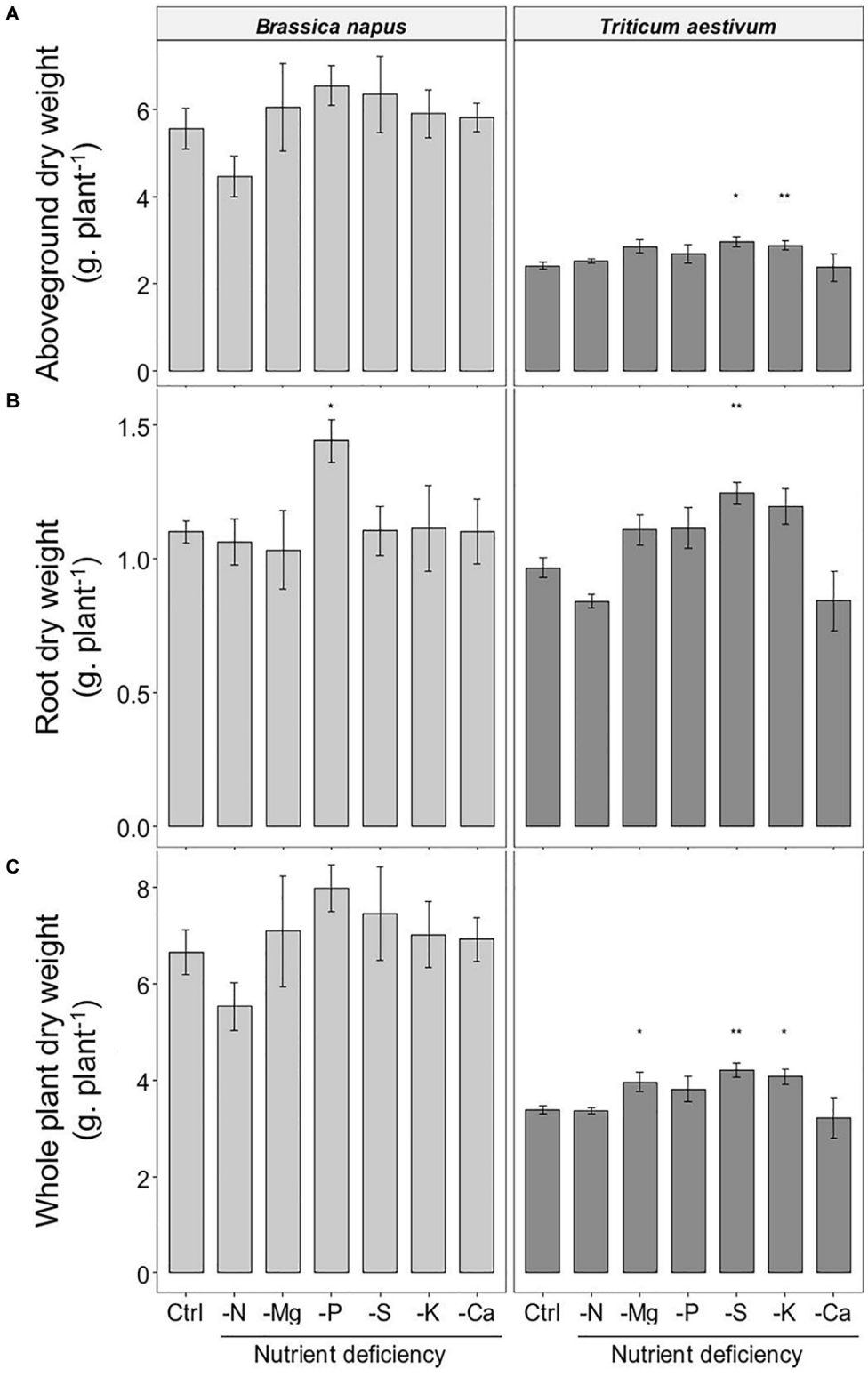


FIGURE 1 | Accumulated dry weight **(A)** aboveground; **(B)** roots; **(C)** whole plant) of *B. napus* and *T. aestivum* plants, 10 days after macronutrient deprivation under hydroponic conditions. Data are given as the mean ± S.E. ($n = 5$) and significant differences between control and macronutrient-deprived plants are indicated as follows: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$.

−S, −K, −Mg, and control plants, respectively). Overall, the results of biomass production in both species showed that 10 day macronutrient deprivation had a moderate effect or no effect on growth.

Species-Specific Ionome

The ionomic compositions corresponding to the elemental content of control plants in each tissue harvested at D_{10} for oilseed rape and wheat are presented in **Table 1**. For all tissues, the mineral nutrient content in oilseed rape was higher than in wheat, except for Si, which was found at much higher concentrations in wheat shoots.

In OLBs and YLBs, the K, Mn, Fe, Ni, Cu, V, and Co concentrations were mostly within the same order of magnitude for both species while the N, Mg, P, S, Ca, B, Mo, Na, Al, and Se concentrations were significantly higher in oilseed rape. In contrast, the leaf blades of oilseed rape contained much less Si, Zn, and Cl (except for the latter in YLBs) than in wheat and showed lower concentrations for some metal elements (Mn, Fe, Zn) in OLBs. In roots, except for N and Cu, all element concentrations were higher in oilseed rape. A clear age effect associated with leaf blades emerged for both species, as lower concentrations of all elements were found in YLBs compared to OLBs, except for N, P, and Zn. In roots, Fe, Ni, Cu, Na, V, Co, and Se were in much higher concentrations than in the aboveground tissues, irrespective of the species.

Relative Root Nutrient Amounts Under Macronutrient Deprivation

Relative root nutrient amounts, resulting from both root nutrient uptake and shoot nutrient translocation, were calculated as the ratio of the root nutrient amount to the whole plant nutrient amount (**Figures 2B,C**). For an optimal interpretation, this relative root nutrient amount needs to be compared to the root biomass/whole plant biomass ratio (**Figure 2**). In both species, the biomass ratios of nutrient-deprived plants were similar to control plants (around 0.17 ± 0.018 and 0.28 ± 0.018 in oilseed rape and wheat, respectively), except for N deprivation, which in wheat resulted in a significantly lower biomass ratio of 0.25 ± 0.009 ($p < 0.05$) (**Figure 2A**).

In control plants of both species, the comparison of these biomass ratios with relative root nutrient content allowed classification of the nutrients into different categories. The first category corresponded to nutrients accumulated or sequestered in roots such as Fe, Ni, Cu, Na, V, and Co in both species as well as Si in oilseed rape and Mg in wheat. It must also be pointed out that some nutrients belonging to this category were highly sequestered in roots such as Co (91 and 98% in roots for oilseed rape and wheat, respectively) and Na in wheat (93% vs. only 51% in oilseed rape). The second category are nutrients for which the relative root amount reflected their relative contribution to total biomass, such as N, P, S, K, Mn, Al, and Se in both species as well as Mg in oilseed rape. The last category included nutrients with

TABLE 1 | Mineral nutrient concentrations in parts per million (ppm), of *B. napus* and *T. aestivum* control plants at time D_{10} grown under hydroponic conditions.

		Brassica napus					*Triticum aestivum*		
		YLBs	**OLBs**	**YPs**	**OPs**	**Roots**	**YLBs**	**OLBs**	**Roots**
Macronutrients	**N**	61,030 a	43,116 b	31,843 d	29,222 d	29,598 d	42,445 b	38,569 b	31,461 d
	Mg	2,723 d	6,422 a	3,350 c	4,669 b	3,693 c	1,683 e	3,340 c	4,255 b
	P	9,382 a	5,465 c	7,647 b	5,656 c	7,454 b	5,492 c	3,440 d	4,167 d
	S	9,972 b	21,142 a	7,486 c	6,890 c	10,178 b	4,481 d	6,360 c	2,748 e
	K	47,222 b	55,803 b	91,073 a	101,813 a	52,682 b	50,639 b	50,798 b	30,241 c
	Ca	11,692 d	50,763 a	17,257 c	38,986 b	8,254 e	3,871 f	12,003 d	6,574 e
Micronutrients	**B**	43 b	84 a	34 c	37 c	24 d	7 e	8 e	7 e
	Cl	4,655 f	16,764 c	19,760 b	31,554 a	12,910 d	14,870 cd	13,834 d	10,467 e
	Mn	81 de	210 b	51 e	88 de	139 c	84 de	265 a	101 d
	Fe	162 d	163 d	77 d	63 d	905 a	167 d	396 c	578 b
	Ni	0.4 c	0.7 c	0.4 c	0.2 c	5.1 a	0.3 c	0.9 c	3.8 b
	Cu	8 cd	8 cd	4 de	3 e	26 b	11 c	12 c	47 a
	Zn	70 b	41 c	50 c	40 c	93 a	88 a	87 a	73 b
	Mo	3.0 d	6.6 a	2.0 e	3.7 c	3.2 d	2.0 e	5.9 b	1.2 f
Beneficial nutrients	**Na**	717 de	1,336 de	2,003 d	3,509 c	10,356 a	187 e	219 e	6,175 b
	Al	399 b	681 a	730 a	798 a	705 a	431 b	432 b	360 b
	Si	729 c	1,018 c	654 c	737 c	2,391 c	5,597 b	39,124 a	2,275 c
	V	0.05 c	0.06 c	0.04 c	0.05 c	0.24 a	0.03 c	0.16 b	0.20 ab
	Co	0.15 c	0.10 c	0.10 c	0.09 c	6.91 a	0.03 c	0.11 c	3.91 b
	Se	0.63 c	1.44 a	0.80 b	0.84 b	0.77 b	0.37 d	0.28 d	0.34 d

Tissues developed before or after D_0 are indicated as "young" or "old" as follows: young leaf blades (YLBs), old leaf blades (OLBs), young petioles (YPs) and old petioles (OPs). Data are given as the mean ± SE (n = 5), with each replicate (n = 5) corresponding to a pool of two individual plants, and are expressed in ppm. For each mineral nutrient, means sharing the same letter were not significantly different (Tukey post-hoc test at α = 0.05).

A

	Brassica napus							*Triticum aestivum*						
	control	-N	-Mg	-P	-S	-K	-Ca	control	-N	-Mg	-P	-S	-K	-Ca
Root Biomass/whole plant biomass	0.17 ± 0.03	0.2 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.003	0.29 ± 0.04	0.3 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.01

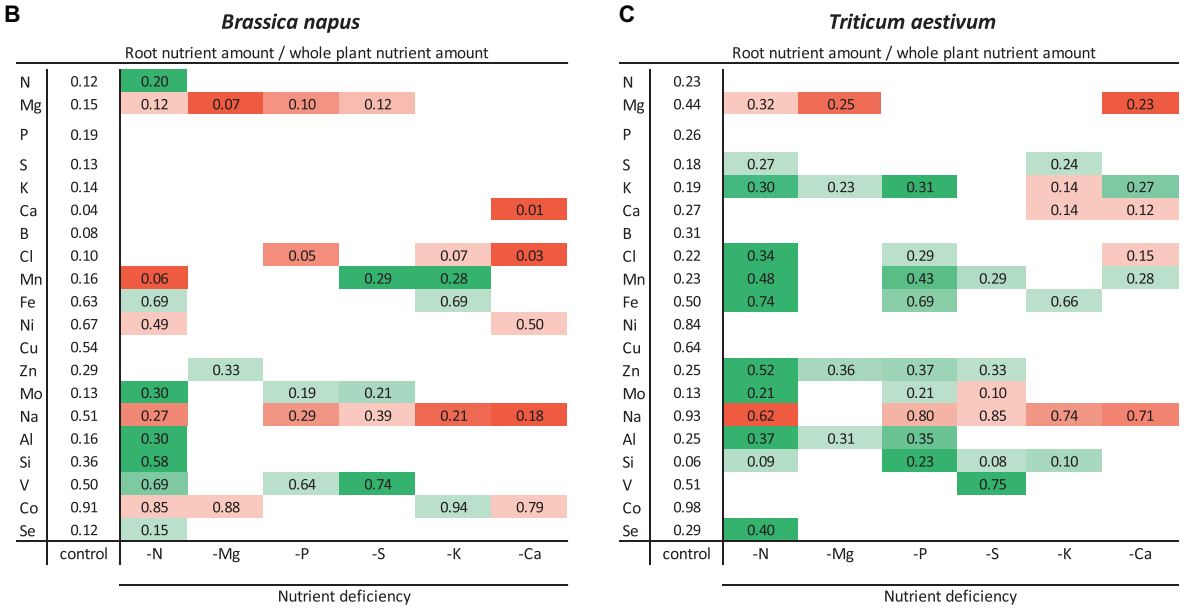


FIGURE 2 | Ratio of roots to whole plant biomass **(A)** and relative root nutrient contents of *B. napus* **(B)** and *T. aestivum* **(C)** plants after 10 days of macronutrient deprivation calculated as the ratio of nutrient content in roots/entire plant. Increases (green) or decreases (red) in relative root contents are only given if they were different from control plants for $p < 0.01$. The root biomass/total plant biomass ratios are also given as the mean ± S.E. ($n = 5$) for comparisons with relative root nutrient contents.

a low root accumulation (Ca, B, and Cl in oilseed rape and Mo and Si in wheat).

For a given macronutrient deprivation (**Figure 2**), relative root amounts of 20 mineral nutrients (including the deprived nutrient) were monitored in both species (**Figures 2A,B**). Overall, the 6 macronutrient deprivations led to (i) a significant decrease ($p < 0.01$) in 19 relative root nutrient amounts in oilseed rape and 14 in wheat and (ii) a significant increase in the relative root nutrient amount of 16 and 30 nutrients in oilseed rape and wheat, respectively. For example, in both species, in Ca- and Mg-deprived plants, the strong decrease in the relative root amounts of Ca and Mg suggests that these two nutrients were remobilized from the roots to the shoots (**Figures 2A,B**). Similarly, in both species the relative root amount of Na was also significantly decreased in response to all macronutrient deprivations (except under -Mg). In contrast, in both species, the increase in relative V amount in S-deprived plants indicated that the lack of S availability led to an accumulation of V in the roots of both species. It can be noted that while some nutrients moved in the same direction in both plants (e.g., Na) in response to a given nutrient deprivation, other nutrients moved in opposite directions in the roots of the two species. For example, N deprivation resulted in a decrease in the relative amount of Mn in the roots of rapeseed and an increase in wheat roots.

Plant Mineral Nutrient Net Uptake and Relative Tissue Contents Under Deprivation

The net uptake of each nutrient was calculated as the net difference in the concentration of each nutrient between Day 0 (beginning of nutrient deprivation) and Day 10 of macronutrient deprivation. The net uptake of macronutrients (N, Mg, P, S, K, and Ca), micronutrients (B, Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo) and beneficial elements (Na, Si, Al, V, Co, and Se) in control plants and their relative net uptake in deprived plants (−N, −Mg, −P, −S, −K, and −Ca) are presented in **Figure 3**. As expected, the net uptake of the deprived nutrients significantly decreased in most of the corresponding nutrient deprivation conditions, reaching less than about 10% of the net uptake in control plants. Indeed, significant reductions in the relative contents of these deprived nutrients were observed in all tissues, regardless of

the plant species (**Figures 4**, **5**), except for N in oilseed rape roots (**Figure 4**).

Under each of the macronutrient deficiencies, two thirds of the 66 significant variations in the net uptake of the other nutrients (excluding the deprived nutrient of each deficiency) observed in oilseed rape showed similar trends to the 93 variations detected in wheat (**Figure 3**). Among them, N deficiency led to a significant decrease in most of the net nutrient uptakes for both species except for Si (1.84 ± 0.05 and 1.28 ± 0.03-fold increases in oilseed rape and wheat, respectively). Similarly, the relative net uptake of Si significantly increased under -P and -S in oilseed rape (**Figure 3A**) and under Mg, -P, -S, and -K in wheat plants (**Figure 3B**). This increase in net Si uptake was associated with a significant increase in Si concentration in the roots of both species (**Figures 4**, **5**) and in the YLBs of wheat (**Figure 5**).

In oilseed rape (**Figure 3A**), Na and Mn were the most affected elements under N deprivation, with surprisingly an almost total cessation of their net uptake (0.04 ± 0.06 and −0.01 ± 0.02 for Mn and Na relative uptake, respectively) while Na was also strongly affected in wheat (**Figure 3B**, 0.04 ± 0.02). These interactions between N, Na, and Mn will be discussed later on. In Mg-deprived plants, the relative net uptakes of N, Mn, Fe, Zn, and Co in both species and of most other nutrients (P, S, K, Ca, Cu, Mo, Na, Si, V, and Se) in wheat (**Figure 3B**) were significantly increased. However, although the relative contents of these nutrients were higher in most Mg-deprived oilseed rape tissues (**Figure 4**), in wheat they only increased in the roots under –Mg conditions (**Figure 5**). It is noteworthy that none of the relative net nutrient uptakes decreased significantly in response to Mg deprivation (apart from Mg) (**Figures 3A,B**).

Under P deficiency, the relative net uptakes of Cl, Al, Se, and especially Na were strongly reduced in both species, whereas a larger range of nutrients had reduced net uptakes (S, Ca and most micronutrients) in wheat (**Figure 3B**). Si was the only nutrient with a higher net uptake in both species, while the N and V relative net uptakes were also increased in oilseed rape and wheat, respectively. The relative net uptakes of Co in the two species showed opposite trends, increasing in oilseed rape but decreasing in wheat.

In S-deprived plants, positive interactions were associated with N, K, Cl, Mo, Al, Si, V, and Se in both species (**Figure 3**) and B, Mn, Ni, Cu, Co in oilseed rape (**Figure 3A**). These increased uptakes in oilseed rape resulted in a significant increase in Cl concentrations in leaf blades (young and old) and roots of oilseed rape (**Figure 4**). However, see section "Materials and Methods" these increases in Cl uptake (and concentrations) could be partially explained by the slightly higher Cl concentration in the S- and N-deprived nutrient solutions than in the control (2.7 mM and 4.6 mM vs. 2 mM, **Supplementary Data SD1**). Increases in V, Mo and Se net uptakes in S-deprived plants in both species (by a factor of 5.23 ± 0.32, 2.03 ± 0.17, and 1.34 ± 0.11, respectively, in oilseed rape and by 2.43 ± 0.11, 1.89 ± 0.06, 1.89 ± 0.06, and 2.52 ± 0.08, respectively, in wheat) (**Figures 3A,B**) were associated with an increase in Mo in all oilseed rape tissues (**Figure 4**) and wheat leaves (**Figure 5**) and an increase in V concentrations in the roots of both species (**Figures 4**, **5**). The analysis of leaf V concentration

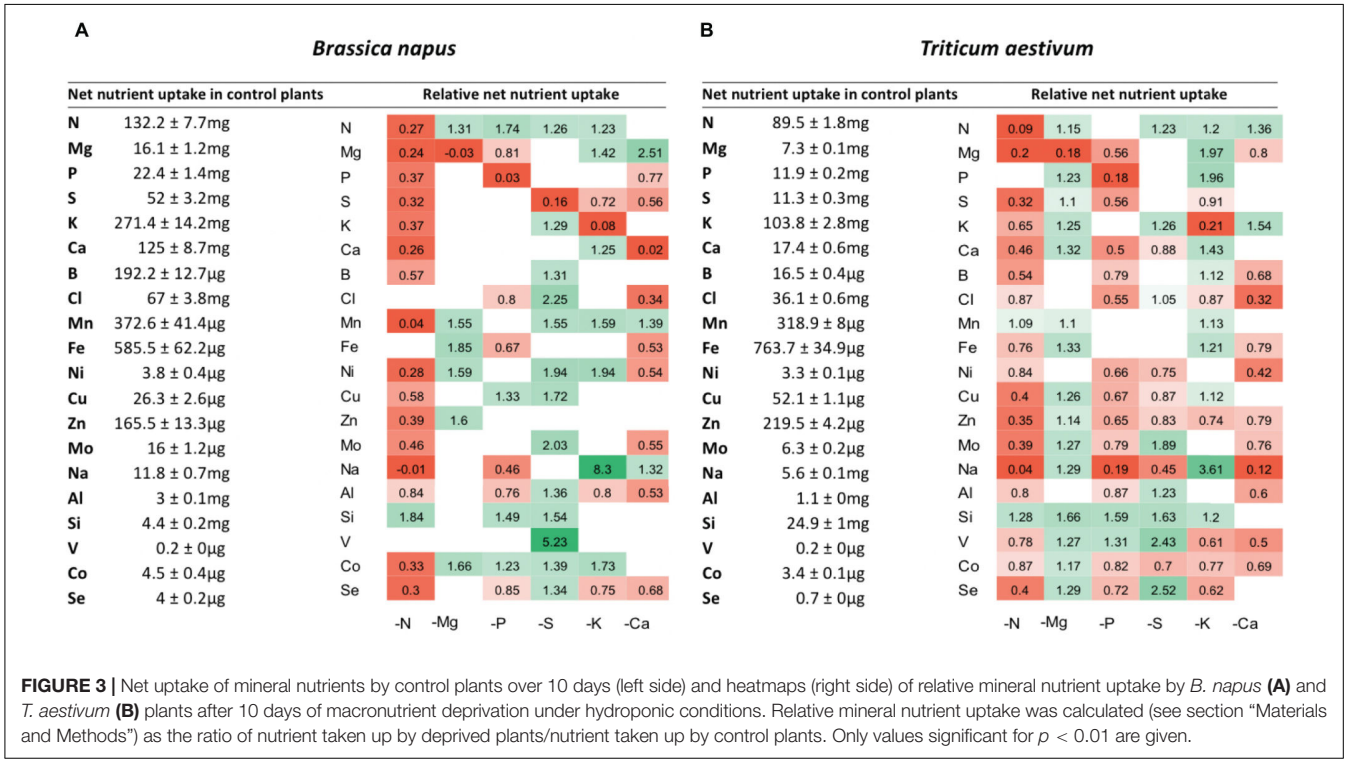


FIGURE 3 | Net uptake of mineral nutrients by control plants over 10 days (left side) and heatmaps (right side) of relative mineral nutrient uptake by *B. napus* **(A)** and *T. aestivum* **(B)** plants after 10 days of macronutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative mineral nutrient uptake was calculated (see section "Materials and Methods") as the ratio of nutrient taken up by deprived plants/nutrient taken up by control plants. Only values significant for $p < 0.01$ are given.

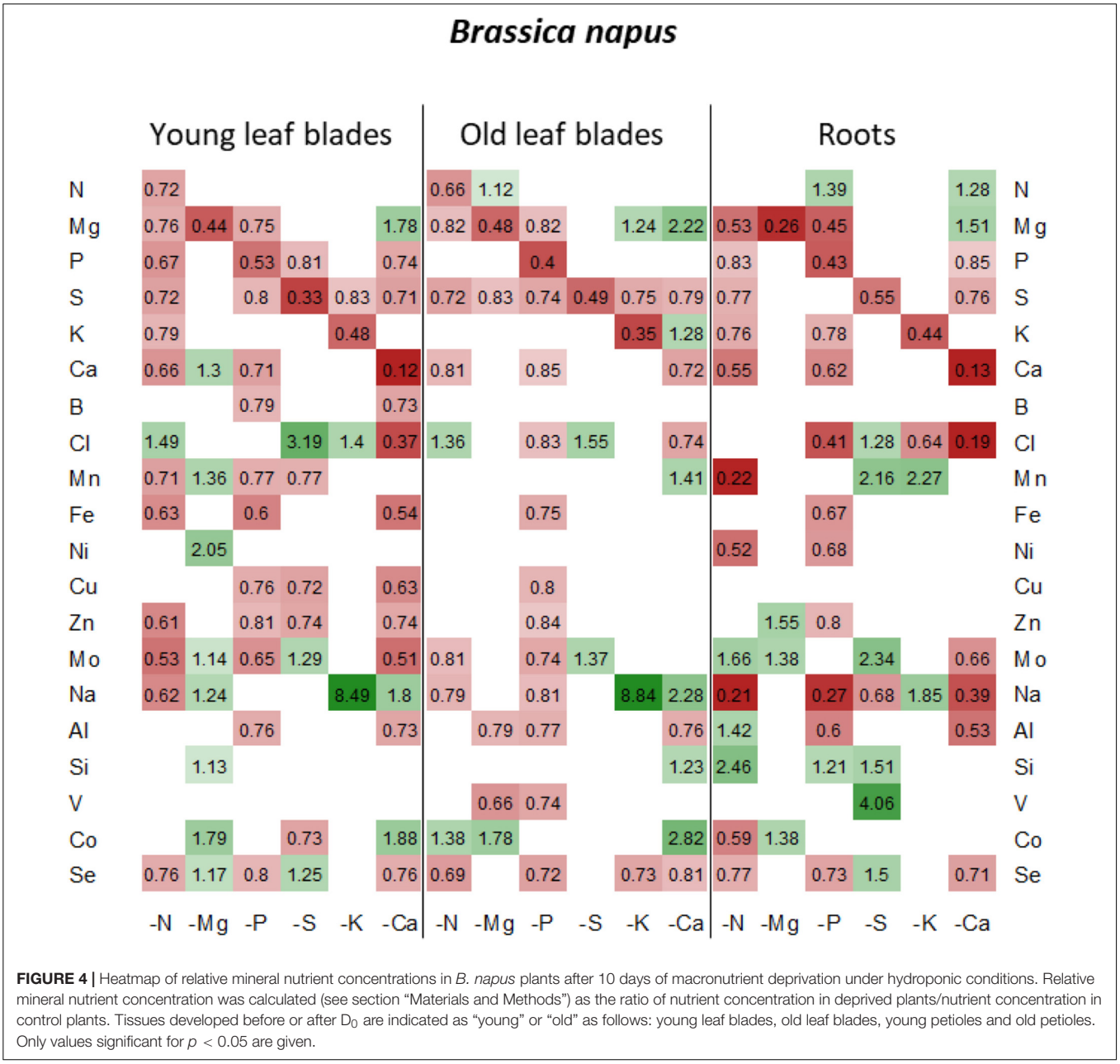


FIGURE 4 | Heatmap of relative mineral nutrient concentrations in *B. napus* plants after 10 days of macronutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative mineral nutrient concentration was calculated (see section "Materials and Methods") as the ratio of nutrient concentration in deprived plants/nutrient concentration in control plants. Tissues developed before or after D_0 are indicated as "young" or "old" as follows: young leaf blades, old leaf blades, young petioles and old petioles. Only values significant for $p < 0.05$ are given.

in *Arabidopsis sultr1.1 KO* mutants *and sultr1.2 sel1-8* mutants showed that their capacity for root V uptake was increased under S deficiency, but not as much as in the wild type (**Figure 6**). This suggests that both SO_4^{2-} transporters were able to mediate the uptake of VO_4^{2-} as they do for other compounds with similar structural properties like MoO_4^{2-}, SeO_4^{2-}, and of course SO_4^{2-}. Similar to P deprivation, relative net Co uptake showed opposite trends in the two species, increasing in oilseed rape but decreasing in wheat.

In K-deprived oilseed rape and wheat plants (**Figures 4**, **5**), the relative net uptake of N, Mg, Ca and Mn was increased. In the same way, net Na uptake was strongly increased (by a factor of 8.3 ± 0.03 and 3.61 ± 0.01 for oilseed rape and wheat, respectively) and led to a higher Na concentration in the leaf blades of both species (**Figures 4**, **5**). Other positive interactions that were more specific to the plant species included Ni and Co in oilseed rape and P, B, Fe, Cu, and Si in wheat. The relative net uptakes of S and Se decreased in both species while the relative net uptakes of Al in oilseed rape (**Figure 3A**) and Cl, Zn, V, and Co in wheat (**Figure 3B**) decreased under K deprivation.

Finally, in the Ca-deprived plants of both oilseed rape and wheat, a negative effect on the relative net uptake of a large range of nutrients was observed, including Cl, Fe, Ni, Mo, Al in both species, P, S, Se in oilseed rape (**Figure 3A**), and Mg, B, Zn Na, V, and Co in wheat (**Figure 3B**). For example, the decrease in Cl uptake led to a very low Cl concentration in the YLBs and roots

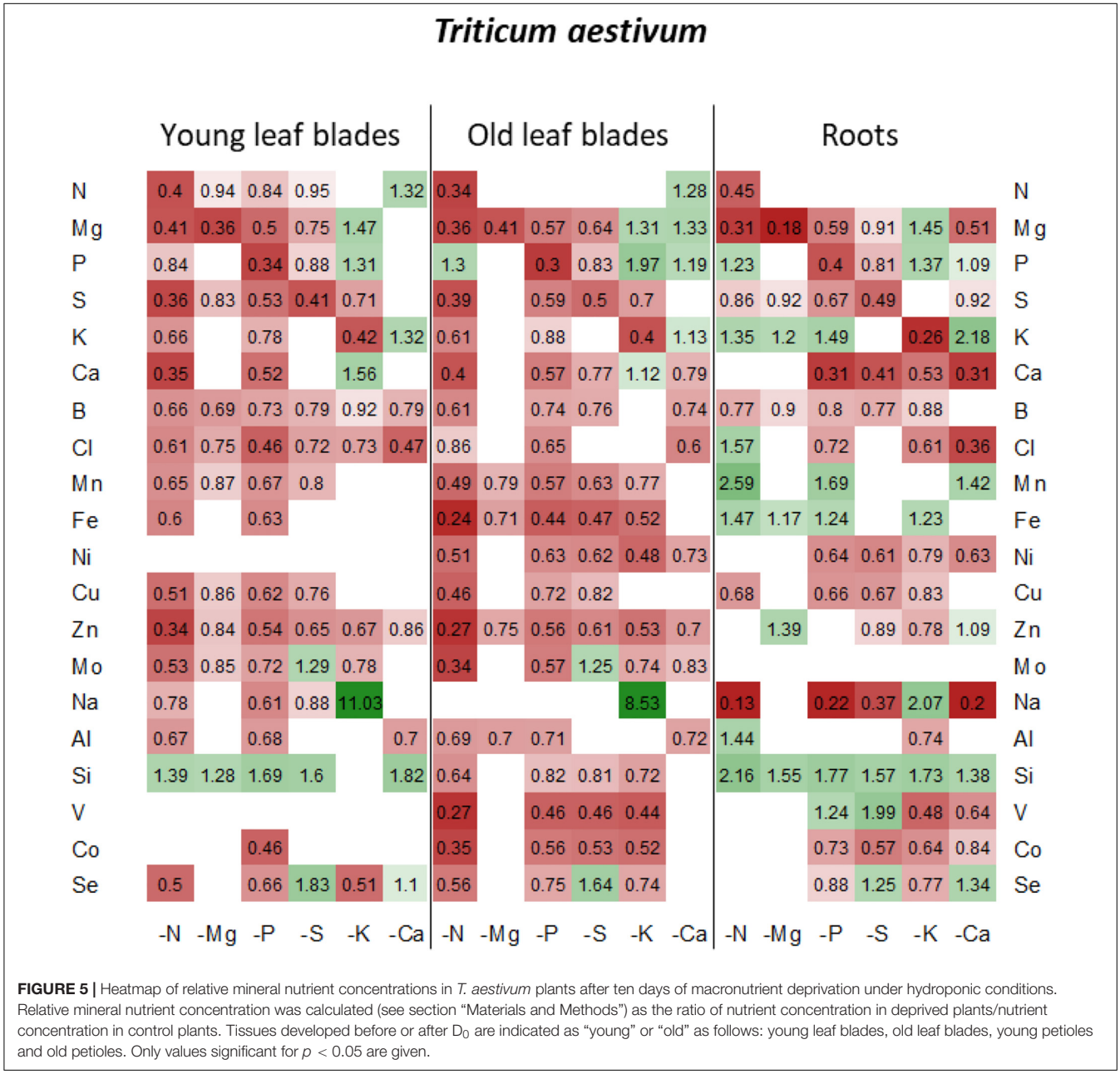


FIGURE 5 | Heatmap of relative mineral nutrient concentrations in *T. aestivum* plants after ten days of macronutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative mineral nutrient concentration was calculated (see section "Materials and Methods") as the ratio of nutrient concentration in deprived plants/nutrient concentration in control plants. Tissues developed before or after D_0 are indicated as "young" or "old" as follows: young leaf blades, old leaf blades, young petioles and old petioles. Only values significant for $p < 0.05$ are given.

of both species in particular (**Figures 4**, **5**). In contrast, only the relative net uptakes of N and K in wheat and Mn, Mg and Na in oilseed rape were significantly increased, and in the case of the two latter nutrients oilseed rape and wheat showed opposite trends in their uptake responses under Ca deprivation.

DISCUSSION

Previous work (Maillard et al., 2015, Maillard et al., 2016a; Courbet et al., 2019) has suggested that analysis of the plant functional ionome can be used to identify the physiological and molecular interactions that occur during mineral deprivations. In this study, changes in the functional ionome during macronutrient deficiencies have been observed in oilseed rape and wheat before any significant change in plant growth was recorded (**Figure 1**). Thus, under such conditions, the net uptake of each nutrient can be quantified and compared between deprivations of each of the 6 macronutrients without significant interference to plant growth.

First of all, nearly all mineral nutrient concentrations were higher in oilseed rape than wheat, regardless of the plant tissue examined (**Table 1**). For example, in control plants, the concentration of B, an element that is known to play a key role in cell wall structure, was about 10-fold higher in mature oilseed rape leaves than in wheat (**Table 1**). The

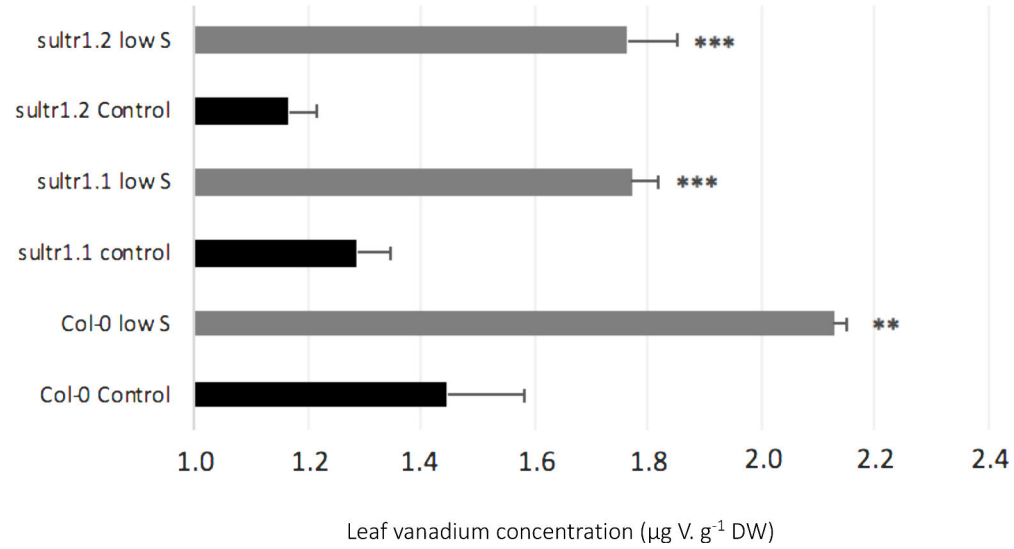


FIGURE 6 | Effects of S deficiency on vanadium concentration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants, wild type Col-0 and the mutants AtSultr1.1 (KO) and AtSultr2.1 (point mutated, Shibagaki et al., 2002), grown under sufficient S supply (Control) or under low S. Data are given as the mean ± SE (n = 4) and are significantly different between control and low S at $^{**}P < 0.01$) or $^{***}P < 0.001$.

opposite conclusion can be drawn for Si content, which was about 38-fold higher in mature wheat leaves than in oilseed rape (**Table 1**). Si is considered to be a beneficial element, probably taken up by aquaporin family and notably by Lsi1 (Mitani et al., 2008; Ma et al., 2011). Ma et al. (2011) showed that Lsi1 was involved in Si uptake from the soil in the form of silicic acid, in roots of monocotyledon and dicotyledon, then Si was transported in aerial part of plant by Lsi2, an active efflux transporter. Significant increases in grain yield and dry matter were observed when two wheat genotypes (Auqab-2000 and SARC-5) subjected to NaCl received supplementary Si (Tahir et al., 2006). Moreover, in poaceous species (such as wheat), which are considered Si-accumulating species (Marschner(eds), 2012), this element is known to reinforce the cell wall specifically when plants experience biotic and abiotic stresses (Epstein, 1999). Another difference between the two plant species involves the partitioning of Si between plant tissues. Indeed, about 10% of the relative Si content is localized in the roots of wheat (**Figure 2B**) compared to about 40% in oilseed rape (**Figure 2A**), irrespective of the nature of the nutrient deprivation, thus indicating that a higher proportion of the Si taken up by roots was translocated to the shoots in wheat. On the other hand, the relative root nutrient amounts (**Figure 2**) revealed that some nutrients were more immobile in wheat roots (well above 40%, such as Mg, Fe, Ni, Cu, Zn) than in oilseed rape roots (mostly below 30%), for all deprivations. Nutrient transport from roots to shoots is known to be regulated by the Casparian barrier, which blocks apoplastic flow in roots (Barberon et al., 2016). Furthermore, Ma et al. (2011) and Olsen and Palmgren (2014) suggested that monocotyledonous plants (such as cereals) possess an additional selective Casparian barrier, localized between the cortex and endodermis. According to this assumption it is possible that the second Casparian barrier might contribute to this wheat-specific sequestration of nutrients in the roots. Overall, these results clearly indicate that the ionome is specific to the plant tissue in question, as well as the plant species, even though the ionome shows a large degree of plasticity under different types of macronutrient deprivation.

One of the first processes that may affect the plant ionomic composition under macronutrient deprivation is remobilization of endogenous macronutrients from the source organs to sink organs. Under our experimental conditions, net remobilization of the deprived nutrient can be assessed. For example, the strong decrease in Mg and Ca in roots of both species suggests that these elements are massively remobilized from the roots to the shoots. On the other hand, the fact that the concentration in old leaves of wheat and oilseed rape (**Figures 4**, **5**) dropped during deprivation to a greater degree than in young leaves suggests that remobilization of N, P, S, and K occurred in both species. This remobilization of macronutrients toward growing tissues may explain why plant growth was maintained for at least 10 days despite the macronutrient deprivation.

Regarding the effects of macronutrient deprivations on other elements, this study revealed 48 analogous patterns of change in relative net nutrient uptake between oilseed rape and wheat (**Figure 3**). Amongst these effects, negative interactions such as the impact of N deficiency on plant metabolism *via* protein synthesis and alteration of resource allocation are already well known (Crawford, 1995; Scheible et al., 2004). In this study, N starvation induced a decrease in the uptake of almost all mineral nutrients in both species, except for Si. According to other work conducted on rice, this exception for Si could be due to an antagonistic interaction between N and Si during growth enhancement in this species (considered a Si-accumulator) (Wu

et al., 2017). Indeed, Wu et al. (2017) demonstrated that an increase in N fertilization reduced leaf Si content significantly, and in contrast, Si supply downregulated gene expression (*amt1.1* and *nrt1.1*) involved in N uptake in wheat. Contrastingly, recent results obtained in oilseed rape (a non Si-accumulator species) have indicated that a Si root supply upregulates the gene encoding a nitrate transporter (*BnaNRT2.1)* and enhances N uptake (Haddad et al., 2018). Overall, our results also suggest that Si, which is considered a beneficial element, could interact with N, one of the major macronutrients for plant growth and yield.

In a very similar way to N deprivation, P deficiency revealed numerous elemental interactions. Indeed, the net uptakes of Mg, Cl, Na, Al, and Se decreased in oilseed rape and wheat, as did the uptakes of S, Ca, B, Ni, Cu, Zn, Mo, and Co in wheat and Fe in oilseed rape. This could be explained by the major role that P plays in plant metabolism because this macronutrient is central to the structure of adenosine triphosphate (ATP) and is responsible for its high-energy proprieties (Neupane et al., 2019). Plaxton and Tran (2011) explained that under P deprivation, Pi-use efficiency is increased by upregulation of Pi-starvation-inducible hydrolases that trap and recycle P *via* extra and intracellular organic P to maintain plant metabolism. Nevertheless, P deficiency cannot be continuously offset, so this means that any ATP decrease will restrict plant photosynthesis function due to Rubisco deactivation (Butz and Sharkey, 1989; de Groot, 2003) and also the uptake of some nutrients that are usually ATP-dependent processes in the root.

Our results also provided evidence about novel negative interactions between N, P and Na in both species. These results suggest that Na transport could be functionally related to N uptake and this may be illustrated by data extracted from the Ionomic Hub (Salt et al., 2008), which contains an ionomic analysis of *Arabidospis* nitrate transporter mutant lines. For example, compared to the parent line, there were significant reductions of 39 and 48% ($p \leq 0.001$) in the leaf Na concentration in an *nrt2.1 Arabidopsis thaliana* mutant (SALK_035429 homozygote knock-out line) cultivated on 2 different soils. It is usually assumed that NRT2.1, a high-affinity nitrate transporter, works as a $NO_3^-/2H^+$ symporter that requires energy for H^+/ATPase activity. Consequently, the secondary efflux of H^+ probably coupled with a Na^+ influx could partially explain the strong decrease in Na uptake shown in N-deprived plants. On the contrary, compared with the parent line, the *nrt1.1* (SALK_097431 homozygote knock-out line) mutant showed similar or increased Na concentration in leaves compared to the parent line when cultivated on the two different soils. This increase in leaf Na concentrations in the *nrt1.1* KO mutant could be the consequence of a compensatory increase in NRT2.1 expression, as previously reported by Munos et al. (2004), and could explain the increased H^+/Na^+ antiporter activity that in turn increased Na^+ uptake. Alvarez-Aragon and Rodríguez-Navarro. (2017) suggested that under saline conditions two nitrate-dependent transport systems that work in series to take up and load Na^+ into the xylem constitute the major pathway for the accumulation of Na^+ in *Arabidopsis thaliana* shoots. They also found that Na^+ accumulation in the *nrt1.1* mutant was partially defective, suggesting that NRT1.1 either partially mediates or modulates nitrate-dependent Na^+ transport.

In the same way, relative net uptake of Na^+ was also strongly decreased in P-deprived plants (**Figures 3A,B**) and led to a reduction in the relative amount (**Figures 2B,C**) and concentration of Na in roots (**Figures 4**, **5**). Previous work has indicated that the uptake of Pi is mediated by different PHO1 and PHT transporters that require energy from H^+/ATPase activity (Hamburger et al., 2002; Briat et al., 2015). From our results and data from the literature, it could be hypothesized that these transport systems are also connected to a Na^+/H^+ antiporter that is inefficient when Pi is not available, thus leading to a decrease in Na^+ uptake (Shi et al., 2002; Saito and Uozumi, 2020).

Ca deprivation also negatively affected the net uptake of several mineral nutrients in oilseed rape and wheat. This result is very interesting because to our knowledge no nutrient interactions have been previously reported in Ca-deprived plants. At the cellular level, Ca plays the role of second messenger in the regulation of major metabolic and physiological processes such as photomorphogenesis, drought resistance, cold adaptation and thermotolerance (Anil and Rao, 2001). Furthermore, Ca is essential for the structure of cell walls because it is bound to pectate during the strengthening of plant tissues (Olle and Bender, 2009).

It is notable that the macronutrient deprivation experiments highlighted 20 positive interactions common to both species, some of them already described, such as a strong increase in Na uptake under K deprivation (**Figure 3**) coupled with a reduction in its relative content in roots (**Figure 2**) and a massive accumulation in leaves (**Figures 4**, **5**). K is one of the most abundant cations in plants (Mäser et al., 2002), principally known for its osmotic role, and it is regulated via the KUP potassium transporter family, which contributes to K^+ uptake under K starvation or under drought stress (Osakabe et al., 2013; Nieves-Cordones et al., 2016). Most HKT transporters are Na^+ transporters, but a few are regarded as Na^+/K^+ symporters (Wang and Wu, 2013). Mäser et al. (2002) suggested multiple pathways for root Na^+ uptake such as permeation of Na^+ through K^+ and Ca^{2+} transporters, use of Na^+ transport to energize K^+ uptake, and also Na^+-selective uptake. Sodium is a beneficial element whose function is not well understood (Alvarez-Aragon and Rodríguez-Navarro, 2017) but our data show a potential substitution of K^+ by Na^+ under our K^+-deprivation conditions, suggesting at least a transient osmotic compensation.

Under S deprivation there was surprisingly a greater effect on mineral nutrient uptake in wheat than in oilseed rape (**Figure 3**). Nevertheless, novel positive interactions between S, Mo, V and Se could be identified in both species. As detailed in the introduction, S as a macronutrient is involved in multiple interactions with other components of the functional ionome (Courbet et al., 2019) such as the synthesis of Mo-cofactor, which also requires Fe, Zn and Cu, as well as the synthesis of Fe-S clusters. Moreover, it has been shown that the strong over-expression of sulfate transporters triggered by S deficiency (Maruyama-Nakashita et al., 2004) leads to an increased uptake

of Mo and Se in the form of MoO_4^{2-} and SeO_4^{2-}, respectively (Shinmachi et al., 2010; Maillard et al., 2016a), as also found in this study (**Figure 3**). Moreover, we observed that under S deprivation, V uptake is 6 and 2 times higher in oilseed rape and wheat, respectively, compared to control plants (**Figure 3**). These results suggested that V could be taken up by sulfate transporters, and probably in the form of vanadate (VO_4^{3-}), which is also supported by the analysis of leaf V concentration in *Arabidopsis sultr1.1* KO mutants *and sultr1.2* (*sel1-8*) mutants subjected to S deficiency (**Figure 6**). This suggests that both transporters are able to mediate the uptake of VO_4^{2-} as they do for other compounds with similar structural properties (SO_4^{2-}, MoO_4^{2-}, SeO_4^{2-}). The use in this study of *Arabidopsis sultr1.1 KO* mutants and *sultr1.2 (sel1-8)* mutants for V analysis was derived from samples of a previous study that has been previously published (Maillard et al., 2016a) in which the expression of genes encoding sulfate transporters was already given for the wild type and the mutants. Lastly, it must be pointed out that the stimulation of V uptake found in this study under S deprivation occurred in the absence of any added V, with the element only being present at an ultra-trace level in the nutrient solution (<0.01 ppm), thus suggesting a high affinity of SULT transporters for VO_4^{2-}.

CONCLUSION

In conclusion, this work demonstrates that the ionomic composition is tissue and species specific. While usually considered as being tightly regulated, our work shows the true plasticity of the ionome composition when plants are exposed to macronutrient deprivation. The concentrations of the deprived nutrients sharply declined, allowing the plants to maintain a similar growth rate for at least 10 days, and this is probably the result of remobilization toward actively growing tissues such as young leaves. A large number of positive and negative interactions between nutrients were demonstrated, some of them being common to the two species studied. Numerous mechanisms and crosstalks, which will require further work, may be involved in direct (S, Se, V, Mo) or indirect interactions (NO_3^- and Na^+) at the level of root transporters, while a substitution mechanism may be hypothesized between a number of the cations (Ca and Mg, K and Na). The consequences of micronutrient and beneficial nutrient deprivations will be presented in a companion paper (D'Oria et al., 2020), together with an analysis of the specificity of ionomic signatures.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work conducted through the EAUPTIC project, was supported by the Regional Council of Normandy (CRN, grant no. 17P07231), the "Fond Unique Interministériel" (FUI, grant no. 3870401/1), and the Centre Mondial d'Innovation—Roullier Group (CIFRE grant to AO).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the PLATIN (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for element analysis used in this study and more particularly, Fanny Leroy, Jéhane Lepoitevin, Frédérine Marie and Josette Etienne Bonnefoy. We thank Dr. Laurence Cantrill for improving the English in this manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.641648/full#supplementary-material

Supplementary Data D1 | Averaged nutrient concentrations (ppm) of *B. napus* leaf (young and old leaves together) grown in field conditions [from Sarda et al. (2013) and Maillard et al. (2016b) corresponding to a maximum of 194 agricultural plots randomly harvested in France], or grown under hydroponic conditions [samples from Maillard et al. (2016a) or from this paper and the companion paper D'Oria et al. (2020)] with different nutrient solutions. Leaf nutrient concentrations obtained under hydroponic cultures, were averaged from all treatments (control plants and plants submitted to macro, micro or beneficial nutrients deficiencies) to maximize the range of concentrations encountered in hydroponic conditions compare to field experiments. Values are given as the mean ± SD for the corresponding number of leaf samples (n). For each nutrient concentration, a ratio between hydroponically [from Maillard et al. (2016b), ratio 1; from this study and companion paper D'Oria et al. (2020), ratio 2] and field grown plants is also given.

Supplementary Data D2 | Compositions of the nutrient solutions modified from Hoagland solution according to Maillard et al. (2016a,b) to best match the hydroponic ionome to field observations (data not shown). These solutions were used to expose *Brassica napus L.* and *Triticum aestivum* to 10 days of single-element deprivations of nitrogen (N), magnesium (Mg), phosphorus (P), sulfur (S), potassium (K), or calcium (Ca).

REFERENCES

Abdallah, M., Dubousset, L., Meuriot, F., Etienne, P., Avice, J.-C., and Ourry, A. (2010). Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.* 61, 2635–2646. doi: 10.1093/jxb/erq096

Alvarez-Aragon, R., and Rodríguez-Navarro, A. (2017). Nitrate-dependent shoot sodium accumulation and osmotic functions of sodium in *Arabidopsis* under saline conditions. *Plant J.* 91, 208–219. doi: 10.1111/tpj.13556

Andresen, E., Peiter, E., and Küpper, H. (2018). Trace metal metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* 69, 909–954. doi: 10.1093/jxb/erx465

Anil, V. S., and Rao, K. S. (2001). Calcium-mediated signal transduction in plants: a perspective on the role of Ca^{2+} and CDPKs during early plant development. *J. Plant Physiol.* 158, 1237–1256. doi: 10.1078/0176-1617-00550

Arnon, D. I., and Stout, P. R. (1939). The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol.* 14, 371–375. doi: 10.1104/pp.14.2.371

Barberon, M., Vermeer, J. E. M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T. G., et al. (2016). Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell* 164, 447–459. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.021

Baxter, I. (2009). Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 381–386. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.002

Baxter, I. R., Vitek, O., Lahner, B., Muthukumar, B., Borghi, M., Morrissey, J., et al. (2008). The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12081–12086. doi: 10.1073/pnas.0804175105

Briat, J.-F., Rouached, H., Tissot, N., Gaymard, F., and Dubos, C. (2015). Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1). *Front. Plant Sci.* 6:290. doi: 10.3389/fpls.2015.00290

Butz, N. D., and Sharkey, T. D. (1989). Activity ratios of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase accurately reflect carbamylation ratios. *Plant Physiol.* 89, 735–739. doi: 10.1104/pp.89.3.735

Courbet, G., Gallardo, K., Vigani, G., Brunel Muguet, S., Trouverie, J., Salon, C., et al. (2019). Disentangling the complexity and diversity of crosstalk between S and other mineral nutrients in cultivated plants. *J. Exp. Bot.* 70, 4183–4196. doi: 10.1093/jxb/erz214

Crawford, N. M. (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7, 859–868. doi: 10.2307/3870042

De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J.-M., Thomine, S., Gambale, F., et al. (2009). CLC-mediated anion transport in plant cells. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 195–201. doi: 10.1098/rstb.2008.0128

de Groot, C. C. (2003). Contrasting effects of N and P deprivation on the regulation of photosynthesis in tomato plants in relation to feedback limitation. *J. Exp. Bot.* 54, 1957–1967. doi: 10.1093/jxb/erg193

D'Oria, A., Courbet, G., Lornac, A., Pluchon, S., Arkoun, M., Maillard, A., et al. (2020). Specificity and plasticity of the functional ionome of Brassica napus and Triticum aestivum exposed to micro and beneficial nutrient deprivations and predictive sensitivity of ionomic signatures. *Front. Plant Sci.*

Epstein, E. (1999). Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 641–664.

Etienne, P., Diquelou, S., Prudent, M., Salon, C., Maillard, A., and Ourry, A. (2018). Macro and micronutrient storage in plants and their remobilization when facing scarcity: the case of drought. *Agriculture* 8:14. doi: 10.3390/agriculture8010014

Girondé, A., Dubousset, L., Trouverie, J., Etienne, P., and Avice, J.-C. (2014). The impact of sulfate restriction on seed yield and quality of winter oilseed rape depends on the ability to remobilize sulfate from vegetative tissues to reproductive organs. *Front. Plant Sci.* 5:695. doi: 10.3389/fpls.2014.00695

Girondé, A., Etienne, P., Trouverie, J., Bouchereau, A., Le Cahérec, F., Leport, L., et al. (2015). The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. *BMC Plant Biol.* 15:59. doi: 10.1186/s12870-015-0437-1

Gojon, A., Nacry, P., and Davidian, J.-C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 328–338. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.015

Grusak, M. A., Pearson, J. N., and Marentes, E. (1999). The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Res.* 60, 41–56. doi: 10.1016/s0378-4290(98)00132-4

Haddad, C., Arkoun, M., Jamois, F., Schwarzenberg, A., Yvin, J.-C., Etienne, P., et al. (2018). Silicon promotes growth of *Brassica napus* L. and delays leaf senescence induced by nitrogen starvation. *Front. Plant Sci.* 9:516. doi: 10.3389/fpls.2018.00516

Hamburger, D., Rezzonico, E., MacDonald-Comber Petétot, J., Somerville, C., and Poirier, Y. (2002). Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* 14, 889–902. doi: 10.1105/tpc.000745

Huang, C., Barker, S. J., Langridge, P., Smith, F. W., and Graham, R. D. (2000). Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and-deficient barley roots. *Plant Physiol.* 124, 415–422. doi: 10.1104/pp.124.1.415

James, M., Poret, M., Masclaux-Daubresse, C., Marmagne, A., Coquet, L., Jouenne, T., et al. (2018). SAG12, a major cysteine protease involved in nitrogen allocation during senescence for seed production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 59, 2052–2063. doi: 10.1093/pcp/pcy125

Ma, J. F., Yamaji, N., and Mitani-Ueno, N. (2011). Transport of silicon from roots to panicles in plants. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 87, 377–385. doi: 10.2183/pjab.87.377

Maillard, A., Diquélou, S., Billard, V., Laîné, P., Garnica, M., Prudent, M., et al. (2015). Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Front. Plant Sci.* 6:317. doi: 10.3389/fpls.2015.00317

Maillard, A., Etienne, P., Diquélou, S., Trouverie, J., Billard, V., Yvin, J.-C., et al. (2016a). Nutrient deficiencies modify the ionomic composition of plant tissues: a focus on cross-talk between molybdenum and other nutrients in *Brassica napus*. *J. Exp. Bot.* 67, 5631–5641. doi: 10.1093/jxb/erw322

Maillard, A., Sorin, E., Etienne, P., Diquélou, S., Koprivova, A., Kopriva, S., et al. (2016b). Non-Specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate. *PLoS One* 11:e0166910. doi: 10.1371/journal.pone.0166910

Malagoli, P., Laine, P., Rossato, L., and Ourry, A. (2005). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest: i. global n flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Ann. Bot.* 95, 853–861. doi: 10.1093/aob/mci091

Marschner, H. (eds) (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd Edn. Waltham, MA: Elsevier/Academic Press.

Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T., and Takahashi, H. (2004). Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *J. Exp. Bot.* 55, 1843–1849. doi: 10.1093/jxb/erh175

Mäser, P., Gierth, M., and Schroeder, J. I. (2002). Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plants Soil* 247, 43–54. doi: 10.1007/978-94-017-2789-1_3

Mitani, N., Yamaji, N., and Ma, J. F. (2008). Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 456, 679–686. doi: 10.1007/s00424-007-0408-y

Munos, S., Cazettes, C., Fizames, C., Gaymard, F., Tillard, P., Lepetit, M., et al. (2004). Transcript profiling in the chl1-5 mutant of *Arabidopsis* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, *NRT2.1*. *Plant Cell* 16, 2433–2447. doi: 10.1105/tpc.104.024380

Neupane, P., Bhuju, S., Thapa, N., and Bhattarai, H. K. (2019). ATP synthase: structure, function and inhibition. *BioMol Concepts* 10, 1–10. doi: 10.1515/bmc-2019-0001

Nieves-Cordones, M., Ródenas, R., Chavanieu, A., Rivero, R. M., Martinez, V., Gaillard, I., et al. (2016). Uneven HAK/KUP/KT protein diversity among angiosperms: species distribution and perspectives. *Front. Plant Sci.* 7:127. doi: 10.3389/fpls.2016.00127

Olle, M., and Bender, I. (2009). Causes and control of calcium deficiency disorders in vegetables: a review. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 84, 577–584. doi: 10.1080/14620316.2009.11512568

Olsen, L. I., and Palmgren, M. G. (2014). Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed. *Front. Plant Sci.* 5:30. doi: 10.3389/fpls.2014.00030

Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., et al. (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 609–624. doi: 10.1105/tpc.112.105700

Peng, J.-S., and Gong, J.-M. (2014). Vacuolar sequestration capacity and long-distance metal transport in plants. *Front. Plant Sci.* 5:19. doi: 10.3389/fpls.2014.00019

Pii, Y., Cesco, S., and Mimmo, T. (2015). Shoot ionome to predict the synergism and antagonism between nutrients as affected by substrate and physiological status. *Plant Physiol. Biochem.* 94, 48–56. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.05.002

Plaxton, W. C., and Tran, H. T. (2011). Metabolic *Adaptations* of phosphate-starved plants. *Plant Physiol.* 156, 1006–1015. doi: 10.1104/pp.111.175281

R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available online at: https://www.R-project.org/

RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R.* Boston, MA: RStudio, PBC. Available online at: http://www.rstudio.com/

Saito, S., and Uozumi, N. (2020). Calcium-Regulated phosphorylation systems controlling uptake and balance of plant nutrients. *Front. Plant Sci.* 11:44. doi: 10.3389/fpls.2020.00044

Salt, D. E., Baxter, I., and Lahner, B. (2008). Ionomics and the study of the plant ionome. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 709–733. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092942

Sarda, X., Diquelou, S., Abdallah, M., Nesi, N., Cantat, O., Le Gouee, P., et al. (2013). Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *J. Agric. Sci*. 152, 616–633. doi: 10.1017/S0021859613000105

Schachtman, D., and Liu, W. (1999). Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 4, 281–287. doi: 10.1016/s1360-1385(99)01428-4

Scheible, W.-R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., et al. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136, 2483–2499. doi: 10.1104/pp.104.047019

Schiavon, M., Pittarello, M., Pilon-Smits, E. A. H., Wirtz, M., Hell, R., and Malagoli, M. (2012). Selenate and molybdate alter sulfate transport and assimilation in *Brassica juncea* L. Czern.: implications for phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* 75, 41–51. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.08.016

Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., and Zhu, J.-K. (2002). The putative plasma membrane Na + /H + Antiporter SOS1 controls long-distance Na + transport in plants. *Plant Cell* 14, 465–477. doi: 10.1105/tpc.010371

Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J. P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., et al. (2002). Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1; 2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J.* 29, 475–486. doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01232.x

Shinmachi, F., Buchner, P., Stroud, J. L., Parmar, S., Zhao, F.-J., McGrath, S. P., et al. (2010). Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiol.* 153, 327–336. doi: 10.1104/pp.110.153759

Sorin, E., Etienne, P., Maillard, A., Zamarreño, A.-M., Garcia-Mina, J.-M., Arkoun, M., et al. (2015). Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. *J. Exp. Bot.* 66, 6175–6189. doi: 10.1093/jxb/erv321

Tahir, M. A., Rahmatullah, T., Aziz, M., Ashraf, S., Kanwal, S., and Maqsood, M. A. (2006). Beneficial effects of silicon in wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *Pak. J. Bot.* 38, 1715–1722.

Wang, Y., and Wu, W.-H. (2013). Potassium transport and signaling in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 451–476. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120153

Williams, L., and Salt, D. E. (2009). The plant ionome coming into focus. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 247–249. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.009

Wu, X., Yu, Y., Baerson, S. R., Song, Y., Liang, G., Ding, C., et al. (2017). Interactions between nitrogen and silicon in rice and their effects on resistance toward the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Front. Plant Sci.* 8:28. doi: 10.3389/fpls.2017.00028

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

Copyright © 2021 Courbet, D'Oria, Lornac, Diquélou, Pluchon, Arkoun, Koprivova, Kopriva, Etienne and Ourry. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

	Field grown plants From Sarda *et al.* (2013) and Maillard *et al.* (2016b)			Hydroponically grown plants from Maillard *et al.* (2016a)			Hydroponically grown plants from this study, and companion paper D'Oria *et al.* (2020)				
	mean	**sd**	**n=**	**mean**	**sd**	**n=**	**mean**	**sd**	**n=**	**ratio 1**	**ratio 2**
N	24 059	± 8804	151	42 286	± 13315	166	43 374	± 10953	200	1.76	1.80
Mg	1 274	± 580	194	3 761	± 2196	166	4 237	± 2407	200	2.95	3.33
P	2 830	± 978	194	4 354	± 2350	166	5 426	± 2172	200	1.54	1.92
S	6 228	± 3755	194	10 944	± 5403	166	14 895	± 5723	200	1.76	2.39
K	23 195	± 9042	194	30 797	± 10975	166	44 996	± 12391	200	1.33	1.94
Ca	33 569	± 19496	194	42 432	± 26961	166	34 792	± 20955	200	1.26	1.04
B	29	± 18	194	44	± 20	166	69	± 27	200	1.50	2.37
Cl	7 298	± 3520	41	10 301	± 5598	35	12 741	± 6162	200	1.41	1.75
Mn	64	± 44	194	186	± 104	166	150	± 77	200	2.91	2.36
Fe	652	± 708	192	103	± 46	166	121	± 42	200	0.16	0.19
Ni	1.4	± 1.6	191	0.26	± 0.11	30	0.9	± 1.16	200	0.18	0.62
Cu	3.7	± 1.8	194	4.0	± 3.1	166	6.9	± 6.1	200	1.09	1.87
Zn	29	± 22	188	40	± 30	161	49	± 25	200	1.39	1.67
Mo	2.1	± 1.8	194	177	± 176	166	4.5	± 2.1	200	84.71	2.18
Na	1 055	± 1391	194	600	± 1240	166	1 391	± 1965	200	0.57	1.32
Al	2 121	± 1973	39	348	± 97	35	505	± 158	200	0.16	0.24
Si	1 323	± 1146	40	581	± 265	43	1 074	± 280	200	0.44	0.81
Co	0.33	± 0.34	192	0.11	± 0.06	31	0.25	± 0.29	200	0.33	0.76
Se	0.14	± 0.14	194	0.05	± 0.03	32	0.90	± 0.34	200	0.34	6.55

Supplementary Data SD1 | Averaged nutrient concentrations (ppm) of B. napus leaf (young and old leaves together) grown in field conditions [from Sarda et al. (2013) and Maillard et al. (2016b) corresponding to a maximum of 194 agricultural plots randomly harvested in France], or grown under hydroponic conditions [samples from Maillard et al. (2016a) or from this paper and the companion paper D'Oria et al. (2020)] with different nutrient solutions. Leaf nutrient concentrations obtained under hydroponic cultures, were averaged from all treatments (control plants and plants submitted to macro, micro or beneficial nutrients deficiencies) to maximize the range of concentrations encountered in hydroponic conditions compare to field experiments. Values are given as the mean ± SD for the corresponding number of leaf samples (n). For each nutrient concentration, a ratio between hydroponically [from Maillard et al. (2016b), ratio 1; from this study and companion paper D'Oria et al. (2020), ratio 2] and field grown plants is also given.

Salts	Salt concentrations (µM) of deprived solutions :						
	Control	-N	-Mg	-P	-S	-K	-Ca
KNO_3	1000	0	1000	1000	1000	0	3500
$Ca(NO_3)_2 +4H_2O$	1250	0	1250	1250	1250	1750	0
KH_2PO_4	200	0	200	0	0	0	0
K_2HPO_4	0	200	0	0	200	0	0
$MgSO_4$	400	150	0	400	0	400	400
$MgCl_2$	0	250	0	0	400	0	0
NaFe-EDTA $3H_2O$	50	50	50	50	50	50	50
NaFe-EDDHA	50	50	50	50	50	50	50
Fe-Citrate	0	0	0	0	0	0	0
H_3BO_3	10	10	10	10	10	10	10
$MnSO_4$	3	3	3	3	0	3	3
$MnCl_2$	0	0	0	0	3	0	0
$ZnSO_4$	3	3	3	3	0	3	3
$CuSO_4$	0.7	0.7	0.7	0.7	0	0.7	0.7
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
$CoCl_2$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$NiCl_2$	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
$Si(OH)_4$	900	900	900	900	900	900	1100
$CaCl_2 + 2H_2O$	500	750	500	200	0	450	0
KCl	100	400	0	300	100	0	0
Na_2SeO_4	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
$CaCO_3$	360	940	0	620	720	0	0
K_2SO_4	100	350	150	100	0	0	100
Na_2SiO_3	200	200	200	200	200	200	0
HCl	600	2220	500	1400	1800	300	900
$CaSO_4$	0	0	350	0	0	100	0
$Ca(H_2PO_4)$	0	0	0	0	0	200	0
$ZnCl_2$	0	0	0	0	3	0	0
$CuCl_2$	0	0	0	0	0.7	0	0
NaCl	0	0	0	0	0	0	200
NaH_2PO_4	0	0	0	0	0	0	200
KOH	0	0	0	0	0	0	1000

Nutrients	Elemental concentrations (µM) of deprived solutions :						
	Control	-N	-Mg	-P	-S	-K	-Ca
N	3500	0.048	3500	3500	3500	3500	3500
Mg	400	400	0	400	400	400	400
P	200	200	200	0	200	200	200
S	507	507	507	507	0	507	507
K	1500	1500	1500	1500	1500	0	4700
Ca	2110	1690	2100	2070	1970	2500	0
B	10	10	10	10	10	10	10
Cl	2001	4621	1701	2101	2707	1201	1101
Mn	3	3	3	3	3	3	3
Fe	100	100	100	100	100	100	100
Ni	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Cu	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Zn	3	3	3	3	3	3	3
Mo	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056
Na	500	500	500	500	500	500	500
Al	0	0	0	0	0	0	0
Si	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100
V	0	0	0	0	0	0	0
Co	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Se	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Supplementary Data SD2 | Compositions of the nutrient solutions modified from Hoagland solution according to Maillard et al. (2016a, b) to best match the hydroponic ionome to field observations (data not shown). These solutions were used to expose Brassica napus L. and Triticum aestivum to 10 days of single-element deprivations of nitrogen (N), magnesium (Mg), phosphorus (P), sulfur (S), potassium (K), or calcium (Ca).

De la même manière que pour les carences en macroéléments, les modifications de la composition du ionome fonctionnel des différents organes et de l'absorption nette des éléments du ionome, ont été caractérisées chez *Brassica napus* et *Triticum aestivum* après 22 jours de carences individuelles en microéléments et en éléments bénéfiques. La comparaison des modifications du ionome en réponse à des carences en micronutriments et éléments bénéfiques a également permis de mettre en évidence des interactions nutritionnelles.

Résultats majeurs : Les carences en micronutriments et éléments bénéfiques ont révélé beaucoup moins d'interactions communes entre les éléments chez *Brassica napus* et *Triticum aestivum*, que les carences en macroéléments. Les carences en B et Si ont notamment permis de mettre en évidence qu'il existe des réponses métaboliques différentes chez le colza (dicotylédone) et le blé (monocotylédone). Les analyses ionomiques ont montré que le colza est plus sensible à la carence en B que le blé, et inversement concernant la carence en Si. L'acide monosilicique, $Si(OH)_4$ et l'acide borique, $B(OH)_3$ sont tous deux des acides faibles en solution aqueuse qui participent principalement au renforcement des parois cellulaires. Toutefois, les différences de capacités d'absorption de ces deux éléments chez *Brassica napus* et *Triticum aestivum*, pourraient expliquer les réponses contrastées observées en situation de carences. A l'inverse, la seule interaction commune à ces espèces est l'augmentation de l'absorption et du stockage racinaire de cations divalents (Cu, Zn, Co, etc.) lors des carences en Fe, Cu, Zn, Mo et Na, qui pourraient être dues à l'augmentation de l'expression du gène *BnaIRT1*, codant un transporteur aspécifique de Fe. De plus, ceci suggère que la perturbation dans le transport des cations divalents, pourrait être liée à une modification de la subérisation de la barrière casparienne. Enfin, les signatures ionomiques obtenues avec ces 19 carences (6 carences en macroéléments et 13 carences en microéléments et éléments bénéfiques) et sur deux espèces différentes, ont également permis de mettre en place une proposition de modèle statistique susceptible de prédire, de façon précoce, de potentielles carences nutritionnelles.

Ces résultats sont présentés dans un article intitulé « Specificity and plasticity of the functional ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* exposed to micronutrient or beneficial nutrient deprivation and predictive sensitivity of the ionomic signatures » et publié dans Frontiers in Plant Science.

frontiers in Plant Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 10 February 2021
doi: 10.3389/fpls.2021.641678

Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* Exposed to Micronutrient or Beneficial Nutrient Deprivation and Predictive Sensitivity of the Ionomic Signatures

*Aurélien D'Oria[1,2†], Galatéa Courbet[1†], Aurélia Lornac[1], Sylvain Pluchon[2], Mustapha Arkoun[2], Anne Maillard[2], Philippe Etienne[1], Sylvain Diquélou[1] and Alain Ourry[1]**

[1] UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions N, C, S, Normandie Université, UNICAEN, INRAE, Caen, France, [2] Laboratoire de Nutrition Végétale, Centre Mondial de l'Innovation, Le Groupe Roullier, Saint-Malo, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Rafael Pérez-Vicente, University of Córdoba, Spain

Reviewed by:
Guangda Ding, Huazhong Agricultural University, China
Naoko Ohkama-Ohtsu, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan

***Correspondence:**
Alain Ourry
alain.ourry@unicaen.fr

[†] These authors have contributed equally to this work

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

Received: 14 December 2020
Accepted: 12 January 2021
Published: 10 February 2021

Citation:
D'Oria A, Courbet G, Lornac A, Pluchon S, Arkoun M, Maillard A, Etienne P, Diquélou S and Ourry A (2021) Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of Brassica napus and Triticum aestivum Exposed to Micronutrient or Beneficial Nutrient Deprivation and Predictive Sensitivity of the Ionomic Signatures. Front. Plant Sci. 12:641678. doi: 10.3389/fpls.2021.641678

The specific variation in the functional ionome was studied in *Brassica napus* and *Triticum aestivum* plants subjected to micronutrient or beneficial mineral nutrient deprivation. Effects of these deprivations were compared to those of macronutrient deprivation. In order to identify early events, plants were harvested after 22 days, i.e., before any significant reduction in growth relative to control plants. Root uptake, tissue concentrations and relative root nutrient contents were analyzed revealing numerous interactions with respect to the 20 elements quantified. The assessment of the functional ionome under individual mineral nutrient deficiency allows the identification of a large number of interactions between elements, although it is not totally exhaustive, and gives access to specific ionomic signatures that discriminate among deficiencies in N, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, Si, and Se in both species, plus Mg, Cl, Cu, and Mo in wheat. Ionome modifications and components of ionomic signatures are discussed in relation to well-known mechanisms that may explain crosstalks between mineral nutrients, such as between Na and K, V, Se, Mo and S or Fe, Zn and Cu. More surprisingly, when deprived of beneficial nutrients such as Na, Si, Co, or Se, the plant ionome was strongly modified while these beneficial nutrients contributed greatly to the leaf ionomic signature of most mineral deficiencies.

Keywords: ionome, ionomic signatures, nutrient deficiency, nutrient interactions, rapeseed, wheat

HIGHLIGHTS

Tightly regulated, the functional ionome is tissue and species specific, but shows a high degree of plasticity when plants are exposed to micronutrient and beneficial nutrient deprivation, resulting from numerous crosstalks between nutrients. Some highly sensitive specific signatures for each deprivation are outlined in this study.

INTRODUCTION

The whole elemental composition of plants, also defined as the ionome, is species, genotype and tissue specific (Shakoor et al., 2016; Neugebauer et al., 2018), and while it is supposed to be tightly regulated, it can also be modified under changing climatic conditions (Soares et al., 2019) or when plants are facing numerous abiotic stresses such as atmospheric CO_2 enrichment (Loladze, 2014), mineral deficiencies or drought (Etienne et al., 2018). The way that macronutrient deficiencies modify the plant ionome has been recently described in a companion paper (Courbet et al., 2021) using *Brassica napus* and *Triticum aestivum*. It highlighted numerous negative and positive interactions between macronutrient, micronutrient, and beneficial nutrients. Novel interactions were reported, for example, between S and vanadium (V), with a stimulation of vanadate uptake in plants cultivated under S deficiency that occurred alongside enhanced molybdate and selenate uptake, which had been described previously (Shinmachi et al., 2010; Maillard et al., 2016a; Courbet et al., 2019). Furthermore, the companion paper also highlighted a negative interaction between N and Na that was also strengthened using data extracted from the Ionomic Hub (Salt et al., 2008) with knockout Arabidopsis lines for genes encoding nitrate transporters, suggesting that NO_3^- uptake and Na^+ influx were connected.

Numerous studies have already indicated negative effects of micronutrient deficiencies on physiological and agronomic parameters, such as strong decreases in plant growth and grain yield and quality (Allen, 2000; Fageria et al., 2008; Rawat et al., 2013). Micronutrient and beneficial nutrients are thought to be required for many metabolic functions [for a review see Andresen et al. (2018)]. For example, plants need metal elements like manganese (Mn), iron (Fe), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), and molybdenum (Mo) to operate in energy metabolism (Dalcorso et al., 2014; Andresen et al., 2018), photosynthesis (van Oijen et al., 2004), the mitochondrial respiratory chain, gene expression regulation (Dalcorso et al., 2014), hormone synthesis, Mo cofactor (MoCo) synthesis (Maillard et al., 2016b), and protein structure. In order to maintain nutritional homeostasis in plants, a finely tuned balance of tissue mineral content is achieved through the regulation of root transporters (Andresen et al., 2018) coupled with a controlled translocation from roots to the shoot tissues partly through the Casparian strip (Barberon et al., 2016; Barberon, 2017). While relatively few studies have considered the effects of micronutrient or beneficial nutrient deficiency on the plant ionome, some interactions between micronutrients have been described from more focused experiments.

One of the most frequently described examples of micronutrient homeostasis concerns Fe and its interactions with other nutrients such as Ni, Cu, Zn, and cobalt (Co). In dicotyledonous plants, Fe concentration regulation is at least partly achieved by the fine tuning of Fe uptake from roots through the expression of iron regulated transporter 1 (IRT1), a member of the *Arabidopsis* ZIP (Zrt/Irt-like protein) metal transporter family (Henriques et al., 2002), which acts as a major high-affinity Fe transporter (Vert et al., 2002). This has been confirmed by the chlorotic appearance of the *irt1-1* knockout mutant of *Arabidopsis thaliana* (Barberon et al., 2014). However, IRT1 is not only involved in root Fe uptake, but also in the uptake of divalent cations like Ni, Cu, Zn, and Co, which occurs more specifically under iron limitation when IRT1 expression is up-regulated (Korshunova et al., 1999; Henriques et al., 2002; Nishida et al., 2012; Waters and Armbrust, 2013; Alejandro et al., 2020). Indeed, Nishida et al. (2012) have reported that IRT1 mediates Ni accumulation in *A. thaliana* hydroponic cultures under Fe deficiency. Similarly, Li et al. (2013) reported that ZmIRT1 gene expression was increased in maize cultivated under Fe and also under Zn deficiency. Only a few studies have shown Cu interactions with IRT1 transporter expression, such as Waters and Armbrust (2013), who found that *Arabidopsis* leaf Cu content increased under low Fe conditions together with increases in Ni and Zn leaf content. Finally, Co, which is assumed to be a beneficial element, but whose function in non-leguminous plants remains to be established (with no specific Co transporter described so far), is widely accumulated in plants grown on different soils (Jayakumar and Jaleel, 2009; Jayakumar et al., 2013). Only a small number of studies have suggested that the transport of Co might also be mediated by IRT1 (Korshunova et al., 1999; Zelazny and Vert, 2015). Thus, during the Fe deficiency response, Zn, Mn, Cd, Co, and Ni could be taken up at least by an over-expressed IRT1 transporter but this will require molecular evidences as other transporters are probably involved in these processes (Curie et al., 2000; Pinto and Ferreira, 2015; Sasaki et al., 2016; Alejandro et al., 2020). In excess, these elements required detoxification mechanisms, such as vacuolar transporter expression [reviewed by Ricachenevsky et al. (2018)] in *Arabidopsis* and rice (*Oryza sativa*). The up-regulation of IRT1 when plants face Fe deficiency highlights a complex network of regulation pathways that lead to mineral content fluctuations in plant tissues. This is further illustrated by the fact that about 50 known ionome genes (KIG) related to Fe accumulation were recently identify in *Arabidopsis* (Whitt et al., 2020).

Another example of networks involving several nutrients can be found with Mo. Once taken up, Mo is mostly used for MoCo synthesis (Bittner, 2014), which are involved in the structure of essential enzymes such as nitrate reductase, aldehyde oxidase, and xanthine dehydrogenase (Zimmer and Mendel, 1999). In mitochondria, biosynthesis of the MoCo (Kaufholdt et al., 2017) requires not only Cu (Billard et al., 2014), but also Fe (Bittner, 2014), Zn, and S (Maillard et al., 2016b). Consequently, Mo root uptake and its resultant tissue concentration is increased when plants experience S, Mn, Zn, Fe, or Cu deficiencies (Maillard et al., 2016b). Overall, the synthesis of MoCo can be considered as a crucial crosstalk where several interactions between macronutrients and micronutrients occur.

Other micronutrient root co-transporters have been reported in literature (Sasaki et al., 2016; Alejandro et al., 2020) as for example AtNRAMP1 (Curie et al., 2000) and OsNRAMP5 (Sasaki et al., 2012), which belong to the Natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) family. The latters were assumed to transport Mn as well as Cd and Fe, and are both up-regulated by −Fe treatment, as well as under −Mn condition for AtNRAMP1. In rice, root Si influx proteins, named Lsi1

(Ma and Yamaji, 2006; Ma et al., 2006) and members of the nodulin 26-like intrinsic protein III (NIP III) family have been reported to transport not only Si but also Se (Zhao et al., 2010). These examples illustrate the need to take into account a full functional ionomic analysis when considering plant adaptations to micronutrient and beneficial mineral nutrient deficiencies with the objective of identifying all potential interactions. We assumed that total deprivation of a micronutrient [boron (B), chlorine (Cl), Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, or Mo], or a beneficial element [sodium (Na), silicon (Si), Co, or selenium (Se)] in rapeseed and wheat grown in hydroponic culture had the potential to reveal numerous interactions within the two contrasting species. The first objective of this work was to identify these interactions and to determine the mechanisms involved. Therefore, the tissue ionomic composition was quantified before the appearance of any significant growth reduction as the approach to evaluating plant net uptake since deprivation, specific root accumulation (as a proxy of root to shoot translocation of nutrients) and tissue concentrations.

To study large ionomic datasets, multivariate analyses have been used to establish ionomic signatures of physiological responses to abiotic stress and plant growth stage (Baxter et al., 2008; Salt et al., 2008; Wu et al., 2013). For example, Baxter et al. (2008) showed that the ionomic signatures of *A. thaliana* could provide robust information to detect plant physiological responses to a specific environmental modification. Therefore, following partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of the ionomic data, the second objective of this work was, to establish tissue relevance in terms of sensitivity and specificity to characterize the specific ionomic signatures resulting from macronutrient (data extracted from companion paper Courbet et al., 2021), micronutrient or beneficial mineral nutrient deficiencies. Finally, these ionomic signatures were compared between the two species and their relevance tested using an independent dataset derived from Maillard et al. (2016a).

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials and Growth Conditions

Brassica napus (cv. Trezzor) and *T. aestivum* (cv. Bagou) were grown in a greenhouse (20°C day/15°C night) at Caen Normandy University (France) between February–March for rapeseed and April–May for wheat. Seeds of both species were germinated on perlite over demineralized water for 4–5 days in the dark followed by 2 days under natural light. After emergence of the first true leaf, seedlings were transferred to hydroponic conditions in a complete nutrient solution and were then split into 10 plants groups, each group grown in a 10 L plastic container. The plants were exposed to natural light and supplemented with high-pressure sodium lamps (HPS 400 Watt, Hortilux Schréder, Monster, Netherlands) at 350 μmol m^{-2} s^{-1} over a 16 h day/8 h night photoperiod. The composition of the nutrient solution used above was derived from Maillard et al. (2015) and adapted according to Courbet et al. (2021) to obtain a plant ionomic composition as close as possible to the ionome obtained with field grown plants, and comprised the following: 1 mM KNO_3, 1.25 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.2 mM KH_2PO_4, 0.4 mM $MgSO_4$, 0.5 μM NaFe-EDTA, 50 μM NaFe-EDDHA, 10 μM H_3BO_3, 3 μM $MnSO_4$, 3 μM $ZnSO_4$, 0.7 μM $CuSO_4$, 0.008 μM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.1 μM $CoCl_2$, 0.15 μM $NiCl_2$, 0.9 mM $Si(OH)_4$, 0.5 mM $CaCl_2$, 0.1 mM KCl, 0.01 μM Na_2Se0_4, 0.1 mM K_2SO_4, and 0.2 mM Na_2SiO_3 buffered to pH 6.8 with 0.36 mM $CaCO_3$. It must be pointed out that among the constitutive elements of the plant functional ionome, vanadium (V) and aluminum (Al) were not provided directly, assuming that traces present in the other compounds used in the nutrient solution were sufficient. In order to maintain optimal nutrition conditions, this solution was tested with NO_3^- strips (Macherey-Nagel, Düren, Germany) every day during plant growth and was renewed when NO_3^- depletion reached 30% of the initial concentration. Overall, nutrient solutions were changed every 4–5 days with younger plants and every 2 days when plant biomass and therefore growth were maximal.

After 18 and 24 days of growth with complete solution for wheat and rapeseed, respectively, individual deprivations of eight micronutrients (B, Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, and Mo) or four beneficial elements (Na, Si, Co, and Se) were imposed. A harvest of control plants was performed just before the application of nutrient deficiency, which corresponded to day 0 (D_0) of the deficiency experiments. In order to separate tissues that developed before or during deficiencies, marker pen was used to record the level of growth by marking the last-developed leaves and petioles in wheat and rapeseed, respectively, before starting the deprivation treatments. The compositions of nutrient solutions used for individual micronutrient or beneficial nutrient deprivations are provided in the **supplementary Data 1** and were optimized to reduce the effect, as much as possible, of accompanying cations and anions of the deprived nutrient. Two plastic containers (20 plants in total) were used for each individual deficiency or control experiment.

On the day of deficiency application (D_0), control plants were harvested as five replicates of four plants each to ensure enough material for subsequent analysis. After 22 days of deficiency (D_{22}), before any significant decrease in plant growth, plants were randomly harvested for each condition using a pool of two plants per replicate (five replicates per condition). The duration of deficiency was adapted from Maillard et al. (2016a) who reported that at least 30 days of micronutrient deprivation were required to cause a significant growth reduction of plants in these conditions Therefore, the effects of individual deficiencies on the uptake of other nutrients could be analyzed without the interacting effects of reduced plant growth.

Tissues were harvested as follows: for both species, roots were separated from leaves; for rapeseed, leaves and petioles were also spit. Tissues that were present before nutrient deficiency were separated from new tissues that emerged after D_0 and thus had developed during nutrient deficiencies. For both species and throughout the manuscript, the tissues present before deficiency have been described as old leaf blades (OLBs) or old petioles (OPs), while those whose development occurred during deficiency have been designated young leaf blades (YLBs) and young petioles (YPs). The fresh weight of each sampled tissue was recorded and sub-sampled into two homogeneous batches, one

was stored at −80°C for molecular analysis and the second was dried at 65°C (72 h) for dry weight determination and used for further elemental concentration (i.e., ionome) quantification.

Elemental Content Analysis and Calculations

All the analytical methods used were previously detailed in Maillard et al. (2016a) and Courbet et al. (2021). Briefly, all dried sampled were ground to a fine powder using 0.4 mm diameter stainless steel beads in an oscillating grinder (Mixer Mill MM400, Retsch, Haan, Germany). Most of the macronutrient (Mg, P, S, K, and Ca), micronutrient (B, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, and Mo), and beneficial elements (Na, Co, V, and Se) were quantified, after previous acid digestion of dry weight samples (about 40 mg), with high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS, Element 2^{TM}, Thermo Scientific) and using internal and external standards. For total N concentration, 1.5 mg of fine powder were analyzed by using continuous flow isotope mass spectrometry (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). An x-ray-fluorescence spectrometer (XEPOS, Ametek, Berwyn, PA, United States) was used to quantify Cl, Si, and Al (Aluminum) from calibration curves from approximately 1 g of dry weight powder.

The quantity (Q) of each element in each harvested tissue (i) was calculated using the following equation:

$$Q = E_{i_D} \times DW_{i_D} \quad (1)$$

where E is the elemental concentration (ppm) in a given tissue i, at each harvest day D (D_0 or D_{22}) and DW is the corresponding dry weight.

The net uptake (NU) of a given nutrient during one specific deficiency, i.e., between D_0 and D_{22}, can be estimated by the following equation:

$$\mathrm{NU} = \sum_{i=1}^{n} Q_{i_{D22}} - \sum_{i=1}^{n} Q_{i_{D0}} \quad (2)$$

where Q is the amount of an element at day D of the plant tissue i, with n corresponding to three (roots, OLBs, and YLBs) or five (roots, OLBs, OPs, YLBs, and YPs) tissue types for wheat and rapeseed, respectively.

In this study, to assess the specific effect of a given deficiency, some of the results were expressed relative to control, using the ratios: $\frac{E_{deprived}}{E_{control}}$ or $\frac{NU_{deprived}}{NU_{control}}$

RNA Extraction, Reverse Transcription (RT), and Quantitative PCR (q-PCR) Analysis

In order to evaluate the potential for modulation of *BnaIRT1* gene expression by different nutrient deficiencies, total RNA was extracted from 200 mg of fresh root material. Frozen samples were powdered with a pestle in a mortar containing liquid nitrogen. 750 µl of 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 4.3) were added to the root powder and vortexed for 40 s. After addition of 750 µl of chloroform/isoamyl alcohol (24/1; v/v), the mixture was centrifuged at 15,000 × *g* for 5 min at 4°C. The supernatant was recovered and transferred into 750 µl of 4 M LiCl solution (w/v) and stored at 4°C overnight. Then, samples were centrifuged at 15,000 × *g* for 20 min at 4°C. The supernatant was eliminated and the pellet was suspended in 100 µl of sterile water. Extracted RNA was purified with an RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Quantification of total RNA was assessed with spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France).

A 1 µg of total RNA was converted to cDNA with an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) for reverse transcription (RT). cDNA was diluted at 100×.

For quantitative PCRs (q-PCRs), 11 µL of Master Mix was prepared with 0.5 µM of primers, SYBR Green 2× (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) and 2 µL ultrapure water before adding 4 µl of diluted cDNA and using a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). The three incubation steps in the program were: (i) activation at 95°C for 3 min; (ii) 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 s; (iii) and an extension step at 60°C for 40 s. For each pair of primers, the amplification specificity was monitored by the presence of a single peak in the melting curves within the thermocycler program and by sequencing the q-PCR product (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France). After primer validation, the relative expression of the genes in nutrient deficiency samples was compared with the control sample and calculated with the delta Ct (ΔΔCt) method (Livak and Schmittgen, 2001): relative expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ with Ct corresponding to the threshold cycle determined for each gene in the exponential phase of PCR amplification,

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{control} \text{ and}$$

$$\Delta Ct = Ct_{target\ gene} - Ct_{reference\ gene}.$$

For q-PCR amplification the following primers were selected: *EF1* (Forward: 50-GCCTGGTATGGTTGTGACCT-30; Reverse: 50-GAAGTTAGCAGCACCCTTGG-30) and *18sRNA* (Forward: 50-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG-30; Reverse: 50-GTACTCATTCCAATTACCAGAC-30) as housekeeping genes. *BnaIRT1* (Forward: 50-GCGTCAAGATGCAGATCAAGTGTT-30; Reverse: 50-GTTTTGAGTTCCACAACGAAATCC-30) was the target gene.

Statistical Analysis

Data were based on five independent replicates. Thus, elemental concentration (E; ppm) and quantity (Q; mg or µg) are indicated as the mean ± SE (standard error) for n = 5. For each nutrient, net uptake (NU) is given as the mean ± SE for n = 25, considering all random subtractive combinations of nutrient quantity between five replicates at D_{22} and D_0, according to the previously indicated Eq. 2.

Statistical analyses were performed using R software (version 3.5.1: R Core Team, 2019) and RStudio (version 1.3.959: RStudio Team, 2020). Significant differences among all treatments were established using the non-parametric Kruskal–Wallis test and the significant difference of the means between control and a specific

mineral deprivation were determined using the non-parametric Wilcoxon test. The Dunn's *post hoc* test was used for multiple comparisons of groups, especially to compare the accuracy level of the four PLS-DA prediction methods cited below. Heatmaps were generated using the gplots package (version 3.0.1.1) with a color gradient representing values relative to control plants between 0.2 (blue = low) and 5 (orange = high). Blank cells in the heatmaps corresponded to non-significant variations relative to control plants.

Multivariate analysis methods offer the ability to reduce the dimension of large data, where the number of variables (i.e., genes, proteins, metabolites or the elements tested here) widely exceeds the number of samples, via new variables (components) defined as combinations of all the original variables. The purposes here were: (i) to study whether the ionome could be a relevant tool to reveal plant nutritional status and whether or not it possesses enough information for multiclass predictions; (ii) and to detect ionomic signatures for each deficiency, highlighting the weight of each element in these signatures. For this purpose, data from this study about micronutrient and beneficial element deprivations, as well as data from a companion paper (Courbet et al., 2021) dealing with macronutrient deprivations were used in the following steps.

After preliminary principal component analysis (PCA) to guide the modeling strategy, a PLS-DA model was used following the steps described in **Figure 1** using the mixOmics R package (version 6.3.2) (Lê Cao et al., 2009; Rohart et al., 2017; Hervé et al., 2018) and the R caret package (version 6.0) (Kuhn, 2008). In this supervised classification method, the response variable Y is a class vector indicating the class of each sample (i.e., here the deprived element = deficiency). X is a matrix of predictors, composed here by the element raw concentration (ppm). The aim of the PLS-DA is to predict the class of new test samples based on a trained classification model (Rohart et al., 2017). Thus, the following process was repeated ten times.

The dataset (X) was randomly split into a training set (X′ training) and a test set (X′ test) (80/20 percentage, respectively) to limit overfitting and/or over-optimistic classification results (Brereton, 2006; Gromski et al., 2015), while keeping the original sample by class proportion in balance. This test set was used in the last prediction step by the PLS-DA model, using four different datasets: (i) using all data available (named thereafter method A) or, for exploratory purposes with a truncated test set of data ($X'_{truncated}$ test) where (ii) the concentration of the deprived element was not considered (B), or (iii) only the concentration of macroelements were kept (C), or (iv) only the concentration of the deprived element was kept (D). The classification model was built using a five-fold and 50-repeat cross validation (CV) (Rohart et al., 2017) on centered and scaled data (because of the large differences in element concentration between macronutrient, micronutrient and beneficial nutrients). The optimal number of latent variables to retain was chosen based on the lowest classification error rate (CER) using the Mahalanobis distance calculation. The final PLS-DA model was used to predict classes

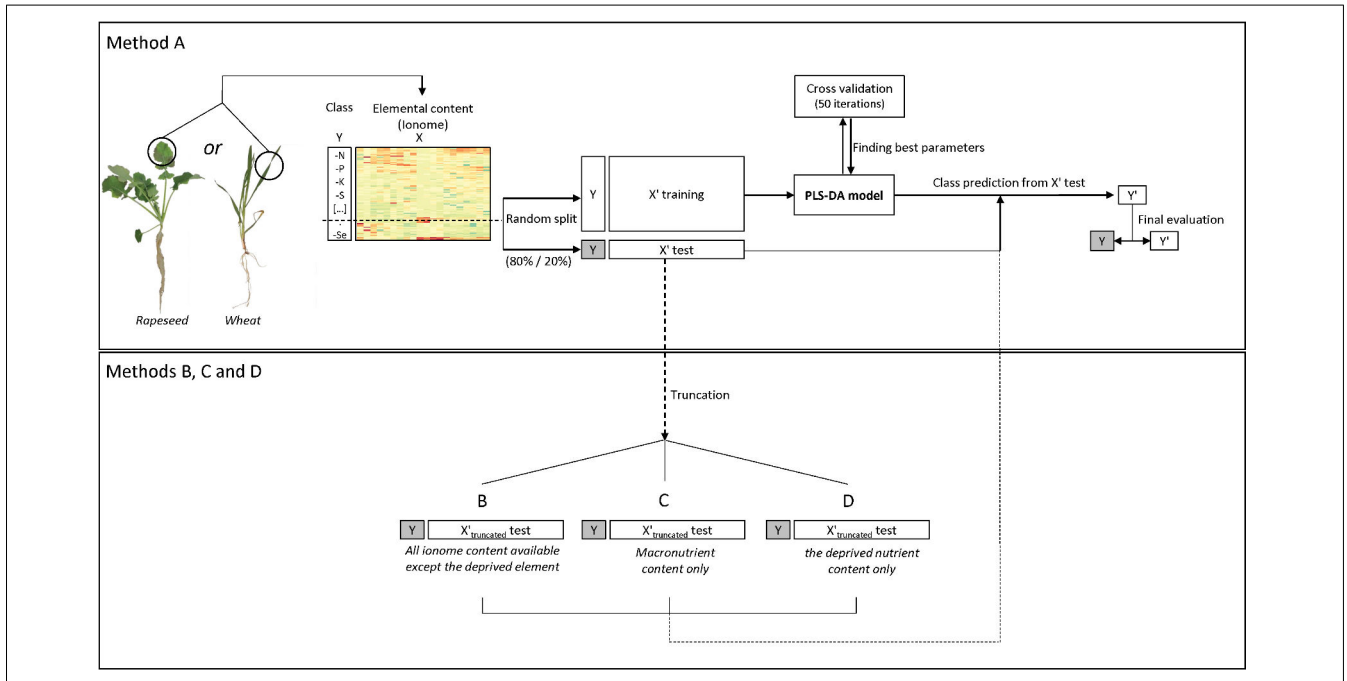


FIGURE 1 | Flow diagram of the ionomic data analysis procedure using the PLS-DA model. The dataset containing the elemental concentrations (i.e., the ionome) (X) and deficiency classes (Y) was randomly split ten times into a training set and a test set (80/20 percent, respectively). Each time a five-fold and 50 repeat cross validation on the PLS-DA was used to measure model performance and find the best parameters (i.e., latent components to be retained) for class prediction. Thereafter a confusion matrix was used to assess prediction quality and the results were averaged after running the analysis ten times. Four methods and associated datasets were used (A) all ionomic data, (B) all ionomic data except the deprived nutrient, (C) macronutrient ionomic data, and (D) the deprived nutrient data.

(Y′) from the test set "X′ test" and to build a confusion matrix for comparison with real deficiency classes (Y) (**Figure 1**).

After the ten replication steps, averages were generated of the overall model prediction accuracy, the sensitivity (proportion of individuals predicted in a class that are correctly identified) and the specificity (individuals predicted as not belonging to a deficiency which does not actually belong to this deficiency) for each predicted class (deficiency). The variable importance in projection (VIP) of each predictor (i.e., element) contributing to determination of the predicted class (deficiency) was used to highlight specific ionomic signatures of the plant nutritional status. Hierarchical clustering on principal components (HCPC) with the Ward criterion was performed with the FactoMineR R package (version 1.41) to explore similarities between signatures.

Lastly, in order to validate the process and thus the results generated in this study, an external dataset was used for a supplemental validation. Consequently, the dataset generated by this experiment and the companion paper Courbet et al. (2021) was used following the same process, training a PLS-DA model to predict deficiency classes from the hydroponics experiments of Maillard et al. (2016a) where *B. napus* was grown under hydroponic conditions and included data for N, Mg, P, S, K, Ca, B, Mn, Fe, Cu, Zn, and Na.

RESULTS

Root and Shoot Biomass

A 22-day deprivation of one of the micronutrients or beneficial elements had no effect on root or shoot biomass in either rapeseed or wheat (**Figure 2**), no visual symptoms causes by deficiency were recorded and photosynthetic activity was unchanged (unshown data) compared to the respective control plants. The only exception was found for rapeseed, which when subjected to B deprivation, demonstrated significant reduction in root dry weight, while the shoot biomass was only slightly lowered in comparison to control plants (not significantly). Micronutrient or beneficial element deprivations over the 22 days did not interfere with growth and thus growth was not considered as an explanatory variable.

Relative Root Nutrient Content Under Micronutrient and Beneficial Nutrient Deprivation

The relative root nutrient content (RRNC) corresponding to the ratio of roots to total plant content is given in **Figure 3**. First of all, the RRNC of N and S were unaffected by any of the nutrient deprivations in both species, which was also the case for K and Cl in wheat and Al and Se in rapeseed. Generally, the RRNC of the nutrient that was deprived was usually reduced compared to control plants, indicating that translocation from the roots to the shoots was favored. This was the case for nearly all nutrients except for B in both species. About 12 and 36% of B was kept in the roots under B deprivation versus 7 and 18% in control rapeseed and wheat, respectively. Moreover, under B deprivation, it should be noted that the root biomass was significantly reduced in rapeseed (**Figure 2**) leading to a lower root to whole plant biomass ratio (**Figure 3B**). In rapeseed, the RRNCs of individual nutrients were either unaffected or decreased by micronutrient or beneficial deprivation (**Figure 3**), with the exception of Na deprivation (increase of RRNC of P, Ca, Fe, Cu, Zn, and Si). This general trend can be illustrated for example under B (reduced RRNC of Mg, P, K, Fe, Ni, Cu, Zn, and Na) or Fe (reduced RRNC of Mg, Fe, Ni, Cu, Mo, and Co) deprivations. The trend was slightly different in wheat as there were greater increases in some RRNCs following deprivation of a specific micronutrient or beneficial nutrient. For example, under Si deprivation in wheat (**Figure 3A**), the relative root contents of Mg, P, Ca, Fe, Ni, Zn, Mo, Na, V, and Co were significantly higher than in control plants. In both species, under Na deprivation, the relative root contents of Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, and Si were significantly higher than in control plants. Overall, the results show that the RRNC was not only a function of the root to whole biomass ratio as it can be significantly affected by the availability of some micronutrient or beneficial mineral nutrients.

Relative Net Uptake of Mineral Nutrients and Their Concentration in Plant Tissues

The root uptake of nutrients, expressed relative to the uptake measured in control plants (**Figure 4**) was significantly affected under micronutrient or beneficial nutrient deprivation in both species, although with opposite trends in rapeseed (general decreases) and wheat (general increases). Overall, 103 negative and 14 positive interactions were found in rapeseed versus 46 and 99, respectively, in wheat.

Firstly, for most treatments, nutrients that were deprived had a relative net uptake close to 0, except for Si and Se for which some traces were probably found in the water used to make the nutrient solutions. For these elements, deficiency should be the consideration rather than deprivation. In wheat, the nickel-deprived treatment showed no significant decrease in net Ni uptake compared to control plants, so the Ni deprivation results must be considered with caution.

Secondly, positive interactions affecting both species were observed, such as Fe deprivation, which increased the uptake of Ni, Cu, Zn, and Co. This was also the case under Na deprivation during which Fe uptake was also strongly increased (**Figure 4**). Since the assumption is that a root transporter encoded by the *BnaIRT1* gene takes up these nutrients, the expression of this gene has been quantified in rapeseed roots (**Figure 5**). The root expression of *BnaIRT1* was strongly and significantly increased under Fe, B, Na, Zn, Ni, and Mo deprivations, by 83, 8, 7, 6, 3.8, and 2.7 fold, respectively, relative to control plant roots. However, under Fe and Na deprivations only, this stronger expression led to an increase in root uptake of the above-mentioned nutrients in rapeseed roots (**Figure 4A**). Consequently, for Fe-deprived rapeseed plants, the concentrations of Ni, Cu, Zn, and Co were increased in roots and also in YLBs and OLBs (**Figure 6A**). The same trend was found under Na deprivation, but unlike the –Fe

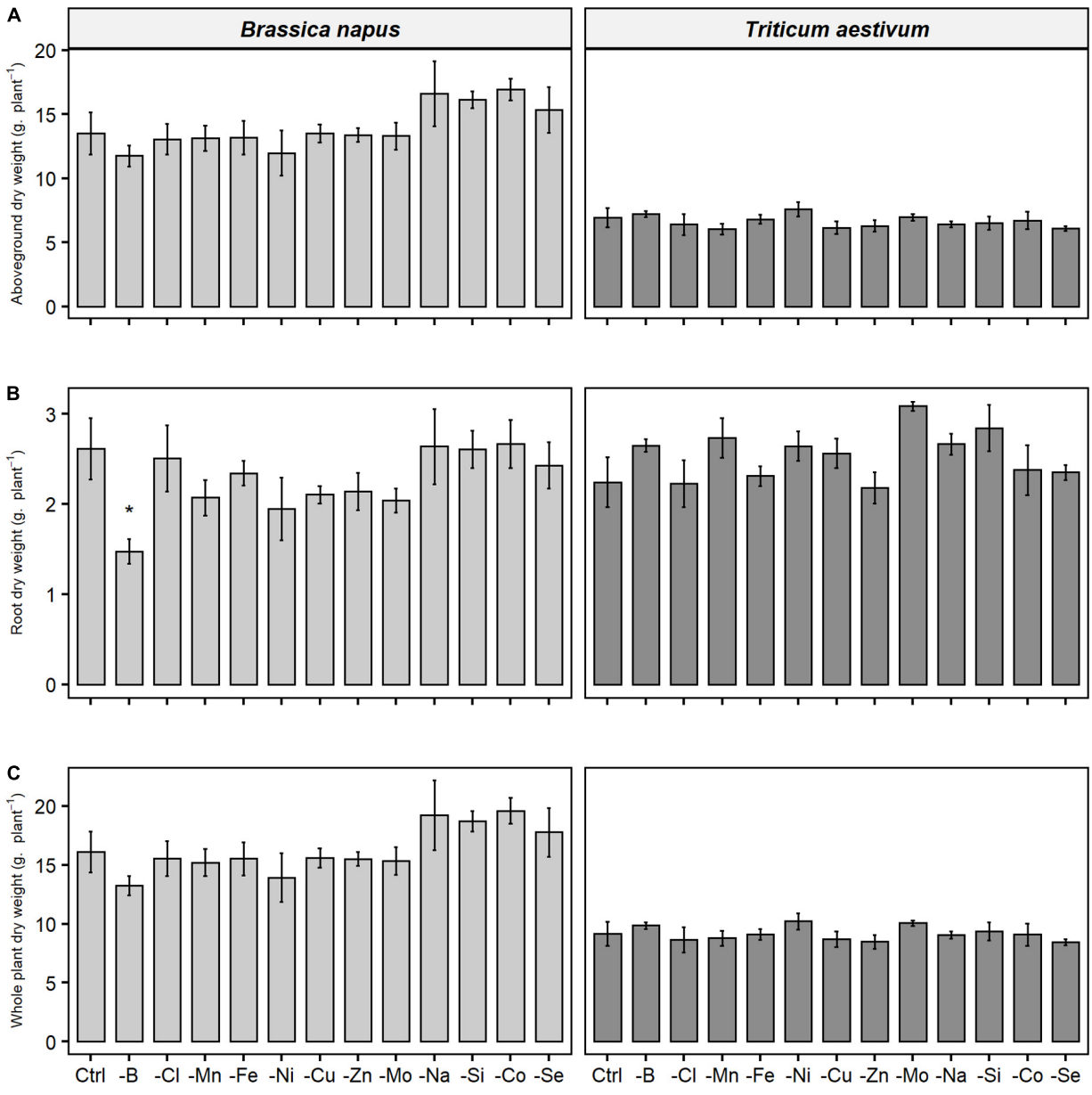
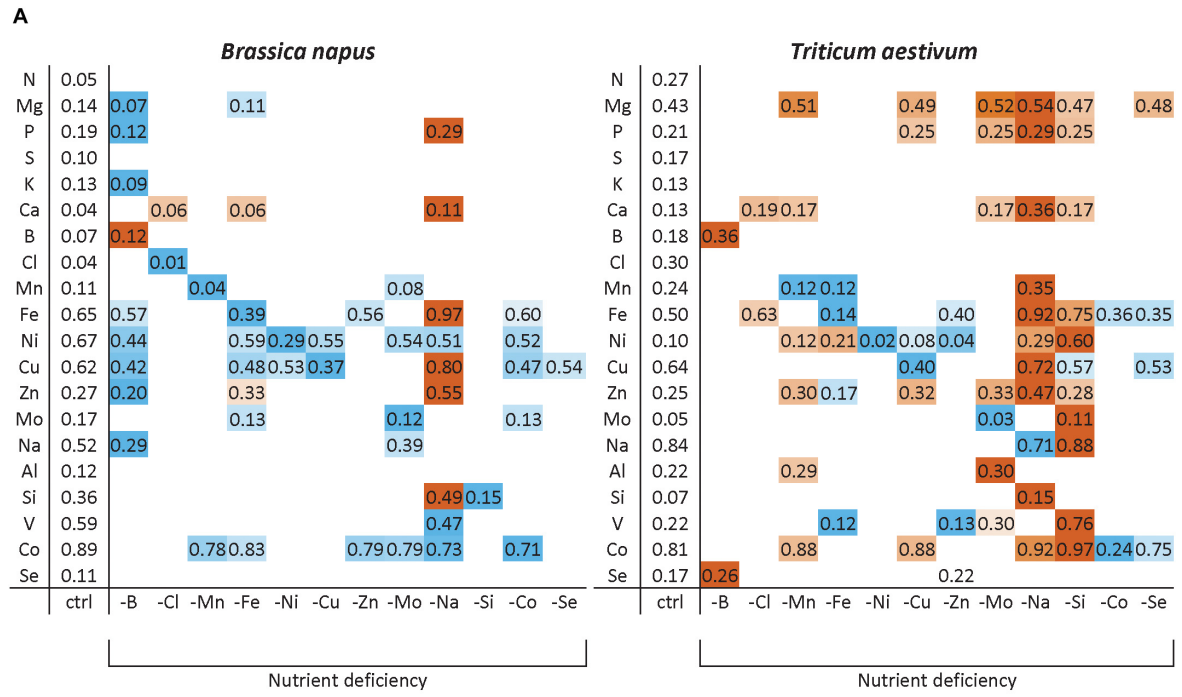


FIGURE 2 | (A) Aboveground, **(B)** root, and **(C)** whole plant dry weight of *B. napus* and *T. aestivum* plants after 22 days of micronutrient or beneficial nutrient deprivation under hydroponic conditions. Data are given as the mean ± SE (n = 5) and significant differences between control and nutrient-deprived plants are indicated as follows: *, $p < 0.05$.

treatment, these elements were mainly accumulated in roots (**Figures 3**, **5**). While the IRT1 expression in wheat roots was not quantified, it is possible that the same increase in gene expression occurred on the basis of the similar increased root uptake (**Figure 4B**) and tissue concentrations (**Figure 6B**) of Cu, Zn, and Co.

In wheat, a general trend for an increase in the uptake of most nutrients (see for example, Mg, S, Ca, or Cl uptake in **Figure 4B**) was found under most deprivation conditions and thus concentrations of macronutrients (except N), micronutrients and beneficial nutrients in roots, YLBs and OLBs (**Figure 6B**) increased, with the strongest trend in roots. Finally, the tissue concentrations (**Figure 6**) clearly showed that while Na deprivation strongly increased *BnaIRT1* expression in rapeseed (**Figure 5**), and the associated increased Fe uptake found in both species (**Figure 4**), the increased Fe concentration was only observed in the roots of rapeseed and wheat (**Figure 5**). This is perfectly in line with the higher Fe RRNC previously reported under Na deprivation (**Figure 3**), amounting to 97 and 92% in rapeseed and wheat, respectively, which was higher than the 65 and 50% recorded in controls of the two species, respectively. Similarly, a higher retention of Ca, Cu, Zn, and Si



B

	control	-B	-Cl	-Mn	-Fe	-Ni	-Cu	-Zn	-Mo	-Na	-Si	-Co	-Se
Brassica napus	0.17 ±0.05	0.11 ±0.03	0.16 ±0.03	0.14 ±0.02	0.15 ±0.02	0.14 ±0.02	0.14 ±0.01	0.14 ±0.03	0.13 ±0.01	0.14 ±0.01	0.14 ±0.01	0.14 ±0.02	0.14 ±0.01
Triticum aestivum	0.24 ±0.01	0.27 ±0.02	0.26 ±0.01	**0.31 ±0.01**	0.25 ±0.002	0.26 ±0.02	**0.3 ±0.01**	0.26 ±0.01	**0.31 ±0.02**	0.29 ±0.02	**0.3 ±0.01**	0.26 ±0.02	0.28 ±0.01

FIGURE 3 | Relative root nutrient contents (RRNC) of *B. napus* and *T. aestivum* plants after 22 days of micronutrient or beneficial nutrient deprivation **(A)**. The RRNC was calculated as the ratio of nutrient content in roots/entire plant. A color gradient for large increases (red) or decreases (blue) in the RRNC are given only if they were significantly different from control plants for $p < 0.01$. The ratios of root biomass/whole plant biomass **(B)** are also given as the mean ± SE. for comparisons with RRNC, and only the values indicated in bold differ significantly from control plant biomass.

in roots obviously occurred under Na deprivation in both species (**Figures 3**, **4**).

Plasticity and Specificity of the Ionome Composition When Exposed to Mineral Nutrient Limitation

The PCA of the entire elemental raw concentration is presented in **Figure 7** with scatter plots of individuals colored by species (**Figure 7A**) or tissue (**Figure 7B**). On the first components, PC1 and PC3, which respectively explained 28 and 12% of the total variance, individuals of rapeseed and wheat (**Figure 7A**) as well as the tissues within each species (**Figure 7B**) were well discriminated (results on PC1 and PC2 are available in **Supplementary Data 2**). Loading vectors (i.e., the multivariate regression coefficient) indicating the importance of each element in component 1 (**Figure 7C**) suggested that the species-related discrimination was driven by Ca, B, Se, and S concentration in particular. On other hand, nutrients such as Mn, Si, K, and Mo, among others, contributed toward discriminating the different tissues analyzed (**Figure 7D**). This was supported by the elemental concentrations quantified in all tissues of both species (see **Supplementary Data 3**). These results led to an ionome analysis strategy that considered each tissue within each species independently.

The prediction accuracy is presented in **Table 1** of the four methods of deficiency predictions that briefly considered a test set with all nutrients available for prediction (A), all nutrients available except the deprived nutrient (B), only macronutrients (C), or only the deprived nutrient (D). Overall, deficiency predictions by PLS-DA models for both species and all tissues were significantly more accurate in method A where all elements of the functional ionome were available (**Table 1**). For all predictions, the B method decreased the accuracy significantly compared to method A, indicating the deprived element weighting in the deficiency characterization. Further, all D method prediction results were significantly less accurate than the B method for wheat, and in most of the cases for rapeseed (except OPs and roots). Thus, the D method in its consideration of only the deprived element did not manage to reach the same level of prediction accuracy as the other elements (B) or the entire available ionome (A). Surprisingly

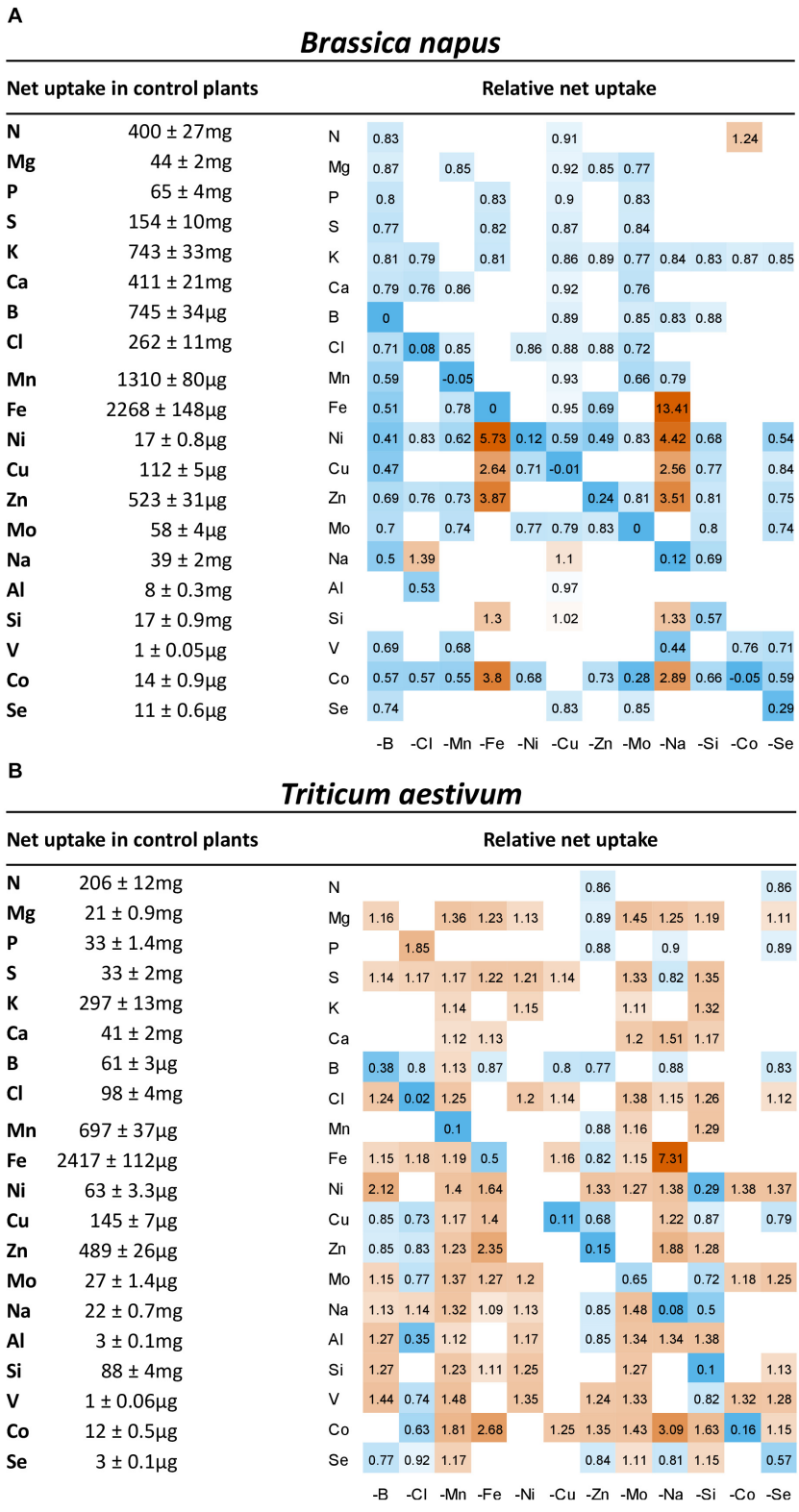


FIGURE 4 | Heatmap of relative net uptake by **(A)** *B. napus* and **(B)** *T. aestivum* plants after 22 days of micronutrient or beneficial nutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative net nutrient uptake was calculated (see section "Materials and Methods") as the ratio of nutrients taken up by deprived plants/nutrients taken up by control plants. Only values significant for $p < 0.05$ are given, with the color gradient indicating values relative to control plants between 0.2 (blue = low) and 5 (orange = high). Blank cells in heatmaps corresponded to non-significant variations in net uptake compared to control plants.

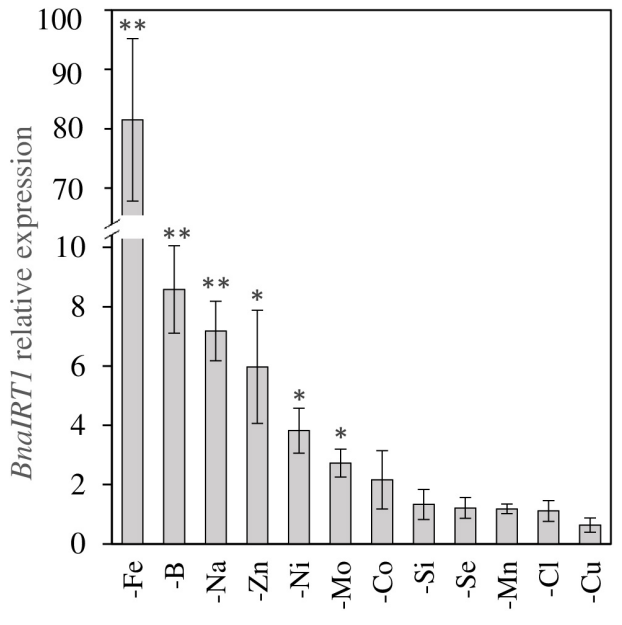


FIGURE 5 | *BnaIRT1* gene expression relative to control plants in roots of *B. napus* subjected to micronutrient or beneficial nutrient deprivation for 22 days. Values are given as the mean ± SE (n = 5) and significant differences between control and nutrient-deprived plants are indicated as follows: $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$.

for rapeseed, the prediction method based on the availability of all macronutrients (C) reached significantly lower accuracy compared to the process that considered only the deprived element (D). On other hand, results from methods C and D for wheat did not differ significantly. Consequently, the results were significantly more accurate with the addition of microelements (B) compared with the assessment using only the macronutrients (C).

For rapeseed in method A, the accuracy level did not differ significantly between all the tissues, even though the accuracy level obtained from root samples was lower. Young tissue grown during deficiency (YLBs and YPs) showed the highest level of accuracy. In contrast, in wheat the root samples allowed good prediction accuracy, whereas OLBs seemed to be the least relevant tissue for prediction with a significantly lower level of accuracy (**Table 1**).

Since the prediction results achieved from aboveground tissues were accurate for both species (**Table 1**), especially tissues that grew during deficiency, and also taking their harvest feasibility into consideration, YLBs seemed the most relevant for deficiency prediction. YLBs were therefore chosen to evaluate the predictions of PLS-DA models on micronutrient and beneficial element deprivation datasets from this study and macronutrient deprivations from the Courbet et al. (2021) companion paper. Finally, a supplemental validation was made that tested the PLS-DA prediction on an external validation dataset from Maillard et al. (2016a).

Thus, the sensitivity and specificity resulting from PLS-DA predictions for each class (deprived or control) are presented in **Table 2** and the remaining tissues are available in the **Supplementary Data 4**. Overall, most of the deficiency classes were well classified and reached a sensitivity and specificity close or equal to one. It must be noted that Ni deficiency was the only exception for both species and reached only a 0.4 sensitivity, indicating that only 40% of nickel-deprived individuals were predicted as –Ni. The PLS-DA model was also good at predicting control plants from the D_{22} harvest and the harvest undertaken at D_{10} in the macronutrient deprivation experiments described in Courbet et al. (2021). The sensitivity and specificity was close to one for control treatments (except for D_{22} wheat where sensitivity only reached 0.8), which suggested that the elemental content allowed discrimination of control individuals from two time-separated harvests, and this indicated that ionome composition is also linked to the developmental stage.

Lastly, serving as supplemental validation, a PLS-DA model previously trained on YLBs sample data associated with the Courbet et al. (2021) companion paper, was used to predict the deficiency classes of the Maillard et al. (2016a) samples and led to accurate predictions for −N, −Mg, −P, −S, −K, −B, −Mn, and −Zn-treated plants (**Table 2**). A bias resulting from higher concentrations of Mo, Ca, and Fe in the nutrient solution used by Maillard et al. (2016a) led to incorrect classification of plants subjected to Mo, Ca, and Fe deprivations.

Remaining treatments involving Cl, Ni, and beneficial nutrient deficiencies were not available.

In order to highlight the elements that contributed most to discriminating each deficiency in the PLS-DA on YLBs samples, grayscale heatmaps representing VIP are represented in **Figure 8**. Elements with a VIP greater than one were considered relevant for deficiency characterization when a clear pattern could be extracted from the PLS-DA. Overall, the obtained results were a good reflection of previous observations of YLBs content (**Figure 6**), indicating that concentration variations were specific enough to distinguished deficiencies from each other. As already described in **Table 1**, microelements seemed to be frequently retained as important elements and highly participate to establish a specific signature for each deficiency (**Figure 8**).

Hierarchical clustering on the VIP for wheat brought all of the macronutrient deprivation treatments closer. In contrast, for rapeseed the −Ca and −S patterns differed from the −K-N cluster and –P, indicating that for this species, macronutrient deprivations led to more specific ionome variations. As previously described for YLBs content, micronutrient deprivation in rapeseed caused fewer significant variations compared to wheat (**Figure 6**), limiting the identification of clear signature patterns in the PLS-DA components. Nevertheless, specific signatures for Mn, Fe, Zn, Na, Si, and Se deficiency for both species, plus Cl, Cu, and Mo for wheat were highlighted thanks to the PLS-DA approach. In addition, the rapeseed −Fe and wheat −Si treatments, whose global contents stand out from among the other treatments (**Figure 6**), showed strong signatures composed of a lower number of elements than the other deficiencies (**Figure 8**). On the other hand, although some signatures were composed of larger numbers of elements, some of them contained higher VIP scores, such as Na in K-deprived plants for both species (**Figure 8**).

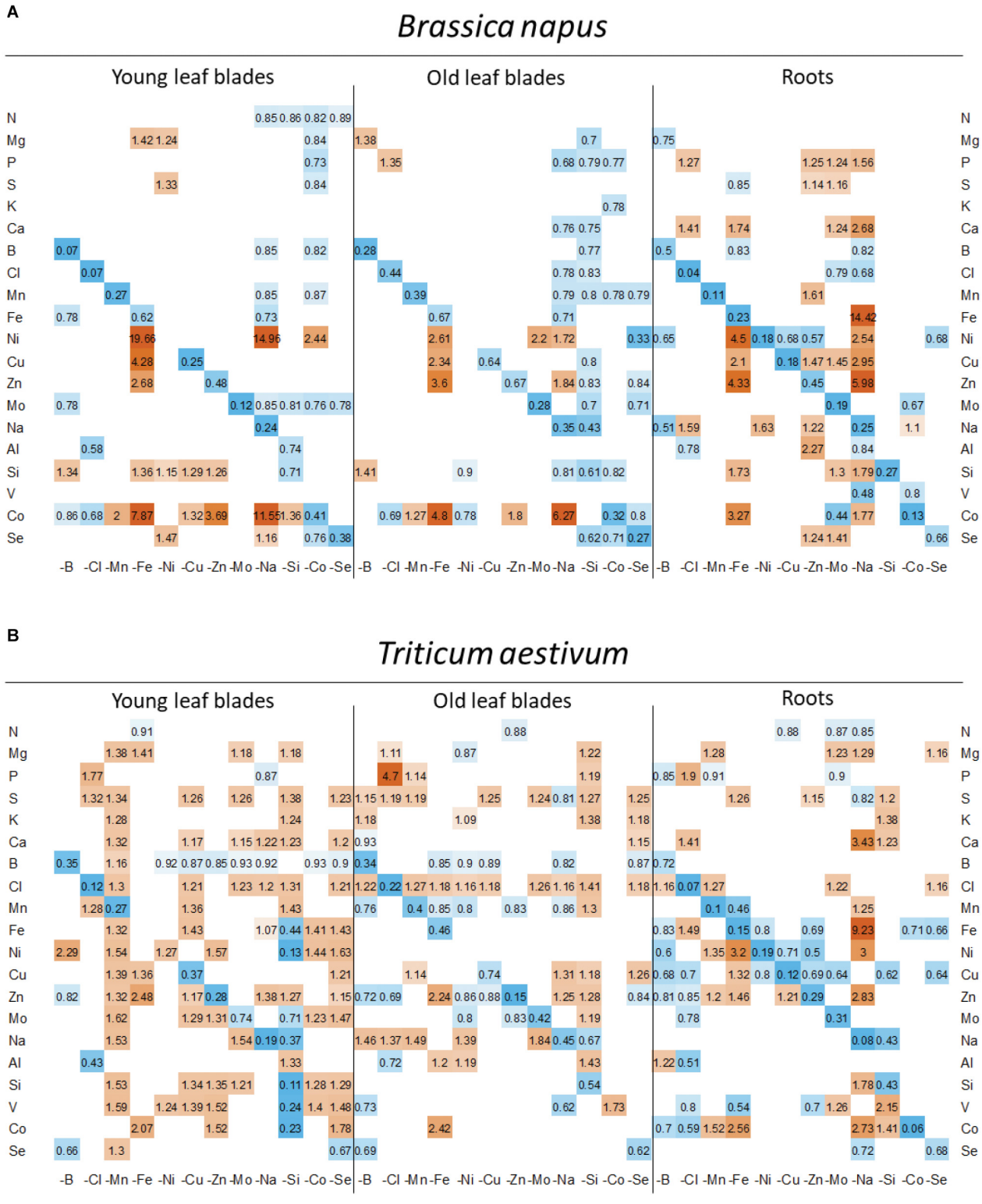


FIGURE 6 | Heatmap of relative mineral nutrient concentrations in **(A)** *B. napus* and **(B)** *T. aestivum* plants after 22 days of micronutrient or beneficial nutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative mineral nutrient concentration was calculated (see section "Materials and Methods") as the ratio of the nutrient concentration in deprived plants/nutrient concentration in control plants. Tissues developed before or after the beginning of deprivation (D_0) are indicated as "young leaf blades" (YLBs) and "old leaf blades" (OLBs), respectively. Only values significant for $p < 0.05$ are given, with the color gradient indicating values relative to control plants between 0.2 (blue = low) and 5 (orange = high).

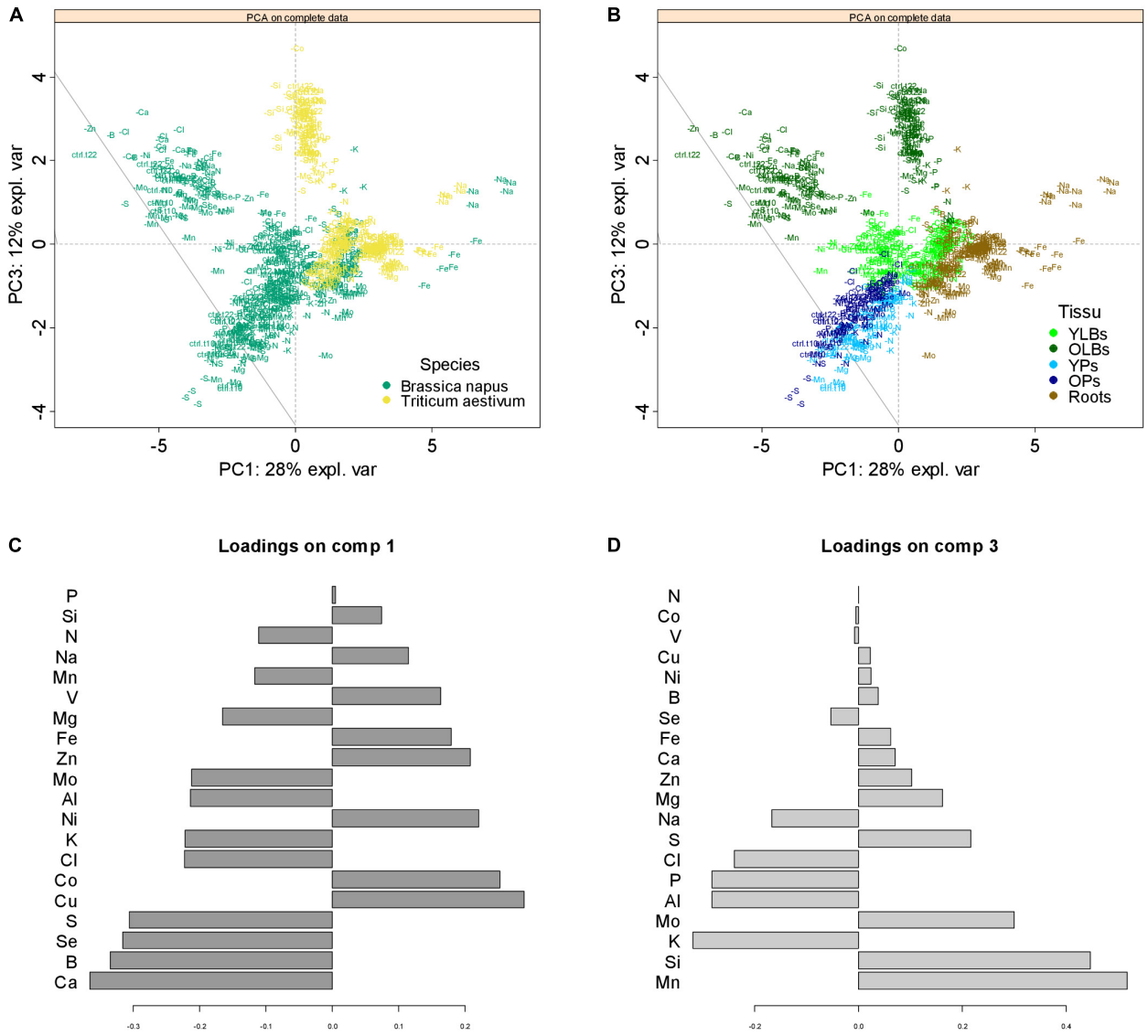


FIGURE 7 | Principal component analysis (PCA) score plots of the complete elemental content data. Projection of the data onto the subspace spanned by components 1 (PC 1) and 3 (PC3), which are colored according to species **(A)** or tissue **(B)**, with each individual labeled with its treatment class (control or deprived plant). The contribution plots **(C,D)** depict the importance of each element in component 1 and 3, respectively, the bar length representing regression coefficients with either positive or negative signs. Variables are ranked by decreasing importance starting from the bottom.

Within signatures, these elements thus contributed toward discriminating similar deficiencies.

In some cases, the deprived element was not found in the ionomic signature of its own deficiency, which was the case for −Fe in both species and −Zn in rapeseed (**Figure 8**). This could be explained by a low variation in the deprived element concentration in YLBs (**Figure 6**). Consequently, the ionomic signature seemed to be described as a qualitative ionomic variation, looking for elements contributing the most to discrimination, and associated with quantitative variations in concentrations of targeted elements. Finally, no specific ionomic signatures were found for the B, Co, and Ni deficiencies in either species or for Mg, Cl, and Mo deficiencies in rapeseed (**Figure 8**). Although they were well predicted (**Table 2**), these deficiencies showed too many similarities in their signatures with other deficiencies.

DISCUSSION

The Ionome Discriminates Species, Tissues and Most Nutrient Deficiencies

The ionome appeared to be highly species and tissue dependent (**Figure 7**; Baxter et al., 2012), and the main variables contributing to their discrimination include Ca, B, Se, S, and Si (**Figures 7C,D**). As previously found in the Courbet et al. (2021) companion

TABLE 1 | Overall accuracy percentage of the PLS-DA model predictions (after ten replications) (A) all ionomic data, (B) all ionomic data except the deprived nutrient, (C) the macronutrient ionomic data, and (D) the deprived nutrient data (see section "Materials and Methods" for details).

		Accuracy (%)			
Species	**Tissue**	**A**	**B**	**C**	**D**
B. napus	YLBs	94 a	68 b	29 c	58 b
	OLBs	92 a	60 a	30 b	**37** b
	YPs	95 a	**50** b	21 c	**45** b
	OPs	91 a	58 c	27 d	65 b
	Roots	82 a	**43** b	28 b	**47** b
T. aestivum	YLBs	94 a	61 b	29 c	33 c
	OLBs	**89** a	65 b	27 c	34 c
	Roots	96 a	64 b	32 c	31 c

B. napus and T. aestivum tissues are indicated as follows: young leaf blades (YLBs), old leaf blades (OLBs), young petioles (YPs), old petioles (OPs), and roots.
Percentages with the same letter for each tissue are not significantly different according to the Dunn's test ($p < 0.05$; $n = 10$).
Within each prediction method for each species, a bold value differs significantly from other tissue (from the highest accuracy according to the Dunn's test; $p < 0.05$).

TABLE 2 | Sensitivity and specificity of PLS-DA prediction for each class predicted (control or deprived) in rapeseed and wheat young leaf blade (YLBs) samples after 10 days (D_{10}) of macronutrient deprivation (Courbet et al., 2021) or 22 days (D_{22}) of micronutrient or beneficial element deprivation.

	B. napus		***T. aestivum***		**Maillard et al. (2016a)**	
Class	**Sensitivity**	**Specificity**	**Sensitivity**	**Specificity**	**Sensitivity**	**Specificity**
control D_{10}	0.9	1	1	1	NA	0.91
control D_{22}	0.9	0.98	0.8	0.99	NA	0.84
−N	1	1	1	0.99	1	1
−Mg	1	1	1	1	1	1
−P	1	0.99	1	1	1	1
−S	1	1	1	1	1	1
−K	1	1	1	1	1	1
−Ca	1	1	1	1	0.50	1
−B	1	1	0.9	1	0.75	0.75
−Cl	1	0.98	0.9	1	NA	1
−Mn	1	0.99	1	1	1	1
−Fe	1	1	1	1	0	1
−Ni	0.4	1	0.4	0.99	NA	0.98
−Cu	0.9	1	1	1	0	0.93
−Zn	1	1	1	1	1	1
−Mo	1	1	0.9	0.99	0	0.95
−Na	1	1	1	1	NA	1
−Si	1	0.99	1	1	NA	1
−Co	0.7	0.99	0.9	0.99	NA	0.97
−Se	1	1	1	0.98	NA	0.84

Sensitivity is defined as the ability of the test to correctly identify individuals in a class (i.e., deficiency), whereas specificity measure the test's ability to predict that individuals do not actually belong to a deficiency. Briefly (see section "Materials and Methods"), a random subset of data was extracted (X' test), the remaining data (X' training) was used to train the PLS-DA, and the X' test was used in the last step to compare classes predicted with it by the PLS-DA (Y') from real deprivations applied to plants (Y). Results are presented as the mean (n = 10) from prediction method (A), considering the entire ionome. For supplemental validation purposes, the complete data from this study and a companion paper (Courbet et al., 2021) were used to train another PLS-DA model to try to predict the deficiency membership of rapeseed samples from hydroponic experiments conducted by Maillard et al. (2016a).

paper, rapeseed is characterized here by higher elemental concentrations, particularly B and S, than wheat, in line with previous studies showing that Poales were distinguished by their low Ca, B, and S concentrations relative to Brassicales (Broadley et al., 2004; Neugebauer et al., 2018). Hence, this species discrimination is related to an upper S concentration in Brassicaceae as previously described (Holmes, 1980; Zhao et al., 1993) while it has been shown that dicots require more Ca (Broadley et al., 2003) and B (Hu et al., 1996) for their cell wall composition. In the same way, cultivated Poaceae such as wheat, rice, barley, and maize are assumed to be Si accumulator species (Marschner, 2012) compared to Brassicales considered as low Si accumulators.

Furthermore, our results indicate that each tissue has a different ionome, demonstrating that each tissue should be considered independently within each species to avoid background noise while determining the signature.

We showed, in the purpose of an approach without *a priori*, that taking into account the plant tissue content of the deprived element only, did not allow discrimination of the 18 deficiencies examined in this study (**Table 2**) and in a companion paper (Courbet et al., 2021). In the same way, the sole use of the macronutrient content did not provide an as accurate prediction as a complete ionome assessment (**Table 1**). This was supported by the fact that among the macronutrients, N and P were considered to be poorly informative (Parent et al., 2013a,b). These results provide interesting evidence that combining micronutrients and beneficial elements in the analysis allows accurate identification of each applied deficiency (**Table 2**) and that analysis of the full functional ionome as a whole should be advocated for deficiency diagnosis (Cao et al., 2019). Considering each tissue independently, we also point out that leaves that have grown during the deficiency period (YLBs), and in particular the leaf blades, seem to be the most relevant tissue for the determination of nutritional status (**Table 1**). Indeed, as suggested by Baxter et al. (2008), the leaf ionome is the result of global genotype × environment interactions because it results from biochemical and physiological processes that originate from the roots to the shoots via apoplastic and symplastic transport, as well as vascular translocation and transpiration.

The functional ionome can then be used to design specific signatures of mineral deficiency resulting from physiological processes or to highlight crosstalks. Before any significant growth reduction (**Figure 2**), ionomic variation caused by a single deprived nutrient (**Figures 3–5**) can be considered as an early response. These ionomic variation gives access to a large source of interactions between elements possessing similar chemical properties or biological roles (Baxter, 2015), which in leaves were specific enough to provide deprivation signatures (**Figure 8**). Indeed, thanks to a PLS-DA approach, the whole macronutrient, micronutrient, and beneficial nutrient contents

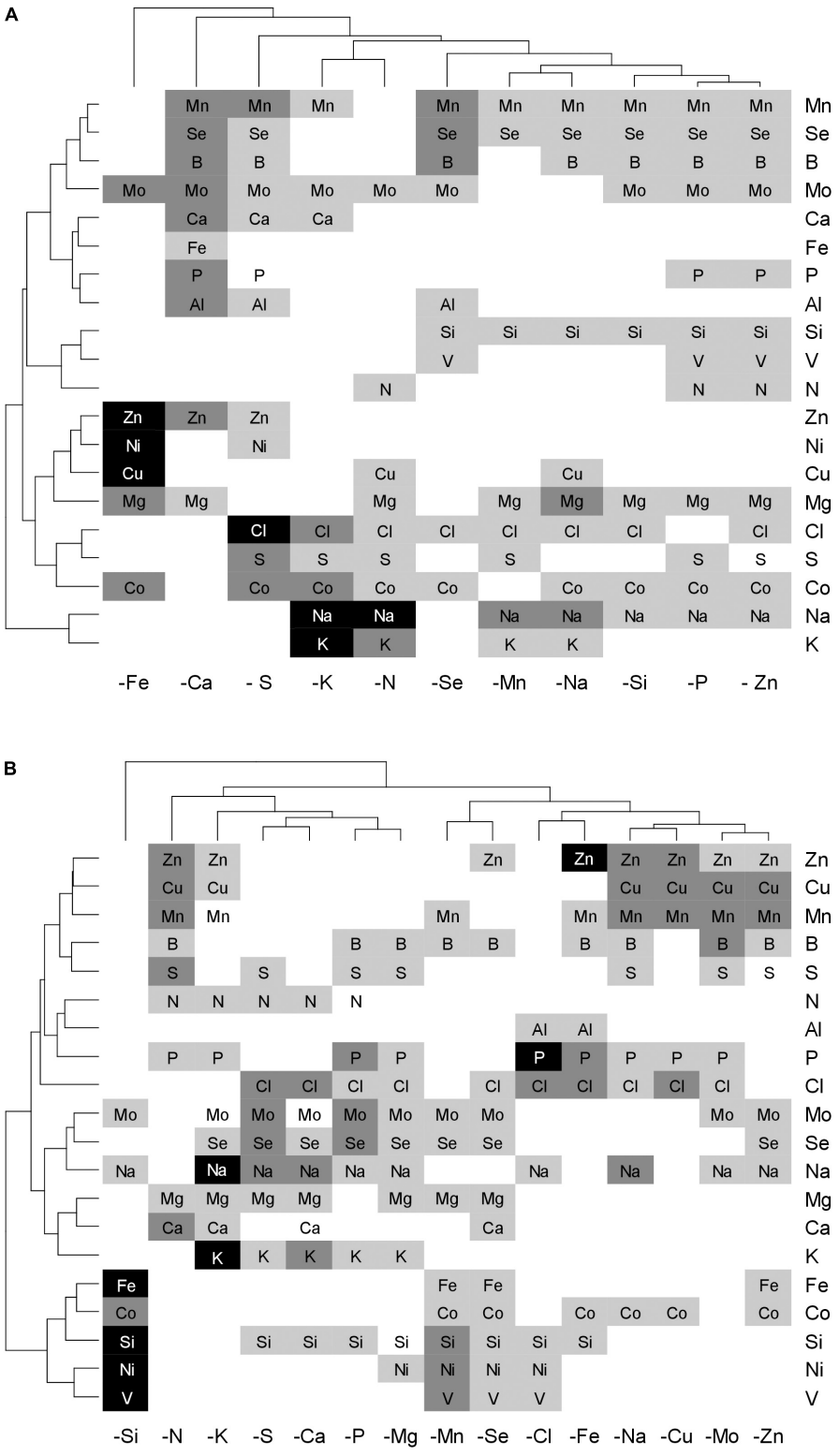


FIGURE 8 | Heatmap of the elements with the highest VIP scores for each deficiency applied to *B. napus* **(A)** and *T. aestivum* **(B)** which were retrieved from the PLS-DA model on YLBs samples. Elements with VIP scores ≥1 are significant (≥1, light gray; ≥1.5, mid gray; ≥2, dark gray) and indicate the importance of each element (X variable) to predict deficiencies (Y). The specific combination of elements and their concentration variation (high or low in tissue) discriminate samples and generate signature.

allows to correctly classified most of the deficiencies (**Table 2**) and to extract the most contributive elements which participate to characterized the specific signatures of N, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, Si, and Se deficiency in both species, as well as Mg, Cl, Cu, and Mo in wheat (**Figure 7**). Si deprivation induces specific ionome variation in both species, nevertheless this signature being much more specific in wheat, which may be related to its Si accumulator behavior.

Leaf Ionomic Signatures Are Determined by Specific Crosstalks, Some Known, Some Still Unknown

In rapeseed, micronutrient or beneficial element deficiency induces an overall decrease in the root uptake of mineral nutrients (**Figure 4**). With the exception of Na-deprived plants, this mainly resulted in the RRNC decreasing or remaining unchanged (**Figure 3**), while the YLBs content (**Figure 6**) showed only a few variations. The fact that only a few variations were measured suggests the existence of compensatory mechanisms, such as remobilization of endogenous reserves from source organs (e.g., mature leaves) to sustain growth of newly developed tissue (Malagoli et al., 2005; Abdallah et al., 2010), because numerous elements are assumed to be highly mobile (Etienne et al., 2018). The weak signal at the leaf level may explain why fewer signatures were found in micronutrient- or beneficial-nutrient-deprived rapeseed than in deprived wheat. Following micronutrient or beneficial nutrient deprivation in wheat, an overall increase in root uptake ultimately led to a global increase in elemental concentrations in YLBs. Hence, changes in the availability of one micronutrient or beneficial nutrient alone can greatly affect the uptake and concentrations of all other nutrients (**Figures 6**, **4**) as well as their root/shoot partitioning (**Figure 3**).

Some deficiency signatures determined here can be explained by interactions that are well known in the literature. For example, because both Na^+ and K^+ are taken up by non-selective cation transporters such as HKT1-type (high affinity potassium transporter) or LCT1 (low-affinity cation transporter) (Schachtman and Liu, 1999), this crosstalk between both elements resulted in a large uptake of Na during K deprivation. Obviously Na, which accumulates in leaves (companion paper Courbet et al., 2021), is then one the most contributive element in −K signature (**Figure 8**).

Under S deficiency, Mo and Se are accumulated in rapeseed (Shinmachi et al., 2010; Maillard et al., 2016b), at least partly because of a strong induction of the expression of genes encoding root sulfate transporters (*Sultr1.1* and *Sultr1.2*). This may be explained by structural similarities among sulfate (SO_4^{2-}), molybdate (MoO_4^{2-}), and selenate (SeO_4^{2-}) that permit them to act as competitive anions for the sulfate transporters (Shinmachi et al., 2010; Schiavon et al., 2012). Hence, these elements were found in the specific signature determined for S deficiency in both species, as was accumulation of Cl. This increased Cl in −S treated rapeseed plants (Sorin et al., 2015) has been attributed to another crosstalk where Cl can partly osmotically replace SO_4^{2-} during S-deficiency-induced remobilization from the vacuole. Additionally, Courbet et al. (2021) observed an increase in root V uptake in rapeseed and wheat subjected to S deficiency, suggesting that sulfate transporters might also take up vanadate (VO_4^{2-}). This was supported by quantification of V in Arabidopsis *sultr1.1* KO mutants and *sultr1.2 sel1-8* mutants. Nevertheless, because this accumulation mainly occurs in roots (Courbet et al., 2021) V therefore did not appear in the foliar −S signature (**Figure 8**). Indeed, the control of root to shoot translocation of elements such as V, which is probably due to the presence of the Casparian strip, may affect the leaf ionomic signature.

Furthermore, Fe, Cu, Mn, and Zn root uptake can be mediated by the iron regulation transporter, IRT1 (Grusak et al., 1999). Under Fe deficiency, an increase in IRT1 expression went hand-in-hand with an increased uptake and leaf accumulation of Mn, Co, Zn, and Cd, which together define a specific signature of the Fe nutritional status (**Figure 8**), as also reported by Baxter et al. (2008). This signature implies that studies focused on shoot Fe content alone might not provide evidence of an Fe deficiency because decreased Fe concentrations in growth media are not associated with fluctuations in shoot Fe content (Baxter et al., 2008), unlike the root Fe content. Consequently, Fe deficiency is an example where changes in content of the deprived element were mainly observed at the root level, whereas the associated leaf signature does not necessarily represent the element in question.

The overexpression of *BnaIRT1* gene observed in roots of *B. napus* plants cultivated under Fe, B, Na, Zn, Ni, and Mo deficiencies relative to the control (**Figure 5**) was concomitant with an increased root uptake of Ni, Cu, Zn, and Co (except when the element is deprived) in −Fe and −Na treated plants alone (**Figure 4**). Although IRT1 was not quantified in wheat and Fe acquisition is not governed by the same processes in dicotyledonous (Strategy I) and graminaceous monocotyledonous plants (Strategy II) (Marschner, 2012), the same trend was observed in both rapeseed and wheat. Na deprivation resulted in high RRNCs (**Figure 3**) and root concentration (**Figure 6**) of Fe, B, Na, Zn, Ni, and Mo but relatively few changes at the leaf level (except for Ni concentration). This suggested a relatively low level of translocation from roots to shoots under Na deficiency compared to Fe deficiency, and control of Cu, Zn, and Co transport via the Casparian strip.

The Casparian strip, which is a selectively impermeable structure made of suberin and lignin deposited by root endodermis cells (Naseer et al., 2012) can block passive flow of water and solutes in the root apoplast and consequently has a crucial role in selection of mineral nutrients in vascular plants (Barberon et al., 2016; Barberon, 2017). It has been shown that suberin accumulation in *A. thaliana* leads to water uptake disruptions coupled with a decrease in Ca, Mn, and Zn accumulation in the shoot (Baxter, 2009). In our results, the amounts of Fe, Cu, and Zn increased in roots but not in leaves in both species in association with an increase in IRT1 relative expression under Na deficiency. This suggested that transport is disrupted, which might be linked to a modification of the suberization of the Casparian barrier.

Finally, the overall results at the root uptake level, ionomic composition and derived signatures suggest multiple crosstalks between other mineral nutrients, but these are currently difficult to explain. The most striking examples concern beneficial mineral nutrients such as Na, Si, Co, and Se. Not only did their deprivation lead to massive changes in ionomic content in most tissues, and especially in wheat (**Figure 6**), they were also identified as elements that contributed to a large proportion of the leaf ionomic signatures (**Figure 8**). Their exact physiological roles in higher plants (particularly in the case of Co and Se) and their interactions with other mineral nutrients will require more focused research. Another example concerns the highly specific ionome signature in Si-deprived wheat for which Ni, Co, V, and Fe concentrations (**Figure 8**) are strongly decreased in young leaves (**Figure 6**). If the contrasted response of both species to Si deprivation could be explained by their opposite Si accumulator behaviors [high and low accumulator for wheat and rapeseed, respectively (Ma and Yamaji, 2006; Ma et al., 2006; Marschner, 2012)], the crosstalks between Si and above cited elements observed in wheat remain unknown and difficult to explain. A last example, as suggested in the companion paper (Courbet et al., 2021) the strong decrease in Na uptake in N- and P-deprived plants in rapeseed and wheat, which also appeared in their respective foliar signatures [supported by data provided by the Ionomic Hub (Salt et al., 2008)], highlights a link between N, P, and Na uptake. Indeed, there may be involvement of H^+ ATPase during active transport of N and P whereby H^+ efflux is coupled to root Na^+ uptake (Courbet et al., 2021), but this remains to be characterized.

CONCLUSION

In conclusion, this study demonstrated that deprivation of a single micronutrient or beneficial nutrient revealed numerous interactions between the mineral nutrients, leading to specific modifications of ionome composition as previously found with macronutrient deprivation. We showed that most mineral deficiencies could be diagnosed from the resulting leaf ionome. Based on the most contributive elements, the ionomic signatures identified at the leaf level are supported by known processes that explain such crosstalks and moreover, provide evidence of numerous unknown interactions that still require exploration. To achieve this, transcriptomic analyses firstly at a global scale and secondly, with a focus on already identified ionomic genes (Whitt et al., 2020), could provide a way to explain ionomic modifications and the associated crosstalks between mineral nutrients. Finally, although we have explored the effects of most mineral deficiencies, other abiotic factors may differentially impact the ionome composition of plant tissues, including those generated by climatic changes. For example, the meta-analysis conducted by Loladze (2014) on FACE experiments showed that elevated CO_2 impacts the plant ionome, mostly by shifting the mineral content downward. A lack of knowledge still exists about the effects of other abiotic stresses on leaf ionomic composition such as high temperatures with or without water deficit (Etienne et al., 2018).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AD'O, GC, AO, SD, PE, MA, and SP conceived and designed the experiments. AD'O, GC, and AL performed the greenhouse experiments and acquired the data. AD'O and GC analyzed the data. AD'O, GC, AO, and SD wrote the manuscript. PE, MA, AM, and SP revised the manuscript content. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work, conducted under the EAUPTIC project, was supported by the Regional Council of Normandy (CRN, grant number 17P07231), The "Fonds Unique Interministériel" (FUI, grant number 3870401/1), and the Centre Mondial de l'Innovation–Roullier Group (CIFRE grant number 2018/0276 to AD'O).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis used in this study, and more particularly, Fanny Leroy, Jéhane Lepoitevin, Frédérine Marie, and Josette Etienne Bonnefoy. The authors thank Dr. Laurence Cantrill for improving the English in this manuscript as well as Julie Levallois for her skillful and efficient help with molecular analysis.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.641678/full#supplementary-material

Supplementary Data 1 | Compositions of the nutrient solutions derived from Hoagland nutrient solution and modified based on Maillard et al. (2016a) in order to grow hydroponic plants with an ionomic composition as close as possible to field observations (data not shown, see Courbet et al., 2021). These solutions were used to expose 22 days *Brassica napus* L. and *Triticum aestivum* to single nutrient deprivations of boron (B), chlorine (Cl), manganese (Mn), iron (Fe), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), molybdenum (Mo), sodium (Na), silicon (Si), cobalt (Co), or selenium (Se).

Supplementary Data 2 | Principal component analysis (PCA) score plots of the complete elemental content data. Projection of the data onto the subspace spanned by components 1 (PC 1) and and 2 (PC2), which are colored by species **(A)** or tissue **(B)** and each individual labeled with is treatment class (control or

deprived plant). The contribution plots **(C,D)** depict the importance of each element in component 1 and 2, respectively, the bar length representing regression coefficients with either positive or negative signs. Variables are ranked by decreasing importance starting from the bottom.

Supplementary Data 3 | Mineral nutrient concentrations of *B. napus* and *T. aestivum* control plants grown for 22 days under hydroponic conditions (D_{22}). Tissues developed before or after D_0 are indicated as "young" or "old" as follows: young leaf blades (YLBs), old leaf blades (OLBs), young petioles (YPs), and old petioles (OPs). Data are expressed in parts per million (ppm) and given as the mean with each replicate (n = 5) corresponding to a pool of two individual plants.

Supplementary Data 4 | Classification parameters of each predicted class for rapeseed and wheat tissues. Results are presented as the mean (n = 10) from prediction method A considering the entire ionomic data (see section "Materials and Methods").

REFERENCES

Abdallah, M., Dubousset, L., Meuriot, F., Etienne, P., Avice, J. C., and Ourry, A. (2010). Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.* 61, 2635–2646. doi: 10.1093/jxb/erq096

Alejandro, S., Höller, S., Meier, B., and Peiter, E. (2020). Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. *Front. Plant Sci.* 11:300. doi: 10.3389/fpls.2020.00300

Allen, L. H. (2000). Ending Hidden Hunger: The History of Micronutrient Deficiency Control. Background Analysis for the World Bank UNICEF Nutrition Assessment Project World Bank. Washington, DC.

Andresen, E., Peiter, E., and Küpper, H. (2018). Trace metal metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* 69, 909–954. doi: 10.1093/jxb/erx465

Barberon, M. (2017). The endodermis as a checkpoint for nutrients. *New Phytol.* 213, 1604–1610. doi: 10.1111/nph.14140

Barberon, M., Dubeaux, G., Kolb, C., Isono, E., Zelazny, E., and Vert, G. (2014). Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8293–8298. doi: 10.1073/pnas.1402262111

Barberon, M., Vermeer, J. E. M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T. G., et al. (2016). Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell* 164, 447–459. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.021

Baxter, I. (2009). Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 381–386. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.002

Baxter, I. (2015). Should we treat the ionome as a combination of individual elements, or should we be deriving novel combined traits? *J. Exp. Bot.* 66, 2127–2131. doi: 10.1093/jxb/erv040

Baxter, I., Hermans, C., Lahner, B., Yakubova, E., Tikhonova, M., Verbruggen, N., et al. (2012). Biodiversity of mineral nutrient and trace element accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 7:e35121. doi: 10.1371/journal.pone.0035121

Baxter, I. R., Vitek, O., Lahner, B., Muthukumar, B., Borghi, M., Morrissey, J., et al. (2008). The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12081–12086. doi: 10.1073/pnas.0804175105

Billard, V., Ourry, A., Maillard, A., Garnica, M., Coquet, L., Jouenne, T., et al. (2014). Copper-deficiency in brassica napus induces copper remobilization, molybdenum accumulation and modification of the expression of chloroplastic proteins. *PLoS One* 9:e109889. doi: 10.1371/journal.pone.0109889

Bittner, F. (2014). Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Front. Plant Sci.* 5:28.

Brereton, R. G. (2006). Consequences of sample size, variable selection, and model validation and optimisation, for predicting classification ability from analytical data. *TrAC Trends Anal. Chem.* 25, 1103–1111. doi: 10.1016/j.trac.2006.10.005

Broadley, M. R., Bowen, H. C., Cotterill, H. L., Hammond, J. P., Meacham, M. C., Mead, A., et al. (2003). Variation in the shoot calcium content of angiosperms. *J. Exp. Bot.* 54, 1431–1446. doi: 10.1093/jxb/erg143

Broadley, M. R., Bowen, H. C., Cotterill, H. L., Hammond, J. P., Meacham, M. C., Mead, A., et al. (2004). Phylogenetic variation in the shoot mineral concentration of angiosperms. *J. Exp. Bot.* 55, 321–336. doi: 10.1093/jxb/erh002

Cao, Y., Ye, S., and Yao, X. (2019). Leaf ionome to predict the physiological status of nitrogen, phosphorus, and potassium in *Camellia oleifera*. *Pak. J. Bot.* 51, 1349–1355.

Courbet, G., D'Oria, A., Lornac, A., Diquélou, S., Pluchon, S., Arkoun, M., et al. (2021). Specificity and plasticity of the functional ionome of Brassica napus and Triticum aestivum subjected to macronutrient deprivation. Front. Plant Sci. 12. doi: 10.3389/fpls.2021.641648

Courbet, G., Gallardo, K., Vigani, G., Brunel-Muguet, S., Trouverie, J., Salon, C., et al. (2019). Disentangling the complexity and diversity of crosstalk between sulfur and other mineral nutrients in cultivated plants. *J. Exp. Bot.* 70, 4183–4196. doi: 10.1093/jxb/erz214

Curie, C., Alonso, J. M., Jean, M. L., Ecker, J. R., and Briat, J.-F. (2000). Involvement of NRAMP1 from Arabidopsis thaliana in iron transport. *Biochem. J.* 347(Pt 3), 749–755. doi: 10.1042/0264-6021:3470749

Dalcorso, G., Manara, A., Piasentin, S., and Furini, A. (2014). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* 6, 1770–1788. doi: 10.1039/c4mt00173g

Etienne, P., Diquelou, S., Prudent, M., Salon, C., Maillard, A., and Ourry, A. (2018). Macro and micronutrient storage in plants and their remobilization when facing scarcity: the case of drought. *Agriculture* 8:14. doi: 10.3390/agriculture8010014

Fageria, N. K., Baligar, V. C., and Li, Y. C. (2008). The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. *J. Plant Nutr.* 31, 1121–1157. doi: 10.1080/01904160802116068

Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., et al. (2015). A tutorial review: metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal. Chim. Acta* 879, 10–23. doi: 10.1016/j.aca.2015.02.012

Grusak, M. A., Pearson, J. N., and Marentes, E. (1999). The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. *Field Crops Res.* 60, 41–56. doi: 10.1016/s0378-4290(98)00132-4

Henriques, R., Jásik, J., Klein, M., Martinoia, E., Feller, U., Schell, J., et al. (2002). Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol. Biol.* 50, 587–597.

Hervé, M. R., Nicolè, F., and Lê Cao, K.-A. (2018). Multivariate analysis of multiple datasets: a practical guide for chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 44, 215–234. doi: 10.1007/s10886-018-0932-6

Holmes, M. R. J. (1980). *Nutrition of the Oilseed Rape Crop*. London: Applied Science Publishers.

Hu, H., Brown, P. H., and Labavitch, J. M. (1996). Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *J. Exp. Bot.* 47, 227–232. doi: 10.1093/jxb/47.2.227

Jayakumar, K., and Jaleel, C. A. (2009). Uptake and accumulation of cobalt in plants: a study based on exogenous cobalt in soybean. *Bot. Res. Int.* 2, 310–314.

Jayakumar, K., Rajesh, M., Baskaran, L., and Vijayarengan, P. (2013). Changes in nutritional metabolism of tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill.) plants exposed to increasing concentration of cobalt chloride. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 4, 62–69.

Kaufholdt, D., Baillie, C.-K., Meinen, R., Mendel, R. R., and Hänsch, R. (2017). The molybdenum cofactor biosynthesis network: in vivo protein-protein interactions of an actin associated multi-protein complex. *Front. Plant Sci.* 8:1946.

Korshunova, Y. O., Eide, D., Clark, W. G., Guerinot, M. L., and Pakrasi, H. B. (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.* 40, 37–44.

Kuhn, M. (2008). Building predictive models in R using the caret package. *J. Stat. Softw.* 28, 1–26.

Lê Cao, K.-A., González, I., and Déjean, S. (2009). integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. *Bioinformatics* 25, 2855–2856. doi: 10.1093/bioinformatics/btp515

Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., et al. (2013). Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biol.* 13:114. doi: 10.1186/1471-2229-13-114

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Loladze, I. (2014). Hidden shift of the ionome of plants exposed to elevated CO2 depletes minerals at the base of human nutrition. *eLife* 3:e02245.

Ma, J. F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., et al. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature* 440, 688–691. doi: 10.1038/nature04590

Ma, J. F., and Yamaji, N. (2006). Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sci.* 11, 392–397. doi: 10.1016/j.tplants.2006.06.007

Maillard, A., Diquelou, S., Billard, V., Laine, P., Garnica, M., Prudent, M., et al. (2015). Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Front. Plant Sci.* 6:317. doi: 10.3389/fpls.2015.00317

Maillard, A., Etienne, P., Diquélou, S., Trouverie, J., Billard, V., Yvin, J.-C., et al. (2016a). Nutrient deficiencies modify the ionomic composition of plant tissues: a focus on cross-talk between molybdenum and other nutrients in *Brassica napus*. *J. Exp. Bot.* 67, 5631–5641. doi: 10.1093/jxb/erw322

Maillard, A., Sorin, E., Etienne, P., Diquélou, S., Koprivova, A., Kopriva, S., et al. (2016b). Non-specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate. *PLoS One* 11:e0166910. doi: 10.1371/journal.pone.0166910

Malagoli, P., Laine, P., Rossato, L., and Ourry, A. (2005). Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to HarvestI. global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Ann. Bot.* 95, 853–861. doi: 10.1093/aob/mci091

Marschner, P. ed. (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd Edn. San Diego, CA: Elsevier Academic Press Inc.

Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C., Franke, R., Nawrath, C., and Geldner, N. (2012). Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10101–10106. doi: 10.1073/pnas.1205726109

Neugebauer, K., Broadley, M. R., El-Serehy, H. A., George, T. S., McNicol, J. W., Moraes, M. F., et al. (2018). Variation in the angiosperm ionome. *Physiol. Plant* 163, 306–322. doi: 10.1111/ppl.12700

Nishida, S., Aisu, A., and Mizuno, T. (2012). Induction of IRT1 by the nickel-induced iron-deficient response in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 7, 329–331. doi: 10.4161/psb.19263

Parent, S. -É, Parent, L. E., Egozcue, J. J., Rozane, D. E., Hernandes, A., Lapointe, L., et al. (2013a). The plant ionome revisited by the nutrient balance concept. *Front. Plant Sci.* 4:39. doi: 10.3389/fpls.2013.00039

Parent, S. -É, Parent, L. E., Rozane, D.-E., and Natale, W. (2013b). Plant ionome diagnosis using sound balances: case study with mango (*Mangifera Indica*). *Front. Plant Sci.* 4:449. doi: 10.3389/fpls.2013.00449

Pinto, E., and Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2015). Cation transporters/channels in plants: tools for nutrient biofortification. *J. Plant Physiol.* 179, 64–82. doi: 10.1016/j.jplph.2015.02.010

Rawat, N., Neelam, K., Tiwari, V. K., and Dhaliwal, H. S. (2013). Biofortification of cereals to overcome hidden hunger. *Plant Breed.* 132, 437–445. doi: 10.1111/pbr.12040

R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available online at: https://www.R-project.org/

Ricachenevsky, F. K., de Araújo Junior, A. T., Fett, J. P., and Sperotto, R. A. (2018). You shall not pass: root vacuoles as a symplastic checkpoint for metal translocation to shoots and possible application to grain nutritional quality. *Front. Plant Sci.* 9:412.

Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Cao, K.-A. L. (2017). mixOmics: an R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* 13:e1005752. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005752

RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. Boston, MA: RStudio, PBC. Available online at: http://www.rstudio.com/

Salt, D. E., Baxter, I., and Lahner, B. (2008). Ionomics and the study of the plant ionome. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 709–733. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092942

Sasaki, A., Yamaji, N., and Ma, J. F. (2016). Transporters involved in mineral nutrient uptake in rice. *J. Exp. Bot.* 67, 3645–3653. doi: 10.1093/jxb/erw060

Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K., and Ma, J. F. (2012). Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell* 24, 2155–2167. doi: 10.1105/tpc.112.096925

Schachtman, D., and Liu, W. (1999). Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 4, 281–287. doi: 10.1016/s1360-1385(99)01428-4

Schiavon, M., Pittarello, M., Pilon-Smits, E. A. H., Wirtz, M., Hell, R., and Malagoli, M. (2012). Selenate and molybdate alter sulfate transport and assimilation in *Brassica juncea* L. Czern.: implications for phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* 75, 41–51. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.08.016

Shakoor, N., Ziegler, G., Dilkes, B. P., Brenton, Z., Boyles, R., Connolly, E. L., et al. (2016). Integration of experiments across diverse environments identifies the genetic determinants of variation in Sorghum bicolor seed element composition. *Plant Physiol.* 170, 1989–1998. doi: 10.1104/pp.15.01971

Shinmachi, F., Buchner, P., Stroud, J. L., Parmar, S., Zhao, F.-J., McGrath, S. P., et al. (2010). Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiol.* 153, 327–336. doi: 10.1104/pp.110.153759

Soares, J. C., Santos, C. S., Carvalho, S. M. P., Pintado, M. M., and Vasconcelos, M. W. (2019). Preserving the nutritional quality of crop plants under a changing climate: importance and strategies. *Plant Soil* 443, 1–26. doi: 10.1007/s11104-019-04229-0

Sorin, E., Etienne, P., Maillard, A., Zamarreño, A.-M., Garcia-Mina, J.-M., Arkoun, M., et al. (2015). Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. *J. Exp. Bot.* 66, 6175–6189. doi: 10.1093/jxb/erv321

van Oijen, T., van Leeuwe, M. A., Gieskes, W. W., and de Baar, H. J. (2004). Effects of iron limitation on photosynthesis and carbohydrate metabolism in the Antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol.* 39, 161–171. doi: 10.1080/0967026042000202127

Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J.-F., et al. (2002). IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14, 1223–1233. doi: 10.1105/tpc.001388

Waters, B. M., and Armbrust, L. C. (2013). Optimal copper supply is required for normal plant iron deficiency responses. *Plant Signal. Behav.* 8:e26611. doi: 10.4161/psb.26611

Whitt, L., Ricachenevsky, F. K., Ziegler, G., Clemens, S., Walker, E., Maathuis, F. J., et al. (2020). A curated list of genes that control elemental accumulation in plants. *Plant Biol.* 4:e00272. doi: 10.1101/456384

Wu, D., Shen, Q., Cai, S., Chen, Z.-H., Dai, F., and Zhang, G. (2013). Ionomic responses and correlations between elements and metabolites under salt stress in wild and cultivated barley. *Plant Cell Physiol.* 54, 1976–1988. doi: 10.1093/pcp/pct134

Zelazny, E., and Vert, G. (2015). Regulation of iron uptake by IRT1: endocytosis pulls the trigger. *Mol. Plant* 8, 977–979. doi: 10.1016/j.molp.2015.03.006

Zhao, F., Evans, E. J., Bilsborrow, P. E., and Syers, J. K. (1993). Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L). *J. Sci. Food Agric.* 63, 29–37. doi: 10.1002/jsfa.2740630106

Zhao, X. Q., Mitani, N., Yamaji, N., Shen, R. F., and Ma, J. F. (2010). Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiol.* 153, 1871–1877. doi: 10.1104/pp.110.157867

Zimmer, W., and Mendel, R. (1999). Molybdenum metabolism in plants. *Plant Biol.* 1, 160–168. doi: 10.1111/j.1438-8677.1999.tb00239.x

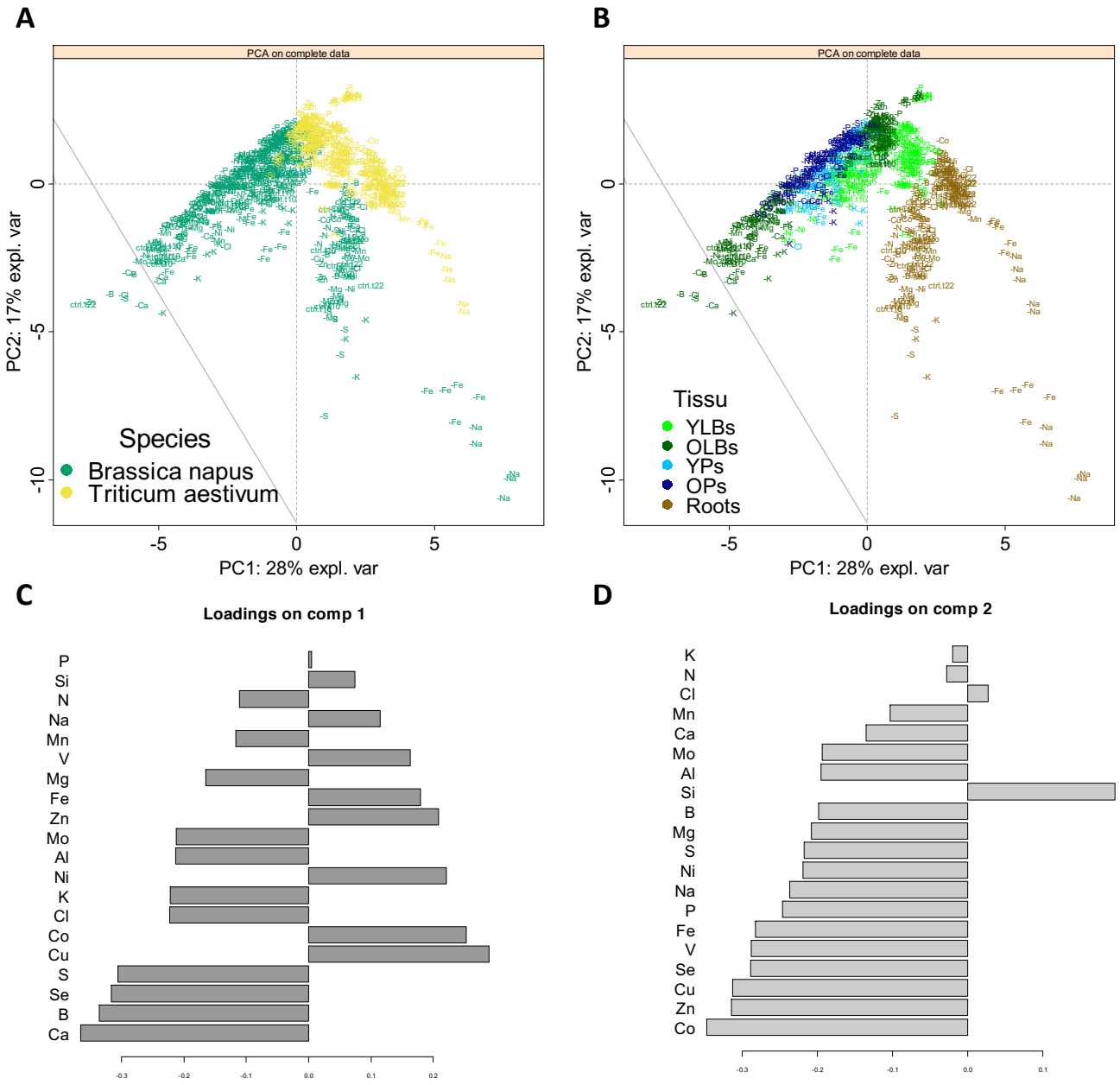
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 D'Oria, Courbet, Lornac, Pluchon, Arkoun, Maillard, Etienne, Diquélou and Ourry. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Salts	Salt concentrations (µM) of deprived solutions :												
	Control	-B	-Cl	-Mn	-Fe	-Ni	-Cu	-Zn	-Mo	-Na	-Si	-Co	-Se
KNO_3	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
$Ca(NO_3)_2 + 4H_2O$	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250
KH_2PO_4	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
K_2HPO_4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$MgSO_4$	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
$MgCl_2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaFe-EDTA $3H_2O$	50	50	50	50	0	50	50	50	50	0	50	50	50
NaFe-EDDHA	50	50	50	50	0	50	50	50	50	0	50	50	50
Fe-Citrate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
H_3BO_3	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
$MnSO_4$	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$MnCl_2$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$ZnSO_4$	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3
$CuSO_4$	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0	0.008	0.008	0.008	0.008
$CoCl_2$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0.1
$NiCl_2$	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
$Si(OH)_4$	900	900	900	900	850	900	900	900	900	1100	0	900	900
$CaCl_2 + 2H_2O$	500	500	0	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
KCl	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Na_2SeO_4	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0
$CaCO_3$	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360	360
K_2SO_4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Na_2SiO_3	200	200	200	200	250	200	200	200	200	0	0	200	200
HCl	600	600	0	600	660	600	600	600	600	0	300	600	600
H3PO4	0	0	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Nutrients	Elemental concentrations (µM) of deprived solutions :												
	Control	-B	-Cl	-Mn	-Fe	-Ni	-Cu	-Zn	-Mo	-Na	-Si	-Co	-Se
N	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500	3500
Mg	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
P	200	200	500	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
S	507	507	507	504	507	507	506	504	507	507	507	507	507
K	1500	1500	1400	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Ca	2110	2110	1610	2110	2110	2110	2110	2110	2110	2110	2110	2110	2110
B	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cl	2001	1701	1	1701	1761	1700	1701	1701	1701	1101	1401	1700	1701
Mn	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Fe	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100
Ni	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Cu	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Zn	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3
Mo	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.0	0.056	0.056	0.056	0.056
Na	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	100	500	500
Al													
Si	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	0	1100	1100
V													
Co	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0.1
Se	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0

Supplemental data 1: Compositions of the nutrient solutions derived from Hoagland nutrient solution and modified based on Maillard *et al.* (2016a) in order to get hydroponic ionome as close as field observations (data not shown, see Courbet *et al.* (2021)). These solutions were used to expose 22 days *Brassica napus L*. and *Triticum aestivum* to unique nutrient deprivations in boron (B), chlorine (Cl), manganese (Mn), iron (Fe), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), Molybdenum (Mo), sodium (Na), silicon (Si), cobalt (Co) or selenium (Se).



Supplemental data 2: Principal component analysis (PCA) score plots of the complete elemental content data. Projection of the data onto the subspace spanned by components 1 (PC 1) and 2 (PC2), which are colored by species **(A)** or tissue **(B)** and each individual labeled with is treatment class (control or deprived plant). The contribution plots **(C,D)** depict the importance of each element in component 1 and 2, respectively, the bar length representing regression coefficients with either positive or negative signs. Variables are ranked by decreasing importance starting from the bottom.

		Brassica napus					*Triticum aestivum*		
		YLB	**OLB**	**YP**	**OP**	**roots**	**YLB**	**OLB**	**roots**
Macronutrients	**N**	51 222	31 856	27 041	21 206	26 307	30 540	21 141	18 909
	Mg	2 545	5 448	3 767	3 818	3 240	1 655	3 701	4 355
	P	6 650	3 427	6 132	3 315	5 819	4 583	1 630	3 400
	S	11 143	22 794	7 486	5 800	7 568	4 079	6 501	2 843
	K	42 453	51 139	85 501	69 525	45 327	45 098	35 874	19 969
	Ca	17 344	63 343	28 246	37 260	7 169	4 441	15 871	2 649
Micronutrients	**B**	59	101	45	33	24	8	10	5
	Cl	9 697	19 794	27 702	29 566	12 606	12 436	13 142	10 029
	Mn	93	244	61	62	81	65	280	87
	Fe	115	114	59	44	841	208	138	639
	Ni	0.3	0.7	0.6	0.5	5.8	9.0	0.5	3.9
	Cu	6	4	4	2	33	9	6	47
	Zn	52	31	33	28	72	59	66	62
	Mo	3.9	6.5	3.0	4.1	4.3	4.0	4.6	0.7
Beneficial nutrients	**Na**	714	1 250	2 837	3 743	9 163	530	569	8 922
	Al	469	667	682	705	445	346	358	301
	Si	882	1 309	685	708	2 721	9 786	46 200	3 368
	V	0.04	0.07	0.06	0.02	0.34	0.13	0.04	0.12
	Co	0.12	0.15	0.09	0.08	6.34	0.29	0.11	4.89
	Se	0.66	1.40	0.74	0.62	0.58	0.46	0.41	0.28

Supplemental data 3: Mineral nutrient concentrations of *B. napus* and *T. aestivum* control plants grown 22 days under hydroponic conditions (D_{22}). Tissues developed before or after D_0 are indicated as "young" or "old" as follows: young leaf blades (YLBs), old leaf blades (OLBs), young petioles (YPs) and old petioles (OPs). Data are expressed in parts per million (ppm) and given as the mean with each replicate (n=5) corresponding to a pool of two individual plants.

					Nutrient deficiency																
			control D10	**control D22**	**-N**	**-Mg**	**-P**	**-S**	**-K**	**-Ca**	**-B**	**-Cl**	**-Mn**	**-Fe**	**-Ni**	**-Cu**	**-Zn**	**-Mo**	**-Na**	**-Si**	**-Co**	**-Se**
Brassica napus	YLBs	Sensitivity	0.9	0.9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.4	0.9	1	1	1	1	0.7	1
		Specificity	1	0.98	1	1	0.99	1	1	1	1	0.98	0.99	1	1	1	1	1	1	0.99	0.99	1
		Balanced Accuracy	0.95	0.94	1	1	0.997	1	1	1	1	0.992	0.997	1	0.70	0.95	1	1	1	0.99	0.85	1
	OLBs	Sensitivity	1	0.5	0.9	0.8	1	1	1	1	1	1	1	1	0.7	0.8	0.9	1	0.9	0.9	1	1
		Specificity	1	0.98	1	1	1	0.98	1	1	1	1	1	0.99	0.99	0.98	0.99	1	1	0.99	0.99	0.99
		Balanced Accuracy	1	0.74	0.95	0.9	1	0.99	1	1	1	1	1	1	0.85	0.89	0.95	1	0.95	0.95	0.99	1
	Roots	Sensitivity	0.5	0.3	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.5	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	0.5
		Specificity	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.97	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98	0.97	0.99
		Balanced Accuracy	0.75	0.65	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.74	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.89	0.74
	YPs	Sensitivity	1	0.7	1	1	1	1	1	1	1	0.7	1	1	0.7	0.9	1	1	1	0.9	1	1
		Specificity	1	0.99	1	1	1	1	1	0.98	1	1	0.98	1	0.99	1	0.99	1	1	1	1	0.99
		Balanced Accuracy	1	0.84	1	1	1	1	1	0.99	1	0.85	0.99	1	0.85	0.95	1	1	1	0.95	1	1
	Ops	Sensitivity	1	0.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.8	0.6	1	1	1	0.7	1	0.9
		Specificity	1	0.98	0.99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.96	1	1	1	0.99	0.99	0.98
		Balanced Accuracy	1	0.59	0.99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.9	0.78	1	1	1	0.85	1	0.94
Triticum aestivum	YLBs	Sensitivity	1	0.8	1	1	1	1	1	1	0.9	0.9	1	1	0.4	1	1	0.9	1	1	0.9	1
		Specificity	1	0.99	0.99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.99	1	1	0.99	1	1	0.99	0.98
		Balanced Accuracy	1	0.89	0.997	1	1	1	1	1	0.95	0.95	1	1	0.70	1	1	0.94	1	1	0.94	0.99
	Ops	Sensitivity	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.4	0.9	1	1	0.7	1	0.1	0.6
		Specificity	1	0.98	1	1	1	1	1	1	0.96	1	1	0.99	1	0.97	0.99	0.99	1	1	0.99	0.99
		Balanced Accuracy	1	0.99	1	1	1	1	1	1	0.98	1	1	1	0.7	0.93	1	0.99	0.85	1	0.54	0.8
	Roots	Sensitivity	1	0.9	1	1	1	1	1	1	1	0.9	1	1	0.8	1	1	1	1	0.9	1	0.7
		Specificity	1	1	1	1	1	1	0.99	1	0.99	1	1	1	0.99	0.99	1	0.98	1	1	1	0.99
		Balanced Accuracy	1	0.95	1	1	1	1	1	1	1	0.95	1	1	0.9	1	1	0.99	1	0.95	1	0.85

Supplemental data SD 4: Classification parameters of each predicted class for rapeseed and wheat tissues. Results are presented as the mean (n= 10) from prediction method A considering the entire ionomic data (see section “Materials and Methods”).

Les macroéléments sont présents en grandes quantités dans les tissus végétaux (plus de 0,1 % de la masse sèche) et sont essentiels à de nombreux processus biologiques, au rendement des graines et à leur qualité nutritionnelle. Il a déjà été montré que les carences en azote (N), magnésium (Mg), phosphore (P), soufre (S), potassium (K) et calcium (Ca) entraînent généralement de profondes modifications du contenu élémentaire des tissus végétaux, reflétant une modulation de l'absorption de plusieurs nutriments. Aussi, pour approfondir nos connaissances sur les modifications induites par ces carences sur les processus biologiques des plantes, notre étude propose une comparaison entre les réponses transcriptomiques des 6 carences en macroéléments réalisées simultanément chez *Brassica napus*. L'expérimentation a été conçue de manière à soumettre les plantes à une privation totale, mais en les récoltant avant tout effet significatif sur leur croissance, afin de détecter les processus les plus précoces affectés par les carences en macroéléments.

Résultats majeurs : Notre étude a montré que toutes les carences en macroéléments chez *Brassica napus* ont entrainé une importante modulation du transcriptome et du métabolome, avant toute réponse phénotypique visuelle. Les carences en P, Ca et N sont celles qui ont le plus affecté le transcriptome, en modulant respectivement 17387 gènes exprimés de manière différentielle (DEG), 15842 DEG et 12565 DEG. Les enrichissements GO de ces DEG sont principalement associés aux métabolismes N et P et au processus de traduction. A l'inverse, la carence en K est celle qui a généré le moins de DEG (1470), ceux-ci intervenaient majoritairement dans le métabolisme des ROS. D'un autre côté, l'analyse transcriptomique comparative a permis de définir un sous-ensemble de 3282, 2011, 6325, 1384, 439, et 5157 DEG spécifiques aux privations de N, Mg, P, S, K, et Ca, respectivement. La majorité des items des enrichissements GO de ces gènes spécifiques était liée au transport d'ions, aux acides aminés, aux glucides et de manière surprenante, au métabolisme du soufre. En effet, les processus métaboliques du soufre ont été surreprésentés dans cinq des six carences en macroéléments, probablement en raison du rôle central que joue le métabolisme du S dans les cellules des plantes. Ces groupes de gènes spécifiques de chaque carence, déterminés dans notre étude, peuvent constituer une base de données candidate pertinente pour développer un outil de diagnostic des carences en macroéléments. Enfin, une approche métabolique a permis d'identifier un ensemble de 38 composés biochimiques permettant de distinguer les privations de macroéléments. De la même manière, ces composés biochimiques pourraient être utilisés comme indicateurs métaboliques potentiels, pour diagnostiquer une carence en macroéléments.

Ces résultats sont présentés dans un article intitulé « Comparative omics analysis of *Brassica napus* roots subjected to six individual macronutrient deprivations reveals deficiency-specific genes and metabolomic profiles » et publié dans International Journal of Molecular Sciences.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Comparative Omics Analysis of *Brassica napus* Roots Subjected to Six Individual Macronutrient Deprivations Reveals Deficiency-Specific Genes and Metabolomic Profiles

Galatéa Courbet [1], Aurélien D'Oria [1,2], Anne Maillard [2], Lun Jing [3], Sylvain Pluchon [2], Mustapha Arkoun [2], Stéphanie Pateyron [4], Christine Paysant Le Roux [4], Sylvain Diquélou [1], Alain Ourry [1], Jacques Trouverie [1,†] and Philippe Etienne [1,*,†]

1 Unicaen, Inrae, UMR 950 Eva, SFR Normandie Végétal (FED4277), Normandie Université, 14000 Caen, France; galatea.courbet@unicaen.fr (G.C.); aurelien.doria@unicaen.fr (A.D.); sylvain.diquelou@unicaen.fr (S.D.); alain.ourry@unicaen.fr (A.O.); jacques.trouverie@unicaen.fr (J.T.)
2 Laboratoire de Nutrition Végétale, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France; anne.maillard@roullier.com (A.M.); sylvain.pluchon@roullier.com (S.P.); mustapha.arkoun@roullier.com (M.A.)
3 Plateformes Analytiques de Recherche, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France; lun.jing@roullier.com
4 Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), Université Paris-Saclay, CNRS, INRAE, Univ Evry, 91405 Orsay, France; stephanie.pateyron@inrae.fr (S.P.); christine.paysant-le-roux@inrae.fr (C.P.L.R.)
* Correspondence: philippe.etienne@unicaen.fr
† Authors with equal contribution.

Abstract: The early and specific diagnosis of a macronutrient deficiency is challenging when seeking to better manage fertilizer inputs in the context of sustainable agriculture. Consequently, this study explored the potential for transcriptomic and metabolomic analysis of *Brassica napus* roots to characterize the effects of six individual macronutrient deprivations (N, Mg, P, S, K, and Ca). Our results showed that before any visual phenotypic response, all macronutrient deprivations led to a large modulation of the transcriptome and metabolome involved in various metabolic pathways, and some were common to all macronutrient deprivations. Significantly, comparative transcriptomic analysis allowed the definition of a subset of 3282, 2011, 6325, 1384, 439, and 5157 differentially expressed genes (DEGs) specific to N, Mg, P, S, K, and Ca deprivations, respectively. Surprisingly, gene ontology term enrichment analysis performed on this subset of specific DEGs highlighted biological processes that are common to a number of these macronutrient deprivations, illustrating the complexity of nutrient interactions. In addition, a set of 38 biochemical compounds that discriminated the macronutrient deprivations was identified using a metabolic approach. The opportunity to use these specific DEGs and/or biochemical compounds as potential molecular indicators to diagnose macronutrient deficiency is discussed.

Keywords: macronutrient deprivations; metabolic pathways; metabolomic; molecular indicators; regulations of nutrient metabolism; transcriptomic

check for updates

Citation: Courbet, G.; D'Oria, A.; Maillard, A.; Jing, L.; Pluchon, S.; Arkoun, M.; Pateyron, S.; Paysant Le Roux, C.; Diquélou, S.; Ourry, A.; et al. Comparative Omics Analysis of *Brassica napus* Roots Subjected to Six Individual Macronutrient Deprivations Reveals Deficiency-Specific Genes and Metabolomic Profiles. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11679. https://doi.org/10.3390/ijms222111679

Academic Editors: Giampiero Cai, Luigi Parrotta and Lavinia Mareri

Received: 21 September 2021
Accepted: 21 October 2021
Published: 28 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Nitrogen (N), magnesium (Mg), phosphorus (P), sulfur (S), potassium (K), and calcium (Ca) are macronutrients present in large amounts in plant tissues (more than 0.1% of dry weight) and are essential for plant growth, seed yield, and nutritional quality [1,2]. In higher plants, severe macronutrient deficiencies are usually associated with phenotypic symptoms [3] such as leaf chlorosis [4], root ramification [5], and, ultimately, reduction in plant growth [6]. In addition, a single macronutrient deficiency commonly leads to profound alterations in the elemental content of plant tissues, reflecting a modulation of the uptake of several nutrients with a corresponding modification of plant ionomic

composition [7–10]. While the root uptake of other nutrients is reduced by individual deficiencies in most cases, there are also many instances of increased mineral uptake that result from the numerous crosstalks between nutrients. For example, S deficiency [9–11] is associated with an increase in plant contents of molybdenum (Mo), selenium (Se), and vanadium (V) because root sulfate transporters, which are up-regulated under S deficiency, are also able to mediate transport of these structurally similar anions. Contrastingly, one macronutrient deficiency can massively decrease the uptake of another. This can be illustrated by N deficiency, which massively decreases sodium (Na) uptake [9].

Since macronutrients are involved in many crucial metabolic pathways [12,13], all macronutrient deficiencies have a myriad of effects on plant metabolism [3]. For example, because N is incorporated into organic compounds such as amino acids and nucleic acids, a limitation of this element leads to a defect in protein synthesis that affects various metabolic pathways [14,15]. Similarly, as S is a constituent of two amino acids, cysteine and methionine, S deprivation also disrupts many metabolic pathways, including nitrogen metabolism [16,17]. Moreover, due to the requirement for S in the synthesis of molecules such as glutathione and S adenosine methionine (ethylene precursor), its depletion leads to the alteration of pathways involved in the mitigation of biotic and abiotic stresses [18]. Likewise, Mg and P are important components of biomolecules, with Mg essential for chlorophylls, and P being a key component of adenosine triphosphate (ATP), nucleic acids, and phospholipids [19,20], so they are both crucial for plant cell functioning. The central structural role that Ca plays in cell wall and plasma membrane organization means that Ca deficiency results in cell death and growth cessation [3,21]. More broadly, Ca is an ubiquitous and versatile second messenger in plants [22], and Ca deprivation alters a wide range of plant metabolic pathways [3,23]. Finally, although K is mainly involved in cellular osmoregulation and in the maintenance of cation–anion balances, it is well documented in several plants species that K deficiency negatively affects photosynthesis processes in particular, and mostly via alterations of stomatal movement, enzyme activation, and protein synthesis and through overproduction of reactive oxygen species (ROS) [24–26].

Over the past few decades, access to the genomes of numerous species has favored the emergence of transcriptomic approaches that allow a more integrated view of plant responses to different nutritional deprivations. Thus, a range of studies across diverse plant species have used transcriptomic approaches to decipher metabolic changes in response to a given macronutrient deprivation. For example, in rice deprived of N for 12 h, it was observed that among the 1650 differentially expressed genes (DEGs), more than 30% were classified into the Gene Ontology (GO) categories "metabolic process", "stimulus response", and "biological regulation" [27]. In another study [28], authors reported that durum wheat responded to a long-time N starvation (until the late milk developmental stage Z77) by modulating the expression of 4626 genes mainly classified into the following GO categories: N compound metabolism, C metabolism, photosynthesis, N transport, and N assimilation. Similar approaches focusing on S deficiency have shown that among the 632 DEGs in S-deprived plants, most were related to the sulfur assimilation pathway but also to the flavonoid, auxin, and jasmonate biosynthetic pathways [29]. Other authors have demonstrated that variations in sulfur availability modulates the expression of genes involved in the regulation of S, N, and P metabolisms [30–32], highlighting the strong interactions between S and other elements. Previously, it has been reported that K deficiency modulates the expression of a smaller panel of genes than N or P deficiencies [33]. In many plant species, several studies have shown that the majority of DEGs identified in K-starved plants are linked to phytohormones (especially auxin and jasmonate), cation transporters (especially iron, zinc, and Ca transporters), Ca signaling, and protein phosphorylation [33–37]. Concerning transcriptomic analysis of P-starved plants, a study performed on wheat identified several DEGs associated with plant defense, plant stress responses, nutrient mobilization, or pathways involved in the gathering and recycling of phosphorus [38]. In another study authors reported that among the 1644 DEGs in roots of P-deprived plants, most of them belonged to pathways involving phosphorylated metabolites such as nucleic

acids and phospholipids [39]. Nevertheless, P is not the only element able to modulate phosphorylation pathways. Indeed, it was previously demonstrated that *Citrus sinensis* adapts to Mg privation in association with DEGs implicated in cell cycle regulation, signal transduction, photosynthesis, cell wall remodeling, and the antioxidant system, as well as phosphorylation control [40]. Finally, among all the macronutrients, Ca deprivation is the least studied. However, a large set of genes are known to be regulated in Ca-starved rice plants (5588 DEGs after 14 days) and their functional classification allocated them to processes related to growth and development such as ion transport, signal transduction, and transcriptional regulation [41].

These large-scale studies have provided valuable data to the scientific community exploring macronutrient deficiencies. Nevertheless, due to a diversity in the genotypes used and the growing conditions, treatment durations, and intensity of the limitations applied, it is difficult to formulate an integrative and comparative overview of the responses of a given plant species to all individual macronutrient deprivations. In this study, we propose to overcome this difficulty by performing simultaneous deprivation of each macronutrient (N, P, K, S, Mg, or Ca) in *Brassica napus* plants cultivated in controlled conditions. The experiment was designed so that plants were subjected to total deprivation but harvested before any significant effect on plant growth in order to detect the earliest processes affected by macronutrient deficiencies. The first aim of this study was to characterize the molecular response for each macronutrient deficiency by using transcriptomic and metabolomic analyses in roots, the first tissues that experience a nutrient deficiency. Based on these global data and using comparative analyses, the second aim was to define DEG lists and metabolomic profiles specific to each macronutrient deprivation. Because accurate molecular indicators of single macronutrient deprivations are lacking for *Brassica napus*, we discuss the opportunity to use these specific gene and/or metabolite sets for early diagnosis of each macronutrient deprivation before manifestation of any growth alteration and/or visual symptoms.

2. Results

2.1. A 10-Day Single Macronutrient Deprivation Had Minor Effects on Biomass and Photosynthetic Activity

Compared to the control, the root and shoot biomasses of rapeseed plants subjected to single macronutrient deprivations for 10 days were not significantly altered, with the exception of the root biomass of P-deficient plants, which increased significantly by about 30% (Table 1). Nevertheless, the –P shoot/root ratio was not significantly altered (5.0 ± 0.4 and 4.5 ± 0.5 for P-deprived and control plants, respectively), which was similar to all the other macronutrient deprivations.

Regardless of the treatments (control and macronutrient deprivation), leaf photosynthetic activities were similar until day 6 (Supplemental Data SD8). At day 9, only N and P deprivations resulted in a significant decrease in photosynthetic activity compared to the control of about 62% and 30%, respectively (Table 1). To check the effect of deprivation, total net uptake of each macronutrient was evaluated per plant (control or deprived) as the difference between plant content before and after 10 days of deficiency. For most macronutrients, plant uptake was marginal during the 10 days of deficiency, except for N, whose uptake was only reduced by 73% compared to control plants (Table 1). This may be easily explained by plant heterogeneity (at D0 and/or at 10 days) rather than by of nutrients that may have been left in the deprived nutrient solution.

2.2. Overview of the Root Transcriptome of Brassica napus Deprived of N, Mg, P, S, K, or Ca for 10 Days

Principal component analysis (PCA) of the normalized RNA-seq counts showed that replicates for each condition (control and macronutrient deprivations) are clustered. Except for control and K deprivation, clusters segregated from each other along the three first principal component axes, which explained 25%, 16%, and 14% of the overall variability of the root samples, respectively (Figure 1A).

Table 1. Shoot and root dry weight, shoot/root ratio, photosynthesis, and net uptake of the deprived macronutrient by *Brassica napus* subjected or not (control) to six single macronutrient deprivation for ten days. Data are given as the mean ± SE. (n = 5 or n = 25 for uptake) and significant differences between control and macronutrient deprived plants are indicated ("*": $p < 0.01$).

		Shoot Biomass (g plant^{-1})	Root Biomass (g plant^{-1})	Shoot/Root	Photosynthesis (µmol.CO_2.m^{-2}.s^{-1})	10-Days Uptake (mmol plant^{-1})	
						Macronutrient	
						Control	Deprived
	Control	5.56 ± 0.48	1.10 ± 0.04	5.05 ± 0.50	18.16 ± 1.47		
Macronutrient deficiencies	−N	4.47 ± 0.46	1.06 ± 0.09	4.20 ± 0.46	**6.94 ± 1.29 ***	N	
						9.44 ± 0.55	**2.54 ± 0.44 ***
	−Mg	6.06 ± 1.01	1.03 ± 0.15	5.86 ± 0.24	14.35 ± 2.74	Mg	
						0.66 ± 0.05	**−0.019 ± 0.04 ***
	−P	6.55 ± 0.46	**1.44 ± 0.08 ***	4.54 ± 0.35	**12.74 ± 1.36 ***	P	
						0.72 ± 0.05	**0.02 ± 0.01 ***
	−S	6.35 ± 0.88	1.11 ± 0.09	5.74± 0.0.31	19.39 ± 1.35	S	
						1.62 ± 0.10	**0.26 ± 0.06 ***
	−K	5.91 ± 0.55	1.12 ± 0.16	5.30 ± 0.54	21.50 ± 1.41	K	
						6.94 ± 0.36	**0.54 ± 0.21 ***
	−Ca	5.82 ± 0.33	1.10 ± 0.12	5.28± 0.44	19.86 ± 1.94	Ca	
						3.12 ± 0.22	**0.05 ± 0.01 ***

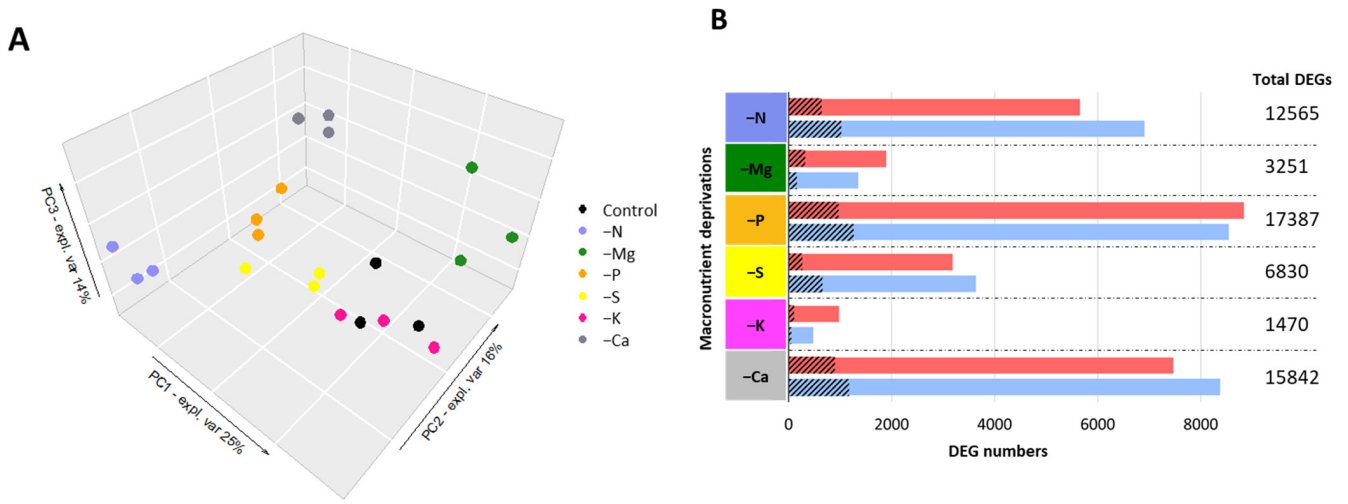


Figure 1. (**A**) Principal component analysis (PCA) score plots of normalized counts of *Brassica napus* roots projected onto the subspace spanned by components 1 (PC 1), 2 (PC2), and 3 (PC3). Roots samples (n = 3) are colored according to the nutritional status (control and macronutrient deprived). (**B**) Number of total DEGs and upregulated (red) and downregulated (blue) differentially expressed genes (DEGs). Hatched areas correspond to the number of DEGs with "unknown" annotation.

The count of total DEGs (up- and down- regulated compared to the control; $p \leq 0.05$) for each macronutrient deprivation was highly variable (Figure 1B). Thus, P, Ca, and N deprivations affected the transcriptome the most with 17,387 (8839 upregulated and 8548 downregulated), 15,842 (7469 upregulated and 8373 downregulated), and 12,565 (5653 upregulated and 6912 downregulated) DEGs, respectively. For example, deprivation of S and Mg revealed about two- and fourfold fewer DEGs (6830 and 3251 DEGs, respectively) than N deprivation. Finally, K deprivation showed comparatively restricted effects on the transcriptome, with a total of only 1470 DEGs, of which 984 and 486 were up- and down- regulated, respectively (Figure 1B).

2.3. Functional Classification of DEGs for Each Macronutrient Deprivation in Roots of Brassica napus

For each individual macronutrient deprivation, all enriched GO terms for "Biological Processes" were determined with g:Profiler and are provided in Supplemental Data SD4A.

Redundant GO terms were removed with ReviGO and the top 20 enriched terms were kept and reported in Figure 2 for each macronutrient deprivation (except for −K, for which Revigo retrieved only 18 GO terms).

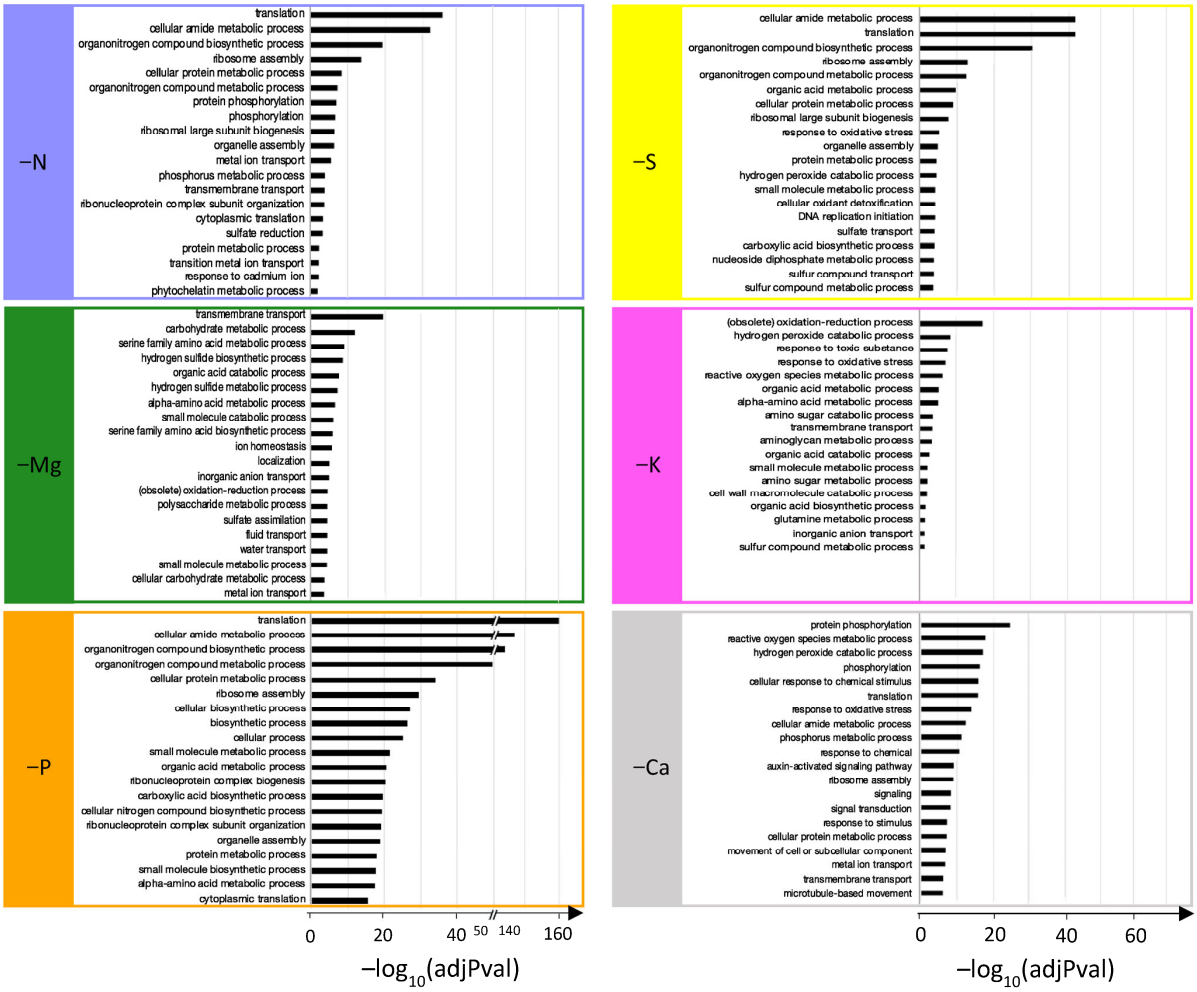


Figure 2. Top 20 significantly enriched "biological process" GO terms from DEGs of *Brassica napus* roots subjected to N, Mg, P, S, K, or Ca deprivations.

Interestingly, among the seven most enriched terms for the N, P, and S deprivations, six related to protein biosynthesis were common to all three deprivations (Figure 2: "translation", "cellular amide metabolic process", "organonitrogen compound biosynthetic process", "ribosome assembly", "cellular protein metabolic process", and "organonitrogen compound metabolic process"). For N deprivation, other GO-enriched terms (Figure 2: "protein phosphorylation", "phosphorylation", "phosphorus metabolic process", and "sulfate reduction") highlighted interconnections of N metabolism with P and S metabolism. In addition to the seven most enriched GO terms, some found in P deprivation were also related to N metabolism (Figure 2: "cellular nitrogen compound biosynthetic process", "protein metabolic process", and "alpha amino acid metabolic process"). Surprisingly, processes related to P that were expected (Figure 2: "energetic metabolism" and "acid nucleic biosynthesis") were less enriched (beyond the 20th rank; Supplemental Data SD4A). Similarly, GO terms related to S metabolism ("sulfate transport," "sulfur compound transport", and "sulfur compound metabolic process") and ROS detoxification ("oxidative stress response", "hydrogen peroxide", "catabolic process", and "cellular oxidant detoxification") were enriched by S deprivation, but less so than those involved in N metabolism that were previously listed (Figure 2). Magnesium deprivation mainly led to the enrichment of GO terms related to "transport", "photosynthesis", "S metabolism", and "amino acid metabolic

processes" (Figure 2). Calcium deprivation enriched GO terms mainly associated with P metabolism ("protein phosphorylation", "phosphorylation", "phosphorus metabolic process"), signaling ("cellular response to chemical stimulus", "response to chemical", "auxin-activated signaling pathway", "signaling", "signal transduction", "response to stimulus"), and ROS metabolic processes ("ROS metabolic process", "hydrogen peroxide catabolic process", "response to oxidative stress"). Finally, K deprivation massively enriched GO terms related to ROS (the top five most enriched) but also "organic acid" and "amino acid metabolic processes", "transport", and "sulfur compound metabolic process" (Figure 2).

It is interesting to note that the GO terms related to transport processes were enriched for all macronutrient deprivations, and were placed among the 20 most enriched GO terms for N, Mg, S, K, and Ca deprivations (Figure 2) and also in the 34th position (out of 65) for P deprivation (Supplemental Data SD4A). To further characterize the impacted transport processes, expression patterns of the 302 DEGs related to "ion transport" described in the Materials and Methods were analyzed (Figure 3). Irrespective of the macronutrient, each deprivation-modulated DEG related to the transport of a large panel of elements. However, the hierarchical clustering segregated the macronutrient deprivations into two groups: one that included N, Ca, and P deprivations, which strongly modulated genes encoding for all kinds of ion transporters, and a second that included S, K, and Mg deprivations, which modulated this panel of genes less broadly and less intensively. Finally, it is noteworthy that among the six macronutrients, only S and P deprivations led to a strong upregulation of genes encoding transporters involved in their own transport (Figure 3).

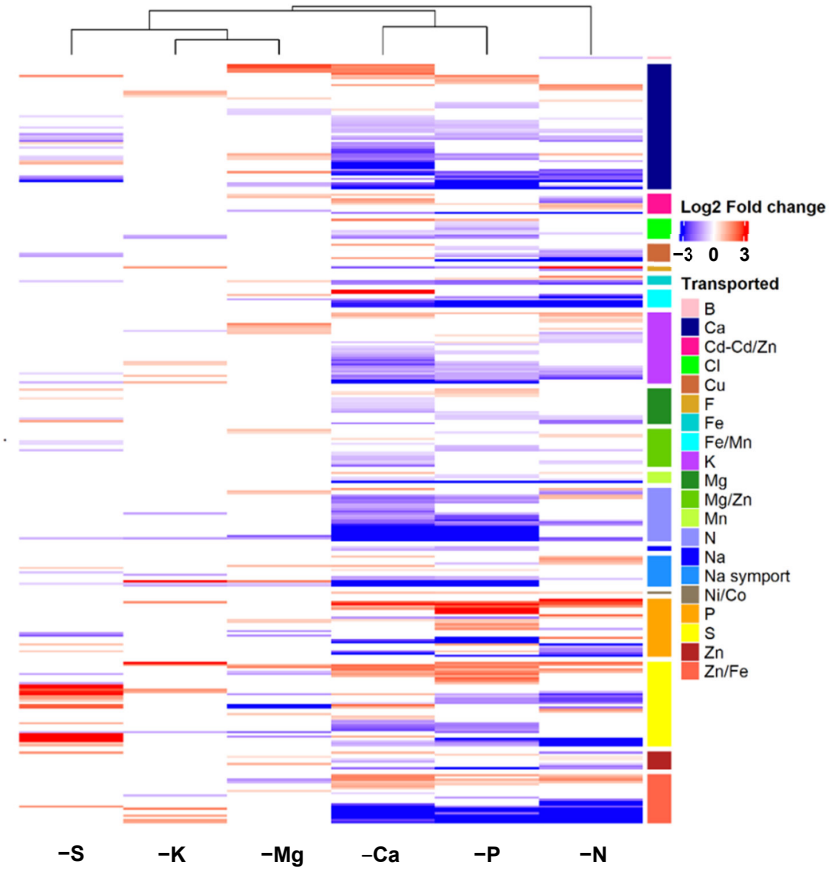


Figure 3. Log2 fold changes ratio of the 302 DEGs belonging to the "ion transport" group and clustered according to transported element. DEGs in roots of *Brassica napus* subjected to six individual macronutrient deprivations with significant ($p < 0.05$) upregulation (red) and downregulation (blue) compared to control plants.

2.4. Identification and Functional Classification of DEGs Specific to a Single Macronutrient Deprivation

By comparing the DEG profiles identified for each macronutrient deprivation, it was possible to determine DEGs with similar modulation among clusters of two to six macronutrient deprivations or specifically modulated by one macronutrient deprivation (i.e., modulated in only one macronutrient deprivation or modulated in an opposite direction by another macronutrient deprivation; Figure 4).

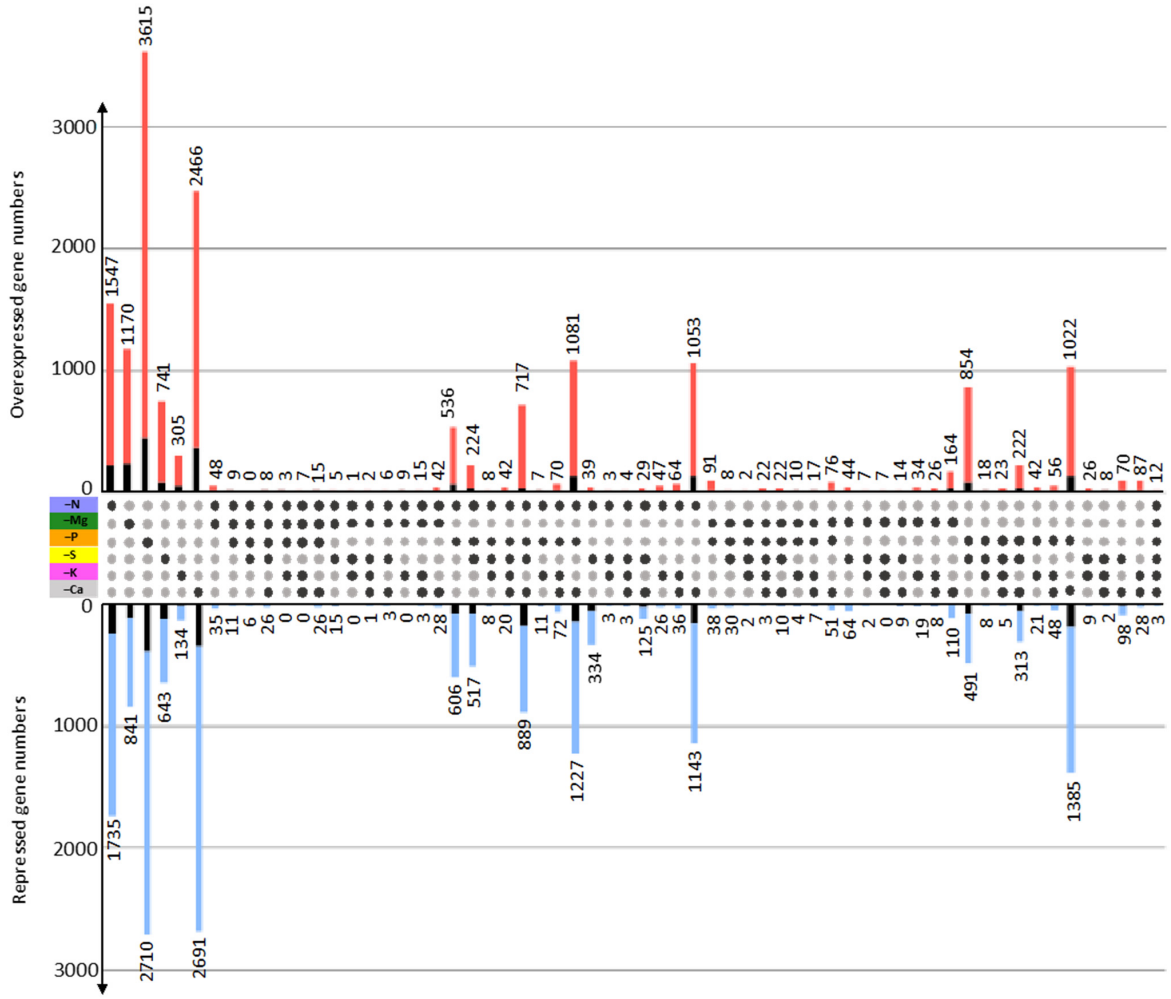


Figure 4. Number of upregulated (red) and downregulated (blue) DEGs specific to each macronutrient deprivation or common to n macronutrient deprivations (with n = 2 to 6) as indicated by the black dots. Black bars indicate the number of DEGs with "unknown" annotation.

Looking at the genes that were common to n deprivations ($2 < n < 6$), the number of shared DEGs was dependent on the type of cluster being considered. For example, the N, P, and Ca macronutrient deprivation cluster shared 2308 (1081 up and 1227 down) DEGs, whereas the N, P, and K cluster only shared 18 (7 up and 11 down) DEGs, while only 15 DEGs (12 up and 3 down) were common to all six macronutrient deprivations. At a single deprivation level, 3282 (1547 up and 1735 down), 2011 (1170 up and 841 down), 6325 (3615 up and 2710 down), 1384 (741 up and 643 down), 439 (305 up and 134 down), and 5157 (2466 up and 2691 down) DEGs were specific to N, Mg, P, S, K, and Ca deprivation, respectively (Figure 4; Supplemental Data SD3). GO enrichment for "Biological Processes" was performed on sets of DEGs specific to each macronutrient deprivation (Supplemental Data SD4B). All enriched GO terms obtained for the N, Mg, S, and K deprivations (9, 18,

16, and 9, respectively) and a selection of the 20 most enriched GO terms for P and Ca deprivations are shown in Figure 5.

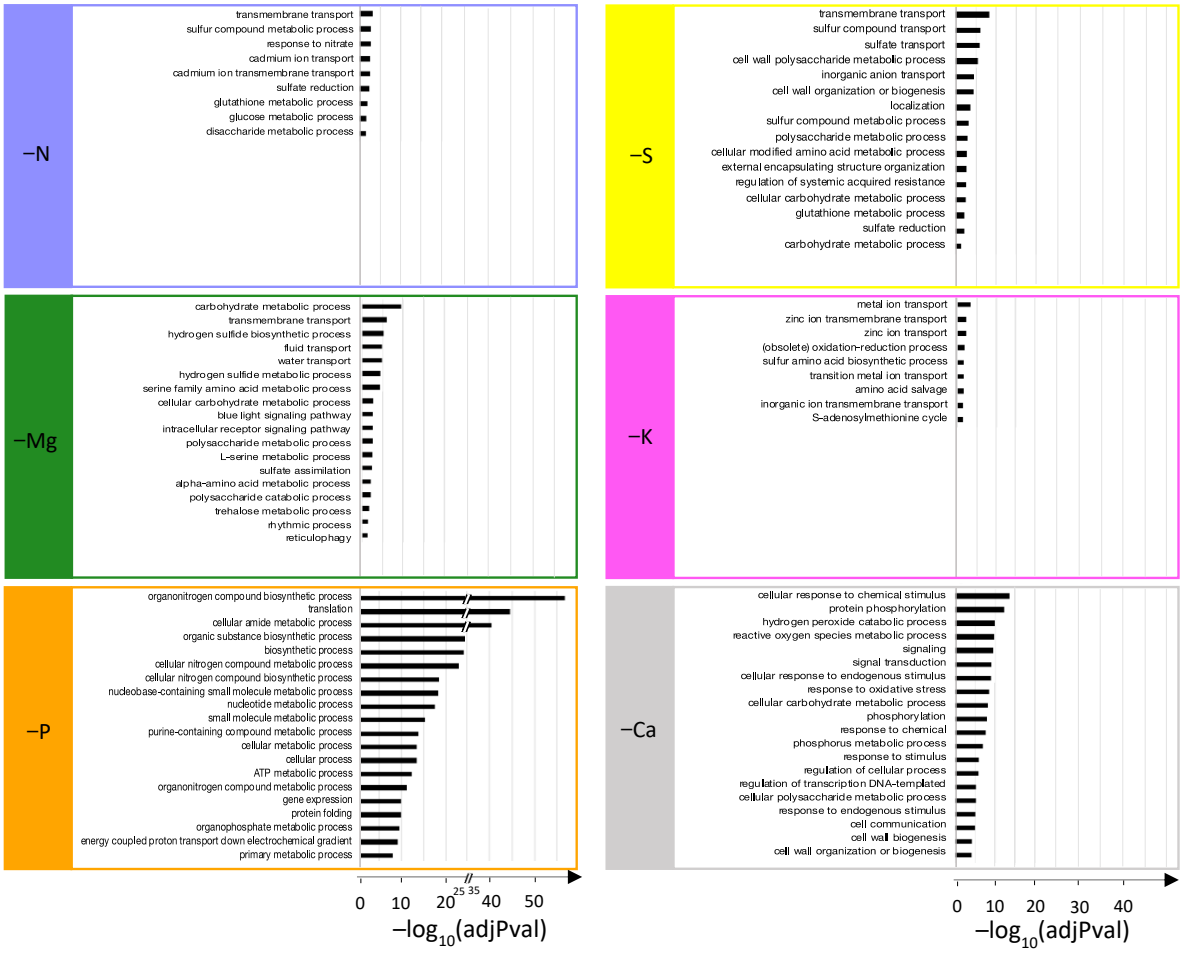


Figure 5. Top 20 significantly enriched "biological process" GO terms from specific DEGs of N, Mg, P, S, K, or Ca deprivations.

Despite an analysis focused on the DEGs specific to each macronutrient deprivation, very few biological processes unique to each element were identified, with the exception of the P and Ca deprivations, which affected energy metabolism ("ATP metabolic process", "energy coupled proton transport down electrochemical gradient") and signaling ("cellular response to chemical stimulus", "signaling", "signal transduction", "cellular response to endogenous stimulus", "response to chemical", "response to stimulus" and "response to endogenous stimulus"), respectively. Indeed, the majority of enriched GO terms were related to ion transport, amino acids, carbohydrate, and, more importantly, sulfur metabolic processes, which were over-represented in five of the six macronutrient deprivations (Figure 5). Thus, enriched GO terms related to S metabolism were the following: "sulfur compounds metabolic process", "sulfate reduction", and "glutathione metabolic process" for N deprivation; "sulfur compound transport", "sulfate transport", "sulfur compounds metabolic process", "glutathione metabolic process", and "sulfate reduction" for S deprivation; "hydrogen sulfide biosynthetic process", "hydrogen sulfide metabolic process", and "sulfate assimilation" for Mg deprivation; "sulfur amino acid biosynthetic process" and "S-adenosylmethionine cycle" for K deprivation (Figure 5); and "sulfolipid metabolic process" and "sulfolipid biosynthetic process" for P deprivation (47th and 48th GO terms; Supplementary Data 4B). To illustrate this point more precisely, the relative expression levels and the functional annotations of DEGs specific to each macronutrient deprivation and related to S metabolism are presented in Table 2.

Table 2. Identification (ID) and annotation of significantly DEGs ($p < 0.05$), specific to a macronutrient deprivation and related to S metabolic pathways (KEGG pathway ID) and sulfate transport. Up- (red) and down-regulation (blue) compared to control plants.

	Genoscope Gene ID	Gene ID	Protein ID	KEGG Pathway	Annotation	log2FC	Padj
−N	*BnaC04g19270D*	*GSBRNA2T00124039001*	CDY07244	bna00920	PAPS reductase	−1.00	2.8×10^{-2}
	BnaA03g59800D	*GSBRNA2T00028621001*	CDY24876	bna00920		−1.88	1.9×10^{-5}
	BnaA01g11840D	*GSBRNA2T00131663001*	CDX79117	bna00920		−1.97	1.1×10^{-8}
	BnaA09g20370D	*GSBRNA2T00094497001*	CDY16659	bna00920		−2.52	1.8×10^{-25}
	BnaA03g45080D	*GSBRNA2T00106793001*	CDX98723	bna00920		−2.13	1.4×10^{-15}
	BnaCnng62800D	*GSBRNA2T00086154001*	CDY69279	bna00920	ATP sulfurylase	−1.47	3.8×10^{-6}
	BnaA03g36860D	*GSBRNA2T00154839001*	CDX92964	bna00920		−1.59	2.2×10^{-9}
	BnaC01g22950D	*GSBRNA2T00090739001*	CDY16260	bna00920		−1.62	1.6×10^{-2}
	BnaC07g51290D	*GSBRNA2T00039753001*	CDY63923	bna00920	APS kinase	−1.16	3.5×10^{-2}
	BnaA03g54400D	*GSBRNA2T00050135001*	CDY31612	bna00920		−1.22	1.3×10^{-2}
	BnaCnng62620D	*GSBRNA2T00084257001*	CDY69239	bna00920/bna00270/bna01230	Cysteine synthase	0.71	3.7×10^{-2}
	BnaC07g27640D	*GSBRNA2T00133834001*	CDX80680	bna00920/bna00270/bna01230		−2.48	2.6×10^{-3}
	BnaA09g55670D	*GSBRNA2T00019599001*	CDY56449	bna00270	Homocysteine S-methyltransferase	−0.77	8.8×10^{-4}
	BnaA06g33260D	*GSBRNA2T00078007001*	CDY13597	bna00270		−0.91	3.8×10^{-2}
	BnaC09g03120D	*GSBRNA2T00109460001*	CDX99989	bna00480	Glutathione synthase	−0.57	3.4×10^{-3}
	BnaA09g14510D	*GSBRNA2T00081552001*	CDY45141	bna00480	Glutathione S-transferase	1.99	7.5×10^{-7}
	BnaA09g14520D	*GSBRNA2T00081550001*	CDY45140	bna00480		1.37	1.3×10^{-3}
	BnaA09g29540D	*GSBRNA2T00090678001*	CDY16220	bna00480		−1.17	3.1×10^{-2}
	BnaC06g25030D	*GSBRNA2T00022180001*	CDY23534	bna00480		−1.62	2.9×10^{-2}
	BnaA07g09120D	*GSBRNA2T00069459001*	CDY40288	bna00480		−1.67	2.8×10^{-2}
−Mg	*BnaC03g48570D*	*GSBRNA2T00062167001*	CDY36498	bna00920	APS kinase	2.08	2.2×10^{-13}
	BnaA06g25000D	*GSBRNA2T00000648001*	CDY08724	bna00920		1.57	1.3×10^{-9}
	BnaA03g38670D	*GSBRNA2T00155065001*	CDX93145	bna00920		−1.20	5.2×10^{-3}
	BnaCnng47170D	*GSBRNA2T00046596001*	CDY65440	bna00920		−1.36	1.6×10^{-3}
	BnaC01g00790D	*GSBRNA2T00131229001*	CDX69374	bna00920		−1.43	3.3×10^{-2}
	BnaA05g37220D	*GSBRNA2T00097688001*	CDY50861	bna00920		−1.53	6.3×10^{-5}
	BnaA01g34620D	*GSBRNA2T00039722001*	CDY63896	bna00920		−1.78	1.6×10^{-2}
−P	*BnaA10g27550D*	*GSBRNA2T00069492001*	CDY40313	bna01100	Glycosyl transferase	6.39	5.4×10^{-67}
	BnaA10g27560D	*GSBRNA2T00069491001*	CDY40312	bna01100	Glycosyl transferase	5.68	7.8×10^{-29}
	BnaCnng03870D	*GSBRNA2T00032420001*	CDY10486	bna01100	Glycosyl transferase	5.01	1.7×10^{-76}
	BnaA03g00460D	*GSBRNA2T00049228001*	CDY11210	bna01100	Glycosyl transferase	2.31	2.2×10^{-17}
−S	*BnaC07g18000D*	*GSBRNA2T00158266001*	CDX94791		SULTR1.1	7.70	1.3×10^{-14}
	BnaA02g10510D	*GSBRNA2T00036843001*	CDY27031		SULTR1.1	6.15	1.2×10^{-111}
	BnaC02g14670D	*GSBRNA2T00102253001*	CDX96184		SULTR1.1	5.15	2.5×10^{-68}
	BnaA10g22050D	*GSBRNA2T00135917001*	CDX69856		SULTR2.1	3.90	5.4×10^{-12}
	BnaC09g46440D	*GSBRNA2T00103928001*	CDX96981		SULTR2.1	3.77	4.0×10^{-4}
	BnaC06g38470D	*GSBRNA2T00147936001*	CDX88403		SULTR2.2	1.62	6.6×10^{-11}
	BnaA07g33850D	*GSBRNA2T00146476001*	CDX87488		SULTR2.2	1.46	1.3×10^{-6}
	BnaA07g33860D	*GSBRNA2T00146474001*	CDX87487		SULTR1.2	1.27	1.4×10^{-2}
	BnaC05g18450D	*GSBRNA2T00119410001*	CDY04744		Sulphate anion transporter	1.24	3.4×10^{-2}
	BnaC06g38480D	*GSBRNA2T00147937001*	CDX88404		SULTR1.2	0.89	4.3×10^{-2}
	BnaC03g05940D	*GSBRNA2T00140339001*	CDX70510		SULTR4.1	0.73	1.9×10^{-2}
	BnaC03g39450D	*GSBRNA2T00123837001*	CDX75862		Sulphate anion transporter	−1.06	4.2×10^{-2}
	BnaC09g08710D	*GSBRNA2T00135048001*	CDX81460	bna00920	APS kinase	0.99	6.0×10^{-5}
	BnaA09g08410D	*GSBRNA2T00063703001*	CDY37220	bna00920		0.91	2.0×10^{-4}
	BnaC01g13420D	*GSBRNA2T00138265001*	CDX82892	bna00920	PAPS reductase	1.31	5.9×10^{-3}
	BnaA03g45080D	*GSBRNA2T00106793001*	CDX98723	bna00920		1.07	5.3×10^{-4}
	BnaA09g20370D	*GSBRNA2T00094497001*	CDY16659	bna00920		0.84	2.1×10^{-3}
	BnaC07g37060D	*GSBRNA2T00156974001*	CDX94072	bna00920		0.62	2.8×10^{-2}
	BnaC09g39920D	*GSBRNA2T00032694001*	CDY25477	bna01230/bna00270	Methionine synthase	0.57	3.0×10^{-2}
	BnaA03g34510D	*GSBRNA2T00137491001*	CDX82370	bna01230/bna00270	S-adenosylmethionine synthetase	0.87	2.2×10^{-2}
	BnaC06g41890D	*GSBRNA2T00023030001*	CDY58045	bna00480	Glutathione S-transferase	1.31	4.2×10^{-3}
	BnaA06g20200D	*GSBRNA2T00061438001*	CDY12324	bna00480		0.71	1.0×10^{-3}
	BnaC05g13360D	*GSBRNA2T00091169001*	CDY48476	bna00480		−0.68	1.1×10^{-2}
	BnaA06g11500D	*GSBRNA2T00034941001*	CDY26267	bna00480		−1.04	1.2×10^{-3}
	BnaA04g28590D	*GSBRNA2T00003272001*	CDY51365	bna00480		−1.29	4.0×10^{-2}
	BnaA06g11510D	*GSBRNA2T00034940001*	CDY26266	bna00480		−1.37	2.8×10^{-2}
	BnaC05g13350D	*GSBRNA2T00091168001*	CDY48475	bna00480		−1.89	6.0×10^{-5}
−K	*BnaAnng28500D*	*GSBRNA2T00080405001*	CDY68838	bna00270/bna01230	Cysteine synthase	0.98	1.4×10^{-3}
	BnaA07g04420D	*GSBRNA2T00054274001*	CDY33397	bna00270	Initiation factor 2B-related	0.75	1.2×10^{-3}
	BnaA01g19100D	*GSBRNA2T00043605001*	CDY29756	bna00270	Acireductone dioxygenase	0.73	1.6×10^{-3}
	BnaCnng67980D	*GSBRNA2T00098221001*	CDY70356	bna00270	Initiation factor 2B-related	0.47	4.4×10^{-2}

In a general way, specific DEGs mainly related to S assimilation (PAPS reductase, ATP sulfurase, APS kinase, cysteine synthase, homocysteine S-methyltransferase, glutathione synthase, and glutathione S-transferase) were downregulated in N and Mg deprivation, while P and K deprivations upregulated DEGs encoding enzymes involved in sulfolipid biosynthesis (glycosyl transferase), cysteine biosynthesis (cysteine synthase), and methionine salvage (acireductone dioxygenase). Finally, S deprivation resulted in a strong upregulation of specific DEGs related to sulfate transport and S assimilation (APS kinase, PAPS reductase, methionine synthase, S adenosylmethionine synthetase), while several DEGs encoding glutathione S transferase were downregulated (Table 2). In the same way, GO enrichment performed with all specific DEGs highlighted terms related to ion transport ("transmembrane transport", "cadmium ion transport", "sulfur compound transport", "sulfate transport", "inorganic anion transport", "metal ion transport", "zinc ion transport",

"transition metal ion transport") in four of the macronutrient deprivations (N, Mg, S, and K). Among DEGs specific to each macronutrient deprivation, the expression patterns of the 164 DEGs belonging to the set of 302 DEGs related to ion transport, as defined in the Material and Methods section, were analyzed (Figure 6 and Supplemental Data SD5).

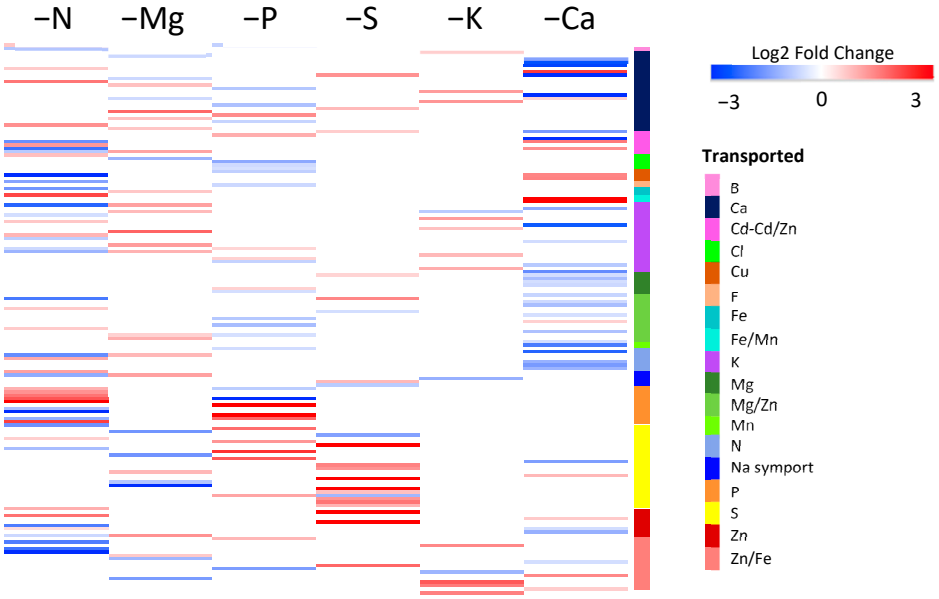


Figure 6. Log2 fold changes ratio of the specific DEGs belonging to the "ion transport" group. The red and blue scale indicates DEGs in roots of *Brassica napus* subjected to six individual macronutrient deprivations with upregulation and downregulation, respectively, compared to control plants.

Irrespective of the macronutrient deprivation, specific genes related to the transport of the deprived nutrient and/or other nutrient transports were modulated. Although only specific DEGs were considered, it was evident that the transport of Ca and Zn/Fe were affected by all macronutrient deprivations.

2.5. Metabolic Profiling of Individual Macronutrient Deprivations

Because transcriptomic analysis suggested that macronutrient deprivations broadly affected plant metabolism, an untargeted metabolomic approach was performed on roots of *Brassica napus*. For each macronutrient deficiency, a chemical similarity clustering of the principal classes of metabolites was performed by ChemRICH software (v4.0) using all the metabolites modulated compared to the control in order to highlight the main affected biological processes (Supplementary Data SD6; Figure 7).

Among the six macronutrient deprivations, K and S deprivations led to the lowest number of enriched metabolic classes with mainly "amino acids" and "indoles" for both, "flavonoids" for K deprivation, and "cinnamates" and "adenine nucleotides" for S deprivation. On the other hand, the N, P, and Ca deprivations were associated with the greatest enrichment of metabolic classes, among which it can be found again the "amino acids", the "indoles", and the "flavonoids", but also several metabolic classes common to these three deprivations, such as "adenosine", "xanthines", "azoles", "coumaric acids", "oligopeptides", and "cinnamates". Interestingly, only Mg deprivation led to an enrichment of certain metabolic classes that were not found in any other deficiency. Thus, even though classes such as "amino acids" and "indoles" were once again highlighted, the "DIHODE" and "unsaturated fatty acids" classes were specifically enriched in response to Mg deprivation. Since there were few metabolic classes specifically enriched by one deprivation, an analysis at the metabolite scale was performed to try to discriminate the deprivations. Compared to the control, there were 451 metabolites overall that were significantly modulated (p-value < 0.001 and ratio >2) in at least one macronutrient deprivation, and these

were further characterized (Supplementary Data SD7). From multivariate analysis, the 38 most discriminating metabolites (VIP > 4) for the six macronutrient deprivations were identified and assigned to major biochemical categories (Figure 8).

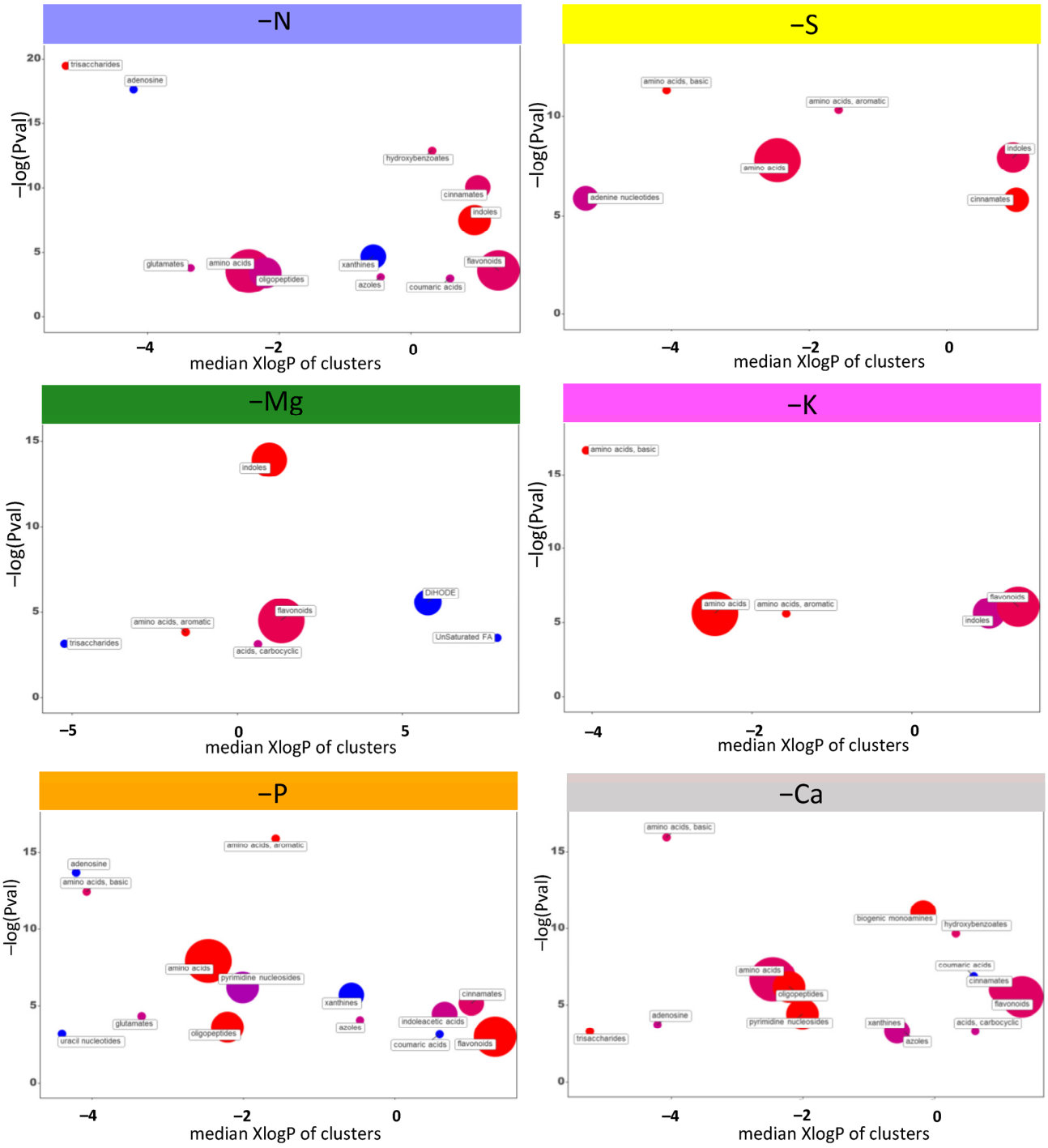


Figure 7. Chemical similarity clustering of the principal classes of metabolites performed by ChemRICH. Discs represent a significantly enriched family of modulated metabolites in *Brassica napus* roots subjected to six individual macronutrient deprivations. Enrichment −log(*p*-value) are displayed along the ordinate while the abscissa reflects the hydrophobicity (negative values) or hydrophilicity (positive values) of each group. Disc sizes varies with the total number of metabolites. Red, blue, and purple discs indicate groups with metabolites increased, decreased, and both increased and decreased, respectively.



Figure 8. Hierarchical clustering of the 38 most discriminating metabolites (VIP > 4) significantly accumulated (red) and depleted (blue) relative to the control plants in *Brassica napus* roots subjected to six individual macronutrient deprivations. The colored dots indicate the biochemical classification of these metabolites.

These discriminating compounds mainly belonged to "lipids", "phospholipids", "phenylpropanoids", "S-containing compounds", and, to a lesser extent, "organic acids", "sugar related", and "alkaloids". Broadly, N deprivation mainly led to an accumulation of phenylpropanoid and a few phospholipid compounds, while Mg deprivation was principally associated with an accumulation of phospholipids and a decrease in phenylpropanoids. P deprivation led, among other things, to a decrease in phenylpropanoids and an accumulation of S-containing compounds, whereas S deprivation tended towards a decrease in these compounds. Under Ca deprivation, there was an accumulation of compounds belonging to different biochemical categories (one sugar related, one organic acid, one phenylpropanoid, and several S-containing compounds) and especially a strong decrease in phospholipids. Finally, K deprivation had the least impact on the metabolome, with only a decrease in some phenylpropanoids and an accumulation of one sugar-related and a few S-containing compounds.

3. Discussion

Maintaining the yield and quality of harvested products to support the food needs of the human population and reducing the use of inputs while managing the influence of climate change on nutrient availability requires a better understanding of plant responses to nutritional deficiencies and earlier diagnosis of their occurrence. This is especially true for crop species such as *Brassica napus*, which are highly demanding of fertilizers [42–44]. In this context, the objective of this study was to provide early insights into the major molecular changes in *Brassica napus* subjected to six individual macronutrient (N, Mg, P, S, K, and Ca) deprivations, with the aim of assessing them before they initiate large macroscopic changes (growth and photosynthesis). Consequently, molecular analysis were performed after ten

days of deprivation when no decreases in root biomass or photosynthesis activity were observed, except for the P and N deprivations, respectively, where small changes were observed (Table 1; Supplementary Data SD8).

3.1. Macronutrient Deprivations Led to Profound Transcriptomic and Metabolomic Modifications in Roots

A large number of DEGS were found in roots under each of the macronutrient deprivations considered. A GO term enrichment analysis of these DEGs indicated that each macronutrient deprivation was associated with extensive changes, mostly related to the metabolism of the deprived nutrient, which was expected, but also related to other metabolic pathways and thus highlighting the interactions between elements. Compared to the other elements, K deprivation resulted in the smallest panel of DEGs (1470 DEGs, with 984 upregulated, and 486 downregulated), as previously observed in rice by [33]. This observation can be explained by the role of K as a monovalent cation mainly found in the vacuole that is especially involved in osmoregulation, rather than it participating in the direct biosynthesis of organic compounds [3,25]. Among the top five GO terms found in the enrichment analysis, four were related to oxidative responses. This is in agreement with several studies reporting strong links between ROS metabolism and K deficiency [45–47]. In contrast, P deprivation modulated the root transcriptome of *Brassica napus* the most, with changes in 17,387 DEGs (8839 upregulated and 8548 downregulated; Figure 1B) that belong to a large number of GO biological process terms mainly related to N metabolism (Figure 2), but also phosphorylation and energy metabolism (Supplementary Data SD4A). The effects of P deprivation on energy production [44,48,49] and its interactions with N metabolism are quite well documented [50]. Similarly, our study also highlighted these kinds of interactions in response to N deprivation. Indeed, N deprivation modulated 12,565 DEGs and in addition to the expected GO terms related to amino acid and proteins synthesis, there were enriched GO terms related to P metabolism such as "protein phosphorylation", "phosphorylation", and "phosphorus metabolic". Similarly, the well-known N/S interaction [51,52] was also emphasized because S-related GO terms and N-related GO terms were observed under N and S deprivations, respectively. In addition, among the 3251 DEGs that responded to Mg deprivation, some of them were associated with C and N metabolisms [53] while others were related to S metabolism. Finally, with Ca being a well-known cellular messenger [22], it is not surprising that its deprivation generated a large panel of DEGs (15842), most of which were enriched GO terms related to signaling such as "protein phosphorylation", thus highlighting a Ca/P interplay. These results are in agreement with previous studies performed in rice that indicated an association of Ca deprivation with the modulation of large panels of genes predominantly related to signaling [41].

Altogether, these GO enrichment analyses show that alongside metabolism and cellular processes directly related to the deprived nutrient, some other terms corresponding to more generic cellular processes were also systematically impacted. The best example is the GO term "ion transport", which was enriched in response to all macronutrient deprivations (Figure 2 and Supplementary Data SD4B). Confirmation was given by the targeted analysis that focused on the 302 DEGs encoding ion transporters, which indicated that all macronutrient deprivations modulated the expression of genes encoding transporters for the deprived nutrients, and at the same time influenced genes belonging to other ion transporter categories (Figure 3). For example, P and S deprivations led to an upregulation of gene sets that encoded their own root transporters, as previously described in different plant species [11,54,55], but also a modulation of the expression of genes encoding other ion transporters (Figure 3). This wide-ranging modulation of the gene expression of numerous elemental transporters can be linked to recent studies performed in *Brassica napus* and *Triticum aestivum* where nutrient uptake and the element composition of plant tissues were broadly modified in response to a single macronutrient deprivation [9,11]. These generic responses observed in roots of plants subjected to six single macronutrient

deprivations could be a consequence of the crucial roles of macronutrients in primary metabolism reported by many authors [3,12,13].

In addition, for each macronutrient deficiency, a metabolomic approach was implemented. The comparative analysis of metabolomic and transcriptomic modulations should have facilitated the deciphering of the biological processes involved in the response to macronutrient deprivation, but the overall connection between transcriptomic and metabolomic results remained elusive. This difficulty has been reported previously for nitrogen starvation in *Arabidopsis thaliana* by [56]. Nevertheless, in our study, chemical similarity clustering of major metabolite classes (Supplementary Data SD6 and Figure 7) revealed that the macronutrient deficiencies that resulted in the greatest number of enriched metabolite classes were also those with the greatest number of DEGS (N, P, and Ca deprivations; Figures 1B and 7), and vice versa (S, Mg, and K deprivations; Figures 1B and 7). Furthermore, all macronutrient deprivations led to an enrichment of the "amino acid" class, which is in agreement with a previous study also showing that P, K, Ca, or Mg macronutrient deficiencies all led to amino acid accumulation in bell pepper leaves and roots [57]. This accumulation of amino acids is consistent with GO enrichment analyses that show that all macronutrient deficiencies enriched protein synthesis and amino acid-related GO terms ("translation" and/or "ribosome" for N, S, P, and Ca deprivation and "metabolic/catabolic process of alpha amino acids" for Mg and K deprivation; Figure 2). It can be noticed that the enrichment analysis of metabolic similarities does not provide evidence for deprivation-specific metabolism. Indeed, with the exception of the metabolic classes "unsaturated fatty acids" and "DiHODE" that were specifically enriched in response to Mg deprivation, the other enriched metabolite classes (e.g., "amino acids", "flavonoids", "cinnamate", "coumaric acid", "indoles", and "xanthine") were always common to at least two deprivations.

3.2. Identification of Sets of DEGs and Metabolomic Profiles Specific to Each Macronutrient Deprivation

When considering the molecular responses to each macronutrient deprivation separately, it is not possible to identify a set of DEGs or metabolites specifically affected by each one. Only a few studies have compared the transcriptome response to several nutrient deprivations simultaneously, and even then, such work has been restricted to deficiencies in the three major macronutrients, N, P, and K [58,59]. To our knowledge, the only other work examining the effects of a large group of macronutrients is a study that was performed on 13 different nutrient availability anomalies in Arabidopsis [58]. However, even though this earlier study is relevant and provided new insights, the meta-analysis used had some limitations due to the dataset being derived from independent experiments that were performed with various genotypes, growing conditions, and treatment procedures. The strength of our study is the simultaneous deprivation of six individual macronutrients, which allowed us to carry out a comparative analysis of the molecular responses of each deprivation. Consequently, it was possible to identify DEGs common to several macronutrient deficiencies. As expected, those that shared the most DEGs (Figure 4, Supplementary Data SD3) were deprivations that involved macronutrients for which metabolic interactions were highlighted in the overall analysis discussed earlier (i.e., N, P, S, and/or Ca deprivations). In contrast, it was only when Mg and K deprivations were included that less common DEGs were found. More interestingly, this comparative analysis enabled the identification of a novel set of DEGs that were specifically upregulated and downregulated for each individual deprivation and for each of the six macronutrients (Figure 4, Supplementary Data SD3). In all cases, large sets of specific DEGs were identified (6325, 5157, 3282, 2011, 1384, and 439 for P, Ca, N, Mg, S, and K deprivation, respectively). Surprisingly, although these DEGs were specific to individual macronutrient deprivations, their GO enrichment analysis highlighted biological processes that were common to several macronutrient deprivations. This apparent discrepancy can be explained by the possibility that different specific DEGs may encode different enzymes involved in the same metabolic pathway or even encode different isoforms of the same enzyme.

To illustrate this, we focused on the S-related and transport biological process GO terms that were enriched in five and four out of the six macronutrient deprivations, respectively (Figures 4 and 6). While a few specific DEGs encoded enzymes or transporters related to S that were found in only one macronutrient deprivation (e.g., glycosyl transferase or S transporter (SULTR) for P or S deprivation, respectively), numerous specific DEGs encoded different isoforms of the same enzyme found in several macronutrient deprivations, such as APS kinase in the N, Mg, and S deprivations (Table 2). This enrichment of the S metabolic pathways by specific DEGs for each macronutrient deprivation could be a consequence of the central role of S metabolism in the cell. Indeed, S metabolism provides cysteine for protein and glutathione synthesis, but also sulfated secondary metabolites involved in oxidative stress homeostasis in plants subjected to various stress conditions [60]. Considering specific DEGs encoding ion transporters, similar conclusions could be made because the transport of a given nutrient can be affected by several macronutrient deprivations through regulation of isoforms specific to each macronutrient deprivation. These two examples focusing on genes related to S and transport illustrate how several elements can interact in the transport and metabolism of other elements by modulating specific targets, and thus highlight the complexity of mineral interactions [3].

Similarly, the metabolic pathway enrichment analysis of all metabolic data focused on the 38 most discriminating metabolites (VIP > 4) but did not enable the identification of a specific metabolic pathway for any macronutrient deprivation (data not shown). Considering the biochemical classification and hierarchical clustering of the 38 most discriminating compounds, even though some trends seemed to emerge (e.g., loss of S-containing compounds and accumulation of phenylpropanoids under S and N deprivations, respectively), no clear evidence of a specific response to macronutrient deprivation could be found (Figure 8).

3.3. Towards Molecular Indicators to Discriminate Macronutrient Deficiencies

Diagnosis of a specific macronutrient deprivation can be challenging because the phenotypic and physiological responses are generally common [3], and therefore, there is little discriminating power. Over the past few decades, a handful of targeted transcriptomic approaches have been carried out [61–64], but they most often failed because the low number of gene candidates that were identified were modulated by deprivations in other macronutrients. To overcome this difficulty, one solution is to use a large-scale transcriptomic approach. This has been conducted by several authors, but most of the time, the limited number of macronutrient deprivations studied does not ensure that candidate genes are truly specific for a given macronutrient deprivation. The originality of the present study was to perform a comparative molecular analysis (transcriptomic and metabolomic) of six macronutrient deprivations (N, Mg, P, S, K, and Ca). For the first time, a large dataset of DEGs (amongst which 9844 were up-regulated, Figure 4) specific to each individual macronutrient deprivation is now available, from which a subset of specific DEGs could be extracted to detect each macronutrient deprivation. Concomitantly, this study also provides metabolomics analysis for the six macronutrient deprivations. Only a few metabolites seem to be specific to a macronutrient deprivation (methyl cinnamate, 6-methyl-5-{3-[2-(trifluoromethyl)phenoxy]propoxy}-2,4(1H,3H)-pyrimidinediimine, 1-linoleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphatidylcholine and 1-(9Z,12Z-octadecadienoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine for N deprivation; uridine 5′-diphosphogalactose for K deprivation; and D−(+)-malic acid for Ca deprivation; Figure 8). Nevertheless, taken together, the 38 most discriminating metabolites provide a specific metabolomic profile for the six individual macronutrient deprivations that could also be used as potential indicators of each macronutrient deprivation.

Results from our study constitute a relevant candidate database that foreshadows the development of a diagnostic tool for macronutrient deprivations. Nevertheless, numerous steps are still needed to reach this goal. This large data set of DEGs could be reduced, for example, by extracting those that are also expressed in other tissues such as leaves and

considered generic if they are found in different cultivated species. Finally, it might be necessary to check the specificity of the molecular candidates when plants are faced with other biotic and abiotic stresses and/or multiple macronutrient deprivations. Ultimately, such a diagnostic tool could allow early and accurate detection of nutritional deficiencies in order to improve the management of field crop fertilization.

4. Material and Methods

4.1. Plant Material and Growth Conditions

Oilseed rape (*Brassica napus* cv. Trezzor) was grown in a greenhouse (20 °C day/15 °C night) in controlled hydroponic conditions. Seeds were germinated on perlite over demineralized water for five days in the dark and then under natural light until the first leaf appearance. At this stage, 10 seedlings were transferred into 10 L plastic containers (400 × 300 × 115 mm), each holding ten seedlings that were exposed to natural light supplemented by high-pressure sodium lamps (HPS 400 Watt, Hortilux Schreder, Monster, Netherlands), which, in combination, attained 350 µmol m^{-2} s^{-1} of photosynthetically active radiation for 16 h. As previously described by [9,10], the complete nutrient solution contained: 1 mM KNO_3, 1.25 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.2 mM KH_2PO_4, 0.4 mM $MgSO_4$, 0.5 µM NaFe-EDTA, 50 µM NaFe-EDDHA, 10 µM H_3BO_3, 3 µM $MnSO_4$, 3 µM $ZnSO_4$, 0.7 µM $CuSO_4$, 0.008 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.1 µM $CoCl_2$, 0.15 µM $NiCl_2$, 0.9 mM $Si(OH)_4$, 0.5 mM $CaCl_2$, 0.1 mM KCl, 0.01 µM Na_2SeO_4, 0.1 mM K_2SO_4, and 0.2 mM Na_2SiO_3 buffered to pH 6.8 with 0.36 mM $CaCO_3$. The NO_3^- concentration was monitored with nitrate test strips (Macherey-Nagel, Düren, Germany) in order to maintain optimal nutrition conditions. The nutrient solution was continuously aerated and renewed each time the NO_3^- concentration reached thirty percent of its initial concentration.

After 24 days of growth with the complete nutrient solution, plants were separated into seven subsets: control plants, which were left in the complete nutrient solution, and six other groups that received a specific solution deprived of a single macronutrient (−N, −Mg, −P, −S, −K, or −Ca). These nutrient-deficient solutions adapted from the complete solution as previously described by [9] are detailed in Supplemental Table SD1. Throughout the deprivation treatments, photosynthetic activity was assessed every three days with a Li-6800 portable photosynthesis system (LI-COR, Lincoln, NE, United States) at 1000 µmol m^2 s^{-1} of photon flux density (PFD) with chamber settings (i.e., temperature and relative humidity) matching environmental conditions.

For each treatment (control and macronutrient deprivations), five replicates of two individual plants were harvested after 10 days of macronutrient deprivation. This duration of privation was chosen according to [65] and [66] so that plants were harvested before a significant decrease in growth would occur in response to the macronutrient deprivation. After shoot and root fresh weight determination, root sample was split into two homogenous aliquots. One was frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C for transcriptomic and metabolomic analysis. The other was dried for 72 h at 70 °C for dry weight determination and elemental analysis performed with Isotopic-Ratio Mass Spectrometry (IRMS) for N and S and high-resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) for all other elements, as previously described in Courbet et al. (2021).

4.2. RNA Extraction, Reverse Transcription and Q-PCR Analyses

Total RNAs were extracted from 200 mg of fresh root samples previously powdered using a mortar containing liquid nitrogen, according to the protocols of [67,68]. Briefly, 750 µL of hot phenol (80 °C, pH 4.3) and 750 µL of extraction buffer (0.1M TRIS, 0.1M LiCl, 0.01M EDTA, 1 % SDS (*w*/*v*), pH 8) were added and the mixture was vortexed for 40 s. Then, 750 µL of chloroform:isoamylalcohol (24/1: *v*/*v*) was added before centrifugation at 15,000× *g* for 5 min at 4 °C. The supernatant was recovered and 750 µL of a 4M LiCl solution (*w*/*v*) were added for nucleic acid precipitation overnight at 4 °C. The mixture was then centrifuged at 15,000× *g* for 20 min at 4 °C, the supernatant was removed, and 100 µL of sterile water was used to suspend the pellet. Extracted RNAs were purified by

DNAse digestion using RNA Clean & Concentrator kits (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Total RNA quantification was evaluated by spectrophotometry at 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq, France) before Reverse Transcription (RT). A 1 µg quantity of total RNAs was converted to cDNAs using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France).

For qPCR, 4 µL of 100× diluted cDNAs were added to 11 µL of 1X SYBR Green Master Mix (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) containing 0.5 µM of specific primers. Amplification reactions were performed with a real-time thermocycler (CFX96 Real Time System, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France) using the following three step program: an activation step at 95 °C for 3 min, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, and finally, an extending step at 60 °C for 40 s. For q-PCR amplifications, the primers used are provided in Supplemental Table SD2A. For each pair of primers, threshold values and PCR efficiency (≈100%) were determined using a range of serial cDNA dilutions. The single peak in the melting curves and the sequencing of the amplicon (Eurofins, Nantes, France) validated the specificity of the amplification for each primer pair. Gene expression in the roots of macronutrient-deprived plants was calculated relative to the control with the ΔΔCt method using the following equation:

Relative expression = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

With

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{control} \quad (1)$$

and

$$\Delta Ct = Ct_{target\ gene} - Ct_{housekeeping\ gene} \quad (2)$$

Using this method, root relative expression of the target gene in the control sample (without nutrient deprivation) was equal to 1 [69].

4.3. Transcriptomic Analysis by RNA-Sequencing (RNA-Seq)

The RNA-seq samples were obtained with Illumina NexSeq500 from POPS platform of Institute of Plant Science (IPS2) in Paris-Saclay (France). RNA-seq libraries were generated with the TruSeq Stranded mRNA protocol (Illumina®, California, CA, USA) with an average size of 260 bp and were sequenced in paired-end (PE) mode with a read length of 75 bases on the NextSeq500 with approximately 25 million PE reads per sample. To remove poor quality sequences, classical trimming (Qscore > 20, read length > 30) was performed and the STAR_2.5.2a mapper was used to align reads against the *Brassica napus* transcriptome (with local option and other default parameters). The abundance of each of the (annotation V5 from Genoscope accessed in February 2021: http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/data/) was evaluated by unequivocal mapping of the PE reads to each gene. According to this method, 25% of reads were unmapped and 10% of reads with multi-hits were removed. Finally, 65% of reads may have combined with a gene without ambiguity.

Differential analysis of each gene followed the procedure described in [70]. Library size was normalized using the trimmed mean of M-values (TMM) method and count distribution was modeled with a negative binomial generalized linear model. Dispersion was estimated by the edgeR method (V1.12.0, [71]). Gene expression was compared between each macronutrient deprivation and control plants using the likelihood ratio test, and *p*-values were adjusted by the Benjamini–Hochberg procedure to control the False Discovery Rate (FDR, *p*-value < 0.05). We chose to consider a gene as differentially expressed (DEG) for an adjusted *p*-value $\leq$ 0.05, whatever the absolute value of the "Log2 fold change" (Supplementary Data SD3). Fragments Per Kilobase Million (FPKMs) were calculated for visual analysis only and were obtained by dividing normalized counts by gene length. PCA was performed with the FactoMineR 2.3 package under R (v 3.6.3) using log2-transformed normalized expression data.

RNA-seq expression data were validated by using eight DEGs with contrasting fold changes for RT-qPCR analysis. RT and qPCR were performed following the protocol described previously. Results of RT-qPCRs are presented in Supplemental Data SD2B.

4.4. RNA-Seq Bioinformatic Analysis

Gene ontology enrichment analysis for Differentially Expressed Genes (DEGs) was performed with gene ontology (GO) information slimmed to plants using g:Profiler (version e103_eg50_p15_eadf141) with the g:SCS multiple testing correction method (threshold of 0.05; [72]) and ReviGO (version February 01, 2021, with medium allowed similarity; [73]).

Among genes that are differentially expressed for at least one macronutrient deprivation, a set of *Brassica napus* DEGs was generated by filtering for the occurrence of the "transport" term in the annotation V5 from Genoscope. This list was supplemented with a set of DEGs associated with the GO term "ion transport" (GO:0006811) extracted from Amigo2 and unambiguously related to the transport of known elements (B, Ca, Cd, Cl, Co, Cu, F, Fe, K, Mg, Mn, N, Na, Ni, P, S, and Zn). This set of 302 DEGs encoding ion transporters is presented in Supplemental Data SD5.

4.5. Element Analysis by Mass Spectrometry and Uptake Calculation

As previously described by [9], dried samples were ground with 4 mm diameter inox beads using an oscillating grinder (Mixer Mill MM400, Retsch, Haan, Germany). Most macroelement (Mg, P, S, K, Ca) concentrations were quantified with 40 mg of dry powder previously subjected to mineralization, using high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS, Element 2^{TM}, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) following the procedure described in [64].

Total N measurement was analyzed with 1.5 mg of fine powder placed in tin capsules before analysis with an isotope-ratio mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester, U.K.) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

Whole plant quantity (i.e., sum of all tissue quantities) was determined before the 10-day net uptake calculation as follow:

$$10\ day\ net\ uptake = \sum_{i\ 1}^{n} Q_{Day\ 10} - \sum_{i\ 1}^{n} Q_{Day\ 0}$$

where n = 5 tissues (roots, mature leaves, young leaves, mature petioles, young petioles) and Q = quantity of each element. This calculation was performed with consideration of all random combinations between the set of five replicates of Day 0 and Day 10. Thus, 10-day net uptake is indicated as the mean ± S.E for n = 25.

4.6. Untargeted Metabolic Profiling Using UPLC-MS/MS

Fifty milligrams of ground frozen root tissues were weighed and extracted with 1 mL of 70% MeOH (Optima LCMS grade, Fisher, U.K.), 29% H_2O (Milli-Q, 18.2 MΩ·cm, Millipore, MA, USA) and 1% formic acid (LCMS grade, Fluka analytics, Germany). After extraction, samples were centrifuged, and the supernatant was collected for UPLC-MS/MS (ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) analysis. For the UPLC-MS/MS analysis, the separation and the detection were accomplished using an Acquity UPLC system (Waters, MA, USA) coupled to a Xevo G2-S QTof mass spectrometer (Waters) equipped with an LockSpray electrospray ionization (ESI) source. Sample separation was carried out by injecting 10 µL into an HSS T3 C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm column (Waters) at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}, and the column oven was maintained at 40 °C. The mobile phases were composed of solvent A (Milli-Q water containing 0.1% formic acid) and solvent B (acetonitrile containing 0.1% formic acid). The separation was achieved by the following gradient: 0–1 min at 98% A, 1–7 min from 98% to 0% A, maintained at 0% A to 9 min, 9–10 min from 0% to 98% A, maintained at 98% until 12 min for column regeneration. The MS analysis was carried out in positive and negative ionization modes with the following parameters: source voltage 0.5 kV (pos) and 2.5 kV (neg); cone voltage 40 V; source temperature 130 °C; desolvation gas temperature 550 °C; desolvation gas flow 900 L/h. Mass spectra were acquired in MSE mode from 50 to 1200 m/z at 0.1 s scan^{-1}. The ramp collision energy was set at 25 to 40 V. For each macronutrient deprivation, all

metabolites significantly modulated compared to control are listed in Supplemental Data SD7. Compound IDs were added to each metabolites using ChemSpider. A chemical similarity enrichment analysis was performed using ChemRICH [74,75] which determines metabolite groups by hierarchical Tanimoto map. The *p*-value of each enriched group is given by the Kolmogorov-Smirnov test.

4.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was based on five independent replicates each consisting of a pool of two individual plants, except for transcriptomic data, for which three independent replicates were used. Thus, plant biomass and photosynthesis are indicated as the mean ± S.E for n = 5, while net nutrient uptake was given as the mean ± S.E. for n = 25. Statistical analyses were performed using R software (v4.0.3) [76] and R Commander (v2.7-1). Significant differences between macronutrient deficient plants and control plants were determined using Student's *t*-test. Heatmaps and clustering were generated with R Commander (v2.7-1) from the heatmap 2 package or the Morpheus-Broad Institute (https://software.broadinstitute.org). Regarding the metabolomics data, multivariate analysis was performed and allowed us to assign a variable importance in projection (VIP) score to each metabolite in order to determine the relative contribution of each metabolite to discriminate each macronutrient deficiency from the other.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222111679/s1.

Author Contributions: Conceptualization: G.C., A.D., A.M., S.P. (Sylvain Pluchon), M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E.; methodology: G.C., L.J., S.P. (Stéphanie Pateyron), C.P.L.R., S.D., A.O., J.T. and P.E.; software: G.C., A.D., L.J., S.P. (Stéphanie Pateyron), C.P.L.R. and J.T.; validation: G.C., A.D., A.M., S.P. (Stéphanie Pateyron), M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E.; formal analysis: G.C., L.J., S.P. (Stéphanie Pateyron), C.P.L.R., J.T. and P.E.; investigation: G.C., A.D., A.M., S.P. (Sylviain Plucho), M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E.; resources: G.C., A.D., A.M., S.P. (Sylvain Pluchon), M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E; data curation: G.C., A.D., A.M., S.P. (Stéphanie Pateyron), M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E.; writing—original draft preparation: G.C., A.D., S.D., A.O., J.T. and P.E.; writing—review and editing: G.C., A.D., A.M., S.P. (Sylvain Pluchon), M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E.; visualization: G.C., A.D., A.M., S.P., M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E; supervision: G.C., A.D., A.M., S.P. (Sylvain Pluchon), M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E.; visualization: G.C., A.D., A.M., S.P. (Sylvain Pluchon), M.A., S.D., A.O., J.T. and P.E.; project administration: S.P. (Sylvain Pluchon), M.A., A.O.; funding acquisition: S.P. (Sylvain Pluchon), M.A., A.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is a part of the EAUPTIC project supported by the Regional Council of Normandy (CRN, grant number 17P07231), "Fond Unique Interministériel" (FUI, grant number 3870401/1), the Centre Mondial de l'Innovation (CMI) of the Roullier Group (Ph.D. CIFRE grant to A.D.), and the French Ministry of Research (Ph.D. grant to G.C.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: RNAseq data were submitted to the Gene Expression Omnibus (GEO) international repository: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo; GEO accession: GSE180378.

Acknowledgments: The authors thank the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis, the POPS transcriptomic platform supported by the Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007) for undertaking RNAseq, as well as Julie Frémont for RT-qPCR analysis. The authors thank Laurence Cantrill for improving the English in this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Amtmann, A.; Armengaud, P. Effects of N, P, K and S on metabolism: New knowledge gained from multi-level analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, *12*, 275–283. [CrossRef] [PubMed]
2. O'Rourke, J.A.; McCabe, C.E.; Graham, M.A. Dynamic gene expression changes in response to micronutrient, macronutrient, and multiple stress exposures in soybean. *Funct. Integr. Genom.* **2020**, *20*, 321–341. [CrossRef]
3. De Bang, T.C.; Husted, S.; Laursen, K.H.; Persson, D.P.; Schjoerring, J.K. The molecular–physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. *New Phytol.* **2021**, *229*, 2446–2469. [CrossRef]
4. Silva, E.D.B.; Santos, A.A.; De Mattos, A.M.; Neto, A.M.B.; Da Cruz, M.D.C.M.; Moreira, R.A.; Júnior, V.C.D.A.; Gonçalves, E.D.; De Oliveira, L.F. Visual symptoms of nutrient deficiencies in *Physalis peruviana* L. *Biosci. J.* **2017**, *33*, 105–112. [CrossRef]
5. Koné, B.; Emile, Y.; Amadji, G.L.; N'Ganzou, K.R. Root and Grain Yield as Affected by Soil Nutrient Deficiency and Fertilizer in Rainfed Rice Cultivation. *Advanced fertilizer technology Syntheis* **2014**, *2*, 213–219.
6. Tränkner, M.; Jákli, B.; Tavakol, E.; Geilfus, C.-M.; Cakmak, I.; Dittert, K.; Senbayram, M. Magnesium deficiency decreases biomass water-use efficiency and increases leaf water-use efficiency and oxidative stress in barley plants. *Plant Soil* **2016**, *406*, 409–423. [CrossRef]
7. Baxter, I.R.; Vitek, O.; Lahner, B.; Muthukumar, B.; Borghi, M.; Morrissey, J.; Guerinot, M.L.; Salt, D.E. The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 12081–12086. [CrossRef]
8. Baxter, I. Ionomics: Studying the social network of mineral nutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, *12*, 381–386. [CrossRef] [PubMed]
9. Courbet, G.; D'Oria, A.; Lornac, A.; Diquélou, S.; Pluchon, S.; Arkoun, M.; Koprivova, A.; Kopriva, S.; Etienne, P.; Ourry, A. Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* Subjected to Macronutrient Deprivation. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*. [CrossRef] [PubMed]
10. D'Oria, A.; Courbet, G.; Lornac, A.; Pluchon, S.; Arkoun, M.; Maillard, A.; Etienne, P.; Diquélou, S.; Ourry, A. Specificity and Plasticity of the Functional Ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* Exposed to Micronutrient or Beneficial Nutrient Deprivation and Predictive Sensitivity of the Ionomic Signatures. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*. [CrossRef]
11. Maillard, A.; Etienne, P.; Diquélou, S.; Trouverie, J.; Billard, V.; Yvin, J.-C.; Ourry, A. Nutrient deficiencies modify the ionomic composition of plant tissues: A focus on cross-talk between molybdenum and other nutrients in *Brassica napus*. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 5631–5641. [CrossRef]
12. Maathuis, F.J. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, *12*, 250–258. [CrossRef] [PubMed]
13. Hawkesford, M.; Horst, W.; Kichey, T.; Lambers, H.; Schjoerring, J.; Møller, I.S.; White, P. Chapter 6-Functions of Macronu-trients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd ed.; Marschner, P., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2012; pp. 135–189.
14. Desclos, M.; Etienne, P.; Coquet, L.; Jouenne, T.; Bonnefoy, J.; Segura, R.; Reze, S.; Ourry, A.; Avice, J.-C. 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. *Proteomics* **2009**, *9*, 3580–3608. [CrossRef]
15. Onodera, J.; Ohsumi, Y. Autophagy Is Required for Maintenance of Amino Acid Levels and Protein Synthesis under Nitrogen Starvation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31582–31586. [CrossRef] [PubMed]
16. Hawkesford, M.J. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 131–138. [CrossRef] [PubMed]
17. Davidian, J.-C.; Kopriva, S. Regulation of Sulfate Uptake and Assimilation—the Same or Not the Same? *Mol. Plant* **2010**, *3*, 314–325. [CrossRef] [PubMed]
18. Kopriva, S.; Malagoli, M.; Takahashi, H. Sulfur nutrition: Impacts on plant development, metabolism, and stress responses. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 4069–4073. [CrossRef]
19. Willows, R.D. Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 327–341. [CrossRef] [PubMed]
20. Lambers, H.; Finnegan, P.; Jost, R.; Plaxton, W.; Shane, M.W.; Stitt, M. Phosphorus nutrition in Proteaceae and beyond. *Nat. Plants* **2015**, *1*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
21. Hocking, B.; Tyerman, S.D.; Burton, R.A.; Gilliham, M. Fruit Calcium: Transport and Physiology. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 569. [CrossRef]
22. Aldon, D.; Mbengue, M.; Mazars, C.; Galaud, J.-P. Calcium Signalling in Plant Biotic Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 665. [CrossRef] [PubMed]
23. Thor, K. Calcium—Nutrient and Messenger. *Front. Plant. Sci.* **2019**, *10*. [CrossRef] [PubMed]
24. Leigh, R.A.; Wyn Jones, R.G. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol.* **1984**, *97*, 1–13. [CrossRef]
25. Cushman, J.C. Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture. *Am. Zoöl.* **2001**, *41*, 758–769. [CrossRef]
26. Hafsi, C.; Debez, A.; Abdelly, C. Potassium deficiency in plants: Effects and signaling cascades. *Acta Physiol. Plant.* **2014**, *36*, 1055–1070. [CrossRef]
27. Yang, W.; Yoon, J.; Choi, H.; Fan, Y.; Chen, R.; An, G. Transcriptome analysis of nitrogen-starvation-responsive genes in rice. *BMC Plant. Biol.* **2015**, *15*, 1–12. [CrossRef]
28. Curci, P.L.; Cigliano, R.A.; Zuluaga, D.L.; Janni, M.; Sanseverino, W.; Sonnante, G. Transcriptomic response of durum wheat to nitrogen starvation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]

29. Nikiforova, V.; Freitag, J.; Kempa, S.; Bielecka, M.; Hesse, H.; Hoefgen, R. Transcriptome analysis of sulfur depletion inArabidopsis thaliana: Interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant. J.* **2003**, *33*, 633–650. [CrossRef] [PubMed]
30. Bielecka, M.; Watanabe, M.; Morcuende, R.; Scheible, W.-R.; Hawkesford, M.; Hesse, H.; Hoefgen, R. Transcriptome and metabolome analysis of plant sulfate starvation and resupply provides novel information on transcriptional regulation of metabolism associated with sulfur, nitrogen and phosphorus nutritional responses in Arabidopsis. *Front. Plant. Sci.* **2015**, *5*, 805. [CrossRef]
31. Yu, Z.; Juhasz, A.; Islam, S.; Diepeveen, D.; Zhang, J.; Wang, P.; Ma, W. Impact of mid-season sulphur deficiency on wheat nitrogen metabolism and biosynthesis of grain protein. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–13. [CrossRef]
32. Canales, J.; Uribe, F.; Henríquez-Valencia, C.; Lovazzano, C.; Medina, J.; Vidal, E.A. Transcriptomic analysis at organ and time scale reveals gene regulatory networks controlling the sulfate starvation response of *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant. Biol.* **2020**, *20*, 1–17. [CrossRef]
33. Ma, T.-L.; Wu, W.-H.; Wang, Y. Transcriptome analysis of rice root responses to potassium deficiency. *BMC Plant. Biol.* **2012**, *12*, 161. [CrossRef] [PubMed]
34. Armengaud, P.; Breitling, R.; Amtmann, A. The Potassium-Dependent Transcriptome of Arabidopsis Reveals a Prominent Role of Jasmonic Acid in Nutrient Signaling. *Plant. Physiol.* **2004**, *136*, 2556–2576. [CrossRef] [PubMed]
35. Wang, Y.; Li, B.; Du, M.W.; Eneji, A.E.; Wang, B.M.; Duan, L.S.; Li, Z.H.; Tian, X.L. Mechanism of phytohormone involvement in feedback regulation of cotton leaf senescence induced by potassium deficiency. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 5887–5901. [CrossRef] [PubMed]
36. Zeng, J.; He, X.; Wu, D.; Zhu, B.; Cai, S.; Nadira, U.A.; Jabeen, Z.; Zhang, G. Comparative Transcriptome Profiling of Two Tibetan Wild Barley Genotypes in Responses to Low Potassium. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100567. [CrossRef] [PubMed]
37. He, Y.; Li, R.; Lin, F.; Xiong, Y.; Wang, L.; Wang, B.; Guo, J.; Hu, C. Transcriptome Changes Induced by Different Potassium Levels in Banana Roots. *Plants* **2019**, *9*, 11. [CrossRef] [PubMed]
38. Sega, P.; Kruszka, K.; Bielewicz, D.; Karlowski, W.; Nuc, P.; Szweykowska-Kulinska, Z.; Pacak, A. Pi-starvation induced transcriptional changes in barley revealed by a comprehensive RNA-Seq and degradome analyses. *BMC Genom.* **2021**, *22*, 1–25. [CrossRef]
39. Mo, X.; Zhang, M.; Liang, C.; Cai, L.; Tian, J. Integration of metabolome and transcriptome analyses highlights soybean roots responding to phosphorus deficiency by modulating phosphorylated metabolite processes. *Plant. Physiol. Biochem.* **2019**, *139*, 697–706. [CrossRef] [PubMed]
40. Yang, L.-T.; Zhou, Y.-F.; Wang, Y.-Y.; Wu, Y.-M.; Ye, X.; Guo, J.-X.; Chen, L.-S. Magnesium Deficiency Induced Global Transcriptome Change in *Citrus sinensis* Leaves Revealed by RNA-Seq. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3129. [CrossRef] [PubMed]
41. Shankar, A.; Srivastava, A.K.; Yadav, A.K.; Sharma, M.; Pandey, A.; Raut, V.V.; Das, M.K.; Suprasanna, P.; Pandey, G.K. Whole genome transcriptome analysis of rice seedling reveals alterations in Ca^{2+} ion signaling and homeostasis in response to Ca^{2+} deficiency. *Cell Calcium* **2014**, *55*, 155–165. [CrossRef]
42. Akmouche, Y.; Cheneby, J.; Lamboeuf, M.; Elie, N.; Laperche, A.; Bertheloot, J.; D'Hooghe, P.; Trouverie, J.; Avice, J.-C.; Etienne, P.; et al. Do nitrogen- and sulphur-remobilization-related parameters measured at the onset of the reproductive stage provide early indicators to adjust N and S fertilization in oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown under N- and/or S-limiting supplies? *Planta* **2019**, *250*, 2047–2062. [CrossRef]
43. Poisson, E.; Trouverie, J.; Brunel-Muguet, S.; Akmouche, Y.; Pontet, C.; Pinochet, X.; Avice, J.-C. Seed Yield Components and Seed Quality of Oilseed Rape Are Impacted by Sulfur Fertilization and Its Interactions With Nitrogen Fertilization. *Front. Plant. Sci.* **2019**, *10*, 458. [CrossRef] [PubMed]
44. Tian, J.; Wang, C.; Zhang, Q.; He, X.; Whelan, J.; Shou, H. Overexpression ofOsPAP10a, A Root-Associated Acid Phosphatase, Increased Extracellular Organic Phosphorus Utilization in Rice. *J. Integr. Plant. Biol.* **2012**, *54*, 631–639. [CrossRef] [PubMed]
45. Kim, M.J.; Ciani, S.; Schachtman, D.P. A Peroxidase Contributes to ROS Production during Arabidopsis Root Response to Potassium Deficiency. *Mol. Plant.* **2010**, *3*, 420–427. [CrossRef] [PubMed]
46. DU, Q.; Zhao, X.-H.; Xia, L.; Jiang, C.-J.; Wang, X.-G.; Han, Y.; Wang, J.; Yu, H.-Q. Effects of potassium deficiency on photosynthesis, chloroplast ultrastructure, ROS, and antioxidant activities in maize (*Zea mays* L.). *J. Integr. Agric.* **2019**, *18*, 395–406. [CrossRef]
47. Behera, S.; Long, Y.; Schmitz-Thom, I.; Wang, X.; Zhang, C.; Li, H.; Steinhorst, L.; Manishankar, P.; Ren, X.; Offenborn, J.N.; et al. Two spatially and temporally distinct Ca^{2+} signals convey *Arabidopsis thaliana* responses to K + deficiency. *New Phytol.* **2017**, *213*, 739–750. [CrossRef] [PubMed]
48. Hammond, J.P.; Broadley, M.; White, P. Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. *Ann. Bot.* **2004**, *94*, 323–332. [CrossRef]
49. Malhotra, H.; Sharma, S.; Pandey, R. Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess. In *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*; Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., Hawrylak-Nowak, B., Eds.; Springer: Singapore, 2018; pp. 171–190. [CrossRef]
50. Krouk, G.; Kiba, T. Nitrogen and Phosphorus interactions in plants: From agronomic to physiological and molecular insights. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2020**, *57*, 104–109. [CrossRef] [PubMed]
51. Jamal, A.; Moon, Y.-S.; Zainul Abdin, M. Sulphur-a General Overview and Interaction with Nitrogen. *Aust. J. Crop. Sci.* **2010**, *4*, 523.
52. Kopriva, S. Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: Interaction with N and C metabolism. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 1831–1842. [CrossRef]

53. Guo, W.; Nazim, H.; Liang, Z.; Yang, D. Magnesium deficiency in plants: An urgent problem. *Crop. J.* **2016**, *4*, 83–91. [CrossRef]
54. Aarabi, F.; Naake, T.; Fernie, A.R.; Hoefgen, R. Coordinating Sulfur Pools under Sulfate Deprivation. *Trends Plant. Sci.* **2020**, *25*, 1227–1239. [CrossRef] [PubMed]
55. Aziz, T.; Sabir, M.; Farooq, M.; Maqsood, M.A.; Ahmad, H.R.; Warraich, E.A. *Phosphorus Deficiency in Plants: Responses, Adaptive Mechanisms, and Signaling. Plant Signaling: Understanding the Molecular Crosstalk*; Springer: New Delhi, India, 2014; pp. 133–148.
56. Krapp, A.; Berthomé, R.; Orsel, M.; Mercey-Boutet, S.; Yu, A.; Castaings, L.; Elftieh, S.; Major, H.; Renou, J.-P.; Daniel-Vedele, F. Arabidopsis Roots and Shoots Show Distinct Temporal Adaptation Patterns toward Nitrogen Starvation. *Plant. Physiol.* **2011**, *157*, 1255–1282. [CrossRef] [PubMed]
57. Kim, Y.X.; Kim, T.J.; Lee, Y.; Lee, S.; Lee, D.; Oh, T.-K.; Sung, J. Metabolite profiling and mineral nutrient analysis from the leaves and roots of bell pepper (*Capsicum annuum* L. var. *angulosum*) grown under macronutrient mineral deficiency. *Appl. Biol. Chem.* **2018**, *61*, 661–671. [CrossRef]
58. Takehisa, H.; Sato, Y.; Antonio, B.; Nagamura, Y. Coexpression Network Analysis of Macronutrient Deficiency Response Genes in Rice. *Rice* **2015**, *8*, 59. [CrossRef] [PubMed]
59. Zhu, Z.; Li, D.; Wang, P.; Li, J.; Lu, X. Transcriptome and ionome analysis of nitrogen, phosphorus and potassium interactions in sorghum seedlings. *Theor. Exp. Plant. Physiol.* **2020**, *32*, 271–285. [CrossRef]
60. Brumbarova, T.; Ivanov, R. The Nutrient Response Transcriptional Regulome of Arabidopsis. *iScience* **2019**, *19*, 358–368. [CrossRef] [PubMed]
61. Chan, K.X.; Phua, S.Y.; Van Breusegem, F. Secondary sulfur metabolism in cellular signalling and oxidative stress responses. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 4237–4250. [CrossRef] [PubMed]
62. Shigaki, T.; Hirschi, K. Characterization of CAX-like genes in plants: Implications for functional diversity. *Gene* **2000**, *257*, 291–298. [CrossRef]
63. Hermans, C.; Vuylsteke, M.; Coppens, F.; Cristescu, S.M.; Harren, F.J.M.; Inzé, D.; Verbruggen, N. Systems analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **2010**, *187*, 132–144. [CrossRef] [PubMed]
64. Kamiya, T.; Yamagami, M.; Hirai, M.; Fujiwara, T. Establishment of an in planta magnesium monitoring system using CAX3 promoter-luciferase in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **2011**, *63*, 355–363. [CrossRef] [PubMed]
65. Verbruggen, N.; Hermans, C. Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. *Plant. Soil* **2013**, *368*, 87–99. [CrossRef]
66. Maillard, A.; Diquélou, S.; Billard, V.; Laîné, P.; Garnica, M.; Prudent, M.; Garcia-Mina, J.-M.; Yvin, J.-C.; Ourry, A. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Front. Plant. Sci.* **2015**, *6*, 317. [CrossRef] [PubMed]
67. Sorin, E.; Etienne, P.; Maillard, A.; Zamarreño, A.-M.; Garcia-Mina, J.-M.; Arkoun, M.; Jamois, F.; Cruz, F.; Yvin, J.-C.; Ourry, A. Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: Identification of a new early indicator. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 6175–6189. [CrossRef] [PubMed]
68. Haddad, C.; Arkoun, M.; Jamois, F.; Schwarzenberg, A.; Yvin, J.-C.; Etienne, P.; Laîné, P. Silicon Promotes Growth of *Brassica napus* L. and Delays Leaf Senescence Induced by Nitrogen Starvation. *Front. Plant. Sci.* **2018**, *9*, 516. [CrossRef] [PubMed]
69. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef]
70. Rigaill, G.; Balzergue, S.; Brunaud, V.; Blondet, E.; Rau, A.; Rogier, O.; Caius, J.; Maugis-Rabusseau, C.; Soubigou-Taconnat, L.; Aubourg, S.; et al. Synthetic data sets for the identification of key ingredients for RNA-seq differential analysis. *Briefings Bioinform.* **2016**, *19*, 65–76. [CrossRef] [PubMed]
71. McCarthy, D.J.; Chen, Y.; Smyth, G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4288–4297. [CrossRef]
72. Raudvere, U.; Kolberg, L.; Kuzmin, I.; Arak, T.; Adler, P.; Peterson, H.; Vilo, J. g:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W191–W198. [CrossRef] [PubMed]
73. Supek, F.; Bošnjak, M.; Škunca, N.; Smuc, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21800. [CrossRef] [PubMed]
74. Barupal, D.K.; Fiene, O. ChemRICH-Chemical Similarity Enrichment Analysis Software. Available online: http://chemrich.fiehnlab.ucdavis.edu/ (accessed on 15 October 2021).
75. Barupal, D.K.; Fiene, O. Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14567. [CrossRef]
76. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020; Available online: https://www.r-project.org/ (accessed on 21 June 2021).

Salts	Salt concentrations (µM) of individual macronutriment deprivated solutions						
	Control	-N	-Mg	-P	-S	-K	-Ca
KNO_3	1000	0	1000	1000	1000	0	3500
$Ca(NO_3)_2 + 4H_2O$	1250	0	1250	1250	1250	1750	0
KH_2PO_4	200	0	200	0	0	0	0
K_2HPO_4	0	200	0	0	200	0	0
$MgSO_4$	400	150	0	400	0	400	400
$MgCl_2$	0	250	0	0	400	0	0
NaFe-EDTA $3H_2O$	50	50	50	50	50	50	50
NaFe-EDDHA	50	50	50	50	50	50	50
Fe-Citrate	0	0	0	0	0	0	0
H_3BO_3	10	10	10	10	10	10	10
$MnSO_4$	3	3	3	3	0	3	3
$MnCl_2$	0	0	0	0	3	0	0
$ZnSO_4$	3	3	3	3	0	3	3
$CuSO_4$	0.7	0.7	0.7	0.7	0	0.7	0.7
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
$CoCl_2$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$NiCl_2$	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
$Si(OH)_4$	900	900	900	900	900	900	1100
$CaCl_2 + 2H_2O$	500	750	500	200	0	450	0
KCl	100	400	0	300	100	0	0
Na_2SeO_4	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
$CaCO_3$	360	940	0	620	720	0	0
K_2SO_4	100	350	150	100	0	0	100
Na_2SiO_3	200	200	200	200	200	200	0
HCl	600	2220	500	1400	1800	300	900
$CaSO_4$	0	0	350	0	0	100	0
$Ca(H_2PO_4)$	0	0	0	0	0	200	0
$ZnCl_2$	0	0	0	0	3	0	0
$CuCl_2$	0	0	0	0	0.7	0	0
NaCl	0	0	0	0	0	0	200
NaH_2PO_4	0	0	0	0	0	0	200
KOH	0	0	0	0	0	0	1000

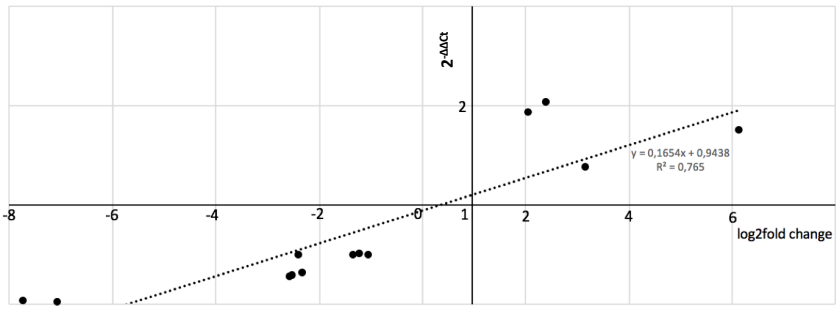
Nutrients	Elemental concentrations (µM) of individual macronutriment deprivated solutions						
	Control	-N	-Mg	-P	-S	-K	-Ca
N	3500	0.048	3500	3500	3500	3500	3500
Mg	400	400	0	400	400	400	400
P	200	200	200	0	200	200	200
S	507	507	507	507	0	507	507
K	1500	1500	1500	1500	1500	0	4700
Ca	2110	1690	2100	2070	1970	2500	0
B	10	10	10	10	10	10	10
Cl	2001	4621	1701	2101	2707	1201	1101
Mn	3	3	3	3	3	3	3
Fe	100	100	100	100	100	100	100
Ni	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Cu	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Zn	3	3	3	3	3	3	3
Mo	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056
Na	500	500	500	500	500	500	500
Al	0	0	0	0	0	0	0
Si	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100
V	0	0	0	0	0	0	0
Co	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Se	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Supplementary data SD1: Compositions of nutrient solutions used to submit *Brassica napus* to ten days of N, Mg, P, S, K and Ca individual deprivations as already described by Courbet *et al.,* 2021.

A

Gene ID	Primers sequences
EF1-α	Forward 5'-TTTCGAGGGTGACAACATGA Reverse 5'-CCGTTCCAATACCACCAATC
18 S	Forward 5'-CGGATAACCGTAGTAATTCTAG Reverse 5'-GTACTCATTCCAATTACCAGAC
BnaA03g43750D	Forward 5'-CCAGAAGGTGGTTATGGCTATG Reverse 5'-TGGAGAAGCTGCACCATTTCCA
BnaA10g25800D	Forward 5'-CTAATGGACGCATGGTTCTCAC Reverse 5'-GAGATCAAACACATGTGGCTCC
BnaA02g35870D	Forward 5'-TTCATAGCGGCTGGTCCTAAAC Reverse 5'-CACTAGCTCTCACGAACACAAC
BnaA02g35870D	Forward 5'-TTCATAGCGGCTGGTCCTAAAC Reverse 5'-TTCATAGCGGCTGGTCCTAAAC
BnaC02g44160D	Forward 5'-GGTGTTGAAGAGAGTGAAGAGC Reverse 5'-CACTAGCTCTCACGAACACAAC
BnaC02g44160D	Forward 5'-GGTGTTGAAGAGAGTGAAGAGC Reverse 5'-ACGTTGTCGTCACTGAAGAGTG
BnaC03g56990D	Forward 5'-GTGATATCGGGAATGACAGGAG Reverse 5'-ATTGAGGATGAGTTGTGGCACG
BnSultr1.1	Forward 5'-AGATATTGCGATCGGACCAG Reverse 5'-GAAAACGCCAGCAAAGAAAG

B



Supplementary data SD2: (A) Nucleotidic sequences of primers for amplification by RT-qPCR of housekeeping (EF1-α and 18s RNA) or target genes used for RNAseq validation. (B) Correlation between log2fold change ratio from RNAseq analysis and 2^{-DDCt} of target genes.

Supplementary data SD3: Transcriptomic data of Brassica napus roots subjected to six individual macronutrient deprivations.
https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11679#supplementary

Supplementary data SD4: (A): GO terms enrichment for "Biological Processes" determined by g:Profiler using DEGs from Brassica napus roots subjected to six individual macronutrient deprivations for 10 days. (B): GO terms enrichment for "Biological Processes" determined by g:Profiler using DEGs specific for individual macronutrient deprivations from Brassica napus roots subjected to six individual macronutrient deprivations for 10 days. https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11679#supplementary

Supplementary data SD5: Brassica napus DEGs with the "transport" term in the annotation V5 from Genoscope or associated with the GO term "ion transport" (GO:0006811) extracted from Amigo2 and unambiguously related to the transport of known elements (B, Ca, Cd, Cl, Co, Cu, F, Fe, K, Mg, Mn, N, Na, Ni, P, S, and Zn).
https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11679#supplementary

Supplementary data SD6: Chemical similarity clustering of the principal classes of metabolites of Brassica napus roots subjected to six individual macronutrient deprivations. https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11679#supplementary

Supplementary data SD7: Metabolomics data of Brassica napus roots subjected to six individu-al macronutrient deprivations.
https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11679#supplementary

	Photosythesis ($\mu mol.CO_2.m^{-2}.s^{-1}$)		
	Day 3	Day 6	Day 9
Control	17.13 ± 1.83	19.2 ± 2.09	18.16 ± 1.47
-N	14.52 ± 1.18	15.23 ± 1.21	6.94* ± 1.29
-Mg	16.09 ± 1.06	19.4 ± 0.81	14.35 ± 2.74
-P	13.62 ± 1.43	16.42 ± 1.52	12.74* ± 1.36
-S	13.47 ± 1.51	20.05 ± 1.39	19.39 ± 1.35
-K	18.44 ± 1.91	20.79 ± 2.07	21.51 ± 1.41
-Ca	15.46 ± 1.09	17.78 ± 2.88	19.86 ± 1.94

Supplementary data SD8: Kinetic of photosynthesis activity of *Brassica napus* subjected to six individual macronutrient deprivations during 9 days.

Chapitre IV

Discussion générale

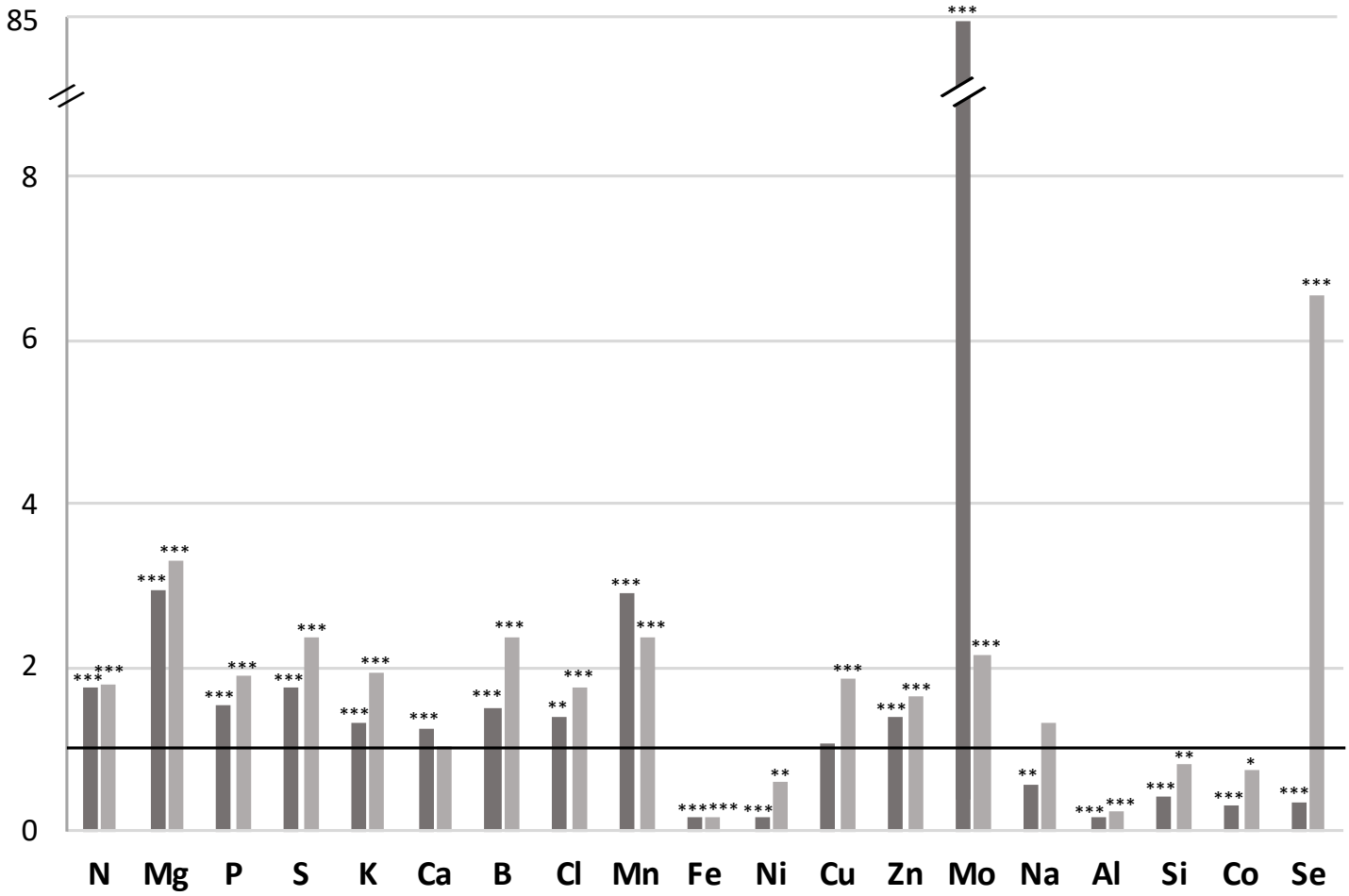


Figure IV. 1 : Concentrations relatives en éléments (en partie par million) de feuilles de *B. napus* (jeunes et vieilles feuilles) cultivées en conditions hydroponiques avec une solution Hoagland ¼ (échantillons de Maillard *et al.,* 2016, en gris foncé) ou une solution Hoagland ¼ optimisée (échantillons de notre expérimentation, en gris clair), par rapport au champ (d'après Sarda *et al.,* 2013 et Maillard *et al.,* 2016 correspondants à un maximum de 194 parcelles agricoles récoltées en France). Lorsque ces concentrations relatives sont supérieures à la barre noire (située à 1), l'élément est trop abondant dans les solutions nutritives, à l'inverse, lorsque ces concentrations relatives sont inférieures à la barre noire, il y a trop peu de l'élément dans les solutions nutritives. Les concentrations relatives ont été calculées grâce aux concentrations en éléments foliaires obtenues en cultures hydroponiques et moyennées à partir de tous les traitements (plantes témoins et plantes soumises à des carences en macro, micro ou éléments bénéfiques), afin de maximiser la gamme de concentrations rencontrées en conditions hydroponiques, par rapport aux expériences de terrain. Un test de Student a été réalisé sur les concentrations en éléments mesurées dans les plantes cultivées en conditions contrôlées avec la solution Hoagland (Maillard *et al.,* 2015) et la solution Hoagland optimisée (Courbet *et al.,* 2021, D'Oria *et al.,* 2021), par rapport aux concentrations en éléments mesurées au champ, les valeurs significatives sont indiquées, pour p-value<0,05 par *, pour p-value<0,01 par ** et pour p-value<0,001 par ***.

I. Mise au point d'une solution nutritive permettant d'obtenir une composition élémentaire comparable entre les plantes cultivées en conditions contrôlées et en conditions de plein champ

Cette thèse avait notamment pour objectif d'identifier de potentiels indicateurs (ionomiques, métabolomiques et/ou transcriptomiques) de la nutrition minérale à partir d'échantillons végétaux produits en culture hydroponique. Dès lors, une expérimentation préliminaire non rapportée dans le manuscrit de thèse testant plusieurs compositions de solutions nutritives a été réalisée afin d'obtenir une composition ionomique des plantes cultivées en hydroponie comparable à celle de plantes cultivées en conditions de plein champ. Pour ce faire, les ionomes fonctionnels des feuilles (jeunes et matures) de colzas cultivés au champ sur différents types de sols et en conditions contrôlées ont été comparés. Les analyses du ionome fonctionnel de ces feuilles matures ont permis d'établir la composition ionomique foliaire moyenne chez du colza cultivé en conditions de plein champ (Fig IV. 1), sur un maximum de 194 parcelles sélectionnées au niveau départemental, régional et national (issues en partie des travaux de Sarda *et al.,* 2014 ; Etienne *et al.,* 2018). Dans ces conditions, les colzas ont été cultivés avec une alimentation minérale potentiellement pléthorique (sols riches et/ou avec apport minérale ou organique) ou à l'inverse dans des conditions de carences non maitrisées. Il en résulte que les données ionomiques ainsi obtenues au champ, présentent une gamme de variations assez larges. De la même manière, le ionome fonctionnel moyen des feuilles (jeunes et matures) de colzas cultivés en conditions contrôlées lors d'expérimentations précédentes (échantillons dérivés de notre expérimentation et de Maillard *et al.,* 2015) a été estimé à partir de plantes témoins ou soumises à différentes carences. L'analyse comparative de la composition élémentaire de ces deux lots d'échantillons (conditions de plein champ *versus* conditions contrôlées) a montré qu'il existait des différences significatives dans la composition des ionomes fonctionnels (par exemple, pour les teneurs en Mn, Fe, Mo et Si) (Fig IV. 1). Ces différences peuvent notamment s'expliquer par la solution nutritive utilisée lors des expérimentations précédentes reposant essentiellement sur une solution nutritive dont la composition est dérivée de celle de Hoagland et dont la composition empirique semblait artificiellement trop riche en certains éléments (Mg, Mn et Mo, par exemple) ou au contraire, trop pauvre pour d'autres (tels que le Fe, le Ni et le Si). A titre d'exemple, la forte teneur en Mo observée dans le ionome foliaire des colzas en conditions contrôlées (Fig IV. 1) pourrait être une conséquence de la forte concentration en Mo (0,7 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ µM) dans la solution nutritive qui était utilisée par Maillard *et al.* (2015). Ainsi, lors d'expérimentations préalables à ces travaux de thèse, la composition de la solution nutritive Hoagland précédemment utilisée a été optimisée afin

d'obtenir une composition ionomique des plantes en culture hydroponique, beaucoup plus proche de celle des plantes cultivées au champ. Par exemple, la teneur en Mo des feuilles de colza a été divisée par 40 avec notre solution Hoagland optimisée, par rapport à la solution Hoagland d'origine. De façon inverse, la solution que nous avons développée permet d'obtenir des teneurs plus élevées et donc plus proches de celles mesurées au champ comme c'est le cas avec le Na, le Ni, le Co et le Si. Certains ajustements supplémentaires (teneurs en Fe et Al qui restent encore trop faibles par rapport aux moyennes mesurées au champ) pourraient d'ailleurs être envisagés à l'avenir et seront exposés dans les perspectives.

II. Application des carences nutritionnelles chez le colza (*Brassica napus*) et le blé (*Triticum aestivum*)

L'application expérimentale de carences nutritionnelles chez le colza (*Brassica napus*) et le blé (*Triticum aestivum*) a nécessité la confection de solutions nutritives contenant globalement la même quantité d'éléments minéraux que la solution nutritive complète, élaborée lors des essais préliminaires, à l'exception de l'élément carencé. Les plantes carencées en macroéléments et les plantes témoins correspondantes ont été récoltées après 10 jours de carences. Cette durée de privation en macroéléments a été choisie, afin de récolter les plantes avant toute réduction significative de la croissance, comme cela a été précédemment montré par Maillard *et al.* (2015) et Sorin *et al.* (2015). En effet, lors de ces études conduites également chez le colza cultivé en conditions de carences en macroéléments, ces auteurs ont montré que la croissance des plantes était significativement réduite seulement après 14 jours de privation de S (Sorin *et al.,* 2015), après 11 jours de carence en N et après 15 jours de carence en Mg, P, S ou K (Maillard *et al.,* 2015). Le maintien de la croissance pendant plus de 10 jours de carence en macroéléments, s'explique potentiellement par la capacité des plantes à remobiliser les réserves internes d'éléments minéraux préalablement stockés. Les carences en microéléments et en éléments bénéfiques ont quant à elles, été appliquées pendant 22 jours et les plantes ont été récoltées avant toute diminution significative de leur croissance des plantes. La durée de la carence a de nouveau été déterminée en se basant sur une étude antérieure conduite par Maillard *et al.* (2016), montrant que la croissance du colza était maintenue au moins pendant les 30 premiers jours de privation en microéléments. Les échantillons végétaux ainsi récoltés ont été utilisés afin d'identifier de potentiels indicateurs (ionomiques, métabolomiques et/ou transcriptomiques) de carences nutritionnelles précoces.

Les plantes supérieures sont des organismes sessiles confrontés à des stress environnementaux variables, notamment des carences nutritionnelles, affectant considérablement leur survie et leur développement (Fan *et al.,* 2021), qui dépendent de l'équilibre entre les éléments

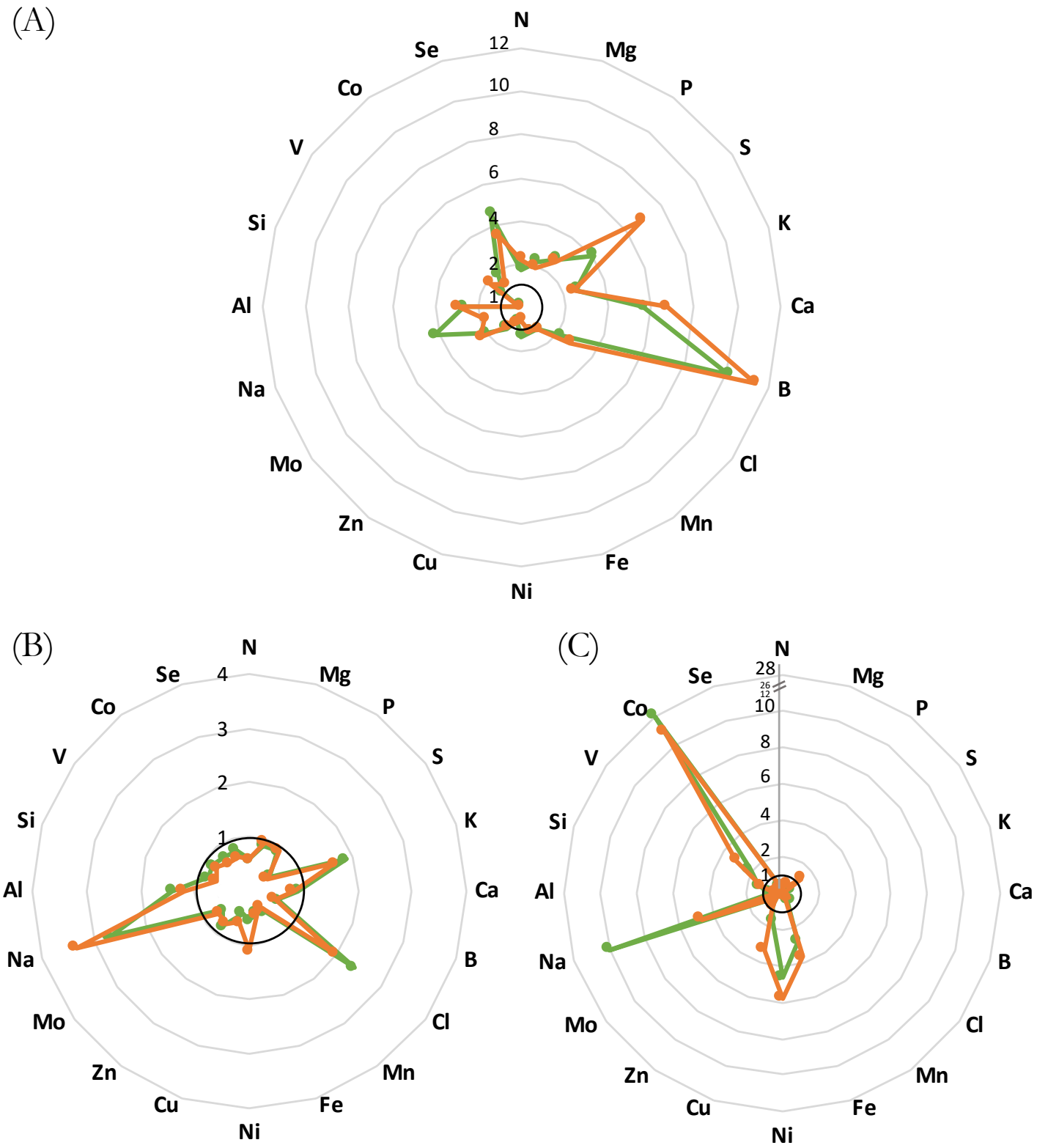


Figure IV. 2 : Concentrations relatives en éléments minéraux (en partie par million) (A) des plantes témoins de *B. napus* par rapport aux plantes témoins de *T. aestivum*, (B) des pétioles par rapport à celles des feuilles (feuilles matures et jeunes) des plantes témoins de *B. napus* et (C) des racines par rapport à celles des feuilles (feuilles matures et jeunes) des plantes témoins de *B. napus*, après 10 (en vert) et 22 (en orange) jours de culture en conditions hydroponiques.

minéraux essentiels. Cet équilibre suggère l'existence de nombreuses voies de régulation de l'absorption, du transport et du stockage des éléments, afin de couvrir les besoins des plantes tout en évitant l'accumulation excessive et les risques de toxicité associés à certains éléments (Williams et Salt, 2009 ; Andresen *et al.,* 2018). Dans nos travaux, les modifications du ionome fonctionnel pendant les carences nutritionnelles ont été observées chez le colza (*Brassica napus*) et le blé (*Triticum aestivum*) aux niveaux des racines, mais aussi des feuilles développées pendant et après les carences, et ce, avant tout impact négatif sur la croissance des plantes et l'apparition de symptômes visuels de carences. Ainsi, l'absorption nette de chaque élément a pu être quantifiée et comparée entre les différentes carences, mais aussi entre les espèces, sans interférence significative de la croissance des plantes.

III. La composition ionomique est caractéristique de l'espèce végétale, mais aussi, du tissu considéré

En l'absence de contraintes nutritionnelles (plantes témoins), il a été possible de montrer, que la composition ionomique est spécifique du tissu et de l'espèce considérée (Fig IV. 2). Par exemple, dans les feuilles matures de colza, il a été observé que la teneur en Si était moins élevée que dans les feuilles matures de blé, une espèce, qui contrairement au colza, est connue pour être fortement accumulatrice de Si. A l'inverse, les feuilles de colza présentent des teneurs plus élevées en B, en S et en Se mais aussi et dans une moindre mesure, en Na et en Ca. De plus, au niveau tissulaire et indépendamment de la privation étudiée, une plus grande proportion du Si absorbé par les racines du blé a été transloquée vers les parties aériennes, par rapport au colza (Fig 4 et 5 de Courbet *et al.,* 2021 et Fig 6 de D'Oria *et al.,* 2021 présentées dans le Chapitre III ; Fig IV. 2). Les racines du blé sont ainsi maintenues dans un état relatif de faible teneur en Si, propice à une absorption continue du Si (Rafi et Epstein, 1999). Par la suite, le Si absorbé est largement immobilisé sous forme de silice amorphe et solide (silice hydratée ($SiO2\text{-}nH_2O$) et/ou de phytolithes) dans les parties aériennes (Meunier *et al.*, 2018). A l'inverse du Si, dans des conditions de nutrition optimale, la teneur en B, élément connu pour intervenir dans le maintien de la structure des parois cellulaires en entrant dans la composition des polysaccharides pectiques, tels que les rhamnogalacturonanes II (Miwa *et al.,* 2013), était 10 fois plus élevée dans les feuilles matures de colza que dans celles du blé. Ce résultat est en accord avec des études précédentes montrant que les dicotylédones requièrent plus de B que les monocotylédones (Singh *et al.,* 2020).

L'évaluation des quantités d'éléments dans les racines relativement au contenu total dans la plante (Fig 2 de Courbet *et al.,* 2021 présentée dans le Chapitre III) montre que les racines assurent une séquestration spécifique de certains éléments tels que le Fe, le Ni, le Cu, le Na, le V et le Co

chez les 2 espèces, ainsi que le Si chez le colza ou le Mg chez le blé. Cela se traduit par le fait, que les concentrations racinaires de ces éléments sont beaucoup plus élevées que dans les parties aériennes (Fig IV. 2). Un des mécanismes qui expliqueraient ces divergences dans la composition ionomique de ces deux espèces pourrait impliquer la sélectivité de la barrière casparienne. Cette structure permet la régulation de la translocation des éléments absorbés par les racines aux parties aériennes, en bloquant le flux apoplastique dans les racines (Barberon *et al.,* 2016). Chez les monocotylédones, une seconde barrière casparienne localisée entre le cortex et l'endoderme permettrait une sélection plus spécifique des éléments minéraux et serait responsable du maintien de certains éléments dans les racines.

Ces divergences dans les contenus ionomiques du colza et du blé permettent de se questionner sur la définition d'un élément essentiel à la nutrition des plantes, telle qu'elle a été établie à l'origine par Arnon et Stout en 1939, puis revue par Marschner en 2012 dans l'ouvrage "*Mineral nutrition of higher plants*". Ce dernier précise qu'un élément essentiel est défini selon trois conditions ; (i) une plante donnée doit être incapable d'accomplir son cycle de développement en l'absence de l'élément, (ii) la fonction de l'élément ne doit pas pouvoir être remplacée par un autre élément, (iii) l'élément doit être directement impliqué dans le métabolisme de la plante. L'essentialité d'un élément minéral apparait donc comme espèce dépendante. Brown *et al.* (2021) proposent également de remettre en question la définition des éléments essentiels sur différents aspects, notamment leur essentialité pour toutes les espèces ou encore, tenir compte des conditions de croissance d'une espèce dans son environnement naturel, lui imposant une contrainte unique surmontée par l'absorption d'un nutriment en particulier (par exemple l'exigence du théier en Al pour générer de nouvelles racines, un élément classé comme bénéfique).

IV. Les carences nutritionnelles conduisent, en impactant la barrière casparienne et les mécanismes de remobilisation, à des modifications du ionome.

La subérisation de la barrière casparienne dépend de l'état nutritionnel des plantes et pourrait en partie expliquer certaines variations de la composition ionomique des tissus. Par exemple, les carences en S et K sont susceptibles d'induire le processus de subérisation en agissant sur la voie de l'acide abscissique, limitant ainsi la translocation de nombreux éléments (S, K, Ca, Mn, Fe et Zn) (Barberon *et al.,* 2016 ; Doblas *et al.,* 2017). A l'inverse, des carences en Mn, Fe et Zn sont capables de diminuer la subérisation de la barrière casparienne, par l'intermédiaire de la voie de l'éthylène et d'améliorer la translocation des éléments vers les feuilles (Barberon *et al.,* 2016).

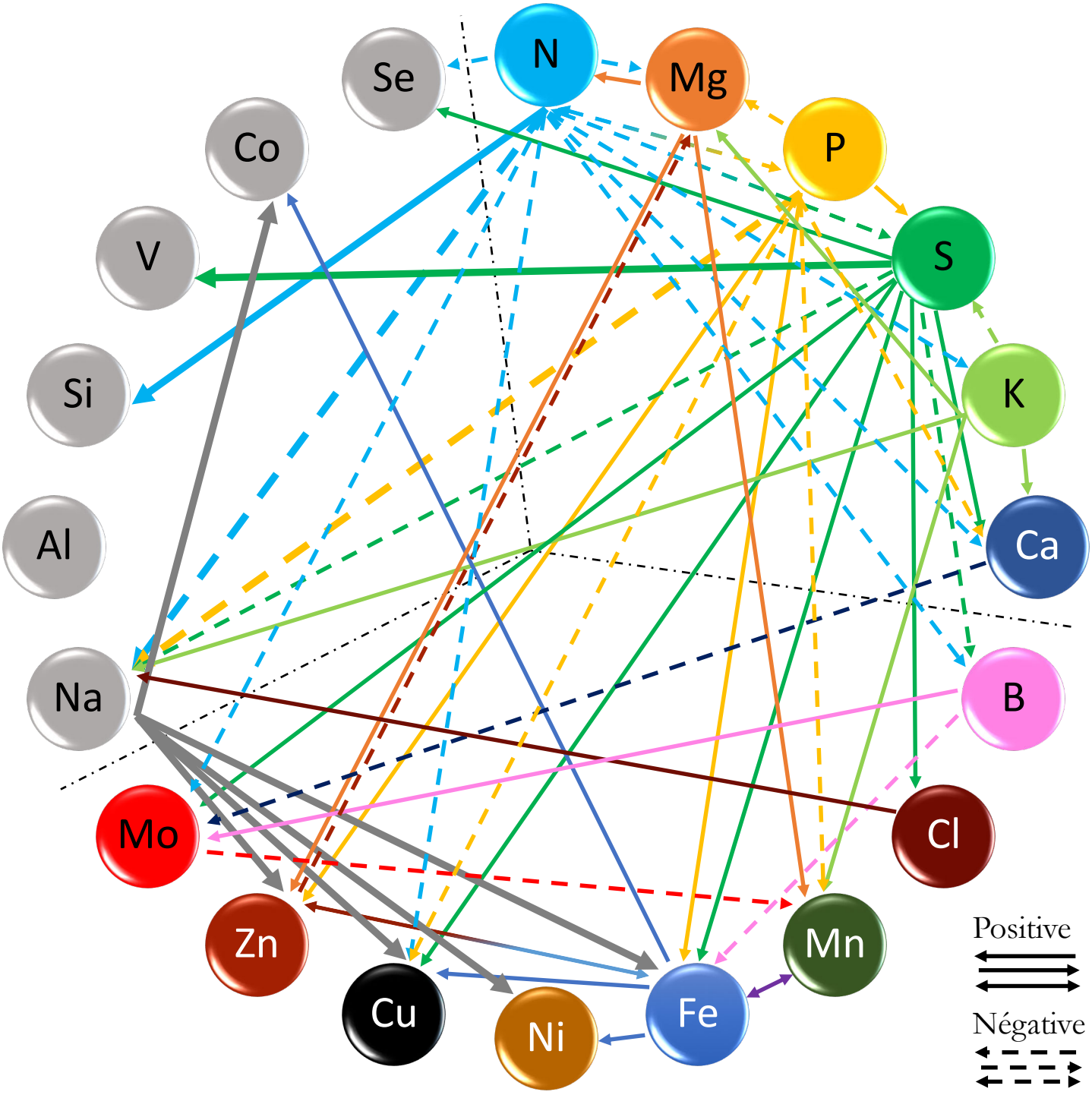


Figure IV. 3 : Représentation schématique des interactions positives ou négatives entre éléments minéraux répertoriées dans la littérature (inspiré de Baxter *et al.,* 2009 ; Maillard *et al.,* 2016 ; Courbet *et al.,* 2019 ; Fan *et al.,* 2021) et enrichies avec de nouvelles interactions mises en évidence par notre étude (représentées en gras).

Un autre mécanisme qui pourrait induire des modifications de la composition du ionome lors de carences nutritionnelles, concerne la remobilisation des éléments. Dans notre expérimentation, la forte diminution des teneurs en Mg et Ca dans les racines et du N, P, S et K dans les feuilles matures (Fig 4 et 5 de Courbet *et al.,* 2021 présentées dans le Chapitre III) au profit des jeunes feuilles suggère une remobilisation des macroéléments endogènes des organes sources vers les organes puits. C'est ce processus de remobilisation qui lors de notre expérimentation, aurait permis le maintien de la croissance des plantes lors des carences nutritionnelles, même pour la carence en N, élément le plus limitant pour les plantes. De la même manière pour les carences en microéléments, le Cl et le Mn semblent être remobilisés des racines vers les parties aériennes, comme cela a déjà été montré chez le colza dans de précédentes études (Maillard *et al.,* 2015 ; Etienne *et al.,* 2018).

V. De nombreuses interactions entre éléments sont mises en évidence lors de carences nutritionnelles

Les végétaux supérieurs, pour pallier les effets négatifs des stress nutritionnels auxquels ils sont exposés au cours de leur cycle de vie, ont développé des mécanismes efficaces afin de maintenir l'homéostasie des nutriments. Au niveau physiologique, de nombreuses interactions entre les macro, microéléments et éléments bénéfiques (Fig IV. 3) ont été mises en évidence chez différentes espèces depuis plusieurs années et ont fait récemment l'objet d'une revue (Fan *et al.,* 2021), révélant ainsi la complexité des interactions entre macro et microéléments. Ces auteurs tentent d'identifier les mécanismes physiologiques et moléculaires expliquant certaines interactions particulières (telles que P, S et Fe ; N et P ; P, Zn et Fe), mais concluent cependant à la nécessité de mettre en place des travaux complémentaires pour élucider les mécanismes impliqués.

La plasticité des réponses du colza et du blé, mise en évidence par les modifications du ionome fonctionnel en réponse aux carences nutritionnelles, a permis de mettre en évidence un certain nombre d'interactions communes aux deux espèces, qui à notre connaissance n'ont pas encore été rapportées dans la littérature (Fig IV. 3). Par exemple, la carence en N affecte globalement négativement l'absorption des autres éléments essentiels, mais plus particulièrement celle du Na dont l'absorption a été très fortement réduite chez les deux espèces (Fig IV. 3). Ceci suggère que le transport de Na pourrait être fonctionnellement lié à l'absorption de N. Cette hypothèse est soutenue par l'analyse de données de mutants KO *nrt1.1* et *nrt1.2* d'*Arabidopsis* issues de la Ionomic Hub. Par rapport à la lignée parentale, des réductions significatives de 39 et 48% ($p<0,001$) de la teneur en Na ont été observées dans les feuilles d'un mutant *nrt2.1 Arabidopsis thaliana* (SALK_035429 homozygote knock-out line) cultivé sur deux sols différents. A l'inverse, le

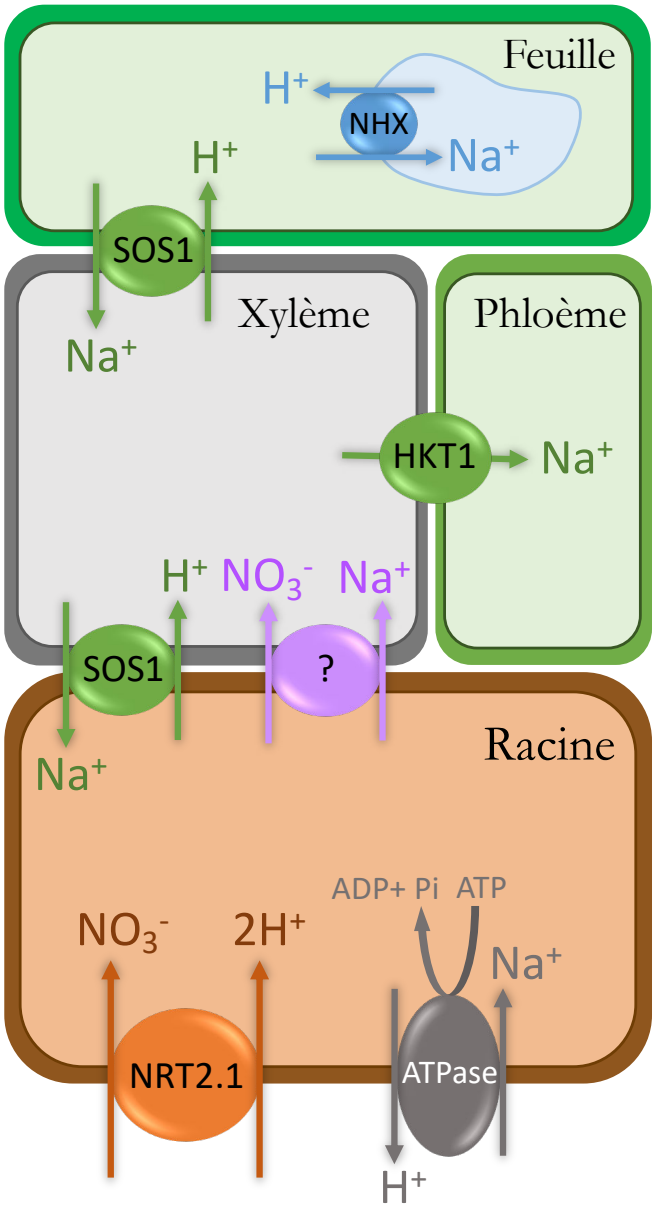


Figure IV. 4 : Représentation schématique et hypothétique de la potentielle absorption de Na^+ couplée à l'absorption de NO_3^- et du chargement du Na^+ dépendant du NO_3^- dans le xylème ou par le transporteur SOS1. NRT2.1 : nitrate transporter 2.1 ; SOS1 : salt overly sensitive 1 ; HKT1 : high-affinity K^+ transport 1 ; NHX : sodium/hydrogen antiporter (inspiré de Alvarez-Aragon et Rodríguez-Navarro, 2017 ; Raddatz *et al.,* 2020)

mutant *nrt1.1* (SALK_097431 homozygote knock-out line) a montré une teneur en Na dans les feuilles, similaire ou augmentée, par rapport à la lignée parentale lorsqu'il est cultivé sur deux sols différents. Ainsi, il est possible que NRT2.1, un transporteur de nitrate à haute affinité pour l'N, fonctionne comme un symporteur $NO_3/2H^+$ qui nécessite de l'énergie pour l'activité H^+/ATPase (Salt *et al.,* 2008 ; Alvarez-Aragon et Rodríguez-Navarro, 2017). L'efflux secondaire de H^+, pourrait probablement être couplé à un influx de Na^+, ce qui pourrait expliquer, en partie, la forte diminution de l'absorption de Na observée chez les plantes carencées en N (Fig IV. 4). De plus, selon Raddatz *et al.* (2020), le Na^+ accumulé dans les parties aériennes peut être chargé dans le xylème par des systèmes de transport potentiellement couplé à celui du nitrate. La charge du Na^+ dans le xylème, dépendante du nitrate, serait réalisée en parallèle à celle effectuée par le transporteur SOS1, un antiporteur Na^+/H^+ localisé au niveau des cellules du parenchyme du xylème (Alvarez-Aragon et Rodríguez-Navarro, 2017 ; Raddatz *et al.,* 2020). Le Na^+ est ensuite transféré dans le phloème *via* le transporteur HKT1, puis dans les feuilles où il pourra par exemple, être stocké dans les vacuoles (Raddatz *et al.,* 2020). Comme la carence en N, une limitation en P entraine la diminution de l'absorption de nombreux autres éléments (et plus particulièrement le Na, Fig IV. 3 et IV. 4) en raison du rôle majeur du P dans le métabolisme énergétique. En effet, le transport des nutriments à travers les membranes des racines et des feuilles est un processus dépendant de l'énergie, notamment sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), or le P est indispensable à la structure de l'ATP et lui confère également ses propriétés hautement énergétiques (Neupane *et al.,* 2019). La diminution de la synthèse de l'ATP induite par une carence en P entraine par exemple, une diminution d'activité de la Rubisco et par conséquent, une limitation de l'activité photosynthétique des plantes (Butz et Sharkey, 1989 ; De Groot *et al.,* 2003) et de l'absorption racinaire ATP-dépendante de certains nutriments (Fig IV. 3).

A l'inverse, des interactions positives peuvent être observées, telles que l'augmentation de l'absorption du Si en réponse à la carence en N (Fig IV. 3). Par ailleurs, il s'agit du seul élément dont l'absorption racinaire augmente lors de la carence en N chez le colza. Minden *et al.* (2021), ont également observé cette interaction N/Si chez *Holcus lanatus*. Selon ces auteurs, l'absorption accrue de Si pourrait être un avantage pour maintenir la rigidité des parois, tout en consommant un minimum d'énergie. Selon d'autres travaux menés sur le riz, une espèce accumulatrice de Si, cette augmentation pourrait aussi être due à une interaction antagoniste entre N et Si pendant la croissance de la plante (Malav *et al.,* 2017 ; Wu *et al.,* 2017). Il a également été montré qu'une augmentation de la fertilisation N réduit significativement le contenu en Si des feuilles (Malav *et al.,* 2017 ; Wu *et al.,* 2017). Aussi, cela suggère que le Si, considéré comme un élément bénéfique, pourrait interagir avec un macroélément comme l'N.

Par ailleurs, lors d'une carence en S, une absorption accrue de Mo et de Se et une augmentation de la teneur de ces éléments dans les tissus végétaux ont été mises en évidence, aussi bien dans notre expérimentation que rapportées dans la littérature. Ainsi, si l'on considère la proximité structurale du MoO_4^{2-} SeO_4^{2-} et SO_4^{2-}, il peut être suggéré que la surexpression des gènes *SURTR1.1* et *SULRT1.2* codant des transporteurs racinaires de sulfate classiquement observée en condition de carence en S (Maillard *et al.,* 2016) soit à l'origine de l'augmentation de l'absorption (et donc des teneurs) de Mo et de Se. Nos résultats montrent de façon originale que l'absorption du vanadium (V), élément présent uniquement sous forme de traces dans la solution nutritive, a été fortement augmentée lors d'une carence en S (Fig IV. 3), notamment chez le colza. Il peut donc être suggéré que le vanadium, présent sous forme d'ion vanadate (VO_4^{3-}), puisse également être absorbé par les transporteurs SULTR1.1 et SULTR1.2. Cette hypothèse a été confirmée par l'analyse ionomique des feuilles de mutants d'*Arabidopsis sultr1.1* et *sultr1.2* précédemment utilisés par Maillard *et al.* (2016). Le V est un oligoélément largement répandu dans la nature et dans presque tous les organismes vivants, y compris chez l'homme. Son importance dans les fonctions cellulaires reste encore à élucider et actuellement, il est le plus souvent considéré comme un élément néfaste notamment chez les animaux (Hanus-Fajerska *et al.,* 2021). Chez les plantes, ses effets sont controversés puisque si certains le considère comme néfaste (Hanus-Fajerska *et al.,* 2021), d'autres travaux ont montré qu'un apport de faibles doses de VO_4^{3-} pouvait stimuler leur croissance et leur développement, avoir des effets cytoprotecteurs et améliorer efficacement la synthèse de certains composés biologiquement actifs (Venkataraman et Sudha, 2005).

Une autre interaction positive, mais moins « originale » que les précédentes, a également été mise en évidence. Il s'agit de la forte augmentation de l'absorption de Na, couplée à une accumulation massive dans les feuilles et une réduction de sa teneur relative dans les racines, chez les deux espèces étudiées, lors d'une carence en K (Fig IV. 3). Le K^+ est l'un des cations les plus abondants chez les plantes (Mäser *et al.,* 2002) et joue un rôle osmotique majeur. La plupart des transporteurs HKT impliqués dans l'absorption de K^+, peuvent également être des transporteurs de Na^+ en agissant comme des symporteurs Na^+/K^+ (Wang et Wu, 2013). Le Na est un élément bénéfique dont la fonction n'est pas bien comprise (Alvarez-Aragon et Rodríguez-Navarro, 2017) mais nos données suggèrent, qu'en conditions de carence en K^+, il participerait à la compensation osmotique transitoire en se substituant au K^+.

L'une des homéostasies des microéléments la plus décrite dans la littérature concerne l'homéostasie du Fe, ainsi que les interactions entre le Fe et d'autres cations divalents (Fan *et al.,* 2021). En effet, les plantes dicotylédones soumises à une carence en Fe ont développé un mécanisme pour réguler positivement l'expression de gènes tels que ceux codant des transporteurs

de Fe afin de maintenir son homéostasie (Li *et al.,* 2017). Toutefois, cette induction des transporteurs de Fe s'accompagnerait également d'une augmentation de l'absorption d'autres cations divalents tels que Ni, Cu, Zn et Co (Fig IV. 3). Selon plusieurs études, l'absorption accrue de ces éléments est spécifiquement corrélée à la surexpression d'*IRT1*, un gène codant un transporteur aspécifique de Fe (Korshunova *et al.,* 1999 ; Henriques *et al.,* 2002 ; Nishida *et al.,* 2011 ; Waters et Armbrust, 2013 ; Alejandro *et al.,* 2020). L'augmentation significative chez le colza de l'expression de *BnaIRT1* corrélée aux augmentations de l'absorption de Ni, Cu, Zn et Co mises en évidence dans notre expérimentation en réponse à une carence en Fe, mais également en B, Na, Zn, Ni et Mo, est donc en accord avec les données bibliographiques (Fig IV. 3). La même tendance à l'augmentation de l'absorption de ces cations divalents lors d'une carence en Fe a été observée chez le blé, bien que l'expression du gène *IRT1* n'ait pas été quantifiée pour cette espèce et que l'acquisition du Fe chez les dicotylédones ne dépende pas des mêmes processus d'absorption (Stratégie I détaillée dans le chapitre de synthèse bibliographique). De manière surprenante, la carence en Na a également entrainé une augmentation de l'absorption de cations divalents et notamment de Fe, Ni, Cu, Zn et Co (Fig IV. 3). Il a aussi été observé qu'en réponse à la carence en Na, le Fe et le Zn s'accumulaient au niveau des racines alors que leurs teneurs foliaires diminuaient. Ceci peut être dû à la faible translocation du Fe et du Zn des racines vers les feuilles *via* la régulation du transport qu'exerce le cadre de Caspary sur ces éléments lors de carences nutritionnelles. En effet, plusieurs études ont déjà montré que des carences nutritionnelles peuvent influencer le niveau de subérisation de la bande de Caspary (Barberon *et al.,* 2016 ; 2017), et qu'une subérisation accrue du cadre de Caspary perturbe la translocation des éléments tels que le S, le K, le Ca, le Mn, le Fe et le Zn (Barberon *et al.,* 2016 ; Doblas *et al.,* 2017 ; Bao *et al.,* 2019).

VI. Interactions entre éléments et détermination de signatures ionomiques de carences

Toutes ces interactions entre éléments révélées par l'analyse du ionome fonctionnel résultant de processus physiologiques parfois identifiés, suggèrent qu'il est possible de discriminer certaines carences nutritionnelles, avant toute réduction significative de la croissance à partir du contenu ionomique. Ainsi, la variation de la composition ionomique causée par une seule privation de nutriment peut être considérée comme une réponse précoce des plantes. Grâce à une approche PLS-DA (Partial Least-Squares Discriminant Analysis) prenant en considération l'ensemble des teneurs en macroéléments, microéléments et éléments bénéfiques, il a été possible de définir que les jeunes feuilles (émises pendant les périodes de privations) constituent les tissus les plus pertinents pour fournir des signatures ionomiques spécifiques des différentes carences (D'Oria *et*

al., 2021). A partir de ces tissus, il a ainsi été possible d'identifier les éléments les plus discriminants qui caractérisent les signatures spécifiques des carences en N, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, Si et Se chez les deux espèces, ainsi qu'en Mg, Cl, Cu et Mo chez le blé (D'Oria *et al.,* 2021). Cette approche PLS-DA est une proposition de méthode pour définir des signatures ionomiques de carences, mais elle pourrait également être utilisée pour caractériser les effets d'autres stress abiotiques, tels que l'élévation de température ou le déficit hydrique (Etienne *et al.,* 2018), ainsi que pour d'autres fluctuations environnementales, comme l'élévation du CO_2 atmosphérique, dont les effets sur le ionome ont été plus largement caractérisés grâce à l'utilisation des systèmes FACE (Free Air CO_2 Enrichment) (Loladze, 2014). Ainsi, les signatures ionomiques identifiées au niveau des feuilles, en se basant sur les éléments les plus discriminants, sont en partie expliquées par des processus connus de la littérature et déjà identifiés comme spécifiques de certaines carences (par exemple, l'augmentation de l'absorption de Na^+ lors d'une carence en K, ou celle du Mo lors d'une carence en S), mais aussi de nombreuses interactions inconnues qui doivent encore être explorées. L'utilisation de ces signatures ionomiques comme marqueurs ou indicateurs spécifiques de carences présente un potentiel applicatif, mais cela nécessitera des travaux complémentaires qui seront développés dans les perspectives.

Des analyses transcriptomiques pourraient constituer un moyen d'expliquer certaines modifications ionomiques et d'identifier les processus ou les nœuds métaboliques impliqués dans ces interactions. De manière ciblée, Whitt *et al.* (2020) ont identifié des gènes ionomiques qui pourraient expliquer certaines corrélations entre éléments. Cette liste de gènes est fortement enrichie en gènes codant des transporteurs et des protéines impliquées dans l'accumulation des éléments dans les parties aériennes (notamment Fe et Zn).

VII. Une analyse transcriptionnelle pour mieux comprendre les interactions nutritionnelles

De manière plus globale, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur les racines de *Brassica napus* après dix jours de privation individuelle en macroéléments, afin de mettre en évidence les principaux changements moléculaires survenant dans le premier organe confronté à la diminution de la disponibilité en macroéléments, mais aussi, afin de déterminer s'il était possible d'expliquer les interactions nutritionnelles mises en lumière par l'approche ionomique. Les carences en macroéléments ont largement affecté le transcriptome racinaire du colza, notamment les carences en N, P et Ca. Celles-ci ont modulé une large gamme de gènes, intervenant principalement dans le métabolisme de l'élément privé, mais également dans d'autres métabolismes mettant ainsi en évidence les interactions entre éléments. La carence en P est celle qui a le plus modulé le

transcriptome, en affectant 17387 DEG (gènes différentiellement exprimés) (8839 régulés à la hausse et 8548 régulés à la baisse). Ceux-ci sont principalement associés au processus de phosphorylation, au métabolisme énergétique (car cet élément est nécessaire à la structure de l'ATP et à ses propriétés hautement énergétiques (Neupane *et al.,* 2019)) et au métabolisme de l'N. La plupart des DEG intervenant dans le métabolisme de l'N codent des protéines ribosomiques intervenant dans la synthèse protéique. Concernant la carence en N et les 12565 DEG qu'elle a modulés, les métabolismes essentiellement affectés incluent la synthèse des acides aminés et des protéines, ainsi que le métabolisme du P, mettant en avant le lien étroit entre les métabolismes de ces deux macroéléments. La plupart des DEG liés au métabolisme du P codent des protéines kinases, c'est-à-dire des protéines catalysant le transfert d'un groupement phosphate, issu de l'ATP, sur le groupement hydroxyle des acides aminés (sérine, thréonine et tyrosine). Ce processus de phosphorylation permet de réguler l'activité des protéines contenant dans leurs structures la sérine, la thréonine ou la tyrosine. A titre d'exemple, la sérine-thréonine kinase TOR est capable de phosphoryler des protéines intervenant dans la synthèse des ribosomes (TAP46), dans le chargement de l'ARNm dans les ribosomes (S6K1) et dans l'activation du méristème foliaire (E2FA) (McCready *et al.,* 2020). La carence en N a également modulé l'expression de 8 gènes codant des isoformes de la phosphoadénosine phosphosulfate réductase (PAPS réductase) intervenant dans la réduction du S, tandis que la carence en S a régulé 66 DEG intervenant dans le métabolisme du N et codant principalement des protéines ribosomiques. Ceci met en évidence les interactions N/S déjà bien décrites dans la littérature, notamment au niveau métabolique. En effet, la cystéine est le premier composé organique soufré réduit dans la voie d'assimilation du S, qui intègre les voies d'assimilation du carbone et de l'azote (Aarabi *et al.,* 2020). De plus, la synthèse de la cystéine nécessite de l'O-acétyl-sérine, issue de la sérine. La carence en Ca a modulé un large panel de DEG (15842) impliqués dans la signalisation comme la phosphorylation des protéines, mettant ainsi en évidence une interaction Ca/P. A l'inverse des carences en N, P et Ca, les carences en Mg et K furent celles qui modulèrent le moins de DEG. Des 3251 DEG modulés par la privation en Mg, certains étaient associés aux métabolismes du C et de l'N, tandis que d'autres étaient liés au métabolisme du S. Pour le K, seuls 1470 DEG ont été modulés, avec 984 induits et 486 réprimés. Ceci peut s'expliquer par le rôle du K en tant que cation monovalent, principalement présent dans la vacuole et qui est surtout impliqué dans l'osmorégulation, plutôt que dans la biosynthèse directe de composés organiques. Parmi les 5 principaux items d'enrichissement retrouvés dans notre analyse, 4 étaient liés aux réponses oxydatives. Ceci est en accord avec plusieurs études rapportant des liens forts entre la carence en K et le métabolisme des ROS (Hafsi *et al.,* 2014 ; Chen *et al.,* 2016 ; Qi *et al.,* 2019).

Dans l'ensemble, ces analyses d'enrichissement réalisées sur chacune des carences en macroéléments montrent qu'en dehors du métabolisme et des processus cellulaires directement liés à l'élément carencé, certains autres items correspondant à des processus cellulaires plus généraux ont également été systématiquement impactés, c'est le cas par exemple, du transport ionique. Toutes les privations en macroéléments ont modulé l'expression des gènes codant des transporteurs de l'élément carencé, et ont également influencé les gènes codant d'autres catégories de transporteurs d'ions. Une recherche dans des bases de données (Genoscope et Amigo2) a permis d'établir une liste de 302 gènes codant des transporteurs d'ions. Ainsi, les profils d'expression de ces gènes ont pu être analysés en réponse aux différentes carences. Par exemple, les privations de P et de S ont entraîné une régulation à la hausse des gènes codant pour leurs propres transporteurs racinaires. La régulation à la hausse des transporteurs racinaires de S (*SULTR1.1* et *1.2*) est susceptible d'expliquer au niveau ionomique, l'accumulation de Mo, de Se et de V dans les plantes carencées en S. Néanmoins, ceci est l'une des seules modifications ionomiques qui peut être reliée aux résultats de l'approche transcriptomique. En effet, la difficulté de comparer ces différents jeux de données pourrait être due au fait que les résultats issus de l'approche ionomique sont la résultante d'une somme d'interactions cumulées pendant les 10 jours de carence en macroéléments, tandis que les données transcriptomiques constituent une observation plus instantanée du niveau d'expression des gènes 10 jours après l'application de la carence. Ainsi, la transcriptomique telle qu'elle a été réalisée dans notre expérimentation, ne reflète pas la cinétique d'expression des gènes durant toute la période de carence, ce qui pourrait expliquer potentiellement les modifications ionomiques mises en évidence en réponse aux différentes carences en macroéléments. Ces modulations de l'expression des gènes de nombreux transporteurs d'éléments minéraux dans les racines de plantes soumises à six privations uniques en macroélément, pourraient être une conséquence des rôles cruciaux des macroéléments dans le métabolisme primaire rapportés par de nombreux auteurs (Maathuis, 2009 ; Hawkesford *et al.,* 2012 ; de Bang *et al.,* 2021).

Parallèlement à cette analyse transcriptomique, une analyse métabolomique a été réalisée, afin de mettre en évidence les variations d'abondance des métabolites primaires et secondaires, ainsi que les mécanismes associés dans les 6 carences en macroéléments. Cependant, un défaut de quantification et d'identification de composés dans les banques de données métabolomiques ont drastiquement limité les analyses de ces données, ainsi que sa comparaison avec les réponses transcriptomiques du colza. Seuls les effets délétères sur la traduction et la synthèse protéique ont été mis en évidence dans ces deux analyses « omiques », notamment pour les carences en N, P et Ca.

VIII. Analyse comparative des transcriptomes racinaires de colzas carencés en macroéléments : vers la notion d'indicateurs moléculaires de carences nutritionnelles.

A notre connaissance, seules quelques études ont comparé les modifications du transcriptome en réponse à plusieurs privations de nutriments au sein du même dispositif expérimental. Par ailleurs lorsqu'elles existent, ces études se sont le plus souvent limitées à comparer les réponses aux trois principales carences en macroéléments *i.e.* N, P et K (Takehisa *et al.,* 2015 ; Zhu *et al.,* 2020). Dans la littérature, seule une étude conduite chez *Arabidopsis* a mis en évidence des réseaux de gènes dont l'expression est modifiée en réponse à 13 conditions différentes de disponibilité en nutriments, dont 8 carences nutritionnelles (Brumbarova et Ivano, 2019). Toutefois, même si cette étude a fourni un ensemble de données permettant d'ouvrir de nouvelles perspectives, la méta-analyse utilisée présente certaines limites puisque l'ensemble de données provenait d'expériences indépendantes qui ont été réalisées avec différents génotypes, différentes conditions de croissance et/ou des durées de carences très variables. Ainsi, le point fort de notre étude est l'application simultanée de six carences individuelles en macroéléments sur le colza, ce qui nous a permis de réaliser une analyse comparative des modifications transcriptomiques du même génotype de colza soumis, durant la même durée, aux différentes carences en macroéléments. Dans ce contexte, il a été possible d'identifier les DEG régulés à la hausse et à la baisse, spécifiques à chaque privation en macroéléments ou communs à n privations en macroéléments (avec n = 2 à 6). Malgré le nombre total de DEG assez élevé dans certaines carences en macroéléments, peu d'entre eux sont communs aux 6 carences, seulement 15 gènes sont concernés (12 DEG surexprimés et 3 DEG sous-exprimés) et sont essentiellement impliqués dans la réponse des plantes au stress oxydatif. En effet, un des signes clefs des stress abiotiques au niveau moléculaire est la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le superoxyde ($O_2.^-$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'origine de dommages dans la structure des lipides, des acides nucléiques et des protéines, qui peuvent conduire à la mort cellulaire (Tewari *et al.,* 2007 ; Xie *et al.,* 2019). Par exemple, lors d'une carence en K, des teneurs accrues de H_2O_2 ou de $O_2.^-$ ont déjà été mises en avant dans de nombreuses espèces végétales telles qu'*Arabidopsis*, le maïs, le riz, le coton et le café (Weng *et al.,* 2007, Hu *et al.,* 2016, Da Silva *et al.,* 2017 ; Trănkner *et al.,* 2018). En conséquence, les plantes possèdent des voies enzymatiques (faisant intervenir par exemple, la superoxyde dismutase, la glutathion réductase et la Glutathione S-transferase) ou non enzymatiques (*via* par exemple, l'ascorbate, le glutathion et les caroténoïdes), pour contrer les effets délétères de ces ROS (Hasanuzzaman *et al.,* 2012). Nos données, et en particulier la surexpression des gènes

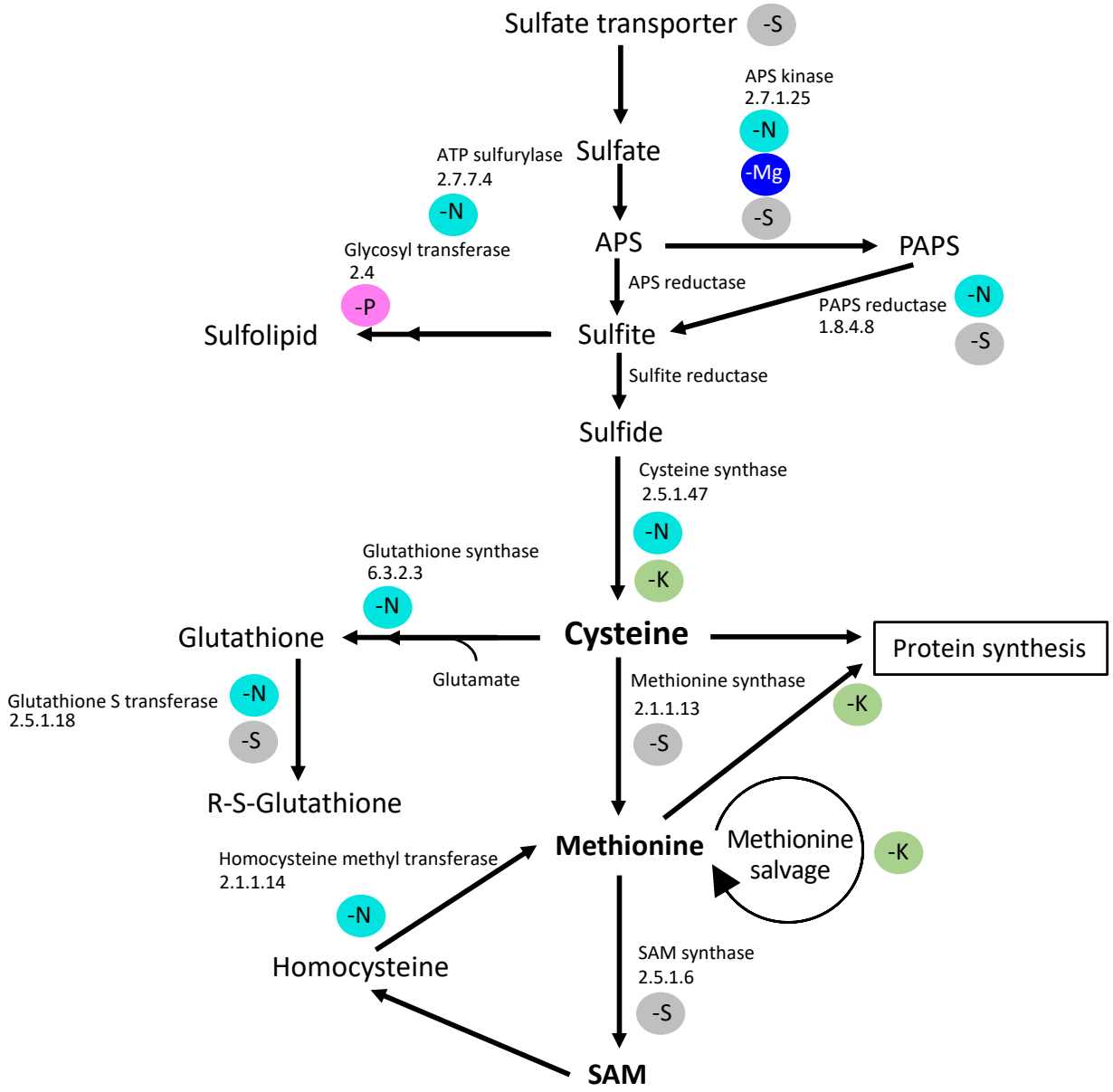


Figure IV. 5 : Représentation schématique du métabolisme du S dont les gènes codants les enzymes intervenant dans ce métabolisme ont été modulés par les carences en N, Mg, P, S ou K.

La carence en N module la plupart des gènes codant des enzymes intervenant dans ce métabolisme (APS kinase, ATP sulfurylase, PAPS reductase, cystéine synthase, gluthatione synthase, gluthatione S transferase et l'homocystéine methyl transférase). La carence en S module également de nombreux gènes codant des enzymes de son propre métabolisme, mais aussi, les gènes des transporteurs racinaires de sulfate. Les carences en Mg et P modulent respectivement, seulement les gènes d'une enzyme, la APS kinase et la Glycosyl transferase. Enfin, la carence en K module des gènes des enzymes intervenant dans la synthèse de la cystéine et au recyclage de la méthionine.

codant des inhibiteurs de protéases ou la Glutathione S-transferase, suggèrent une augmentation potentielle de l'activité des enzymes de détoxification des ROS dans toutes les carences en macroéléments chez le colza. Cependant, le fait que peu de ces gènes soient communs à toutes ces carences, suggère qu'il existe potentiellement de nombreux gènes spécifiques.

IX. Identification des gènes et des métabolites spécifiques à chacune des 6 carences en macroéléments

Maintenir le rendement et la qualité des produits récoltés pour subvenir aux besoins alimentaires de la population humaine et réduire l'utilisation d'intrants tout en gérant l'influence du changement climatique sur la disponibilité des nutriments, nécessitent une meilleure compréhension des réponses des plantes aux carences nutritionnelles et un diagnostic plus précoce de leur apparition. Ceci est particulièrement vrai pour les espèces cultivées telles que *Brassica napus*, qui sont très exigeantes en engrais (Akmouche *et al.*, 2019 ; Poisson *et al.*, 2019 ; Tian *et al.*, 2020). Dans ce contexte, l'expérimentation que nous avons réalisée nous a conduit à identifier les gènes spécifiques de chaque carence en macroéléments (6325, 5157, 3282, 2011, 1384, 439 pour la carence en P, en Ca, en N, en Mg, en S, et en K, respectivement). De manière surprenante, l'analyse d'enrichissement GO réalisée sur les listes de DEG spécifiques à chaque privation individuelle en macroéléments, a mis en évidence des processus biologiques communs à plusieurs privations en macroéléments. Ceci s'explique probablement par le fait que différents DEG spécifiques de chaque carence, puissent coder différentes enzymes impliquées dans la même voie métabolique et/ou coder différentes isoformes de la même enzyme. A titre d'exemple, les items de GO liés au métabolisme du S et à son transport étaient enrichis, respectivement, dans cinq et quatre des six privations de macroéléments. Cet enrichissement des voies métaboliques du S par des DEG spécifiques à chaque privation en macroéléments, pourrait être une conséquence du rôle central du métabolisme du S dans le fonctionnement cellulaire (Fig IV. 5). En effet, le métabolisme du S fournit notamment de la cystéine pour la synthèse des protéines et du glutathion (Chan *et al.*, 2019). Si l'on considère les DEG spécifiques codant des transporteurs d'ions, des conclusions similaires pourraient être tirées car le transport d'un élément donné peut être affecté par plusieurs privations de macroéléments *via* la régulation d'isoformes spécifiques à chaque privation de macroéléments. Ces deux exemples axés sur les gènes liés au S et au transport illustrent comment plusieurs éléments peuvent interagir dans le transport et le métabolisme d'autres éléments en modulant des cibles spécifiques, et mettent ainsi en évidence la complexité des interactions minérales (de Bang *et al.*, 2021). Le diagnostic d'une seule carence en macroélément peut être difficile s'il est basé uniquement sur les réponses phénotypiques et physiologiques des plantes, étant donné qu'elles sont

généralement communes à l'ensemble des carences nutritionnelles (de Bang *et al.*, 2021). Dès lors, des approches transcriptomiques ciblées ont été développées au cours des dernières décennies (Shigaki et Hirschi, 2000, Hermans *et al.*, 2010 ; Kamiya *et al.*, 2011 ; Verbruggen et Hermans, 2013), mais elles n'ont généralement pas abouti en raison du faible nombre de gènes candidats étudiés et de leur modulation en réponse à plusieurs carences en macroéléments. Pour surmonter cette difficulté, une solution consiste à utiliser une approche transcriptomique à grande échelle sur des plantes apparentées au même génotype et cultivées dans les mêmes conditions de croissance. Ainsi, les résultats de notre étude constituent une base de données de candidats moléculaires, potentiellement utilisables pour le développement d'un outil de diagnostic des privations en macroéléments.

Enfin, une autre originalité de notre étude a été de réaliser une analyse moléculaire comparative, transcriptomique et métabolomique, de six carences en macroéléments (N, Mg, P, S, K et Ca). L'analyse métabolomique réalisée sur les racines de colzas carencés en macroéléments a révélé que seuls quelques métabolites semblent être spécifiques à une privation de macroéléments (cinnamate de méthyle, 6-méthyl-5-{3-[2-(trifluorométhyl)phénoxy]propoxy}-2,4(1H, 3H)-pyrimidinediimine, 1-linoleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphatidylcholine et 1-(9Z,12Z)-octadecadienoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine pour la privation de N ; uridine 5'-diphosphogalactose pour la privation de K ; et acide D-(+)-malique pour la privation de Ca). Néanmoins, en sélectionnant les métabolites dont le VIP est supérieur à 4 (c'est-à-dire les métabolites qui discriminent le plus les carences entre elles), il a été possible de mettre en évidence un ensemble de 38 métabolites dont le profil métabolomique est relativement spécifique des six privations individuelles en macroéléments. Au même titre que les DEG spécifiques, cette combinaison de métabolites pourrait également être utilisée comme indicateur potentiel de chaque privation de macroéléments.

Dans le cadre d'une agriculture durable, le diagnostic précoce de carences nutritionnelles par l'intermédiaire d'outils ionomiques, transcriptomiques et/ou métabolomiques, permettrait de piloter plus finement la fertilisation d'une espèce de plante donnée en apportant spécifiquement l'élément nutritif déficient. Néanmoins, nos résultats restent préliminaires et nécessiteraient d'être complémentés par des travaux visant à s'assurer de la spécificité des indicateurs identifiés, notamment vis-à-vis d'autres stress biotiques et abiotiques ou encore des tissus végétaux qui pourraient être les plus pertinents.

Chapitre V

Perspectives

Au cours de ce travail de thèse, deux thématiques ont été développées. La première visait à caractériser le ionome fonctionnel du blé et du colza soumis à 18 carences nutritionnelles et récoltés avant tout effet significatif sur la croissance des plantes, afin de détecter les processus les plus précoces affectés par ces carences et de mieux appréhender l'ensemble des interactions nutritionnelles sous-jacentes. La seconde thématique consistait à étudier les modifications transcriptomiques et métabolomiques, chez le colza, en réponse à chacune des six carences individuelles en macroéléments, afin d'identifier des groupes de gènes et/ou de métabolites communs à l'ensemble des carences, mais surtout des groupes de gènes spécifiques de chaque carence, qui pourraient servir à la mise au point d'outils de diagnostic de chaque carence nutritionnelle.

I. Perspectives de recherches au niveau fondamental

1. Finaliser le développement d'une solution nutritive permettant d'obtenir une composition ionomique proche entre plantes cultivées en hydroponie ou au champ.

La solution nutritive utilisée lors de nos expérimentations, optimisée afin d'obtenir des plantes cultivées en hydroponie dont la composition ionomique était comparable avec celle mesurée des plantes cultivées au champ, a permis l'ajustement de la composition élémentaire des parties aériennes du colza, notamment *via* la diminution des apports en Ca, Mn et Mo, et au contraire, l'augmentation des apports en Fe, Ni et Si. Cependant, certains ajustements peuvent encore être optimisés. Par exemple, les teneurs en Fe, Ni et Si des plantes cultivées en hydroponie restent encore globalement trop faibles par rapport à celles évaluées au champ. Il en est de même pour l'Al et le Co, des éléments bénéfiques dont le rôle est encore peu connu. A l'inverse la composition des macroéléments reste, dans l'ensemble, encore 2 à 3 fois plus élevée par rapport à celle du champ, notamment pour le Mg et le K. Enfin, la composition du ionome fonctionnel moyen reste encore à déterminer au niveau racinaire (les analyses de racines prélevées au champ sont assez rares), afin de mettre au point une solution nutritive totalement optimisée, pour obtenir des plantes cultivées en hydroponie dont la composition ionomique tant foliaire que racinaire, est comparable à celle mesurée au champ. Pour ce faire, le même type d'analyses que celles effectuées sur les feuilles pourrait être envisagé, c'est-à-dire une comparaison entre le ionome racinaire de colzas cultivés aux champs dans de multiples parcelles et du ionome de colzas cultivés en hydroponie. Par la suite, le ratio entre les plantes cultivées en hydroponie et les plantes cultivées

sur le terrain pourrait être déterminé pour chaque élément, ce qui permettrait d'ajuster la composition de la solution nutritive.

2. Caractériser d'autres interactions ionomiques

Le ionome fonctionnel peut être utilisé pour concevoir des signatures spécifiques de carences minérales résultant de processus physiologiques. Grâce à une approche PLS-DA, l'ensemble des teneurs en macronutriments, micronutriments et nutriments bénéfiques ont permis de classer correctement la plupart des carences et d'extraire les éléments les plus contributifs, qui participent à la caractérisation des signatures spécifiques des carences en N, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, Si et Se chez les deux espèces, ainsi qu'en Mg, Cl, Cu et Mo chez le blé. Ces variations ionomiques donnent accès à une large source d'interactions entre des éléments possédant des propriétés chimiques ou des rôles biologiques similaires (Baxter, 2015) suffisamment spécifiques pour fournir des signatures caractéristiques de chaque privation. Par exemple, la forte interaction entre le S et le Mo a permis de discriminer la carence en S des autres privations. Par ailleurs, il a déjà été montré que le ratio [Mo]:[S] (Maillard *et al.*, 2016) ou encore le ratio ([Cl]+[P]):[S] (Etienne *et al.,* 2018) pouvaient être des indicateurs utilisables pour piloter la fertilisation soufrée. Dans ce sens, en suivant la même approche expérimentale, caractériser d'autres interactions entre éléments conduirait potentiellement à la mise en évidence d'autres indicateurs de carences nutritionnelles et à préciser les interactions les plus contributives des signatures ionomiques. Par exemple, dans nos résultats, lors d'une carence en K, une forte accumulation de Na a été observée pour les deux espèces. En effet, la plupart des transporteurs HKT contribuent à l'absorption racinaire de Na^+, sous forme de symporteurs Na^+/K^+, afin de permettre une compensation osmotique transitoire grâce à une substitution potentielle de K^+ par Na^+ dans des conditions de carence en K^+. Un indicateur de la nutrition potassique pourrait être développé par la détermination du ratio [Na]:[K]. De la même manière, l'augmentation de l'absorption de cations divalents (Ni, Cu, Zn et Co) au niveau racinaire dans la carence en Fe pourrait devenir un indicateur de la nutrition ferrique, *via* par exemple le ratio ([Ni]+[Cu]+[Zn]+[Co]):[Fe].

3. Développer un outil moléculaire de diagnostic de carences nutritionnelles au niveau foliaire

Notre analyse transcriptomique a abouti à l'identification de groupes de gènes qui pourraient constituer une base de données pertinentes, afin de développer un outil de diagnostic des carences en macronutriments. Néanmoins, afin d'affiner la détection précoce de carences en

macroéléments, il serait intéressant de vérifier la généricité des DEG spécifiques de chaque carence, identifiés au cours de notre étude, en étudiant leur profil d'expression dans d'autres tissus carencés (par exemple les feuilles), en réponse à d'autres stress (par exemple, sécheresse, attaque de pathogène, stress thermique) voire chez d'autres espèces cultivées en condition de stress nutritionnel. A terme, ce type d'approche devrait conduire à une réduction des listes de gènes spécifiques pour ne garder que les plus robustes, c'est-à-dire ceux dont l'expression est modulée spécifiquement en réponse à une carence en un macroélément donné et ce, quels que soient le tissu et l'espèce considérés.

Par la suite, il pourrait être nécessaire de vérifier la spécificité des candidats moléculaires lorsque les plantes sont confrontées à des carences multiples de macronutriments (par exemple, des carences multiples en N, P et Ca, sachant que les carences individuelles en N, P et Ca sont celles qui modulent le plus de gènes) et/ou à d'autres stress abiotiques (par exemple, stress hydriques, thermiques ou salin). Ainsi, il serait intéressant de comparer les groupes de gènes spécifiques à chaque carence en macroéléments, issus de nos travaux, avec les gènes modulés lors d'autres stress abiotiques. En conclusion, un tel outil de diagnostic pourrait permettre une détection précoce et précise des carences nutritionnelles afin d'améliorer la gestion de la fertilisation des grandes cultures.

Un autre aspect de ce travail serait, en suivant une démarche expérimentale similaire à celle ayant permis l'identification des gènes spécifiques de chaque carence au niveau racinaire, de développer un outil moléculaire foliaire qui permettrait un diagnostic des carences nutritionnelles. En effet, les feuilles étant des organes plus facilement accessibles que les racines, un tel outil pourrait être plus simple d'utilisation. Cependant, par rapport à l'outil de diagnostic racinaire, le développement d'un outil utilisable au niveau foliaire représente une difficulté supplémentaire dans la mesure où, pour certaines espèces telles que le colza, il sera nécessaire de déterminer le ou les rangs foliaires les plus pertinents à étudier. Aussi, un préalable pour le colza consisterait, à partir des expérimentations conduites au cours de cette thèse, à comparer les modifications transcriptomiques induites par les carences, dans les feuilles développées avant et après les carences afin d'identifier la cohorte de feuilles la plus pertinente pour développer cet outil.

II. Perspectives de développement : préciser la signature ionomique de carences nutritionnelles et identifier les signatures ionomiques d'autres facteurs abiotiques

Les signatures ionomiques développées par une approche PLS-DA demandent à être vérifiées chez d'autres espèces de grandes cultures, telles que le maïs et le pois, tout en suivant la

même approche expérimentale que celle ayant mis en avant les interactions entre éléments permettant de discriminer les carences les unes des autres. Cela permettrait de confirmer certaines interactions entre éléments, qui sont à l'origine de ces signatures. Par exemple, la corrélation entre les augmentations des absorptions de Mo, de V et de Se lors d'une carence en S, met en avant les trois modifications du ionome fonctionnel qui permettent de discriminer cette carence chez le colza et le blé. De plus, d'autres facteurs abiotiques pourraient être discriminés par des signatures ionomiques issues d'une approche PLS-DA, étant donné qu'ils peuvent également modifier le ionome des tissus végétaux. Cette approche permettrait également de déterminer les interactions entre éléments les plus contributives de ces facteurs abiotiques. Par exemple, l'étude de Loladze (2014) menée en système FACE (Free-Air Carbon Dioxide Enrichment) a démontré que les tissus des plantes exposées à un niveau trop élevé en CO_2 étaient appauvries en N, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu et Zn.

Enfin, l'utilisation d'une méthode statistique unique pour déterminer les signatures ionomiques, permettrait une meilleure comparaison de ces signatures entre organes, espèces et stress abiotiques. Pour y parvenir, il serait intéressant de déterminer et comparer les signatures ionomiques de chaque stress abiotique, pour chaque espèce (et organes) cultivée, dans les mêmes conditions expérimentales contrôlées, telles que celles proposées dans notre étude. Une fois identifiées, ces signatures ionomiques pourraient servir de base à l'identification des stress abiotiques, affectant les plantes de grandes cultures cultivées en conditions de plein champ.

Références bibliographiques

Aarabi F, Naake T, Fernie AR, Hoefgen R. 2020. Coordinating sulfur pools under sulfate deprivation. Trends in Plant Science **25**, 1227–1239.

Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice J-C, Ourry A. 2010. Effect of mineral sulphur availability on nitrogen and sulphur uptake and remobilization during the vegetative growth of Brassica napus L. Journal of Experimental Botany **61**, 2635–2646.

Ajeesh Krishna TP, Maharajan T, Victor Roch G, Ignacimuthu S, Antony Ceasar S. 2020. Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. Frontiers in Plant Science **11**.

Akmouche Y, Cheneby J, Lamboeuf M, Elie N, Laperche A, Bertheloot J, D'Hooghe P, Trouverie J, Avice J-C, Etienne P. 2019. Do nitrogen-and sulphur-remobilization-related parameters measured at the onset of the reproductive stage provide early indicators to adjust N and S fertilization in oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown under N-and/or S-limiting supplies? Planta **250**, 2047–2062.

Alejandro S, Höller S, Meier B, Peiter E. 2020. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. Frontiers in Plant Science **11**.

Ali S, Tyagi A, Bae H. 2021. Ionomic approaches for discovery of novel stress-resilient genes in plants. International Journal of Molecular Sciences **22**, 7182.

Alpuerto JB, Brasier KG, Griffey CA, Thomason WE, Fukao T. 2021. Accelerated senescence and nitrogen remobilization in flag leaves enhance nitrogen use efficiency in soft red winter wheat. Plant Production Science **24**, 490–504.

Álvarez-Aragón R, Rodríguez-Navarro A. 2017. Nitrate-dependent shoot sodium accumulation and osmotic functions of sodium in Arabidopsis under saline conditions. The Plant Journal **91**, 208–219.

Andresen E, Peiter E, Küpper H. 2018. Trace metal metabolism in plants. Journal of Experimental Botany **69**, 909–954.

Arkoun M, Sarda X, Jannin L, Laîné P, Etienne P, Garcia-Mina JM, laude Yvin JC, Ourry A. 2012. Hydroponics versus field lysimeter studies of urea, ammonium, and nitrate uptake by oilseed rape (*Brassica napus* L.). Journal of Experimental Botany **63**, 5245–5258.

Armengaud P, Breitling R, Amtmann A. 2004. The potassium-dependent transcriptome of Arabidopsis reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. Plant physiology **136**, 2556–2576.

Arnon DI, Stout PR. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. Plant physiology **14**, 371.

Artyszak A. 2018. Effect of Silicon Fertilization on Crop Yield Quantity and Quality—A Literature Review in Europe. Plants **7**, 54.

Assaha DVM, Ueda A, Saneoka H, Al-Yahyai R, Yaish MW. 2017. The Role of Na^+ and K^+ Transporters in salt stress adaptation in glycophytes. Frontiers in Physiology **8**.

Astolfi S, Celletti S, Vigani G, Mimmo T, Cesco S. 2021. Interaction between sulfur and iron in plants. Frontiers in Plant Science **12**.

Aussignargues C. 2012. Optimisation du métabolisme énergétique du soufre chez la bactérie hyperthermophile *Aquifex aeolicus*.

Avice J-C, Etienne P. 2014. Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (Brassica napus L.). Journal of Experimental Botany **65**, 3813–3824.

Avila-Ospina L, Moison M, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C. 2014. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. Journal of Experimental Botany **65**, 3799–3811.

Bao Z, Bai J, Cui H, Gong C. 2019. A missing link in radial ion transport: ion transporters in the endodermis. Frontiers in Plant Science **10**.

Bar-Peled M, Urbanowicz BR, O'Neill MA. 2012. The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II – insights from nucleotide sugar formation and diversity. Frontiers in Plant Science **3**.

Barberon M, Vermeer JEM, De Bellis D, Wang P, Naseer S, Andersen TG, Humbel BM, Nawrath C, Takano J, Salt DE, Geldner N. 2016. Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. Cell **164**, 447–459.

Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conéjéro G, Curie C, Friml J, Vert G. 2011. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**, E450–E458.

Barberon M. 2017. The endodermis as a checkpoint for nutrients. New Phytologist **213**, 1604–1610.

Barbour GW, Sim JS. 1991. True metabolizable energy and true amino acid availability in canola and flax products for poultry. Poultry Science **70**, 2154–2160.

Barth CA. 2007. Rapeseed for human nutrition–present knowledge and future options. Proceedings of the 12 th International Rapeseed Congress. Wuhan, China.3–5.

Barth JG. 2020. Limestone and calcium in plants. Soin-de-la-terre.

Bauer P, Bereczky Z. 2003. Gene networks involved in iron acquisition strategies in plants. Agronomie **23**, 447–454.

Baxter I, Vitek O, Lahner B, Muthukumar B, Borghi M, Morrissey J, Guerinot ML, Salt DE. 2008. The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. Proceedings of the National Academy of Sciences **105**, 12081–12086.

Baxter I. 2009. Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. Current Opinion in Plant Biology **12**, 381–386.

Baxter I. 2015. Should we treat the ionome as a combination of individual elements, or should we be deriving novel combined traits? Journal of experimental botany **66**, 2127–2131.

Beier MP, Kojima S. 2020. The function of high-affinity urea transporters in nitrogen-deficient conditions. Physiologia Plantarum **4**, 802-808

Bengtsson SB. 2013. *Interception and storage of wet deposited radionuclides in crops*.

Bibikova T, Gilroy S. 2002. Root hair development. journal of plant growth regulation **21**, 383–415.

Biddulph, O, Cory, R, Biddulph S. 1959. Translocation of calcium in the bean plant. Plant Physiol. **34**, 512–519. doi: 10.1104/pp. 34.5.512

Bittner F. 2014. Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. Frontiers in Plant Science **5**.

Bourdon D. 1986. Valeur nutritive des nouveaux tourteaux et graines entières de colza à basse teneur en glucosinolates pour le porc à l'engrais. J. Rech. Porcine Fr. **18**, 91–102.

Brahma R, Ahmed P, Choudhury M. 2020. Silicon nutrition for alleviation of abiotic stress in plants: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry **9**, 1374–1381.

Brandon G, Pelletier P, Cabon G. 2006. Sources azotées pour l'engraissement de jeunes bovins en complément du blé: intérêt du tourteau de colza, du tourteau de tournesol et de la luzerne déshydratée par rapport à un aliment composé. Nitrogen sources in wheat based diets for fattening young bulls. Bull. Tech. CRZV Theix **70**, 173–183.

Brdar-Jokanović M. 2020. Boron Toxicity and Deficiency in Agricultural Plants. International Journal of Molecular Sciences **21**, 1424.

Brown PH, Zhao F-J, Dobermann A. 2021. What is a plant nutrient? Changing definitions to advance science and innovation in plant nutrition. Plant and Soil.

Brumbarova T, Ivanov R. 2019. The Nutrient Response Transcriptional Regulome of Arabidopsis. iScience **19**, 358–368.

Buoso S, Tomasi N, Said-Pullicino D, Arkoun M, Yvin J-C, Pinton R, Zanin L. 2021. Characterization of physiological and molecular responses of Zea mays seedlings to different urea-ammonium ratios. Plant Physiology and Biochemistry **162**, 613–623.

Butz ND, Sharkey TD. 1989. Activity ratios of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase accurately reflect carbamylation ratios. Plant Physiology **89**, 735–739.

Cabot C, Martos S, Llugany M, Gallego B, Tolrà R, Poschenrieder C. 2019. A role for zinc in plant defense against pathogens and herbivores. frontiers in plant science **10**.

Cao Q, Xv C, Jiang Q, Wang L, Shi G. 2019. Comparative transcriptome analysis reveals key genes responsible for the homeostasis of iron and other divalent metals in peanut roots under iron deficiency. Plant and Soil **445**, 513–531.

Cao X, Chen C, Zhang D, Shu B, Xiao J, Xia R. 2013. Influence of nutrient deficiency on root architecture and root hair morphology of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings under sand culture. Scientia Horticulturae **162**, 100–105.

Carvalhais LC, Dennis PG, Fedoseyenko D, Hajirezaei M-R, Borriss R, von Wirén N. 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. Journal of Plant Nutrition and Soil Science **174**, 3–11.

Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin IA, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B. 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic Brassica napus oilseed genome. science **345**, 950–953.

Chan KX, Phua SY, Van Breusegem F. 2019. Secondary sulfur metabolism in cellular signalling and oxidative stress responses. Journal of experimental botany **70**, 4237–4250.

Chen D, Cao B, Qi L, Yin L, Wang S, Deng X. 2016. Silicon-moderated K-deficiency-induced leaf chlorosis by decreasing putrescine accumulation in sorghum. Annals of Botany **118**, 305–315.

Chen ZC, Yamaji N, Motoyama R, Nagamura Y, Ma JF. 2012. Up-Regulation of a Magnesium Transporter Gene *OsMGT1* Is Required for Conferring Aluminum Tolerance in Rice. Plant Physiology **159**, 1624–1633.

Chen, Shinozaki, Luo, *et al.* 2019. Autophagy and nutrients management in plants. Cells **8**, 1426.

Chèvre AM, Pelé A, Paillard S, Rousseau-Gueutin M. 2016. Re-synthèse d'espèces : l'exemple du colza. HAL science ouverte.

Colmenero-Flores JM, Franco-Navarro JD, Cubero-Font P, Peinado-Torrubia P, Rosales MA. 2019. Chloride as a beneficial macronutrient in higher plants: new roles and regulation. International Journal of Molecular Sciences **20**, 4686.

Congreves KA, Otchere O, Ferland D, Farzadfar S, Williams S, Arcand MM. 2021. Nitrogen use efficiency definitions of today and tomorrow. Frontiers in Plant Science **12**.

Courbet G, D'Oria A, Lornac A, Diquélou S, Pluchon S, Arkoun M, Koprivova A, Kopriva A, Etienne P, Ourry A. 2021. Specificity and plasticity of the functional ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* subjected to macronutrient deprivation. Frontiers in plant science **12**.

Courbet G, Gallardo K, Vigani G, Brunel-Muguet S, Trouverie J, Salon C, Ourry A. 2019. Disentangling the complexity and diversity of crosstalk between sulfur and other mineral nutrients in cultivated plants. Journal of experimental botany **70**, 4183–4196.

Cui S, Suzaki T, Tominaga-Wada R, Yoshida S. 2018. Regulation and functional diversification of root hairs. Seminars in Cell & Developmental Biology **83**, 115–122.

Curci PL, Cigliano RA, Zuluaga DL, Janni M, Sanseverino W, Sonnante G. 2017. Transcriptomic response of durum wheat to nitrogen starvation. Scientific reports **7**, 1–14.

Cushman JC. 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. American Zoologist **41**, 758–769.

D'Hooghe P, Dubousset L, Gallardo K, Kopriva S, Avice J-C, Trouverie J. 2014. Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated with alterations of seed yield and quality in sulfur-limited *Brassica napus* L. Molecular & Cellular Proteomics **13**, 1165–1183.

D'Oria A, Courbet G, Lornac A, Pluchon S, Arkoun M, Maillard A, Etienne P, Diquélou S, Ourry A. 2021. Specificity and plasticity of the functional ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* exposed to micronutrient or beneficial nutrient deprivation and predictive sensitivity of the ionomic signatures. Frontiers in plant science **12**, 79.

Da Ros LM, Mansfield SD. 2020. Biotechnological mechanism for improving plant remobilization of phosphorus during leaf senescence. Plant biotechnology journal **18**, 470–478.

Da Silva AA, Lima GS de, de Azevedo CA, Soares LA dos A, Gheyi HR, Oliveira RC de. 2017. Potassium fertilization in the cultivation of colored cotton irrigated with saline water. Revista brasileira de engenharia agricola e ambiental **21**, 628–633.

Dakora FD, Phillips DA. 2013*b*. *Root Exudates as Mediators of Mineral Acquisition in Low-Nutrient*. Springer: Dordrecht.

De Bang TC, Husted S, Laursen KH, Persson DP, Schjoerring JK. 2021. The molecular–physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. New Phytologist **229**, 2446–2469.

De Groot CC, Van Den Boogaard R, Marcelis LF, Harbinson J, Lambers H. 2003. Contrasting effects of N and P deprivation on the regulation of photosynthesis in tomato plants in relation to feedback limitation. Journal of experimental botany **54**, 1957–1967.

Debiton C. 2010. Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy.

Ding J, Ji C, Cai H. 2017. Membrane transporter families of metal microelements make plants grow better and healthier. Asian Journal of Plant Science and Research **7**, 1–27.

Doblas VG, Geldner N, Barberon M. 2017. The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. Current Opinion in Plant Biology **39**, 136–143.

Drechsler N, Zheng Y, Bohner A, Nobmann B, von Wirén N, Kunze R, Rausch C. 2015. Nitrate-dependent control of shoot K homeostasis by NPF7.3/NRT1.5 and SKOR in *Arabidopsis*. Plant Physiology, pp.01152.2015.

Droux M. 2004. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* **79:** 331–348.

Dubousset L, Abdallah M, Desfeux AS, Etienne P, Meuriot F, Hawkesford JM, Gombert J, Ségura R, Bataillé MP, Rezé S, Bonnefoy J, Ameline AF, Ourry A, Le Dily F, Avice JC. 2009. Remobilization of leaf S compounds and senescence in response to restricted sulphate supply during the vegetative stage of oilseed rape are affected by mineral N availability. Journal of Experimental Botany **60**, 3239–3253.

Dubousset L, Etienne P, Avice JC. 2010. Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? Journal of Experimental Botany **61**, 4313–4324.

Eagle AJ, Olander LP, Locklier KL, Heffernan JB, Bernhardt ES. 2017. Fertilizer Management and Environmental Factors Drive N_2O and NO_3 Losses in Corn: A Meta-Analysis. Soil Science Society of America Journal **81**, 1191–1202.

El Mahi H, Pérez-Hormaeche J, De Luca A, Villalta I, Espartero J, Gámez-Arjona F, Fernández JL, Bundó M, Mendoza I, Mieulet D. 2019. A critical role of sodium flux via the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger SOS1 in the salt tolerance of rice. Plant Physiology **180**, 1046–1065.

Etienne P, Sorin E, Maillard A, Gallardo K, Arkoun M, Guerrand J, Cruz F, Yvin J-C, Ourry A. 2018. Assessment of sulfur deficiency under field conditions by single measurements of sulfur, chloride and phosphorus in mature leaves. Plants **7**, 37.

Fan X, Naz M, Fan X, Xuan W, Miller AJ, Xu G. 2017. Plant nitrate transporters: from gene function to application. Journal of Experimental Botany **68**, 2463–2475.

Fan X, Zhou X, Chen H, Tang M, Xie X. 2021. Cross-Talks Between Macro- and Micronutrient Uptake and Signaling in Plants. Frontiers in Plant Science **12**.

Filipek-Mazur B, Tabak M, Gorczyca O, Lisowska A. 2019. Effect of sulfur-containing fertilizers on the quantity and quality of spring oilseed rape and winter wheat yield. Journal of Elementology **24**(4): 1383-1394.

Fontagné-Dicharry S, Véron V, Larroquet L, Godin S, Wischhusen P, Aguirre P, Terrier F, Richard N, Bueno M, Bouyssière B. 2020. Effect of selenium sources in plant-based diets on antioxidant status and oxidative stress-related parameters in rainbow trout juveniles under chronic stress exposure. Aquaculture **529**, 735684.

Frison EA, Cherfas J, Hodgkin T. 2011. Agricultural biodiversity is essential for a sustainable improvement in food and nutrition security. Sustainability **3**, 238–253.

Gaur S, Kumar J, Kumar D, Chauhan DK, Prasad SM, Srivastava PK. 2020. Fascinating impact of silicon and silicon transporters in plants: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety **202**, 110885.

Geay Y, Béranger C, Jailler R, Jailler R, Cuylle G. 1975. Le tourteau de colza dans l'alimentation animale. utilisation comparée des tourteaux de colza toasté, de colza fermenté, de soja et d'arachide pour l'engraissement des jeunes taureaux. Annales de zootechnie. 209–215.

Geilfus C-M. 2017. The pH of the Apoplast: Dynamic Factor with Functional Impact Under Stress. Molecular Plant **10**, 1371–1386.

Geilfus C-M. 2018. Review on the significance of chlorine for crop yield and quality. Plant Science **270**, 114–122.

Genot V, Colinet G, Brahy V, Bock L. 2009. L'état de fertilité des terres agricoles et forestières en région wallonne. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement 1370-6233.

Giehl RFH, Laginha AM, Duan F, Rentsch D, Yuan L, von Wirén N. 2017. A critical role of AMT2;1 in root-to-shoot translocation of ammonium in *Arabidopsis*. Molecular Plant **10**, 1449–1460.

Gledhill D. 2008. The names of plants. Cambridge University Press.

Gomes EF, Rema P, Kaushik SJ. 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): digestibility and growth performance. Aquaculture **130**, 177–186.

Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N. 2013. Plasticity of the arabidopsis root system under nutrient deficiencies. Plant Physiology **163**, 161–179.

Guiboileau A, Masclaux-Daubresse C. 2012. L'autophagie chez les plantes : mécanismes, régulations et fonctions. Comptes Rendus Biologies **335**, 375–388.

Guo W, Nazim H, Liang Z, Yang D. 2016*a*. Magnesium deficiency in plants: An urgent problem. The Crop Journal **4**, 83–91.

Gupta M, Gupta S. 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. Frontiers in plant science **7**, 2074.

Haddad C, Arkoun M, Jamois F, Schwarzenberg A, Yvin J-C, Etienne P, Laîné P. 2018. Silicon promotes growth of *Brassica napus* L. and delays leaf senescence induced by nitrogen starvation. Frontiers in Plant Science **9**.

Hafsi C, Debez A, Abdelly C. 2014. Potassium deficiency in plants: effects and signaling cascades. Acta Physiologiae Plantarum **36**, 1055–1070.

Hajiboland R, Amirazad F. 2010. Growth, photosynthesis and antioxidant defense system in Zn-deficient red cabbage plants. Plant, Soil and Environment **56**, 209–217.

Han Y-L, Song H-X, Liao Q, Yu Y, Jian SF, Lepo JE, Liu Q, Rong XM, Tian C, Zeng J, Guan HY, Ismail AM, Zhang ZH. 2016. Nitrogen use efficiency is mediated by vacuolar nitrate sequestration capacity in roots of *Brassica napus*. Plant Physiology **170**, 1684–1698.

Hanson B, Garifullina GF, Lindblom SD, Wangeline A, Ackley A, Kramer K, Norton AP, Lawrence CB, Pilon-Smits EA. 2003. Selenium accumulation protects Brassica juncea from invertebrate herbivory and fungal infection. New Phytologist **159**, 461–469.

Hanus-Fajerska E, Wiszniewska A, Kamińska I. 2021. A dual role of vanadium in environmental systems—beneficial and detrimental effects on terrestrial plants and humans. Plants **10**, 1110.

Hasanuzzaman M, Hossain MA, da Silva JAT, Fujita M. 2012. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In crop stress and its management: perspectives and strategies. Dordrecht: Springer Netherlands, 261–315.

Hashemi A, Abdolzadeh A, Sadeghipour HR. 2010. Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating salinity stress in hydroponically grown canola, *Brassica napus* L., plants. Soil Science and Plant Nutrition **56**, 244–253.

Havé M, Marmagne A, Chardon F, Masclaux-Daubresse C. 2016. Nitrogen remobilisation during leaf senescence: lessons from Arabidopsis to crops. Journal of Experimental Botany, erw365.

Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Møller IS, White P. 2012. Functions of macronutrients. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Elsevier, 135–189.

Heather, A. Currie, C., Perry, C. 2007. Silica in Plants. *Biological, Biochemical and Chemical Studies*, *Ann Bot., December; 100*(7), 1383–1389.

Henriques R, Jásik J, Klein M, Martinoia E, Feller U, Schell J, Pais MS, Koncz C. 2002. Knock-out of Arabidopsis metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. Plant molecular biology **50**, 587–597.

Hepler PK, Winship LJ. 2010. Calcium at the cell wall-cytoplast interface. Journal of Integrative Plant Biology **52**, 147–160.

Hermans C, Vuylsteke M, Coppens F, Craciun A, Inzé D, Verbruggen N. 2010. Early transcriptomic changes induced by magnesium deficiency in Arabidopsis thaliana reveal the alteration of circadian clock gene expression in roots and the triggering of abscisic acid-responsive genes. New Phytologist **187**, 119–131.

Hernández-Hernández H, Quiterio-Gutiérrez T, Cadenas-Pliego G, Ortega-Ortiz H, Hernández-Fuentes AD, Cabrera de la Fuente M, Valdés-Reyna J, Juárez-Maldonado A. 2019. Impact of selenium and copper nanoparticles on yield, antioxidant system, and fruit quality of tomato plants. Plants **8**, 355.

Hetherington AM. 2001. Guard cell signaling. Cell **107**, 711–714.

Hirel B, Tétu T, Lea PJ, Dubois F. 2011. Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable agriculture. Sustainability **3**, 1452–1485.

Hirose T. 2011. Nitrogen use efficiency revisited. Oecologia **166**, 863–867.

Hodson MJ, White PJ, Mead A, Broadley MR. 2005. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. Annals of Botany **96**, 1027–1046.

Hu W, Lv X, Yang J, Chen B, Zhao W, Meng Y, Wang Y, Zhou Z, Oosterhuis DM. 2016. Effects of potassium deficiency on antioxidant metabolism related to leaf senescence in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Field Crops Research **191**, 139–149.

Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ. 2008. The relationship of drought-related gene expression in Arabidopsis thaliana to hormonal and environmental factors. Journal of experimental Botany **59**, 2991–3007.

Huang Q, Wang M, Xia Z. 2018. The SULTR gene family in maize (*Zea mays* L.): Gene cloning and expression analyses under sulfate starvation and abiotic stress. Journal of Plant Physiology **220**, 24–33.

Ijato T, Porras-Murillo R, Ganz P, Ludewig U, Neuhäuser B. 2021. Concentration-dependent physiological and transcriptional adaptations of wheat seedlings to ammonium. Physiologia Plantarum **171**, 328–342.

Jahreis G, Schäfer U. 2011. Rapeseed (*Brassica napus*) oil and its benefits for human health. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention, Academic press. Chap 114, pp 967-974.

Jamal A, Moon Y-S, Zainul Abdin M. 2010. Sulphur-a general overview and interaction with nitrogen. Australian Journal of Crop Science **4**, 523–529.

James M, Poret M, Masclaux-Daubresse C, Marmagne A, Coquet L, Jouenne T, Chan P, Trouverie J, Etienne P. 2018. SAG12, a major cysteine protease involved in nitrogen allocation during senescence for seed production in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology **59**, 2052–2063.

James M. 2018. Etude de systèmes protéolytiques et anti-protéolytiques impliqués dans la remobilisation de l'azote au cours de la sénescence chez les Brassicacées (*Arabidopsis thaliana* L., *Brassica napus* L).

Jankowski KJ, Sokólski M, Dubis B, Krzebietke S, Żarczyński P, Hulanicki P, Hulanicki PS. 2016. Yield and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) seeds in response to foliar application of boron. Agricultural and food science **25**, 164–176.

Jasinski S, Fabrissin I, Masson A, Marmagne A, Lécureuil A, Bill L, Chardon F. 2021. ACCELERATED CELL DEATH 6 acts on natural leaf senescence and nitrogen fluxes in Arabidopsis. Frontiers in plant science **11**, 2013.

Johnston AM, Bruulsema TW. 2014*a*. 4R Nutrient Stewardship for Improved Nutrient Use Efficiency. Procedia Engineering **83**, 365–370.

Kamiya, T.; Yamagami, M.; Hirai, M.; Fujiwara, T. 2011. Establishment of an in planta magnesium monitoring system using CAX3 promoter-luciferase in Arabidopsis. *J. Exp. Bot. 63*, 355–363.

Karim S, Lundh D, Holmström KO, Mandal A, Pirhonen M. 2005. Structural and functional characterization of AtPTR3, a stress-induced peptide transporter of Arabidopsis. J Mol Model, **11**: 226–236

Kaur A, Pati PK, Pati AM, Nagpal AK. 2017. *In-silico* analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. PlosONE **10**, 1371.

Khan MIR, Ashfaque F, Chhillar H, Irfan M, Khan NA. 2021. The intricacy of silicon, plant growth regulators and other signaling molecules for abiotic stress tolerance: An entrancing crosstalk between stress alleviators. Plant Physiology and Biochemistry.

Kimura Y, Ushiwatari T, Suyama A, Tominaga-Wada R, Wada T, Maruyama-Nakashita A. 2019. Contribution of root hair development to sulfate uptake in Arabidopsis. Plants **8**, 106.

Knipfer T, Danjou M, Vionne C, Fricke W. 2021. Salt stress reduces root water uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) through modification of the transcellular transport path. Plant, Cell & Environment **44**, 458–475.

Knoop V, Groth-Malonek M, Gebert M, Eifler K, Weyand K. 2005. Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. Molecular Genetics and Genomics **274**, 205–216.

Kobayashi T, Nishizawa NK. 2012. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. Annual Review of Plant Biology **63**, 131–152.

Kojima S, Bohner A, Gassert B, Yuan L, Wirén N von. 2007. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots: High-affinity urea uptake in plants. The Plant Journal **52**, 30–40.

Koné B, Emile Y, Amadji GL, N'Ganzou KR. 2014. Root and grain yield as affected by soil nutrient deficiency and fertilizer in rainfed rice cultivation. Advanced fertilizer technology **2**, 213–219.

Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB. 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. Plant molecular biology **40**, 37–44.

Kronzucker HJ, Britto DT. 2011. Sodium transport in plants: a critical review. New Phytologist **189**, 54–81.

Kumar S, Kumar S, Mohapatra T. 2021. Interaction Between Macro- and Micro-Nutrients in Plants. Frontiers in Plant Science **12**.

Kumar V, Pandita S, Singh Sidhu GP, Sharma A, Khanna K, Kaur P, Bali AS, Setia R. 2021. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. Chemosphere **262**, 127810.

Kuo H-F, Hsu Y-Y, Lin W-C, Chen K-Y, Munnik T, Brearley CA, Chiou T-J. 2018. Arabidopsis inositol phosphate kinases IPK1 and ITPK1 constitute a metabolic pathway in maintaining phosphate homeostasis. The Plant Journal **95**, 613–630.

Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinot ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L. 2003. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 21 **:** 1215–1221

Laîné P, Haddad C, Arkoun M, Yvin J-C, Etienne P. 2019. Silicon Promotes Agronomic Performance in Brassica napus Cultivated under Field Conditions with Two Nitrogen Fertilizer Inputs. Plants **8**, 137.

Lee Y-H, Foster J, Chen J, Voll LM, Weber APM, Tegeder M. 2007. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of Arabidopsis: Amino acid uptake by the root. The Plant Journal **50**, 305–319.

Leigh RA, Wyn Jones RG. 1984. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. New phytol **97**, 1, 13

Leménager T, Bougnoux N, Roques N, Martin C. 2016. Dynamiques démographiques, dégradation environnementale et restauration écologique : Enjeux et opportunités. Agence Française Développement. https://www.researchgate.net/publication/289521152

Lewandowska M, Sirko A. 2008. Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. Acta Biochimica Polonica **55**, 457–471.

Li B, Qiu J, Jayakannan M, Xu B, Li Y, Mayo GM, Tester M, Gilliham M, Roy SJ. 2017. AtNPF2.5 modulates chloride (Cl^-) efflux from roots of *Arabidopsis thaliana*. Frontiers in Plant Science **7**.

Li M, Tian H, Gao Y. 2021. A genome-wide analysis of NPF and NRT2 transporter gene families in bread wheat provides new insights into the distribution, function, regulation and evolution of nitrate transporters. Plant and Soil **465**, 47–63.

Li Q, Gao Y, Yang A. 2020. Sulfur homeostasis in plants. International Journal of Molecular Sciences **21**, 8926.

Li S, Zhou X, Huang Y, Zhu L, Zhang S, Zhao Y, Guo J, Chen J, Chen R. 2013. Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. BMC Plant Biology **13**, 1–14.

Li Y, Wang X, Zhang H, Wang S, Ye X, Shi L, Xu F, Ding G. 2019. Molecular identification of the phosphate transporter family 1 (PHT1) genes and their expression profiles in response to phosphorus deprivation and other abiotic stresses in Brassica napus. PLoS One **14**, e0220374.

Liang Y, Sun W, Zhu Y-G, Christie P. 2007. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. Environmental pollution **147**, 422–428.

Lin Y, Sun Z, Li Z, Xue R, Cui W, Sun S, Liu T, Zeng R, Song Y. 2019. Deficiency in silicon transporter lsi1 compromises inducibility of anti-herbivore defense in rice plants. Frontiers in Plant Science **10**.

Liñero O, Cornu J-Y, de Diego A, Bussière S, Coriou C, Thunot S, Robert T, Nguyen C. 2018. Source of Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo and Zn in grains of sunflower (*Helianthus annuus*) grown in nutrient solution: root uptake or remobilization from vegetative organs? Plant and soil **424**, 435–450.

Liu J, Hu J, Li Y, Li G, Wu H. 2021. Calcium channels and transporters in plants under salinity stress. Calcium Transport Elements in Plants, chap 10. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821792-4.00002-3

Loladze I. 2014. Hidden shift of the ionome of plants exposed to elevated CO2 depletes minerals at the base of human nutrition. elife **3**, e02245.

López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. Current Opinion in Plant Biology **6**, 280–287.

Ludewig U, Yuan L, Neumann G. 2019. Improving the efficiency and effectiveness of global phosphorus use: focus on root and rhizosphere levels in the agronomic system. Frontiers of Agricultural Science and Engineering **6**, 357.

Ma JF et Takahashi E. 2002. Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan. Elsevier Science.

Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M. 2006. A silicon transporter in rice. Nature **440**, 688–691.

Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Konishi S, Fujiwara T, Katsuhara M, Yano M. 2007. An efflux transporter of silicon in rice. Nature **448**, 209–212.

Ma JF. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. Soil Science and Plant Nutrition **50**, 11–18.

Ma T-L, Wu W-H, Wang Y. 2012. Transcriptome analysis of rice root responses to potassium deficiency. BMC plant biology **12**, 1–13.

Maathuis FJ. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. Current opinion in plant biology **12**, 250–258.

Maillard A, Diquélou S, Billard V, Lainé P, Garnica M, Prudent M, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A. 2015. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. Frontiers in Plant Science **6**.

Maillard A, Etienne P, Diquélou S, Trouverie J, Billard V, Yvin J-C, Ourry A. 2016. Nutrient deficiencies modify the ionomic composition of plant tissues: a focus on cross-talk between molybdenum and other nutrients in *Brassica napus*. Journal of Experimental Botany **67**, 5631–5641.

Maillard A, Sorin E, Etienne P, *et al.* 2016. Non-specific root transport of nutrient gives access to an early nutritional indicator: the case of sulfate and molybdate (I Baxter, Ed.). PLOS ONE **11**, e0166910.

Malav JK, Ramani VP, Sajid M, Kadam GL. 2017. Influence of nitrogen and silicon fertilization on yield and nitrogen and silicon uptake by rice (*Oryza Sativa* L.) under Lowland Conditions. Res. J. Chem. Environ **21**, 45–49.

Malone M, White P, Morales MA. 2002. Mobilization of calcium in glasshouse tomato plants by localized scorching. Journal of experimental botany **53**, 83–88.

Manzoor H, Chiltz A, Madani S, Vatsa P, Schoefs B, Pugin A, Garcia-Brugger A. 2012. Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. Cell Calcium **51**, 434–444.

Marschner P, Rengel Z. 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Elsevier, 3rd ed. London ; Waltham, MA: Elsevier/Academic Press: San Diego, CA, USA.

Marten I, Hoth S, Deeken R, Ache P, Ketchum K. A, Hoshi T, Hedrich R. 1999. AKT3, a phloem-localized K^+ channel, is blocked by protons. Proceedings of the National Academy of Sciences **96**, 7581–7586.

Mäser P, Gierth M, Schroeder JI. 2002. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. Progress in Plant Nutrition: Plenary Lectures of the XIV International Plant Nutrition Colloquium. Springer, 43–54.

Mauk CS, Nooden LD. 1992. Regulation of mineral redistribution in pod-bearing soybean explants. Journal of experimental botany **43**, 1429–1440.

Mayer M, Dynowski M, Ludewig U. 2006. Ammonium ion transport by the AMT/Rh homologue LeAMT1;1. Biochemical Journal **396**, 431–437.

McCready K, Spencer V, Kim M. 2020. The importance of TOR kinase in plant development. Frontiers in Plant Science **11**.

McDonald TR, Ward JM. 2016. Evolution of electrogenic ammonium transporters (AMTs). Frontiers in Plant Science **7**.

Mendel RR, Schwarz G. 2011. Molybdenum cofactor biosynthesis in plants and humans. Coordination Chemistry Reviews **255**, 1145–1158.

Meunier JD, Saby N, Ackerman A, Angeletti B, Basile-Doelsch I, Borschneck D, Caubet M, Chaurand P, Cornu S, Delvigne C. 2018. Rôle du silicium dans la culture du blé en France : Biodisponibilité, bioaccumulation et effet sur les rendements.

Michigami T, Kawai M, Yamazaki M, Ozono K. 2018. Phosphate as a signaling molecule and its sensing mechanism. Physiological Reviews **98**, 2317–2348.

Miedema, H., Demidchik, V., Véry, A.-A., Bothwell, J. H. F., Brownlee, C., and Davies, J. M. 2008. Two voltage-dependent calcium channels co-exist in the apical plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *New Phytol.* 179, 378–385. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02465.x

Minden V, Schaller J, Venterink HO. 2021. Plants increase silicon content as a response to nitrogen or phosphorus limitation: a case study with Holcus lanatus. Plant and Soil **462**, 95–108.

Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N. 2005. A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. Proceedings of the National Academy of Sciences **102**, 11934–11939.

Mitani N, Yamaji N, Ma JF. 2008. Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **456**, 679–686.

Miwa K, Fujiwara T. 2010. Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. Annals of Botany **105**, 1103–1108.

Miwa K, Wakuta S, Takada S, Ide K, Takano J, Naito S, Omori H, Matsunaga T, Fujiwara T. 2013. Roles of BOR2, a Boron Exporter, in Cross Linking of Rhamnogalacturonan II and Root Elongation under Boron Limitation in Arabidopsis. PLANT PHYSIOLOGY **163**, 1699–1709.

More S, Shinde SE, Kasture MC. 2019. Root exudates a key factor for soil and plant: An overview. The Pharma Innovation Journal **8**(6): 449-459.

Morice J. 1979. Avant-propos : la sélection du colza sans acide érucique. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophy. **19**, 471–477.

Muneer S, Lee B-R, Kim K-Y, Park S-H, Zhang Q, Kim T-H. 2014. Involvement of sulphur nutrition in modulating iron deficiency responses in photosynthetic organelles of oilseed rape (Brassica napus L.). Photosynthesis Research **119**, 319–329.

Nacry P, Bouguyon E, Gojon A. 2013. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. Plant and Soil **370**, 1–29.

Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C, Geldner N. 2012. Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. Proceedings of the National Academy of Sciences **109**, 10101–10106.

Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. New Phytologist **182**, 31–48.

Nedelyaeva OI, Shuvalov AV, Balnokin YV. 2020. Chloride Channels and transporters of the CLC family in plants. Russian Journal of Plant Physiology **67**, 767–784.

Nehe AS, Misra S, Murchie EH, Chinnathambi K, Tyagi BS, Foulkes MJ. 2020. Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and protein concentration in Indian wheat cultivars. Field crops research **251**, 107778.

Neuhäuser B, Dynowski M, Ludewig U. 2014. Switching substrate specificity of AMT/MEP/Rh proteins. Channels **8**, 496–502.

Neuhäuser B, Ludewig U. 2014. uncoupling of ionic currents from substrate transport in the plant ammonium transporter AtAMT1;2. Journal of Biological Chemistry **289**, 11650–11655.

Neupane P, Bhuju S, Thapa N, Bhattarai HK. 2019. ATP synthase: structure, function and inhibition. Biomolecular concepts **10**, 1–10.

Nguyen CT. 2012. Identification et caractérisation d'un canal chlorure, AtCLCg, impliqué dans la réponse au stress salin chez *Arabidopsis thaliana*.

Nieves-Cordones M, Martínez V, Benito B, Rubio F. 2016. Comparison between *Arabidopsis* and rice for main pathways of K^+ and Na^+ uptake by roots. Frontiers in Plant Science **7**.

Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. The Plant Journal **33**, 633–650.

Nishida S, Tsuzuki C, Kato A, Aisu A, Yoshida J, Mizuno T. 2011. AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology **52**, 1433–1442.

Olsen LI, Palmgren MG. 2014. Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed. Frontiers in plant science **5**, 30.

Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2004. Disruption of the nitrate transporter genes AtNRT2.1 and AtNRT2.2 restricts growth at low external nitrate concentration. Planta **219**.

Ortiz-Ramirez C, Mora SI, Trejo J, Pantoja O. 2011. PvAMT1;1, a Highly Selective Ammonium Transporter That Functions as H^+/NH_4^+ Symporter. Journal of Biological Chemistry **286**, 31113–31122.

Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TAG, Rentsch D, Robinson N, Christie M, Webb RI, Gamage HK, Carroll BJ, Schenk PM, Schmidt S. 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. Proceedings of the National Academy of Sciences **105**, 4524–4529.

Pellizzaro A. 2017. Caractérisation du transporteur de nitrate à double affinité, MtNPF6. 8 (MtNRT1. 3), de *Medicago truncatula*: rôles dans le transport et la perception du signal nitrate.

Pennanen A, Xue T, Hartikainen H. 2002. Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. Journal of applied botany (1995) **76**, 66–76.

Pilorgé É, Evrard J, Flenet F, Pinochet X, Reau R. 2006. Colza et apports azotés: enjeux d'une compétitivité durable et voies de recherche. Oléagineux, Corps gras, Lipides **13**, 378–383.

Pilot G, Gaymard F, Mouline K, Chérel I, Sentenac H. 2003. Regulated expression of *Arabidopsis* Shaker K^+ channel genes involved in K^+ uptake and distribution in the plant **51**, 773–787.

Poisson E, Trouverie J, Brunel-Muguet S, Akmouche Y, Pontet C, Pinochet X, Avice J-C. 2019. Seed yield components and seed quality of oilseed rape are impacted by sulfur fertilization and its interactions with nitrogen fertilization. Frontiers in Plant Science **10**.

Puschenreiter M, Gruber B, Wenzel WW, Schindlegger Y, Hann S, Spangl B, Schenkeveld WDC, Kraemer SM, Oburger E. 2017. Phytosiderophore-induced mobilization and uptake of Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn by wheat plants grown on metal-enriched soils. Environmental and Experimental Botany **138**, 67–76.

Qi Du, Zhao X, Le XIA, Jiang C, Wang X, Yi Han, Jing W, Yu H. 2019. Effects of potassium deficiency on photosynthesis, chloroplast ultrastructure, ROS, and antioxidant activities in maize (*Zea mays* L.). Journal of integrative agriculture **18**, 395–406.

Raddatz N, Morales de los Ríos L, Lindahl M, Quintero FJ, Pardo JM. 2020. Coordinated Transport of Nitrate, Potassium, and Sodium. Frontiers in Plant Science **11**.

Rady MM, Belal HE, Gadallah FM, Semida WM. 2020. Selenium application in two methods promotes drought tolerance in Solanum lycopersicum plant by inducing the antioxidant defense system. Scientia Horticulturae **266**, 109290.

Rafi MM, Epstein E. 1999. Silicon absorption by wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant and Soil **211**, 223–230.

Rana MS, Bhantana P, Sun XC, Imran M, Shaaban M, Moussa MG, Saleem MH, Elyamine AM, Binyamin R, Alam M, Afzal J, Khan I, Din IU, Ahmad I, Younas M, Kamran M, Hu CX. 2020. Molybdenum as an essential element for crops: an overview. Biomed J Sci & Tech Res **24**.

Ricachenevsky FK, Menguer PK, Sperotto RA, Williams LE, Fett JP. 2013. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. Frontiers in plant science **4**, 144.

Riedelsberger J, Miller JK, Valdebenito-Maturana B, Piñeros MA, González W, Dreyer I. 2021. Plant HKT channels: an updated view on structure, function and gene regulation. International Journal of Molecular Sciences **22**, 1892.

Roch VG, Maharajan T, Ceasar SA, Ignacimuthu S. 2019. The Role of PHT1 Family transporters in the acquisition and redistribution of phosphorus in plants. Critical Reviews in Plant Sciences **38**, 171–198.

Roelfsema MRG, Hedrich R. 2005. In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. New Phytologist **167**, 665–691.

Rouached H, Wirtz M, Alary R, Hell R, Arpat AB, Davidian J-C, Fourcroy P, Berthomieu P. 2008. Differential regulation of the expression of two high-affinity sulfate transporters, SULTR1.1 and SULTR1.2, in *Arabidopsis*. Plant Physiology **147**, 897–911.

Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee B, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu J-K, Bressan RA, Hasegawa PM. 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na+ entry into plant roots. Proceedings of the national academy of sciences **98**, 14150–14155.

Salt DE, Baxter I, Lahner B. 2008. Ionomics and the study of the plant ionome. Annu. Rev. Plant Biol. **59**, 709–733.

Salt DE. 2004. Update on plant ionomics. Plant Physiology **136**, 2451–2456.

Sanz A, Pike S, Khan MA, Carrió-Seguí À, Mendoza-Cózatl DG, Peñarrubia L, Gassmann W. 2019. Copper uptake mechanism of Arabidopsis thaliana high-affinity COPT transporters. Protoplasma **256**, 161–170.

Sarda X, Diquelou S, Abdallah M, Nesi N, Cantat O, Le Gouée P, Avice J-C, Ourry A. 2014. Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. The Journal of Agricultural Science **152**, 616–633.

Sarwar N, Malhi SS, Zia MH, Naeem A, Bibi S, Farid G. 2010. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. Journal of the Science of Food and Agriculture **90**, 925–937.

Scherzer S, Krol E, Kreuzer I, Kruse J, Kruse J, Karl F, von Ruden M, Escalante-Perez M, Muller T, Rennenberg H, Al-Rasheid KAS, Neher E, Hedrich R. 2013. The Dionaea muscipula Ammonium Channel DmAMT1 Provides NH_4^+ Uptake Associated with Venus Flytrap's Prey Digestion. Current Biology **23**, 1649–1657.

Schiavon M, Pilon-Smits EA. 2017. Selenium biofortification and phytoremediation phytotechnologies: a review. Journal of environmental quality **46**, 10–19.

Schjoerring JK, Cakmak I, White PJ. 2019. Plant nutrition and soil fertility: synergies for acquiring global green growth and sustainable development. Plant and Soil **434**, 1–6.

Shankar A, Srivastava AK, Yadav AK, Sharma M, Pandey A, Raut VV, Das MK, Suprasanna P, Pandey GK. 2014. Whole genome transcriptome analysis of rice seedling reveals alterations in Ca^{2+} ion signaling and homeostasis in response to Ca^{2+} deficiency. Cell Calcium **55**, 155–165.

Shanmugam V, Lo J-C, Yeh K-C. 2013. Control of Zn uptake in Arabidopsis halleri: a balance between Zn and Fe. Frontiers in Plant Science **4**.

Sharma D, Jamra G, Singh UM, Sood S, Kumar A. 2017. Calcium biofortification: three pronged molecular approaches for dissecting complex trait of calcium nutrition in finger millet (*Eleusine coracana*) for devising strategies of enrichment of food crops. Frontiers in Plant Science **7**.

Shibata M, Sugimoto K. 2019. A gene regulatory network for root hair development. Journal of plant research **132**, 301–309.

Shigaki T, Hirschi K. 2000. Characterization of CAX-like genes in plants: implications for functional diversity. Gene **257**, 291–298.

Shin H, Shin H-S, Dewbre GR, Harrison MJ. 2004. Phosphate transport in *Arabidopsis* : Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. The Plant Journal **39**, 629–642.

Shinmachi F, Buchner P, Stroud JL, Parmar S, Zhao F-J, McGrath SP, Hawkesford MJ. 2010. Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. Plant Physiology **153**, 327–336.

Shireen F, Nawaz M, Chen C, Zhang Q, Zheng Z, Sohail H, Sun J, Cao H, Huang Y, Bie Z. 2018. Boron: functions and approaches to enhance its availability in plants for sustainable agriculture. International Journal of Molecular Sciences **19**, 1856.

Sinaj S, Charles R, Baux A, Dupuis B, Hiltbrunner J, Levy L, Pellet D, Blanchet G, Jeangros B. 2017. Fertilisation de grandes cultures. Recherche Agronomique Suisse 8 (6): publication spéciale | 2017.

Singh AK, Singh AK, Singh JP. 2020. Boron in crop production from soil to plant system: A review. Archives of Agriculture and Environmental Science **5**, 218–222.

Smith FW, Mudge SR, Rae AL, Glassop D. 2003. Phosphate transport in plants. Plant and Soil **248**, 71–83.

Song X-P, Verma KK, Tian D-D, Zhang X-Q, Liang Y-J, Huang X, Li C-N, Li Y-R. 2021*a*. Exploration of silicon functions to integrate with biotic stress tolerance and crop improvement. Biological Research **54**.

Sorin E, Etienne P, Maillard A, Zamarreño A-M, Garcia-Mina J-M, Arkoun M, Jamois F, Cruz F, Yvin J-C, Ourry A. 2015. Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. Journal of experimental botany **66**, 6175–6189.

Spasibionek S. 2006. New mutants of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) with changed fatty acid composition. Plant breeding. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2006.01213.x

Stefansson BR, Hougen FW, Downey RK. 1961. Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid. Canadian Journal of Plant Science. **41**(1): 218-219. https://doi.org/10.4141/cjps61-028

Stein AJ. 2010. Global impacts of human mineral malnutrition. Plant Soil **335**:133–154.

Sultana M, Jahiruddin M, Islam MR, Rahman MM, Abedin MA, Al Mahmud A. 2021. Nitrogen, phosphorus and sulphur mineralization in soil treated with amended municipal solid waste compost under aerobic and anaerobic conditions. International journal of recycling organic waste in agriculture **10**, 245–256.

Sustr M, Soukup A, Tylova E. 2019. Potassium in Root Growth and Development. Plants **8**, 435.

Svennerstam H, Ganeteg U, Näsholm T. 2008. Root uptake of cationic amino acids by Arabidopsis depends on functional expression of amino acid permease 5. New Phytologist **180**, 620–630.

Takahashi H. 2010. Regulation of sulfate transport and assimilation in plants. International Review of Cell and Molecular Biology. Vol 281, Chap 4, pp 129-159.

Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T. 2002. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. Nature **420**, 337–340.

Takehisa H, Sato Y, Antonio B, Nagamura Y. 2015. Coexpression network analysis of macronutrient deficiency response genes in rice. Rice **8**, 1–7.

Tang R-J, Luan S. 2017. Regulation of calcium and magnesium homeostasis in plants: from transporters to signaling network. Current Opinion in Plant Biology **39**, 97–105.

Tegeder M, Masclaux-Daubresse C. 2018. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. New Phytologist **217**, 35–53.

Tewari RK, Kumar P, Sharma PN. 2007. Oxidative stress and antioxidant responses in young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. Journal of Integrative Plant Biology **49**, 313–322.

Thiyam-Holländer U, Eskin NAM, Matthaus B. 2012. Canola and rapeseed production, processing, food quality, and nutrition. CRC Press, Taylor & Francis edition. Printed in USA.

Thor K. 2019. Calcium—Nutrient and Messenger. Frontiers in plant science **10**, 440.

Tian C, Zhou X, Liu Q, Peng J, Zhang Z, Song H, Ding Z, Zhran MA, Eissa MA, Kheir AM. 2020. Increasing yield, quality and profitability of winter oilseed rape (Brassica napus) under combinations of nutrient levels in fertiliser and planting density. Crop and Pasture Science **71**, 1010–1019.

Tian X-Y, He D-D, Bai S, Zeng W-Z, Wang Z, Wang M, Wu L-Q, Chen Z-C. 2021. Physiological and molecular advances in magnesium nutrition of plants. Plant and Soil **468**, 1–17.

Tong J, Walk TC, Han P, *et al.* 2020. Genome-wide identification and analysis of high-affinity nitrate transporter 2 (NRT2) family genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) and their responses to various stresses. BMC Plant Biology **20**.

Tränkner M, Jákli B, Tavakol E, Geilfus C-M, Cakmak I, Dittert K, Senbayram M. 2016. Magnesium deficiency decreases biomass water-use efficiency and increases leaf water-use efficiency and oxidative stress in barley plants. Plant and Soil **406**, 409–423.

Tränkner M, Tavakol E, Jákli B. 2018. Functioning of potassium and magnesium in photosynthesis, photosynthate translocation and photoprotection. Physiologia plantarum **163**, 414–431.

Tripathi DK, Singh S, Gaur S, *et al.* 2018. Acquisition and homeostasis of iron in higher plants and their probable role in abiotic stress tolerance. Frontiers in Environmental Science **5**.

Tripathi MK, Mishra AS. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. Animal Feed Science and Technology **132**, 1–27

Tsay Y-F, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM. 1993. The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell **72**, 705–713.

Valantin-Morison M, Meynard JM. 2008. Diagnosis of limiting factors of organic oilseed rape yield. A survey of farmers' fields. Agronomy for Sustainable Development **28**, 527–539.

van Maarschalkerweerd M, Husted S. 2015. Recent developments in fast spectroscopy for plant mineral analysis. Frontiers in plant science **6**, 169.

Vatansever R, Ozyigit II, Filiz E, Gozukara N. 2017. Genome-wide exploration of silicon (Si) transporter genes, Lsi1 and Lsi2 in plants; insights into Si-accumulation status/capacity of plants. BioMetals **30**, 185–200.

Velasco L, Becker HC. 1998. Estimating the fatty acid composition of the oil in intact-seed rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. Euphytica **101**: 221–230.

Venkataraman BV, Sudha S. 2005. Vanadium toxicity. Asian J Exp Sci **19**, 127–134.

Verbruggen N, Hermans C. 2013. Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants. Plant and soil **368**, 87–99.

Vigani G, Di Silvestre D, Agresta AM, Donnini S, Mauri P, Gehl C, Bittner F, Murgia I. 2017. Molybdenum and iron mutually impact their homeostasis in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. New Phytologist **213**, 1222–1241.

Vishwakarma K, Kumar N, Shandilya C, Mohapatra S, Bhayana S, Varma A. 2020. Revisiting plant–microbe interactions and microbial consortia application for enhancing sustainable agriculture: A review. Frontiers in Microbiology **11**, 3195.

Wairich A, de Oliveira BHN, Arend EB, Duarte GL, Ponte LR, Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Fett JP. 2019. The combined strategy for iron uptake is not exclusive to domesticated rice (*Oryza sativa*). Scientific Reports **9**.

Wakeel A, Farooq M, Bashir K, Ozturk L. 2018. Micronutrient malnutrition and biofortification: recent advances and future perspectives. Plant Micronutrient Use Efficiency. Elsevier, 225–243.

Wan S, Wang S, Li Y, Gao B. 2017. Functionalizing biochar with Mg–Al and Mg–Fe layered double hydroxides for removal of phosphate from aqueous solutions. Journal of Industrial and Engineering Chemistry **47**, 246–253.

Wang M, Gong J, Bhullar NK. 2020. Iron deficiency triggered transcriptome changes in bread wheat. Computational and Structural Biotechnology Journal **18**, 2709–2722.

Wang Y, Li B, Du M, Eneji AE, Wang B, Duan L, Li Z, Tian X. 2012. Mechanism of phytohormone involvement in feedback regulation of cotton leaf senescence induced by potassium deficiency. Journal of experimental botany **63**, 5887–5901.

Wang Y, Wu W-H. 2013. Potassium transport and signaling in higher plants. Annual review of plant biology **64**, 451–476.

Wang Y, Wu W-H. 2017. Regulation of potassium transport and signaling in plants. Current Opinion in Plant Biology **39**, 123–128.

Waters BM, Armbrust LC. 2013. Optimal copper supply is required for normal plant iron deficiency responses. Plant Signaling & Behavior **8**, e26611.

Weng X-Y, Zheng C-J, Xu H-X, Sun J-Y. 2007. Characteristics of photosynthesis and functions of the water–water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. Physiologia Plantarum **131**, 614–621.

White PJ, Broadley MR. 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. New Phytologist **182**, 49–84.

White PJ. 2001. The pathways of calcium movement to the xylem. Journal of Experimental Botany **52**, 891–899.

White PJ. 2016. Selenium accumulation by plants. Annals of botany **117**, 217–235.

Whitt L, Ricachenevsky FK, Ziegler GZ, Clemens S, Walker E, Maathuis FJM, Kear P, Baxter I. 2020. A curated list of genes that affect the plant ionome. Plant Direct **4**.

Williams L, Salt DE. 2009. The plant ionome coming into focus. Current Opinion in Plant Biology **12**, 247–249.

Withers P, Doody D, Sylvester-Bradley R. 2018. Achieving sustainable phosphorus use in food systems through circularisation. Sustainability **10**, 1804.

Witte C-P. 2011. Urea metabolism in plants. Plant Science **180**, 431–438.

Wu D, Shen Q, Cai S, Chen Z-H, Dai F, Zhang G. 2013. Ionomic responses and correlations between elements and metabolites under salt stress in wild and cultivated barley. Plant and Cell Physiology **54**, 1976–1988.

Wu H, Li Z. 2019. the importance of Cl^- exclusion and vacuolar Cl^- sequestration: Revisiting the Role of Cl− Transport in Plant Salt Tolerance. Frontiers in Plant Science **10**.

Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, Wu Y, Liu F, Deng XW. 2003. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. Plant physiology **132**, 1260–1271.

Wu X, Yu Y, Baerson SR, Song Y, Liang G, Ding C, Niu J, Pan Z, Zeng R. 2017. Interactions between nitrogen and silicon in rice and their effects on resistance toward the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. Frontiers in Plant Science **8**.

Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y. 2019. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. BioMed Research International **2019**, 1–11.

Xu Z, Jiang Y, Zhou G. 2015. Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO_2 with environmental stress in plants. Frontiers in Plant Science **6**.

Yamaji N, Chiba Y, Mitani-Ueno N, Feng Ma J. 2012. Functional characterization of a silicon transporter gene implicated in silicon distribution in barley. Plant Physiology **160**, 1491–1497.

Yang L-T, Zhou Y-F, Wang Y-Y, Wu Y-M, Ye X, Guo J-X, Chen L-S. 2019. Magnesium deficiency induced global transcriptome change in *Citrus sinensis* leaves revealed by RNA-Seq. International journal of molecular sciences **20**, 3129.

Yang M, Shi L, Xu FS & Wang HY. 2009. Effect of Boron on Dynamic Change of Seed Yield and Quality Formation in Developing Seed of *Brassica napus*, Journal of Plant Nutrition, **32**:5, 785-797.

Yang S-Y, Huang T-K, Kuo H-F, Chiou T-J. 2017. Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. Journal of Experimental Botany, erw481.

Yang S, Hao D, Cong Y, Jin M, Su Y. 2015. The rice OsAMT1;1 is a proton-independent feedback regulated ammonium transporter. Plant Cell Reports **34**, 321–330.

Yavaş İ, Ünay A. 2017. The role of silicon under biotic and abiotic stress conditions. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi **4**.

Ye, Chen, Deng, Yang, Lai, Guo, Chen. 2019. Magnesium-deficiency effects on pigments, photosynthesis and photosynthetic electron transport of leaves, and nutrients of leaf blades and veins in *Citrus sinensis* seedlings. Plants **8**, 389.

Yruela I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. Functional Plant Biology **36**, 409.

Yuan L, Loqué D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H, von Wirén N. 2007. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-Type transporters. The Plant Cell **19**, 2636–2652.

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Vol.14 No.6 pp.415-421.

Zanin L, Tomasi N, Wirdnam C, Meier S, Komarova NY, Mimmo T, Cesco S, Rentsch D, Pinton R. 2014. Isolation and functional characterization of a high affinity urea transporter from roots of *Zea mays*. BMC Plant Biology **14**, 222.

Zhao Y, Liu Z, Duan F, An X, Liu X, Hao D, Gu R, Wang Z, Chen F, Yuan L. 2018. Overexpression of the maize *ZmAMT1;1a* gene enhances root ammonium uptake efficiency under low ammonium nutrition. Plant Biotechnology Reports, 10.1007/s11816-018-0471-1

Zhang Y, Zhao Y, Sun L, Han P, Bai X, Lin R, Xiao K. 2021. The N uptake-associated physiological processes at late growth stage in wheat (*Triticum aestivum*) under N deprivation combined with deficit irrigation condition. Plant Physiology and Biochemistry **164**, 160–172.

Zhu Z, Li D, Wang P, Li J, Lu X. 2020. Transcriptome and ionome analysis of nitrogen, phosphorus and potassium interactions in sorghum seedlings. Theoretical and Experimental Plant Physiology **32**, 271–285.

Zuber H, Davidian JC, Wirtz M, Hell R, Belghazi M, Thompson M, Gallardo K. 2010. Sultr4;1 mutant seeds of Arabidopsis have an enhanced sulphate content and modified proteome suggesting metabolic adaptations to altered sulphate compartmentalization. BMC Plant Biology, **10** :78.

Sites internet consultés :

Arvalis. Le tourteau de colza : sûr, économique et facile à utiliser. https://www.arvalis-infos.fr/le-tourteau-de-colza-s-r-economique-et-facile-a-utiliser-@/view-25476-arvarticle.html

Arvalis. https://www.arvalis-infos.fr/les-besoins-unitaires-en-azote-des-varietes-reactualises-pour-2020-@/view-14925-arvarticle.html

Arvalis. https://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/index.html

Arvalis. Les fiches variété. BAGOU. Blé tendre d'hivers. http://www.fiches.arvalis-infos.fr/fiche_variete/fiches_varietes.php?mode=fv&id_espece=512&id_variete=4275

Caussade-Semences. https://www.caussade-semences.com

Chambres d'Agricultures de Bourgogne. 2012. Cultures Intermédiaires. https://agriculture-de-conservation.com/sites/agriculture-de-conservation.com/IMG/pdf/cipan-bourgogne.pdf

Chambres d'Agricultures du Gers. 2009. Céréales d'hiver : Jusqu'à quand semer ? Quelle variété et quelle espèce ? https://gers.chambre-agriculture.fr/fileadmin/user_upload/Occitanie/067_Inst-Gers/documents/volontepaysannegers/articlesvp2009-2017/Cultures/Grandes_cultures/Annee_2009/Céréales_d_hiver_VP_1158.pdf

COMIFER. https://comifer.asso.fr/images/pdf/brochure_azote_maj_mars%202012.pdf

COMIFER. https://comifer.asso.fr/images/publications/livres/tablesexportgrillescomifer2009.pdf

EFSA. L'acide érucique, un risque sanitaire possible pour les enfants fortement exposés. Autorité européenne de sécurité des aliments. https://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/161109

Eurostat. https://ec.europa.eu/eurostat/data/database

FAO. 2016. https://www.fao.org/3/i6030f/i6030f.pdf

FAO. 2019. OCDE, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. 2019. *Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2019-2028*. OECD.

Florilège. L'origine du colza | Florilege. http://florilege.arcad-project.org/fr/dossiers/colza

Fopoleopro. http://www.fopoleopro.com

FranceAgriMer. 2013. Les études de FranceAgriMer. Prospective filière française semences de blé tendre. Tome 1. https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/28476/document/nov%202013-Complet%20Filière%20française%20semences%20_Tome%201B2.pdf?version=6

FranceAgriMer. 2020. .https://visionet.franceagrimer.fr/Pages/OpenDocument.aspx?fileurl=Statistiques%2fproductions%20v%c3%a9g%c3%a9tales%2fgrandes%20cultures%2fsurfaces%2cproductions%2crendements%2fSTA-GRC-surface_prod_rend_reg-A20.xlsx&telechargersanscomptage=oui

Institute of Applied Ecology. https://appliedeco.org

It's Elemental. https://education.jlab.org/itselemental/index.html

Météo France. https://meteofrance.com/changement-climatique/observer/changement-climatique-et-secheresses

Ministère de la transition écologique. Biocarburants. Ministère de la Transition écologique. https://www.ecologie.gouv.fr/biocarburants

Perspectives Agricoles. https://www.perspectives-agricoles.com/voir-tous-les-anciens-numeros-@/view-1330-category.html

Programme Nitrate. progamme-nitrate.gouv

Techno-Science. Colza - Histoire. Techno-Science.net.

Tela-Botanica.https://www.tela-botanica.org/eflore/?referentiel=bdtfx&module=fiche&action=fiche&num_nom=10308&onglet=synthese

Terre net. https://www.terre-net.fr/marche-agricole/actualite-marche-agricole/article/la-production-europeenne-serait-en-hausse-cette-annee-en-bles-et-en-colza-1395-180979.html

Terres Inovia. https://www.terresinovia.fr/-/le-rapport-d-activite-2020-de-terres-inovia-est-disponible

Terres Inovia. https://www.terresinovia.fr/-/les-atouts-du-colza

Terres Univia. Colza - Les espèces cultivées - Cultures & utilisation - Terres Univia.

Unifa. https://fertilisation-edu.fr/14-cultures-fiches-pratiques.html

Vivescia. 2021. https://www.vivescia.com/grand-format/le-grain-des-semis-au-temps-des-moissons/le-grain-au-fil-des-saisons/le-temps-du-ble

Thèse de l'Université de Caen Normandie au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Spécialité : Sciences agronomiques, Biotechnologies agro-alimentaires). UMR INRAE-UCN 950 EVA (Écophysiologie Végétale Agronomie et nutritions N, C, S).

Titre : Caractérisation et explicitation des modifications des signatures ionomiques des végétaux induites par différentes contraintes minérales.

Résumé : La composition du ionome (*i.e.* macro, micro et éléments bénéfiques) des tissus végétaux résultant de multiples interactions entre éléments mais plus globalement avec l'environnement, est à même de révéler l'état physiologique des plantes. Cette étude vise à mettre en évidence les modifications ionomiques, les interactions potentielles entre éléments et les signatures ionomiques résultant de différentes carences minérales chez *Brassica napus* (une dicotylédone) et *Triticum aestivum* (une monocotylédone). Ainsi, les plantes ont été soumises à 18 carences nutritionnelles individuelles (N, Mg, P, S, K, Ca, B, Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo, Na, Si, Co et Se) et récoltées avant la réduction de leur croissance. Les principaux objectifs étaient i) d'analyser les signatures ionomiques des tissus végétaux et de comparer la réponse des deux espèces aux différentes carences minérales, ii) d'identifier certaines voies métaboliques sous-jacentes et enfin iii) de caractériser chez *Brassica napus*, les réponses moléculaires (transcriptomiques et métabolomiques) à chaque carence en macroéléments en se focalisant au niveau des racines, le premier organe exposé à l'absence de disponibilité en macroéléments.
Chez ces deux espèces, les principaux résultats ont révélé des interactions élémentaires dont certaines sont décrites dans la littérature, telles qu'une forte augmentation de l'absorption du Mo et du Se lors d'une carence en S, une absorption accrue de Na lors d'une privation en K ou des cations divalents en cas de carence en Fe. Ces modifications ionomiques pourraient être la conséquence de la surexpression de transporteurs racinaires non spécifiques, augmentant ainsi l'absorption d'autres éléments disponibles dans les solutions nutritives. Notre étude a également montré d'autres interactions plus originales et notamment l'augmentation de l'absorption du vanadium chez les plantes soumises à une carence en S, résultant probablement d'une surexpression des transporteurs racinaires de sulfate, confirmée notamment par l'analyse ionomique de lignées d'*Arabidopsis* knock-out *sultr1;1* et *sultr1;2*. Une autre interaction originale, mais négative, entre N et Na a été démontrée suggérant que le transport de Na pourrait être fonctionnellement lié à l'absorption de N. Cette hypothèse a été soutenue par l'analyse ionomique des lignées d'*Arabidopsis* knock-out pour les gènes codant les transporteurs de nitrate (*nrt1.1* et *nrt2.1*). Ces interactions entre éléments ont conduit à l'identification des signatures ionomiques potentiellement spécifiques de chaque carence, qui ont été comparées entre les deux espèces végétales considérées. Enfin, dans les racines de colzas carencés en macroéléments, des processus moléculaires spécifiques et communs ont été identifiés en utilisant des approches transcriptomiques et métabolomiques. Ces approches ont également permis d'établir des listes de gènes différentiellement exprimés et des profils métabolomiques spécifiques de chaque privation en macroéléments, susceptibles d'être utilisés afin de diagnostiquer précocement chaque carence nutritionnelle.
Mots clefs : blé, carences nutritionnelles, colza, ionome, indicateurs moléculaires, interactions entre éléments, métabolomique, régulations du métabolisme des éléments, signatures ionomiques, sodium, transcriptomique, vanadium, voies métaboliques.

Title: Characterization of the ionomic signatures of plants submitted to nutritional deprivation.

Abstract: It has been suggested the composition of the ionome (*i.e.* macro, micro and beneficial elements) of plant tissues resulting from multiple interactions between nutrients and affected more globally by plant environment, can reveal the physiological status of plants. The aims of this study were to highlight the ionomic modification, potential interactions between elements and ionomic signatures resulting from different mineral deficiencies in *Brassica napus* (a dicot) and *Triticum aestivum* (a monocot). Thus, plants were subjected to 18 individual element deficiencies (N, Mg, P, S, K, Ca, B, Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo, Na, Si, Co, and Se) and harvested before growth reduction. The main objectives were i) to analyze the ionomic signatures of plant tissues and to compare the response of both species to different mineral deficiencies, ii) to identify some potential metabolic pathways, iii) to characterize in *Brassica napus*, the molecular responses (transcriptomic and metabolomics) to each macronutrient deficiency, focusing to the roots, the first tissue facing the macronutrient deficiencies.
In both species, the main results revealed numerous elemental interactions, some being already described in the literature, such as a strong increase of Mo and Se uptake under S deprivation, a strong increase of Na uptake under K deficiency or of divalent cations under Fe deprivation. These ionomic modifications could be the consequence of the up-regulation of non-specific root transporters, thus increasing the uptake of other elements available in nutrient solutions. Our study also identified original interactions, such as the increase of vanadium uptake in S-deficient plants, probably resulting from an overexpression of root sulfate transporters, confirmed in particular by the ionomic analysis of *Arabidopsis* knockout lines *Sultr1;1* and *Sultr1;2*. Another original, but negative interaction between N and Na has been shown and suggests that Na transport could be functionally linked to N uptake. This hypothesis was supported by ionomic analysis of *Arabidopsis* knockout lines for genes encoding nitrate transporters (*nrt1.1* and *nrt2.1*). These interactions between elements led to the identification of potentially specific ionomic signatures of each deficiency, that were then compared between *Brassica napus* and *Triticum aestivum*. Finally, in macronutrient-deficient rapeseed roots, specific and common molecular processes were identified using broad transcriptomic and metabolomic approaches. We were then able to identify a set of differentially expressed genes and metabolomic profiles that were specific to each macronutrient deficiency, which could be used for early diagnosis of each nutritional deficiency.
Key words : ionome, ionomic signatures, metabolic pathways, metabolomic, molecular indicators, nutrient deficiencies, nutrient interactions, oilseed rape, regulations of nutrient metabolism, sodium, transcriptomic, vanadium, wheat.