Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Plasticité du ionome du colza et du blé en réponse aux carences minérales ou à un stress hydrique : identification des interactions entre éléments, de signatures ionomiques et des mécanismes associés

Présentée et soutenue par
AURELIEN D'ORIA

Thèse soutenue le 07/04/2022 devant le jury composé de		
MME CÉLINE MASCLAUX-DAUBRESSE	Directeur de recherche, INRAE Versailles-Grignon	Rapporteur du jury
MME ANNE REPELIN	Professeur des universités, Université Paris-Est Créteil (UPEC)	Rapporteur du jury
M. SYLVAIN PLUCHON	Docteur, Centre Mondial de l'Innovation (CMI) - Saint-Mâlo	Membre du jury
M. ALAIN BOUCHEREAU	Professeur des universités, UNIVERSITE RENNES 1	Président du jury
M. ALAIN OURRY	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse
M. SYLVAIN DIQUELOU	Maître de conférences, Université de Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par ALAIN OURRY (Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen)) et SYLVAIN DIQUELOU (Université de Caen Normandie)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES – POPULATIONS – INTERACTIONS

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Plasticité du ionome du colza et du blé en réponse aux carences minérales ou à un stress hydrique : identification des interactions entre éléments, de signatures ionomiques et des mécanismes associés

Présentée et soutenue par
AURELIEN D'ORIA

Thèse soutenue le 07/04/2022 devant le jury composé de		
MME CELINE MASCLAUX-DAUBRESSE	Directeur de recherche, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) INRAE Versailles-Grignon	Rapporteur du jury
MME ANNE REPELLIN	Professeur des universités, Université Paris-Est Créteil (UPEC)	Rapporteur du jury
M. ALAIN BOUCHEREAU	Professeur des universités, Université de Rennes 1	Membre du jury
M. SYLVAIN PLUCHON	Directeur R&D, Centre Mondial de L'Innovation - Le Groupe Roullier (Saint-Malo)	Membre du jury
M. ALAIN OURRY	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
M. DIQUELOU SYLVAIN	Maître de conférences HDR, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse
Thèse dirigée par ALAIN OURRY et SYLVAIN DIQUELOU, Écophysiologie végétale, agronomie et nutrition N.C.S. (Caen)		

Remerciements

Le voici enfin arrivé, le moment de rédiger ces remerciements envers toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse de doctorat. Guidé par la volonté de bien faire, la rédaction fut longue, nombre de personnes citées ci-dessous pourraient en attester et il s'agissait très certainement là de l'épreuve la plus compliquée pour moi au cours de ces trois dernières années. Dans un sentiment teinté de nostalgie, c'est aujourd'hui la joie qui prédomine, celle d'être allé au bout du projet et de l'avoir fait à la hauteur des objectifs que je m'étais fixé, même si tout n'est pas parfait.

En premier lieu, je tiens à remercier mes encadrants Alain Ourry, Sylvain Diquélou et Sylvain Pluchon pour la confiance accordée il y a trois ans, sans qui tout cela n'aurait pas débuté pour moi. Je me souviens parfaitement du jour où j'ai appris que j'étais le candidat sélectionné, puis de celui de l'acceptation du dossier par l'ANRT (précisément à Reichsburg Cochem, pour ceux que cela intéresse). Un simple e-mail ou appel pour vous, mais un grand bonheur pour moi, tant je voyais le doctorat comme la possibilité de m'accomplir sur le plan professionnel.

Alain, merci. Merci, d'avoir assuré la direction de cette thèse avec allant, optimisme, ultra-disponibilité, implication de tous les instants, soutien et compréhension. Je ne sais pas si on peut rêver d'un dernier doctorant comme cela, en tout cas je n'aurais échangé de direction pour rien au monde. Derrière une énergie débordante et la volonté farouche de faire de la thèse un tremplin pour la suite, tu pousses à aller de l'avant dans tous les aspects et j'en ressors grandi. En échange d'une implication réciproque, tu fais partie des personnes qui sont également là pour les autres, franches, et qui donnent envie aux "plus jeunes" de rester dans ce milieu de la recherche.

Sylvain, merci pour ton regard et tes conseils qui se sont avérés extrêmement avisés. Merci pour tes interventions et ton soutien qui m'ont parfois permis de moins passer pour un extraterrestre lorsque j'évoquais des statistiques avancées et de l'analyse multivariée au cours de certaines réunions. Je te remercie également pour ton optimisme "calme" qui s'est avéré parfaitement complémentaire de celui plus bouillonnant d'Alain.

Sylvain, bien que plus éloigné, notamment en raison de cette crise sanitaire, merci d'avoir toujours opéré pour me permettre de travailler dans les meilleures conditions possibles au CMI et à Caen (comme dérouter un Li-6800 flambant neuf vers Caen alors qu'il était attendu à Saint-Malo). Merci d'avoir toujours eu un petit mot d'encouragement pendant ou après les réunions ainsi que lors de mes passages au CMI.

Merci à vous pour la gestion de cette thèse et de la période de crise sanitaire compliquée à traverser au cours de laquelle vous avez effectué toutes les adaptations possibles pour me permettre d'avancer convenablement.

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ces travaux et plus particulièrement Céline Masclaux-Daubresse et Anne Repellin d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse, ainsi qu'Alain Bouchereau d'en être examinateur.

Je souhaite également remercier l'école doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (NBISE 497), son directoire composé de François Dauphin, Michaël Aubert, Alain Rincé, Frank Le Foll et Magalie Lecourtois ainsi que l'ensemble des intervenants des formations proposées par l'école doctorale. Je tiens à remercier plus particulièrement Michaël Aubert, d'avoir pris part à mon comité de suivi individuel, ainsi que Catherine Giauffret, Nathalie Vaillant-Gaveau et Barbara Delaunay, pour leurs conseils et leur vision extérieure rafraichissante de la thèse.

Je remercie l'ensemble des financeurs du projet EAUPTIC, la banque publique d'investissement (BpiFrance), le Fond Unique interministériel (FUI), les conseils régionaux des régions Normandie, Bourgogne-Franche-Comté, Bretagne et Pays de la Loire ainsi que les acteurs du projet, les UMR EVA de Caen et AE de Dijon, la coopérative Dijon Céréales, la Start up Weenat et Agro Innovation International filiale du groupe Roullier.

Je voudrais plus particulièrement remercier l'UMR INRAE-Unicaen 950 Écophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N.C.S. (EVA) au sein de laquelle j'ai réalisé la majorité de mes travaux. Je souhaite donc remercier son nouveau directeur d'unité Philippe Laîné et son ancienne directrice Marie-Pascale Prud'homme. Merci pour votre accueil, vos attentions, toujours un mot pour savoir comment se passe la thèse ou pour plaisanter, mais également pour votre disponibilité lorsqu'il faut trouver des solutions. Le laboratoire EVA est un lieu où il fait bon travailler et évoluer, en grande partie grâce à vous.

Je tiens également à remercier les équipes du CMI et plus particulièrement Mustapha Arkoun pour sa prise en main du projet EAUPTIC et mon suivi dès lors. Merci d'avoir toujours gardé un œil et un intérêt particulier pour mes travaux, pour tes encouragements et de t'être démené autant pour mes déplacements, logements et pour un congrès finalement annulé. Je te remercie également pour ton soutien ces dernières semaines et la confiance renouvelée. J'aimerais également associer Anne Maillard à ces remerciements, pour ton accueil dans vos locaux où tu m'as pris sous ton aile afin de m'informer, m'intégrer aux équipes et m'aider lors de mon expérimentation.

Egalement un grand merci à Bastien Billiot, grand (!) manitou technologique, informatique, analytique et à peu près tout ce qui finit en "ique". Merci pour tous tes conseils et pour ces nombreux échanges relatifs au phénotypage et à l'analyse de données, toujours dans la bonne humeur et sans compter le temps qui défile au téléphone. Enfin je tiens également à remercier Amandine Nedellec et ses techniciens en serre au CMI pour leur aide lors de mon expérimentation.

Je voudrais également remercier la plateforme de transcriptomique (POPS) de l'Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay (IPS2) et notamment Etienne Delannoy, Ludivine Soubigou-Taconnat, Stéphanie Pateyron, Véronique Brunaud et Christine Paysant-Le Roux pour la prise en charge des analyses RNAseq de nos échantillons ainsi que les premières étapes de traitement des données.

Je remercie également la plateforme de recherche analytique du groupe Roullier et notamment Frank Jamois son directeur ainsi que Lun Jing pour la réalisation des analyses métabolomiques.

J'adresse un immense merci à l'équipe de PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) pour la réalisation des analyses élémentaires, cœur de ce travail de thèse. Merci à Fanny Leroy, Jéhane Lepoittevin, Josette Bonnefoy, Frédérine Marie et Quentin Dupas qui ont vu passer, au dernier relevé, 1944 échantillons qui pour l'immense majorité ont été analysés une première fois en ICP-MS, une seconde en IR-MS et une troisième en XRF. Je ne vous félicite pas, nous étions si proches de la barre symbolique des 2000, il doit bien rester quelques échantillons par-ci par-là... ! Merci pour votre disponibilité, votre bonne humeur constante malgré les "coups de bourre" et d'avoir toujours fait le maximum pour analyser les échantillons dans les plus brefs délais.

Je tiens également à associer à ces remerciements Josiane Pichon, Magali Bodereau, Benedicte De Loynes D'Estrees et Anne-Francoise Ameline, votre contribution technique à la bonne réalisation de ces travaux a été considérable pour les récoltes, broyages et réalisation des cultures. Merci à Antoine Grandin, ancien ingénieur d'études et néo-doctorant, qui fuyait le ray-grass en venant donner des coups de main lors des récoltes de colza et de blé ! Merci également à Olivier Rose que rien n'arrête, transit d'échantillons dans l'azote liquide entre Caen et Saint-Malo (en ratant la sortie pour se retrouver à Rennes), construction de portoirs, tamisage de sol, remise en fonctionnement du cooling d'une serre avec Sylvain et toujours avec le sourire. Je voudrais également remercier la pétillante Julie Levallois qui par un savant mélange de punch et de gentillesse a réussi à initier le moléculariste de pacotille que j'étais (est-ce mieux aujourd'hui ?) aux extractions ARN, PCR et qPCR en tout genre. Merci à Sophie (la grande) Vogel, l'aiguilleur du ciel administratif du labo EVA.

Je souhaite également remercier deux personnes que j'ai tout au long de cette thèse considérées comme des "encadrants supplémentaires" et qui m'ont également conseillé, aidé et guidé pendant ces trois années, qui sont Philippe Etienne et Jacques Trouverie.

Philippe, merci pour ton franc-parler et ton regard sur mes travaux. Tes remarques étaient nettes et acérées et contrairement à ce que tu penses peut-être, me plaisaient beaucoup en tant qu'éternel indécis. Merci d'avoir pris le temps, tout comme Jacques, de relire, suggérer des modifications pertinentes et corriger les articles. Un grand merci également pour cette faculté hors norme à mettre à l'aise en ayant toujours un bon mot !

Jacques, merci pour tout. Que dire de plus, à part que je ne saurais indiquer dans quel domaine tu ne m'as pas au moins une fois donné un coup de main (informatique, réseau, récoltes, PCR, RNAseq, gestion de la serre, mise en forme de figures, rédaction et j'en passe). Toujours prêt à aider dans les trois minutes qui suivent la requête et d'une gentillesse rare, j'en viendrais presque à envier celui qui sera ton premier doctorant lorsque cette HDR sera passée.

De façon un peu plus globale, je souhaite également remercier l'ensemble des enseignants chercheurs du labo, toujours disponibles et prêts à discuter lors de ce rituel de départ en direction du restaurant universitaire puis lors du repas, moment privilégié d'échanges qui a malheureusement disparu en raison de la crise sanitaire. J'aimerais d'ailleurs adresser des remerciements plus spécifiques à Sophie (la petite) Brunel-Muguet et Jean-Christophe Avice pour les échanges toujours extrêmement intéressants et avec qui j'aurais très certainement apprécié collaborer plus lors de la thèse. Evidemment j'adresse également mes remerciements à Jean-Bernard Cliquet, tellement sympathique et blagueur qui animait ces repas du midi et avec qui c'était un plaisir d'échanger, en féru de sport qu'il est. Au fond, sache que je ne souhaite que le meilleur au Stade Malherbe.

Je tiens à tout particulièrement remercier Aurélia Lornac, tu as été un réel catalyseur d'intégration dans la vie et le fonctionnent du labo EVA. Tu as su, dès mon arrivée, transmettre ton énergie à l'origine d'une belle dynamique en début de thèse. Ciment du trio, tu as également été une épaule dans les moments un peu plus compliqués et je t'en remercie. Je n'oublierais donc pas ces litres et ces litres de solution nutritives préparés et renouvelés. Puisque les records sont faits pour être battus et la recherche pour avancer, je ne sais pas pour toi, mais je souhaite bien du courage aux prochains ou prochaines qui devront faire plus que 18 carences en simultané !

Au passage, j'en profite donc également pour remercier Valentin Dubois, sympathique stagiaire de M1 au parcours de vie déjà bien rempli et qui pourtant, n'avait pas vu arriver le remplissage de bacs d'hydroponie par salves de 420 L et le phénotypage frénétique de feuilles de colza et de blé auquel il a dû prendre part.

Binôme de thèse sur la partie carences et hydroponie, je souhaite également remercier Galatéa Courbet pour son aide lors de ces expérimentations et sa contribution à de nombreux résultats présentés dans ce manuscrit. Cette trop grande promiscuité et ce fonctionnement en binôme en début de thèse auront probablement altéré la synergie et la complémentarité attendues, nous étions simplement trop différents, quoi qu'en disent les tests psychologiques de recrutement.

Je souhaite également remercier deux anciens doctorants tellement attachés à ce labo, qu'ils y sont revenus, Philippe D'Hooghe et Maxence James. Merci d'avoir partagé vos expériences post-doctorat et pour ces nombreux échanges me permettant d'ouvrir les yeux sur l'après-thèse. Philippe, au-delà de cette apostrophe qui m'a immédiatement indiqué que tu devais être un type bien, merci pour ces nombreux conseils et mots d'encouragement.

J'adresse également un remerciement particulier aux membres du bureau des doctorants, dans lequel il y avait, semble-t-il, moins de cohésion que les générations précédentes, mais malgré tout beaucoup de bonne humeur et de rires. Merci à Hanh Nguyen, le rayon de soleil Vietnamien éclipsé à Rouen. Nos sorties étaient toujours revigorantes pour le moral et je garderais toujours en tête cette envolée de lanternes au-dessus de la mer. Merci également à Victor Maignan qui possède un don certain, celui d'être ultra-professionnel, tout en étant capable de faire rire toute l'audience. Merci également à Mohamed Kante pour tous ses points sport et Charlotte Amy pour les conversations de tous les jours et celles relatives à l'immobilier. Courage pour la suite aux nouveaux arrivants, Lethicia Magno Massuia De Almeida et Jeremy Delamare.

Merci également aux petits jeunes Raphael Coquerel, Lucile Bourdet ou encore Lucie Chauvel qui ont apporté un coup de frais aux vieux doctorants que nous étions déjà devenus à vos yeux. Merci Raphael pour ces conversations dépaysantes sur la NBA, deux connaisseurs ensemble provoquant des conversations interminables pour les autres lors des repas du midi. Bon courage pour ton passage dans le paragraphe précédent.

Enfin, je souhaiterais laisser place à des remerciements plus personnels, à des personnes qui n'ont ni broyé, ni analysé des échantillons, mais dont le soutien a également grandement contribué à mon équilibre durant ces trois années.

D'abord, je souhaiterais remercier mon ancien collègue d'Estrées-Mons, devenu mon meilleur ami, Raphaël. Déjà parfaitement compatible en termes de valeurs et de centres d'intérêts, le fait d'avoir vécu, à distance, une expérience doctorale en simultané nous a indéniablement rapprochés. Tu étais très certainement la personne qui comprenait le mieux les hauts et les bas que l'on traverse lors de cette aventure et avec ta légère avance (forcément, la vitesse ça te connais, c'est ton dada) tu as su me comprendre, me conseiller et même me remobiliser. Honnêtement je ne sais pas combien d'heures nous avons passé à discuter de nos thèses respectives (j'ai l'impression d'en savoir plus sur le miscanthus que sur le colza) et d'agriculture. Merci simplement d'être là, et qui sait ce que te réserve l'avenir, le meilleur pour toi je l'espère.

Je souhaite remercier chaleureusement la famille Gatouillat, Didier, Pat(ricia), les brothers Adrien et Armand et leurs compagnes Célia et Chloé. Merci pour votre soutien de tous les jours depuis tout ce temps, ces moments de joie et de réconfort. Merci Didier pour tous les échanges, les conseils, les travaux entrepris ensemble avec une certaine réserve de rigueur, transformée en soutien total dès lors que la première vis est dans sa cheville. Merci Pat, de toujours prendre des nouvelles et "t'inquiéter" à chaque échéance importante, pour toutes ces attentions, en espérant peindre le meilleur pour tes enfants. Merci les deux frères, d'être là, de faire rire, d'aider et de se serrer les coudes dans les bons et les mauvais moments. Désolé, encore un déménagement en perspective. Non, je ne t'oublie pas Fabien, merci pour les découvertes, les bonnes adresses et les séjours "calmes". Je te remercie également pour ta relecture minutieuse de ce manuscrit, n'en déplaise au vieux français si l'accent circonflexe est une espèce en voie de disparition.

Je souhaite adresser du plus profond de mon cœur, mes remerciements envers toi, Maman. Des mots que je prononce trop peu par pudeur, je le sais. Enfant, on pense que tout nous est dû et ce n'est qu'en grandissant que l'on comprend les efforts et les sacrifices faits. Merci pour tout et pas seulement pour ces trois dernières années, pour ton soutien éternel et indéfectible. Cette "réussite" est également la tienne et je te suis infiniment reconnaissant d'avoir façonné la personne que je suis (le début, la suite c'est moi !).

Je souhaite t'adresser, Anne-Lise, mes derniers remerciements. Je mesure la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés depuis plus de treize ans maintenant. Ces trois dernières années de thèse pourraient apparaître bien peu dans cette aventure extraordinaire et pourtant elles ont parfois décuplé les émotions. Merci d'être là, de me soutenir dans tout, d'être à l'écoute et compréhensive. Combien de repas, combien de trajets entre Troyes et Caen ou de ballades à Ouistreham se sont transformés en monologues véhéments sur la ionomique, les carences, le stress hydrique, sur ce qui allait et surtout sur ce qui n'allait pas. Merci de m'avoir porté et supporté pendant ces trois années. Un chapitre se termine, un nouveau s'ouvre et je sais qu'il sera riche en émotions et en aventures.

À Annette, qui m'a transmis la passion du végétale.
J'espère que tu serais fière du chemin emprunté.

Signets actifs

Table des matières

Chapitre I - Introduction générale 1

Chapitre II - Synthèse bibliographique 6

I. La nutrition minérale 7

1. Importance de la nutrition minérale pour la santé humaine et l'alimentation 7

2. Les éléments minéraux chez la plante 12

3. Systèmes d'absorption des nutriments 14

a. Stratégie d'acquisition dans un environnement minéral fluctuant 14

b. L'absorption des anions monovalents 16

c. L’absorption des anions bivalents 20

d. L’absorption des cations monovalents 22

e. L’absorption des cations divalents 23

II. Le ionome 27

1. Quantification multiélémentaire et émergence de la notion de ionome 27

2. Le ionome : outil d'étude du statut nutritionnel 28

III. Modification du ionome et mécanismes potentiellement impliqués 31

1. Lors de carences minérales 31

a. Implication des transporteurs racinaires 31

b. Implication de plusieurs éléments dans un nœud ou réseau métabolique 35

c. Remobilisation des éléments et mécanismes associés 35

2. Lors de contraintes abiotiques telle qu'un manque d'eau 37

a. Gérer le manque d'eau, un enjeu majeur pour l'agriculture 37

b. Effets morphologiques et physiologiques du stress hydrique 37

c. Effets spécifiques du stress hydrique sur la nutrition minérale 43

IV. Objectifs de la thèse et stratégies expérimentales 47

Chapitre III - Spécificité et plasticité du ionome fonctionnel de *Brassica napus* et *Triticum aestivum* exposés à des carences nutritionnelles 49

a-*Article 1* 51

Introduction 51

Materials and methods 53

Plant Material and Growth Conditions 53

Growth Conditions of Oilseed Rape and Wheat 53

Growth of Arabidopsis Lines 54

Element Analysis by Mass Spectrometry and Calculations 54

Statistical Analysis 54

Results 54

Biomass Production During 10 Days of Macronutrient Deprivation 54

Species-Specific Ionome 56

Relative Root Nutrient Amounts Under Macronutrient Deprivation 56

Plant Mineral Nutrient Net Uptake and Relative Tissue Contents Under Deprivation 57

Discussion 60

Conclusion 63

References 63

b-*Article 2* 66

Introduction 67

Materials and methods 68

Plant Material and Growth Conditions 68

Elemental Content Analysis and Calculations 69

RNA Extraction, Reverse Transcription (RT), and Quantitative PCR (q-PCR) Analysis 69

Statistical Analysis 69

Results 71

Root and Shoot Biomass 71

Relative Root Nutrient Content Under Micronutrient and Beneficial Nutrient Deprivation 71

Relative Net Uptake of Mineral Nutrients and Their Concentration in Plant Tissues 71

Plasticity and Specificity of the Ionome Composition When Exposed to Mineral Nutrient Limitation 73

Discussion 77

The Ionome Discriminates Species, Tissues and Most Nutrient Deficiencies 77

Leaf Ionomic Signatures Are Determined by Specific Crosstalks, Some Known, Some Still Unknown 80
Conclusion 81
References 82

Chapitre IV - Le déficit hydrique altère spécifiquement et précocement la nutrition minérale de *Brassica napus* et de *Triticum aestivum* ainsi que l'expression de gènes foliaires impliqués dans le transport des éléments minéraux chez le colza. 84

Introduction 87
Materials and methods 90
Plant growth conditions and watering regimes 90
Plant sampling 91
Phenotyping 91
Elemental content analysis and calculations 92
Determination of phytohormone profiles 93
RNA extraction and RNA sequencing (RNA-seq) 94
Establishment of the transport-related and KIG list 94
Statistical Analysis 95
Univariate analysis 95
RNA-Seq data analysis 95
Results 96
Effects of water deficit on plant phenotype 96
Variation in relative net uptake of mineral nutrients induced by water deficit and their concentration in plant tissues 97
Expression of transport associated genes and KIGs in relation to ionomic changes under water deficit in Brassica napus leaves 98
Discussion 100
Drought significantly and precociously reduced mineral nutrient uptake leading to a specific ionomic composition of plants 100
Patterns of gene expression involved in the ionomic composition of rapeseed were increasingly modified by duration and intensity of drought 103
Reduced nutrient uptake and associated modifications of ionomic composition can be explained by changes of gene expression involved in transport 104
References 111

Chapitre V - Réponses transcriptomiques, métabolomiques et ionomiques des feuilles de *Brassica napus* soumises à un déficit hydrique 119

Introduction 121

Results 123

General Effect of Water Deficit on Growth 123

Overview of the Leaf Transcriptome and Metabolome of Brassica napus Exposed to Water Deficit 124

Chronology of Metabolic Events: The Case of ABA, JA, Glutathione, and Proline 127

Early Effects of Water Deficit on the Leaf Ionome 131

Discussion 132

Leaf Mineral Content Is Affected Early by Drought 133

At the Molecular Level, a Specific Down-Regulation of Genes Encoding Transporters Precedes the Modification of Leaf Ionomic Content 134

Global Transcriptomic Analysis Revealed that Downregulation of Mineral Nutrition Is Elicited before Phytohormone and Proline Metabolism or the Occurrence of Oxidative Stress 135

Materials and methods 136

Plant Material and Growth Conditions 136

RNA Extraction, Reverse Transcription, and Q-PCR Analyses 137

Transcriptomic Analysis by RNA-Sequencing (RNA-Seq) 137

RNA-Seq Bioinformatic Analysis 138

Untargeted Metabolic Profiling Using UPLC-MS/MS 138

Phytohormone Analysis 139

Proline Quantitative Analysis 140

Element Content Analysis by Mass Spectrometry and X-ray Fluorescence 140

Statistical Analysis 140

References 141

Chapitre VI - Discussion générale et perspectives 147

I. Principaux résultats et discussion générale 148

1. Etude du ionome lors de carences nutritionnelles : mise en évidence d'interactions connues ou nouvelles permettant un diagnostic précoce du statut nutritionnel de la plante 149

a. Quelques réflexions sur la méthodologie employée 149

b. Principaux résultats 153
2. Modification de la composition ionomique lors d'un stress hydrique 159
a. Quelques réflexions préalables sur la méthodologie employée 159
b. Modifications ionomiques induites par une contrainte hydrique 161
c. Modifications de l'expression des gènes impliqués dans le transport des éléments, induites par une contrainte hydrique 162
3. Confrontation des effets du stress hydrique sur la composition ionomique avec ceux observés lors de carences nutritionnelles 167
II. Perspectives de recherches et de développement 168
1. Perspectives à visée fondamentale 168
2. Perspectives à visée appliquée 169

Références bibliographiques 173

Annexes 203
Chapitre III 203
Article 1 204
Article 2 206
Chapitre IV 210
Chapitre V 216

Liste des figures

Note : Certains titres ont été résumés dans cette liste, les détails complets des légendes se trouvent dans le texte associé à chaque figure.

Chapitre II - Synthèse bibliographique

Figure II-1. Evolution entre 1950 et 1992 des teneurs en Fe et Zn des grains de cultivars de blé (*Triticum aestivum*) issus du CIMMYT.

Figure II-2. Evolution (a) du rendement en tonne ha^{-1}, (b) de l'indice de récolte, (c) des teneurs des grains en Zn, (d) Fe, (e) Cu et (f) Mg en mg kg^{-1} […]de la production de blé du programme Broadbalk de 1945 à 2008 à l'IACR de Rothamsted.

Figure II-3. Les éléments minéraux et leur affectation au sein des grandes fonctions de la cellule végétale.

Figure II-4. Modèle de régulation de l'absorption racinaire des éléments minéraux en fonction du statut nutritionnel de la plante.

Figure II-5. Localisations racinaire et aérienne des transporteurs de nitrate chez *Arabidopssis thaliana.*

Figure II-6. Régulation du transporteur de NO3- à double affinité NPF6.3 (NRT1.1).

Figure II-7. Principaux transporteurs de S (orange), Mo (bleu) et Se (jaune) identifiés ainsi que leurs localisations cellulaires supposées.

Figure II-8. Principaux transporteurs de microéléments et leur ligand éventuel dans une cellule d'épiderme racinaire (A) ou une cellule épidermique associée à une cellule du mésophylle d'une feuille (B).

Figure II-9. Stratégies d'acquisition du Fe chez les plantes.

Figure II-10. Les applications de la ionomique pour la santé humaine et l'agriculture.

Figure II-11. Interactions entre macroéléments, microéléments et éléments bénéfiques chez les plantes en réponse à une carence minérale individuelle

Figure II-12. Interactions élémentaires d'origine génétiques, physiologiques ou chimiques du Fe et du P.

Figure II-13. Représentation schématique de l'effet d'une carence minérale individuelle sur l'homéostasie de N, P, S, Zn et Fe via les réseaux de régulation des gènes chez les plantes.

Figure II-14. Interaction entre S, Fe, Cu, Zn et Mo au cours de la synthèse du cofacteur Mo.

Figure II-15. Synthèse des effets du stress hydrique chez les végétaux et réponses possibles.

Figure II-16. Stratégies de résistance à la sécheresse selon Levitt (1980).

Figure II-17. Synthèse des modifications morphologiques et physiologiques des cultures annuelles en réponses à la sécheresse.

Figure II-18. Régulation de la photosynthèse et mécanismes altérés conduisant à une réduction de la photosynthèse lors d'un stress hydrique.

Figure II-19. Interconnexion des réponses morphologiques, physiologiques, biochimique et moléculaire lors d'un stress hydrique.

Figure II-20. Schéma illustrant le rôle potentiel de certains cations majeurs dans la physiologie des cellules de garde.

Chapitre III-a - Spécificité et plasticité du ionome fonctionnel de *Brassica napus* et *Triticum aestivum* exposés à des carences nutritionnelles (article 1)

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.

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.

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.

Figure 4. Heatmap of relative mineral nutrient concentrations in *B. napus* plants after 10 days of macronutrient deprivation under hydroponic conditions.

Figure 5. Heatmap of relative mineral nutrient concentrations in *T. aestivum* plants after ten days of macronutrient deprivation under hydroponic conditions.

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.

Chapitre III-b - Spécificité et plasticité du ionome fonctionnel de *Brassica napus* et *Triticum aestivum* exposés à des carences nutritionnelles (article 2)

Figure 1. Flow diagram of the ionomic data analysis procedure using the PLS-DA model.

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

Figure 3. Relative root nutrient contents (RRNC) of *B. napus* and *T. aestivum* plants after 22 days of micronutrient or beneficial nutrient deprivation.

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

Figure 5. *BnaIRT1* gene expression relative to control plants in roots of *B. napus* subjected to micronutrient or beneficial nutrient deprivation for 22 days.

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.

Figure 7. 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.

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.

Chapitre IV - Le déficit hydrique altère spécifiquement et précocement la nutrition minérale de *Brassica napus* et de *Triticum aestivum* ainsi que l'expression de gènes foliaires impliqués dans le transport des éléments minéraux chez le colza

Figure 1. Schematic representation of the experimental design.

Figure 2. Heatmaps of relative net uptake (NU) from t0 by (A) *B. napus* and (B) *T. aestivum* plants exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2) compared to control plants maintained at ≥ 80 % of FC.

Figure 3. Heatmaps of relative nutrient concentration in (A) *B. napus* and (B) *T. aestivum* plants exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2) compared to control plants maintained at ≥ 80 % FC.

Figure 4. Principal component analysis (PCA) score plots of rapeseed YLBs. (A) elemental content raw data (ppm) and (B) RNAseq normalized counts of transport-associated genes.

Figure 5. UpSet plot of interactions between upregulated and downregulated differentially expressed transport-associated genes found in *B. napus* exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2), compared to respective control plants maintained at ≥ 80 % of FC.

Figure 6. (A) Downregulated and (B) upregulated expression patterns of transport-related genes and Known Ionomic Genes (KIGs) across WD treatments.

Figure 7. Expression pattern of transport- related genes and known ionomic genes simultaneously upregulated and downregulated across WD treatments.

Chapitre V - Réponses transcriptomiques, métabolomiques et ionomiques des feuilles de Brassica napus soumises à un déficit hydrique

Figure 1. Shoot (plain) and root (hatch) biomasses of *B. napus* exposed for 5 d (mild), 11 d (severe), and 20 d (severe and extended) of water deficits (WD).

Figure 2. Soil water content expressed as a percentage of field capacity (FC) during the experiment.

Figure 3. Exploratory data analysis of RNA-seq from *B. napus* leaves in response to a water deficit.

Figure 4. The most significantly enriched GO terms ("biological process") from DEGs in leaves of *B. napus* exposed to 5 d (mild) (A), 11 d (severe) (B), and 20 d (severe and extended) (C) of water deficit.

Figure 5. GO Enrichment analysis using g:Profiler then REVIGO for up and down DEGs overlapping between 5 d (mild), 11 d (severe), and 20 d (severe and extended) of WD compared to control plants.

Figure 6. Metabolomic Pathway Analysis from leaves of *B. napus* exposed to 5 d (mild) (A), 11 d (severe) (B), and 20 d (severe and extended) (C) of water deficit relative to control plants.

Figure 7. Summary schemes showing the main changes in leaves of *B. napus* induced by water deficit at the transcriptomic and metabolomics levels relative to control plants.

Figure 8. Log2-fold changes in DEGs and the proline content in leaves of *B. napus* exposed to water deficit for 5 d (mild), 11 d (severe), and 20 d (severe extended), relative to control plants.

Figure 9. Expression profiles of 114 genes encoding macronutrient (A) or micronutrient (B) transporters and changes in mineral nutrient contents in leaves of *B. napus* exposed to 5, 11, and 20 d of water deficit, relative to control plants.

Chapitre VI - Discussion générale et perspectives

Figure VI-1. Analyse en composantes principales (ACP) de la composition élémentaire d'échantillons de feuilles de colza issus d'expérimentations au champ et en conditions contrôlées en hydroponie (CC).

Figure VI-2. Bilan des interactions nutritionnelles communes chez le colza et le blé lors de l'absorption des éléments en cas de carence.

Figure IV-3. Analyse en composante principale (ACP) des teneurs élémentaires d'échantillons de feuilles de colza (A et C) et de blé (B et D) issus des expérimentations carences nutritionnelles et stress hydrique (WD) au sein du projet EAUPTIC.

Figure VI-4. Répartition chez le colza du nombre de gènes foliaires différentiellement exprimés lors d'un stress hydrique, codant des transporteurs associés à chaque élément du ionome.

Figure VI-5. Schéma bilan d'apparition des effets d'un stress hydrique modéré (5 jours), sévère (11 jours) et sévère prolongé (20 jours) à l'échelle du phénotype, du ionome, du métabolome et du transcriptome.

Figure VI-6. Heatmap comparative des variations des teneurs relatives en élément au sein des jeunes feuilles de colza lors d'une carence nutritionnelle ou d'un stress hydrique.

Figure IV-7. Comparaison de l'impact de carences nutritionnelles uniques et du stress hydrique sur la composition du ionome

Figure VI-8. Comparaison de l'impact de carences nutritionnelles uniques et du stress hydrique sur la composition du ionome.

Liste des tableaux

Note : Certains titres ont été résumés dans cette liste, les détails complets des légendes se trouvent dans le texte associé à chaque tableau.

Chapitre II - Synthèse bibliographique

Tableau II-1. Grandes fonctions des éléments minéraux chez l'Homme.

Tableau II-2. Cadre conceptuel des interventions possibles dans la lutte contre la malnutrition minérale selon leur vitesse de mise en œuvre.

Tableau II-3. Découvertes progressives de l'essentialité des éléments minéraux pour les végétaux aux cours des XIXe et XXe siècles.

Tableau II-4. Principales forme d'absorption des éléments minéraux essentiels

Chapitre III-a - Spécificité et plasticité du ionome fonctionnel de *Brassica napus* et *Triticum aestivum* exposés à des carences nutritionnelles (article 1)

Table 1. Mineral nutrient concentrations in parts per million (ppm), of *B. napus* and *T. aestivum* control plants at time D10 grown under hydroponic conditions.

Chapitre III-b - Spécificité et plasticité du ionome fonctionnel de *Brassica napus* et *Triticum aestivum* exposés à des carences nutritionnelles (article 2)

Table 1. Overall accuracy percentage of the PLS-DA model predictions.

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 (D10) of macronutrient deprivation (Courbet *et al*., 2021) or 22 days (D22) of micronutrient or beneficial element deprivation.

Chapitre IV - Le déficit hydrique altère spécifiquement et précocement la nutrition minérale de *Brassica napus* et de *Triticum aestivum* ainsi que l'expression de gènes foliaires impliqués dans le transport des éléments minéraux chez le colza

Table 1. Physiological, and morphological parameters of control plants and plants subjected to short-term (t1) or extended (t2) […] water deficit (WD) applied to *B. napus* and *T. aestivum* plants at 40% or 25% of field capacity (FC).

Chapitre VI - Discussion générale et perspectives

Tableau VI-1. Comparaison des teneurs élémentaires d'échantillons de feuilles de colza issues d'expérimentation en champ et en conditions contrôlées.

Liste des abréviations

A

A	assimilation nette de CO2
ABA	acide abscissique
ABC	ATP-binding Cassette
ACA	aminophospholipid ATPase
ADN	acide désoxyribonucléique
AII	Agro Innovation International
Al	aluminium
ARN	acides ribonucléique
As	arsenic
ASY	abnormal shoot in youth
ATM	ABC Transporters of the Mitochondria
ATP	adénosine triphosphate

B

B	bore
$B(OH)_3$	acide borique
BOR	boron transporter
BPI	Banque Publique d'Investissement

C

C	carbone
Ca	calcium
CAX	cations exchangers
CCC	Ca^{2+}-sensitive cross -complementer
CCX1	calcium exchanger
Cd	cadmium
CDF	cation diffusion facilitator
CER	classification error rate
CHL	nitrate transporter (ancienne nomenclature)
CHX	antiporteurs cation/H^+
CIFRE	Convention industrielle de formation par la recherche
CIMMYT	Internationnal Maize and Wheat Improvement Center
Cl	chlore
CLC	chloride Channel
CMI	Centre Mondial de l'Innovation
Co	cobalt
CO_2	dioxyde de carbone
COPT	copper transporter
CRN	Conseil régional de Normandie
Cu	cuivre
CV	cross validation

D

DACC	depolarization-activated cation channels
DEGs	differentially expressed genes
DW	dry weight

E

E	transpiration rate
EDDHA	ethylene diamine-*N*,*N*′-bis(2-hydroxyphenylacetic acid)
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid

F

FACE	free-air cocentration enrichment
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FC	field capacity
Fe	fer
FPKMs	fragments per kilobase million
FRO	ferric reduction oxidase
FUI	Fond Unique Interministériel

G

GEO	gene expression omnibus
GIEC	Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
GLM	generalized linear model
GO	gene ontology
GS	glutamine synthétase
g_s	stomatal conductance

H

H	hydrogène
HACC	hyperpolarization-activated cation channels
HAK	high affinity K^+ transporters
HATS	high-affinity transporter system

HCPC	hierarchical clustering on principal components
HKT	high-affinity K^+ transporters
HMA	heavy metal transporting P1B-type ATPases
HPS	high-pressure sodium lamps
HR-ICP-MS	high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry
HVPT	high-affinity P-transporter

I

I	iode
IAA	acide indolacétique
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
ICP-OES	inductively coupled plasma optical emission spectrometry
INRAE	Institut national de necherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
IPS2	Institut des Sciences des Plantes
IREG	iron-regulated protein
IRMS	isotope-ratio mass spectrometry
IRT	iron regulated protein

J

JA	jasmonic acid

K

K	potassium
KIG	known ionomic genes
KO	knock-out

L

LATS	low-affinity transporter system
LCT	low-affinity cation transporter

M

MA	mugineic acid
Mg	magnésium
MGT	magnesium transporter
Mn	manganèse
MNM	micronutrient malnutrition
Mo	molybdène
MoCo	cofacteur Mo
MOT	molybdenum transporter
MPT	molybdopterin
MRM	multiple reaction monitoring
MRP	multidrug resistance-associated proteins
MTP	metal tolerance protein

N

N	azote
Na	sodium
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
$NH4^+$	ammonium
NHX	sodium hydrogen exchanger
Ni	nickel
NIP	nod26-like intrinsic proteins
NiR	nitrite réductase
NIRS	near infrared spectroscopy
NPF	nitrate transporter (nouvelle nomenclature)
NR	nitrate réductase
NRAMP	natural resistant associated macrophage proteins
NRT	nitrate transporter (ancienne nomenclature)
NSC	non-selective cation channels
NU	net uptake

O

O	oxygène
OAD	outils d'aide à la décision
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OGM	organismes génétiquement modifiés
OLBs	feuilles matures déjà développées (old leaf blades)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONU	Organisation des Nations Unies
OPs	pétioles déjà développés (Old petioles)

P

P	phosphore
P5C	pyrroline-5-carboxylate
P5CDH	pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase
P5CS	pyrroline-5-carboxylates synthase

PAR	photosynthetically active radiation
PCA	principal component analysis
PDH	proline dehydrogenase
PDR	pleiotropic drug resistance
PE	paired-end
PEG	polyéthylène glycol
PEPCase	phosphoénolpyruvate carboxylase
PHO	phosphate transporter
PHT	phosphate transporter
Pi	phosphate inorganique
Platin'	Plateau d'isotopie de Normandie
PLS-DA	partial least square discriminant analysis
POX	proline oxidase
PPDK	pyruvate orthophosphate dikinase
PPHD	plateforme de phénotypage haut débit
PS	phytosidérophores

Q

QC	quality control
q-PCR	quantitative polymerase chain reaction
QTL	quantitative trait locus
RNA-seq	ribonucleic acid sequencing
ROS	reactive oxygen species
RRNC	relative root nutrient content
RT	reverse transcription
RuBP	ribulose-1,5-bisphosphate

S

S	soufre
Se	selenium
SHST	*Stylosanthes hamata* sulfate transporter
Si	silicium
SICLEX	simulateur de climats extremes
SLAC/SLAH	slow anion channel associated homologs
STAS	sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist
SULTR	sulfate transporter
UMR EVA	Unité Mixte de Recherche Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N.C.S.
UPLC-MS/MS	ultra performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry

V

V	vanadium
VICC	voltage-independant cation channels
VIP	variable importance in projection
VIT	vacuolar iron transporter

W

WC	water content
WD	water deficit
WRI	World Resources Institute
WUE	water use efficiency

X

XRF	x-ray fluorescence spectrometry

Y

YLBs	feuilles en cours de croissance (Young leaf blades)
YPs	pétioles en cours de croissance (Young petioles)
YS	yellow sripe
YSL	yellow strip-like

Z

ZAT	zinc transporter
ZIP	zinc-regulated transporter
Zn	zinc

Chapitre I

-

Introduction générale

Dans un contexte de changement climatique, l'augmentation de l'intensité ou de la fréquence de certains stress abiotiques au cours du cycle de développement des plantes, comme les épisodes de déficit hydrique ou de fortes températures, est préjudiciable à la croissance et au rendement des cultures, impactant également la qualité des produits récoltés (Myers *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2019). En outre, la sécurité nutritionnelle est l'un des défis majeurs poussant la recherche à comprendre les mécanismes et développer des cultures non seulement résistantes au stress, mais également biofortifiées pour lutter contre le phénomène croissant de la malnutrition minérale chez l'homme (Simova-Stoilova *et al.*, 2016). En effet, la diminution progressive de la qualité des grains dont les teneurs en fer (4^{e} problème de santé publique au niveau mondial selon l'OMS), zinc, iode ou sélénium résulte d'après un certain nombre de travaux (Fan *et al.*, 2008; Velu *et al.*, 2016), d'un effet indirect des processus de sélection variétale visant principalement à augmenter les rendements. Par conséquent, la compréhension approfondie des réponses des cultures aux stress abiotiques, unique et combinés (Pandey *et al.*, 2015), apparaît comme cruciale afin d'améliorer la résilience des cultures et maintenir une qualité nutritionnelle satisfaisante pour l'alimentation humaine.

Lorsqu'elles sont confrontées à un stress hydrique, la plupart des plantes font face au manque d'eau via une multitude de réponses morphologiques, biochimiques, physiologiques et moléculaires visant à minimiser les pertes en eau et favoriser son absorption (Farooq *et al.*, 2009; Raza *et al.*, 2017). Si les effets du stress hydrique sur la phénologie, la croissance foliaire et racinaire, la conductance stomatique ou encore l'activité photosynthétique sont largement documentés, ce n'est que de façon plus récente que le rôle des ions (essentiels et non essentiels), en tant qu'acteurs-clés de la physiologie des plantes, est apparu comme un domaine d'investigation.

Pour mieux résister, il est notamment nécessaire aux plantes d'enclencher des mécanismes d'adaptation osmotique afin de maintenir le statut hydrique et la turgescence de leurs cellules. Lors d'un manque d'eau, les macro- et microéléments sont des acteurs essentiels, notamment nécessaires au maintien de la balance osmotique durant une période de stress hydrique. Ce processus métabolique est rendu possible par des modifications de l'absorption et/ou de la distribution des ions et dépend donc de la disponibilité de ces éléments, au cours, ou avant l'apparition du stress.

La plupart des végétaux nécessitent pour leur croissance 14 éléments minéraux issus du sol : l'azote (N), le magnésium (Mg), le phosphore (P), le soufre (S), le potassium (K), le calcium (Ca), le bore (B), le chlore (Cl), le manganèse (Mn), le fer (Fe), le nickel (Ni), le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le molybdène (Mo). Bien que non essentiels, des éléments dit bénéfiques tels que le sodium (Na), le silicium (Si) (Laîné *et al.*, 2019), le vanadium (V) ou encore le sélénium (Se) (Zhou *et al.*, 2020; Ahmad *et al.*, 2021), peuvent favoriser la croissance des plantes ou accroitre leur résilience lors de stress biotiques ou abiotiques (Ali *et al.*, 2021).

Ces éléments sont effectivement indispensables à de nombreuses fonctions de la plante (Marschner, 2012; Broadley *et al.*, 2012) et interviennent, entre autres, dans le métabolisme énergétique (Dalcorso *et al.*, 2014; Andresen *et al.*, 2018), la photosynthèse (van Oijen *et al.*, 2004), la chaîne respiratoire mitochondriale, la régulation de l'expression génique (Dalcorso *et al.*, 2014), la synthèse de phytohormones ou encore dans la synthèse des protéines. Au vu de leurs multiples rôles, le fonctionnement des mécanismes physiologiques permettant la résilience des végétaux aux contraintes et/ou aux stress dépend donc fortement de la disponibilité et de l'accumulation de minéraux.

A l'instar du stress hydrique, de nombreuses études rapportent les effets négatifs de carences en macronutriments ou micronutriments (Andresen *et al.*, 2018; de Bang *et al.*, 2021) sur les paramètres physiologiques et agronomiques, tels que de fortes diminutions de la croissance, du rendement et/ou de la qualité des grains récoltés (Fageria *et al.*, 2008; Rawat *et al.*, 2013). Ces travaux sur les carences nutritionnelles ont été, le plus souvent, appréhendés de façon factorielle élément par élément, mais très rarement en considérant leurs interactions. Pourtant, depuis deux décennies, l'étude de la composition élémentaire globale, également appelée composition ionomique, est considérée comme un outil pertinent et susceptible de révéler l'état physiologique du végétal compte tenu des nombreuses et complexes interactions existant entre éléments (Lahner *et al.*, 2003; Salt *et al.*, 2008; Baxter *et al.*, 2008*b*; Williams and Salt, 2009; Stich *et al.*, 2020). Outre la mise en évidence de la variation de teneurs en éléments résultant des interactions génotype x environnement, l'étude du ionome s'est révélée être un domaine multidisciplinaire, dont l'essor a permis l'identification de gènes et de systèmes de régulation (Sasaki *et al.*, 2016; Whitt *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2021) liés à l'absorption de minéraux, à leur transport, leur métabolisme, leur rôle dans la résilience au stress et à des diaphonies potentielles (Fan *et al.*, 2021).

Ainsi, depuis de nombreuses années, l'étude de l'absorption, de la distribution de ces éléments et l'effet des carences (N, P, K, et plus récemment le S) on fait l'objet de nombreux travaux au sein de l'UMR EVA, notamment sur la culture de colza (*Brassica napus L.*) (Billard *et al.*, 2014; Girondé *et al.*, 2014; Sorin *et al.*, 2015; Maillard *et al.*, 2016*a*). Depuis 2012 et l'acquisition au sein de la plateforme Platin' (Plateau d'Isotopie de Normandie) d'un spectromètre de masse haute résolution couplé à une torche plasma (HR-ICP-MS Element 2, Thermo Fisher) permettant la quantification simultanée d'un grand nombre d'éléments, ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence des mécanismes contrôlant l'absorption et la remobilisation des nutriments, révélant l'existence d'interactions au sein de la plante (Maillard *et al.*, 2015; Etienne *et al.*, 2018).

Les carences minérales peuvent, par exemple, largement affecter la composition du ionome, en réduisant ou en augmentant la concentration de certains éléments. Chez le colza, la carence en S entraîne une élévation de la teneur en Mo des tissus, conséquence d'une surexpression des transporteurs de sulfates racinaires, capables par ailleurs d'absorber du molybdate (Maillard *et al.*, 2016*b*). Chez *Arabidopsis*, la carence en fer ne se traduit pas par une modification de la teneur en fer des feuilles, finement régulée, mais est détectable via l'élévation spécifique des teneurs Mn, Co, Zn et Cd issues de la surexpression d'un transporteur racinaire de fer (IRT1) capable de faire transiter ces éléments (Baxter *et al.*, 2008*b*). Ces observations révèlent en outre, la faculté potentielle de la ionomique pour le développement de marqueurs moléculaires permettant d'évaluer certains états biochimiques ou physiologiques sous différents stress et conditions environnementales. C'est le cas par exemple, des gènes ZIP4 et IRT3, biomarqueurs sensibles de la carence en Zn chez *Arabidopsis*, utilisés comme des proxys afin d'évaluer la tolérance à la carence en zinc (Campos *et al.*, 2017).

Grâce au développement des dispositifs FACE (Free-air concentration enrichment) des données sont déjà disponibles sur les effets de l'élévation de la teneur en CO_2 atmosphérique sur le ionome (Loladze, 2014; Dong *et al.* 2019). En comparaison, les effets du stress hydrique sur la nutrition minérale des végétaux ont fait l'objet de très peu de travaux et très peu de publications ont d'ores et déjà décrit de façon globale l'impact de cette contrainte (Hu and Schmidhalter, 2005; da Silva *et al.*, 2011; Waraich *et al.*, 2011) sur la composition ionomique et le rôle potentiel de celle-ci, en retour, sur la résilience au stress hydrique. L'étude du ionome d'*Arabidopsis* (Acosta-Gamboa *et al.*, 2017) démontre pourtant l'influence du stress hydrique sur l'absorption et l'accumulation de différents ions dans les tissus végétaux, révélant que le profil de variation de leurs teneurs dépend de l'intensité du stress hydrique appliqué. Au bilan,

si de très nombreuses études ont été menées sur les effets physiologiques d'un stress hydrique, très peu d'entre elles considèrent explicitement les conséquences sur la nutrition minérale des végétaux, ni sur la façon dont celle-ci peut favoriser ou non la résistance des végétaux à un manque d'eau.

Cette thèse de doctorat établie en convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE) s'inscrit au sein du projet EAUPTIC, regroupant deux unités de recherches, l'UMR INRAE 950 EVA (Caen) et l'UMR INRAE 1347 Agroécologie (Dijon) ainsi que trois partenaires du secteur privé dont Agro Innovation International (AII) filiale du Groupe Roullier (Saint-Malo), la coopérative Dijon Céréales (Longvic) et la start-up Weenat (Nantes). Ce projet est labellisé par les pôles de compétitivité VEGEPOLYS, VALORIAL et VITAGORA, financé par AII, la Banque Publique d'Investissement (BPI-France), le Fond Unique Interministériel (FUI) et les régions Pays de Loire, Bretagne, Normandie et Bourgogne. Il vise à i) identifier des indicateurs phénotypiques caractéristiques de l'état hydrique et du statut de la nutrition minérale des plantes, ii) améliorer la nutrition minérale pour optimiser la résilience de la plante sous stress hydrique, allant jusqu'au iii) développement d'outils d'aide à la décision permettant de piloter la fertilisation et reposant sur des indicateurs de fonctionnement de la plante.

Pour cela, trois plantes modèles ont été sélectionnées : le blé tendre (*Triticum aestivum*), le pois (*Pisum sativum*) et le colza (*Brassica napus*) du fait de leur importance économique dans l'agriculture française ainsi que de leurs différences de capacité d'adaptation au déficit hydrique, de besoins spécifiques en minéraux, de leurs interactions contrastées avec la microflore du sol (possibilité ou non d'établir des symbioses avec les bactéries fixatrices de diazote et les champignons mycorhiziens) et de la valorisation différenciée des produits récoltés (protéines, amidon, huile).

Au sein de ce projet, cette allocation de thèse CIFRE établie entre AII et l'UMR 950 EVA s'inscrit donc dans une plus grande compréhension de l'écophysiologie du colza et du blé, en particulier pour le prélèvement des nutriments lors de carences minérales ou d'un stress hydrique en fonction du stade de développement de la plante. Elle vise plus spécifiquement à caractériser la modification du contenu élémentaire ou ionome, consécutive à des contraintes minérale ou hydrique, par la mise en évidence de signatures ionomiques et l'identification des métabolismes concernés. Ces travaux doivent notamment permettre d'élaborer des pistes afin d'identifier les mécanismes favorisant la résilience du colza et du blé sous stress hydrique d'intensité variable, notamment via l'ajustement de la nutrition minérale.

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique faisant un bilan non exhaustif des connaissances actuelles, permettant d'appréhender les concepts gravitant autour de la nutrition minérale dans le cadre contextuel de ce sujet de thèse (**Chapitre II**). Pour cela elle évoquera (i) l'importance de la nutrition minérale chez l'homme, résultant en grande partie de celle des plantes cultivées et notamment de leur capacité d'absorption des éléments et (ii) la notion de ionome, qui, grâce à l'essor des analyses ionomiques, offre un prisme d'observation révélateur du statut nutritionnel des plantes notamment lors de contraintes abiotiques telles que plus spécifiquement le stress hydrique.

Les résultats issus de ces travaux de recherches sont ensuite présentés sous la forme de quatre articles scientifiques (**Chapitre III-V**) comme explicité ci-dessous et seront suivis d'un dernier chapitre (**Chapitre VI**) qui présentera une synthèse et une discussion des résultats obtenus, ainsi que les perspectives les plus pertinentes qui en découlent.

Le Chapitre III considérera la plasticité du ionome fonctionnel du colza et du blé lors de carences nutritionnelles et la mise en évidence de la spécificité des signatures ionomiques permettant potentiellement la détection précoce du statut nutritionnel des végétaux. Issus d'un travail collaboratif (acquisition, traitement et interprétation des données) sur une expérimentation de grande ampleur, ces résultats seront présentés sous la forme de deux articles corédigés, entre autres, avec Galatéa Courbet également doctorante au sein de l'UMR EVA :

Courbet G, D'Oria A, Lornac A, Diquélou S, Pluchon S, Arkoun M, Koprivova A, Kopriva S, Etienne P, Ourry A. 2021a. Specificity and plasticity of the functional ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* subjected to macronutrient deprivation. Frontiers in Plant Science **12**, 78.

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.

Le Chapitre IV vise à mettre en évidence les effets spécifiques d'un stress abiotique, le stress hydrique, sur le ionome fonctionnel évalué au travers du contenu élémentaire et de l'expression de gènes potentiellement impliqués dans la composition du ionome. Les résultats seront présentés sous la forme des deux articles suivants :

D'Oria A, Courbet G, Billiot B, Jing L, Pluchon S, Arkoun M, Maillard A, Paysant-Le Roux C, Trouverie J, Etienne P, Diquélou S and Ourry A. 2021. Drought specifically downregulates mineral nutrition: plant ionomic content and associated gene expression. *Submitted to Plant Direct.*

D'Oria A, Jing L, Arkoun M, Pluchon S, Pateyron S, Trouverie J, Etienne P, Diquélou S and Ourry A. 2022**.** Transcriptomic, metabolomic and ionomic analyses reveal early modulation of leaf mineral content in *Brassica napus* under mild or severe drought. International Journal of Molecular Sciences **23**, 781.

Par ailleurs, ces travaux ont permis la publication d'un article qui ne figure pas dans ce manuscrit, auquel je suis également associé :

Courbet G, D'Oria A, Maillard A, Jing L, Pluchon S, Arkoun M, Pateyron S, Paysant-Le Roux C, Diquélou S, Ourry A, Trouverie J and Etienne P. 2021b**.** Comparative omics analysis of *Brassica napus* roots subjected to six individual macronutrient deprivations reveals deficiency-specific genes and metabolomic profiles. International Journal of Molecular Sciences ***22***, 11679.

Chapitre II

-

Synthèse bibliographique

I. La nutrition minérale

1. Importance de la nutrition minérale pour la santé humaine et l'alimentation

La qualité des productions végétales utilisées pour la nutrition animale ou l'alimentation humaine présente d'importantes répercussions sur leur santé respective. Les impacts négatifs de la dénutrition sur le bien-être individuel et la croissance économique au niveau mondial sont bien connus et il est généralement admis que la lutte contre la faim représente non seulement l'un des principaux défis pour l'humanité, mais offre également des retombées économiques et sociales considérables (World Bank, 2006). Si au milieu des années 1980, c'est principalement la teneur en protéines des produits récoltés qui inquiète la communauté scientifique qui étudie leurs propriétés nutritionnelles, ces dernières décennies, c'est la malnutrition en micronutriments (abrégée MNM en anglais) également appelée faim cachée (hidden hunger) qui inquiète les spécialistes (Allen, 2000). En 2000, l'organisation mondiale de la santé (OMS) édite en effet un rapport alarmant, signalant que les carences en fer (Fe), vitamine A, zinc (Zn) et iode (I) sont identifiées parmi les contraintes de santé les plus graves retrouvées à travers le monde (World Health Organization, 2000). Bien que moins importantes, les carences en calcium (Ca) et en sélénium (Se) sont également considérées comme des problèmes de santé publique majeurs et de façon plus localisée, des carences en magnésium (Mg) et en cuivre (Cu) peuvent également être couramment diagnostiquées (Allen *et al.*, 2006). La malnutrition en micronutriments pourrait en effet affecter plus de la moitié de la population mondiale et on estime actuellement qu'une personne sur six est dénutrie sur le plan minéral, plus particulièrement dans les pays en développement (Mayer *et al.*, 2008; Stein, 2010). Cette forme de malnutrition est causée par un manque chronique d'apport en vitamines ou éléments minéraux et est ainsi nommée car les personnes qui en souffrent, n'en ressentent pas les effets et les conséquences qui ne sont, bien souvent, pas immédiatement perceptibles. Toutes les populations peuvent donc être sujettes à ce type de malnutrition, qui diffère de la "famine", provoquée quant à elle par une altération de la quantité (food security) et non de la qualité des produits disponible (food safety).

Tableau II-1 : Grandes fonctions des éléments minéraux chez l'Homme, adapté de (Stein, 2010)

Element	Function
Boron (*B*)	May be essential for humans based on recent experimental evidence showing that boron affects blood biochemical markers of energy and mineral metabolism
Calcium (*Ca*)	Essential role in blood clotting, muscle contraction, nerve transmission, and bone and tooth formation. Structural function (stores in the skeleton), electrophysiological function (carries charge during an action potential across membranes), intracellular regulator, and cofactor for extracellular enzymes and regulatory proteins
Chloride (*Cl*)	As sodium chloride (table salt) required for maintenance of extracellular fluid volume
Copper (*Cu*)	Part of enzymes that help biochemical reactions in every cell, involved in the absorption, storage and metabolism of iron. Component of enzymes in iron metabolism
Iodine	Essential component of thyroid hormones, which regulate cell activity and growth in virtually all tissues and are essential for normal embryonic and postnatal development
Iron (*Fe*)	Component of hemoglobin and numerous enzymes; prevents anemia. Carries oxygen and forms part of hemoglobin in blood and myoglobin in muscles; component of various enzymes
Magnesium (*Mg*)	Important role in 300+ fundamental enzymatic reactions, in the activation of amino acids, the synthesis and degradation of DNA, in neurotransmission and immune function
Manganese (*Mn*)	Part of several enzymes (preventing tissue damage, breaking down carbohydrates, nitric oxide synthesis, urea formation); activates numerous enzymes (cartilage formation). Involved in the formation of bone and in enzymes in the metabolism of amino acid, cholesterol and carbohydrate
Molybdenum (*Mo*)	Component of a number of enzymes (metabolism of sulfur amino acids, oxidation of purines and pyrimidines, production of uric acid, oxidation of aldehydes)
Nickel (*Ni*)	Cellular effects documented but no deficiency disease in man; found in highest concentrations in lung, kidney and some hormone-producing tissues; can activate or inhibit a number of enzymes that usually contain other elements; may serve as a cofactor of metalloenzymes and facilitate iron absorption or metabolism in microorganisms
Phosphorus (*P*)	Maintenance of pH, storage and transfer of energy and nucleotide synthesis. The metabolism of all major metabolic substrates depends on its functioning as a cofactor in a variety of enzymes and as the principal reservoir for metabolic energy
Potassium (*K*)	Required for cellular function; deficiency can cause cardiac arrhythmias, muscle weakness, glucose intolerance, high blood pressure, salt sensitivity, risk of kidney stones, high bone turnover and risk of cardiovascular diseases The most essential cation of the cells; because of its association with the metabolizing, oxygen-consuming portion of the body, a decline in total body potassium is usually interpreted as a loss of muscle mass due to a catabolic condition
Selenium (*Se*)	Functions as a component of enzymes involved in antioxidant protection and thyroid hormone metabolism
Silicon (*Si*)	May play a role in structure of glycosaminoglycans and their protein complexes; no human data available
Sodium (*Na*)	Predominant cation in extracellular fluid; acts in consort with K, the chief cation of intracellular fluid, to regulate body water distribution and blood pressure; important for acid-base balance and the transmission of nerve impulses
Sulfur (*S*)	As inorganic sulfate required for the synthesis of PAPS, which is required for synthesis of many important sulfur-containing compounds
Vanadium (*V*)	No specific biochemical function has been identified
Zinc (*Zn*)	Component of multiple enzymes and proteins; involved in the regulation of gene expression Structural, catalytic and regulatory roles; role in the coding for zinc finger proteins; required by over 60 enzymes for activity, incl. RNA polymerases; supports synaptic vesicles

En effet, la plupart des éléments minéraux ont de nombreux rôles connus chez l'Homme (**Tableau II-1**), le fer, à titre d'exemple, est impliqué dans de nombreuses réaction d'oxydo-réduction et est un constituant indispensable de sites catalytiques de protéines hémiques, dont la carence impacte négativement la croissance, le développement cognitif ou encore le système immunitaire chez l'enfant. La carence en fer qui touche plus de deux milliards d'individus, peut se traduire par l'apparition d'une anémie ferriprive, qui se caractérise par une diminution du nombre de globules rouges dans le sang ou de leur teneur en hémoglobine à l'origine de 800 000 décès chaque année (McLean *et al.*, 2007).

Le zinc quant à lui, est un constituant de nombreuses enzymes essentielles impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaires, ainsi que dans la synthèse de l'ARN et de l'ADN. La carence en zinc entraîne alors une altération de la croissance, mais également un dysfonctionnement immunitaire, une augmentation de la morbidité et de la mortalité ; elle peut entrainer un développement anormal du système nerveux de l'enfant et aboutir à une issue défavorable de la grossesse (Mayer *et al.*, 2008).

L'apparition de ces carences minérales, outre celles provoquées par la sous-nutrition, sont donc issues d'un déséquilibre entre les besoins pour le bon fonctionnement du corps humain et les quantités d'éléments minéraux retrouvées dans l'alimentation. Ces besoins, peuvent ne pas être satisfaits lorsque les teneurs en éléments minéraux des produits récoltés puis transformés fluctuent. Bien que la plupart des plantes cultivées puissent être considérées comme des usines biochimiques capables d'absorber, accumuler (minéraux) ou synthétiser (vitamines) presque l'intégralité de la ration nutritionnelle nécessaire à l'alimentation humaine, ces éléments sont inégalement répartis au sein des différents organes de la plante. La teneur en fer d'un grain de riz ($\simeq$ 3 ppm) est, par exemple, presque 100 fois plus faible que celle retrouvée au niveau des feuilles (100-200 ppm) ; de plus, contrairement à ces dernières, celui-ci ne contient pas de caroténoïdes indispensables à la synthèse de provitamine A.

Les teneurs en éléments minéraux dépendent également de l'espèce considérée, du génotype et des conditions environnementales rencontrées au cours de la croissance. Ces paramètres façonnent l'apparition des carences en micronutriments et c'est notamment dans la faible diversité des produits consommés, appelée également régime monodiète (principalement riz, blé, maïs ou manioc), que réside l'apparition de carences nutritionnelles observées dans les pays en voie de développement.

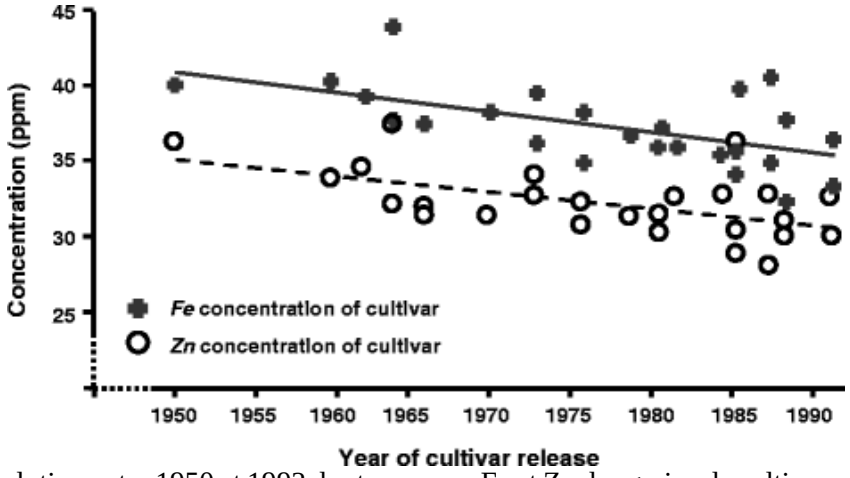


Figure II-1. Evolution entre 1950 et 1992 des teneurs en Fe et Zn des grains de cultivars de blé (*Triticum aestivum*) issus du CIMMYT. D'après Stein (2010), adapté de (Monasterio and Graham, 2000).

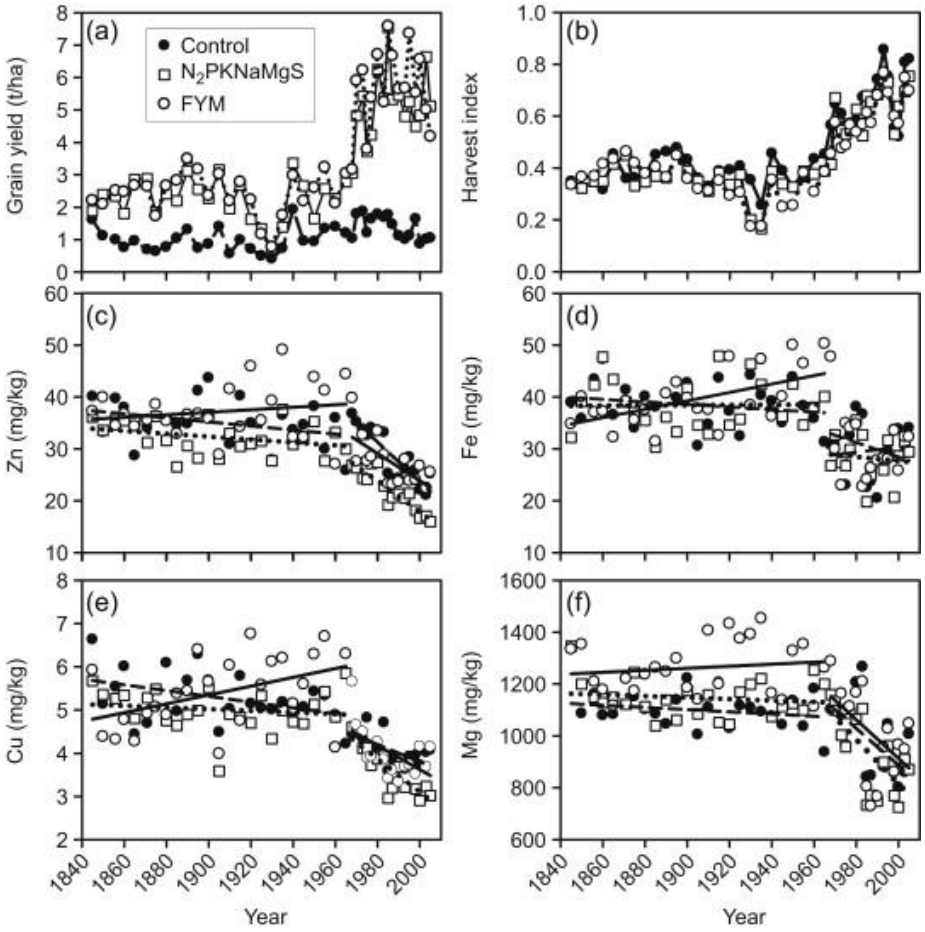
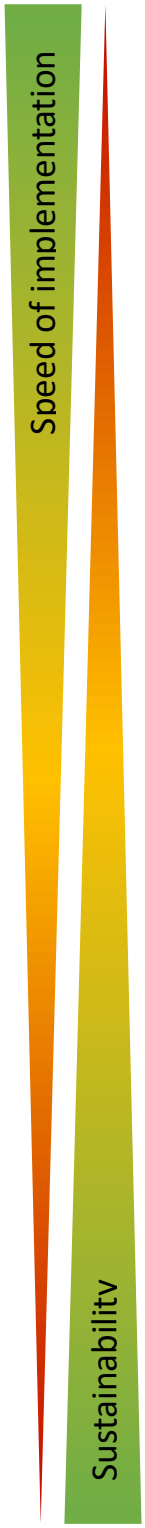


Figure II-2. Evolution (a) du rendement en tonne ha^{-1}, (b) de l'indice de récolte, (c) des teneurs des grains en Zn, (d) Fe, (e) Cu et (f) Mg en mg kg^{-1} selon trois types de fertilisations testées : (●) sans fertilisation, (□) fertilisation minérale en N, P, K, Na, Mg, S ou (○) fertilisation organique de la production de blé du programme Broadbalk de 1945 à 2008 à l'IACR de Rothamsted. D'après (Fan et al., 2008).

Au sein des pays développés, bien que la diversité des produits consommés ne soit pas un facteur limitant, c'est la valeur nutritionnelle des produits récoltés qui inquiète. Face à une population mondiale grandissante, les priorités données par les décideurs politiques passés et les agronomes, focalisées sur le rendement et sans réelle prise en compte de la qualité nutritionnelle des cultures, sont également considérées comme partiellement responsables de la malnutrition minérale chez l'homme (Welch and Graham, 2002; Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2010). Ces études confirment que lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions environnementales et pédoclimatique identiques, les cultivars modernes avec un rendement supérieur en grains, sont souvent associés à des concentrations réduites de minéraux dans les cultures à vocation alimentaire, par comparaison avec les génotypes plus anciens et à plus faible rendement. Cette tendance est par exemple observable dans des cultivars de blé tendre (*Triticum aestivum*) générés par le CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) entre 1950 et 1992 (**Figure II-1**) (Stein, 2010), période au cours de laquelle le rendement en grains a considérablement augmenté. A Rothamsted au Royaume-Uni, une étude menée au sein du projet Broadbalk à partir d'échantillons de grains de blé et de sol archivés entre 1843 et 2008, révèle une tendance similaire sur l'évolution des teneurs en éléments minéraux avec une diminution significative des concentrations en P, S, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn et Cu dans les grains (**Figure II-2**; Fan *et al.*, 2008). Malgré des concentrations stables de ces nutriments mesurées dans le sol, la diminution de ces teneurs coïncide avec l'introduction de cultivars à haut rendement à partir du milieu des années 60. D'après ces auteurs, là encore, la sélection génotypique conduite chez le blé visant notamment à augmenter l'acquisition de carbone (C) afin de déplafonner le rendement, s’est donc faite au détriment de l’acquisition de certains éléments minéraux.

Face à cette baisse généralisée des teneurs en éléments minéraux des grains récoltés, de nombreuses stratégies sont alors développées pour pallier à d’éventuelles carences nutritionnelles.

Tableau II-2 : Cadre conceptuel des interventions possibles dans la lutte contre la malnutrition minérale selon leur vitesse de mise en œuvre, adapté de Stein (2010)



Intervention	*Description*
Supplementation	**Supplying micronutrients in addition to people's usual dietary intakes**
Medical supplementation	Distribution of micronutrients in pharmaceutical form by medical staff or on prescription, often during routine health checks (especially iron pills for pregnant women), during specific supplementation campaigns or in combination with vaccination days (especially vitamin A doses for children)
Dietary supplementation	Selling of micronutrients as over-the-counter drugs, especially for self-medication in industrialized countries
Fortification	**Increasing micronutrient content and availability in the usual food people eat**
Home fortification	Addition of (commercial) micronutrient "sprinkles" during food preparation at home, often containing multiple micronutrients
Industrial fortification	Mandatory or commercial addition of micronutrients to foodstuffs during processing or (as premix) along the supply chain, for instance iodization of salt or enrichment of wheat flour with iron
Fertilization	Addition of minerals in (commercial or subsidized) fertilizers during crop cultivation to increase the mineral content in the final produce
Biofortification	Breeding crops (conventionally or through genetic engineering) to accumulate micronutrients in their edible parts (e.g. iron-rich rice or "golden rice"); also breeding crops for lower presence of micronutrient inhibitors (like phytate) in their edible parts
Dietary diversification	**Increasing the micronutrient uptake through different food**
Micronutrient-rich crops	Increasing production of micronutrient-rich crops (through agricultural policies or the promotion of home gardens) or increasing demand for micronutrient-rich food (through communication for behavior change)
Micronutrient availability in meals	Avoidance of micronutrient losses in food (through new food conservation and preparation techniques) or improvement of the bioavailability of the micronutrients that are present in a meal (through selection of food containing promotors and avoidance of food containing inhibitors of micronutrient uptake, e.g. including a vitamin C source or avoiding tea when consuming iron-rich food)
Infant feeding	Promoting breastfeeding and proper weaning practices to avoid child malnutrition
Nutrition education	Overarching measure to generate the awareness and the knowledge to demand, put into practice and use the other interventions
Public health measures; water, sanitation & hygiene; poverty reduction	Supporting interventions to avoid micronutrient losses (e.g. through diarrhea or parasitic blood loss) and to generate the purchasing power to realize the demand for the other interventions

Depuis les premiers signaux d'alarmes tirés au début des années 2000 par la FAO (L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) et l'OMS, les organismes de santé publique des pays développés ont largement promu l'amélioration de la qualité nutritionnelle des produits consommés via la supplémentation et la fortification industrielle (**Tableau II-2**). En effet, au-delà de toute considération éthique et économique, le Conseil économique et social des Nations Unies a affirmé l'obligation légale de chaque État « d'assurer à toute personne relevant de sa juridiction l'accès à une alimentation minimale essentielle qui soit suffisante, nutritionnellement adéquate et sûre, pour garantir leur libération de la faim » (ONU 1999). Ces procédés ont ainsi permis de considérablement réduire la morbidité et la mortalité induites par les malnutritions en micronutriments (MNM) dans le monde, sans hélas, atteindre les objectifs fixés par les organisations internationales. De plus, ces programmes d'enrichissement des aliments reposent sur de la transformation industrielle et la large distribution de produits ou compléments alimentaires. Ces interventions nécessitent des infrastructures, un pouvoir d'achat et un accès aux marchés et aux systèmes de santé pour leur succès, souvent inaccessibles aux personnes vivant dans les zones rurales reculées.

La biofortification est une des réponses possibles face à l'enjeu des malnutritions minérales (**Tableau II-2**). Elle consiste à augmenter la valeur nutritionnelle des produits issus de l'agriculture, par l'augmentation des concentrations et/ou de la biodisponibilité des éléments minéraux dans les produits récoltés (Mayer et al., 2008). Afin que ces éléments soient retrouvés dans les parties comestibles des cultures à des concentrations suffisamment élevées pour avoir un impact sur la santé humaine, deux approches complémentaires ont été adoptées : i) agronomique par l'optimisation des apports d'engrais minéraux et/ou l'amélioration de la solubilisation et la mobilisation des éléments présent dans le sol ; ii) génétique par des programmes de sélection ou des approches transgéniques. Dans ce dernier cas, deux axes ont également été privilégiés, tout d'abord, via l'amélioration de l'acquisition des éléments et leur accumulation dans les parties comestibles de la plante. Il s'agit notamment de gènes cibles ou transgènes qui influencent la redistribution des éléments entre les tissus, l'efficacité des voies biochimiques, voire même la reconstruction de voies métaboliques dans des organismes génétiquement modifiés (OGM). D'autre part, en permettant l'accumulation de substances promotrices, telles que l'ascorbate, le carotène et les polypeptides riches en cystéine qui stimulent l'absorption des éléments minéraux essentiels par l'intestin ou au contraire, la réduction de la présence d'antinutriments, tels que l'oxalate, les polyphénols ou les phytates, qui quant à eux, interfèrent avec leur absorption (Mayer et al., 2008; White and Broadley, 2009).

L'un des exemples les plus connus est le "golden rice", un riz génétiquement modifié dans lequel la voie de biosynthèse des caroténoïdes a été reconstituée, dans le but de compenser le déficit en provitamine A du riz (Paine *et al.*, 2005; Schaub *et al.*, 2005) et permettant ainsi de lutter contre le phénomène de cécité infantile dans les populations d'Afrique et d'Asie du Sud-Est. De surcroît, et bien que controversé, des OGM ont également permis de doubler la teneur en fer des grains de riz par la surexpression de la ferritine de haricot (Goto *et al.*, 1999) ou encore de multipliée par 15 la teneur en folate au sein de la tomate (Garza *et al.*, 2007).

La biofortification offre ainsi une approche jugée rentable et durable. En effet, après des phases initiales de développement puis d'adoption, l'analyse des coûts d'utilisation des cultures biofortifiées se révèlent similaires à ceux de la production et de la distribution de semences certifiées. Cette dernière est alors rapportée, comme bien inférieure aux coûts nécessaires aux autres interventions de santé publique classiques (Nestel *et al.*, 2006). Elle impose néanmoins à la recherche, le double défi de développer des cultures biofortifiées, permettant d'augmenter durablement la qualité et la quantité des produits récoltés, tout en prenant en considération les nombreuses interactions existantes entre les éléments, comme récemment révélé pour le Se (Zhou *et al.*, 2020) ou le Zn (Hussain *et al.*, 2019) pour lesquels l'étude du ionome, concept présenté ci-après, pourrait s'avérer primordiale.

Tableau II-3 : Découvertes progressives de l'essentialité des éléments minéraux pour les végétaux aux cours des XIX^{e} et XX^{e} siècles (Pilbeam, 2016)

Eléments	Auteurs	Date
N	De Saussure	1804
Fe	Gris	1843
P	Ville	1861
Ca	Stohmann	1862
K	Birner et Lucanus	1866
S	Birner et Lucanus	1866
Mg	Boehm	1875
Mn	Mc Hargue	1922
Cu	Mc Hargue	1925
B	Sommer et Lipman	1926
Zn	Sommer et Lipman	1926
Mo	Arnon et Stout	1939
Cl	Broyer, Carlton, Johnson et Stout	1954
Ni	Brown, Welch et Cary	1987

2. Les éléments minéraux chez la plante

Depuis plus de 2000 ans, l'agriculture a recours à l'apport d'éléments minéraux pour les cultures, quand bien même les effets bénéfiques avérés de ces derniers n'ont été mis en évidence qu'au cours des 150 dernières années suite aux premiers travaux de Justus von Liebig (1803-1873) (**Tableau II-3**). Aujourd'hui, l'application d'engrais minéraux (azote inorganique, superphosphate, potasse, etc) est devenue une pratique systématique en agriculture conventionnelle, ayant pour but d'améliorer la croissance des plantes en vue d'accroître la production agricole.

En effet, afin d'assurer leur croissance et leur développement, les plantes requièrent des éléments minéraux dont certains sont répertoriés en 1939 par Arnon and Stout, comme indispensables à la vie de la plante (Arnon and Stout, 1939; Marschner, 2012). Qualifiés de "nutriments essentiels", les auteurs proposent alors trois critères auxquels ces derniers doivent ainsi répondre afin d'appartenir à cette catégorie :

i) L'incapacité de la plante à réaliser son cycle de développement complet en cas de carence de l'élément concerné,
ii) L'élément ne peut être substitué par un autre,
iii) L'élément est directement impliqué dans le métabolisme de la plante, indépendamment de ses potentiels effets bénéfiques lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la croissance de la plante.

Ces éléments sont alors usuellement regroupés en deux catégories, les **macroéléments** requis en grande quantités par la plante (représentant plus de 0,1% de la masse sèche) tels que carbone (C), l'hydrogène (H), l'oxygène (O), l'azote (N), le magnésium (Mg), le phosphore (P), le soufre (S), le potassium (K) et le calcium (Ca), ainsi que les **microéléments,** requis en plus faible quantité (< 0,1% de la masse sèche) et comprenant le bore (B), le chlore (Cl), le manganèse (Mn), le fer (Fe), le nickel (Ni), le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le molybdène (Mo) (Marschner, 2012). Enfin, bien que non essentiels d'après les critères précédemment cités, d'autres nutriments permettent de favoriser la croissance de certaines espèces végétales ou bien dans certaines conditions environnementales particulières et sont à ce titre appelés **éléments bénéfiques**. C'est le cas notamment du sodium (Na) capable de se substituer au K, du silicium (Si), de l'aluminium (Al), du vanadium (V), du cobalt (Co) ou encore du sélénium (Se) (Broadley *et al.*, 2012).

Bien qu'elle soit communément admise, cette classification n'en reste pas moins en constante évolution au gré de l'acquisition de nouvelles connaissances sur le rôle des éléments. Raison

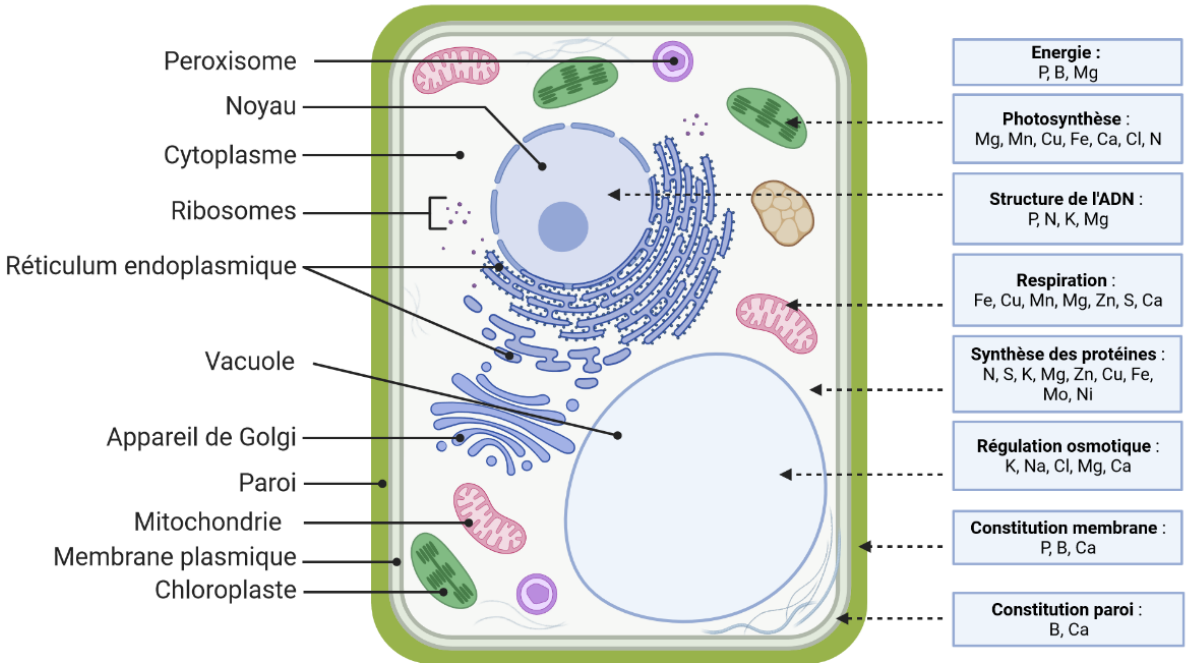


Figure II-3. Les éléments minéraux et leur affectation au sein des grandes fonctions de la cellule végétale. Les éléments essentiels sont indispensables à la croissance et au développement de la plante par leur implication dans la photosynthèse, la respiration, la régulation du potentiel osmotique ou encore la synthèse de protéines. Etabli d'après Broadley *et al.* (2012), Hawkesford *et al.* (2012) et Marschner (2012).

pour laquelle, par exemple, le Ni historiquement considéré comme un élément bénéfique, est depuis les travaux de Brown *et al.* (1987) considéré comme un élément essentiel au regard de son implication dans la structure de l'uréase, enzyme catalysant la réaction de transformation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac. C'est également le cas pour le Si (Ma *et al.*, 2001) et le Cl (Colmenero-Flores *et al.*, 2019) dont les positions dans la classification traditionnelle ont été récemment remises en cause sur la base de leur concentration tissulaire, parfois bien plus élevées que ce qui est était généralement admis. Cette définition de l'essentialité considère les éléments dans le contexte presque exclusif de l'achèvement du cycle de vie de la plante et a récemment été discutée (Brown *et al.*, 2021), pour permettre la prise en compte de critères tels que l'amélioration : i) de la croissance des plantes, ii) de l'efficacité de l'utilisation des éléments nutritifs, de l'eau et d'autres ressources, iii) de la tolérance aux stress abiotiques ou biotiques ou iv) de la qualité ou la valeur nutritionnelle du produit récolté. En effet, cette classification dont le cadre à très peu évolué depuis près d'un siècle, peut aujourd'hui être source d'une grande confusion parmi les scientifiques, les organismes de réglementation et les industries. L'accroissement des connaissances issues des travaux de recherche des dernières décennies a rendu, plus que jamais, la distinction entre éléments bénéfiques et essentiels extrêmement difficile dans le cas de certains "oligo-éléments" (Broadley *et al.*, 2012).

De nombreuses études rapportent alors les effets négatifs de carences en macroéléments ou microéléments sur les paramètres physiologiques et agronomiques, tels que de fortes diminutions de la croissance, du rendement et/ou de la qualité des grains récoltés (Fageria *et al.*, 2008; Rawat *et al.*, 2013). En effet, ces nutriments sont nécessaires à de nombreuses fonctions métaboliques (**Figure II-3**). Ils interviennent, entre autres, dans le métabolisme énergétique (Dalcorso *et al.*, 2014; Andresen *et al.*, 2018), la photosynthèse (van Oijen *et al.*, 2004), la chaîne respiratoire mitochondriale, la régulation de l'expression génique (Dalcorso *et al.*, 2014), la synthèse de phytohormones ou encore dans la synthèse des protéines.

La croissance et le développement des plantes dépendent donc d'un équilibre entre ces éléments essentiels impliqués dans de nombreuses fonctions de la cellule, suggérant de nombreuses régulations afin d'assurer leur absorption, leur transport et leur stockage afin de répondre aux besoins de la plante, tout en évitant leur accumulation excessive qui pourrait alors conduire à une toxicité délétère à la croissance (Williams and Salt, 2009; Andresen *et al.*, 2018). Néanmoins, elles doivent faire face à un environnement minéral en constante fluctuation et être capables de mettre en place différentes stratégies afin de maintenir leur croissance et/ou d'optimiser l'absorption des nutriments au niveau racinaire.

3. Systèmes d'absorption des nutriments

a. Stratégie d'acquisition dans un environnement minéral fluctuant

La disponibilité d'un élément minéral résulte de nombreux facteurs environnementaux : teneur dans le sol, température, pH, teneur en eau ou encore taux d'oxygène, autant de facteurs qui peuvent dans des conditions défavorables, altérer la biodisponibilité des éléments minéraux. Lorsque cette dernière est réduite et que la quantité d'éléments disponibles ne permet plus de couvrir les besoins de la plante, une grande diversité de réponses morphologiques et physiologiques peuvent être mises en place afin d'améliorer l'acquisition des éléments minéraux et d'optimiser leur utilisation. De façon non exhaustive, ces principales modifications peuvent concerner :

- Une modification de l'architecture racinaire visant à augmenter i) la prospection racinaire et/ou ii) la surface d'échange avec le sol (Gruber *et al.*, 2013)
- Une modification des propriétés physico-chimiques de la rhizosphère via l'exsudation racinaire de nombreuses molécules permettant de modifier l'environnement de la racine et ainsi favoriser la biodisponibilité des nutriments : en modifiant le pH, en s'adsorbant préférentiellement sur les surfaces organo-minérales pour désorber les nutriments, en chélatant certains éléments (le fer par exemple), ou encore en favorisant le développement de microorganismes bénéfiques capables de dégrader des substrats organiques variés.
- Une modification de l'expression de gènes codant des transporteurs racinaires spécifiques ou aspécifiques de l'élément ou des éléments concernés.
- Une modification de la répartition des éléments minéraux entre tissus ou organistes, impliquant leur stockage, notamment vacuolaire, puis leur redistribution au sein de la plante, l'ensemble correspondant à un processus de remobilisation.

Pour assurer leur croissance et leur développement, les plantes doivent constamment acquérir des éléments minéraux de la solution du sol et une absorption racinaire adéquate doit alors permettre, notamment dans des conditions environnementales défavorables, le maintien de l'homéostasie des teneurs en éléments au sein des différents tissus. Dans la littérature, de nombreuses revues font l'état des différents transporteurs racinaires identifiés et de leurs régulations potentielles, c'est notamment le cas pour les transporteurs de macroéléments tels que N, P et S (Gojon *et al.*, 2009; Courbet *et al.*, 2019) et de micronutriments tels que Cu, Zn, Mn, Fe (Pilon *et al.*, 2009), Ni, Mo, B et Cl (Tejada-Jiménez *et al.*, 2009).

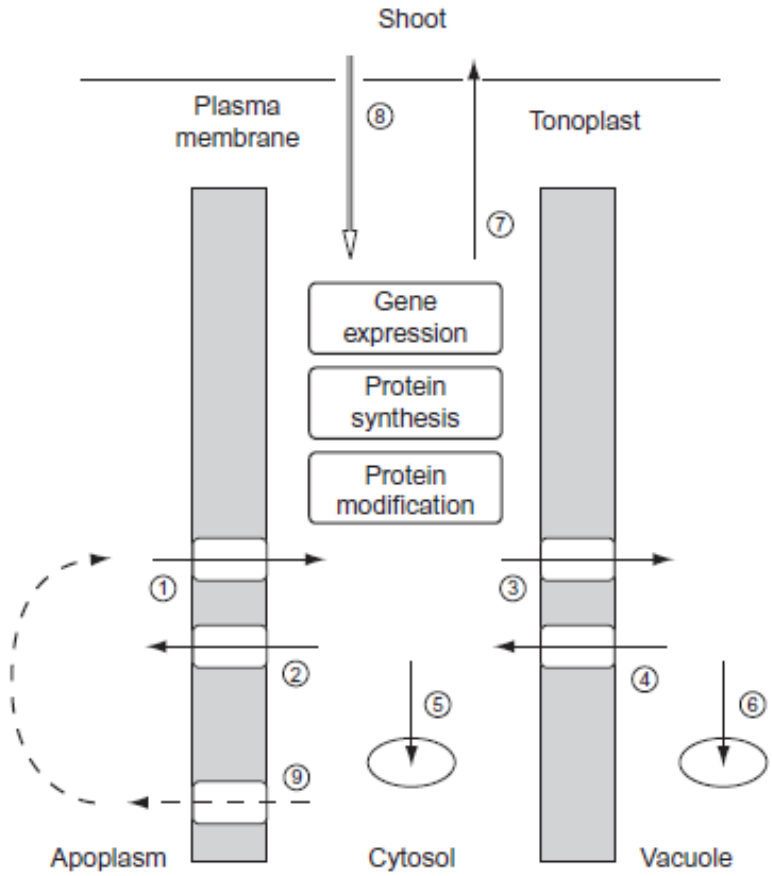


Figure II-4. Modèle de régulation de l'absorption racinaire des éléments minéraux en fonction du statut nutritionnel de la plante.
La modulation de l'expression des gènes, la synthèse et la modification de protéines en réponse à la variation de la concentration cytosolique d'un élément minéral ou de ses métabolites peuvent réguler : (**1**) l'influx et (**2**) l'efflux d'éléments minéraux via i) le nombre et l'activité des transporteurs et ii) le gradient électrochimique à travers la membrane plasmique; (**3**) l'infflux de nutriments dans la vacuole via la concentration de nutriments dans le cytosol, le nombre et l'activité des transporteurs ainsi que le gradient électrochimique du tonoplaste ; (**4**) l'efflux de nutriments de la vacuole via leur concentration vacuolaire, le nombre et l'activité des transporteurs, et le gradient électrochimique du tonoplaste ; (**5**) la complexation dans le cytosol, la séquestration dans les organites et le métabolisme des éléments minéraux, qui affectent les concentrations de l'élément et de ses métabolites dans le cytosol ; (**6**) la complexation ou la précipitation de l'élément minéral dans la vacuole, ce qui affecte sa capacité à en sortir ; (**7**) le transport d'un élément minéral ou d'un de ses métabolites de la racine aux parties aériennes via le xylème, ce qui affecte leurs concentrations cytosoliques ; (**8**) le transport d'un élément minéral ou d'un de ses métabolites des parties aériennes vers les racines via le phloème, ce qui affecte également leurs concentrations cytosoliques; et enfin (**9**) la modification de la rhizosphère par la sécrétion de protons, d'enzymes et de solutés organiques pour augmenter la concentration du nutriment minéral dans l'apoplasme, et sa disponibilité pour l'infflux *(Marschner, 2012)*.

La complexité de ces systèmes d'absorption réside dans l'important nombre de transporteurs mis en évidence et les multiples voies de régulations qui sont progressivement découvertes depuis moins de 2 décennies. Ces voies ont principalement pour but de réguler l'absorption des éléments en réponse i) au statut nutritionnel et à la demande interne (**Figure II-4**), ii) à l'offre externe en éléments biodisponibles, tout en évitant iii) une accumulation excessive d'éléments pouvant mener, pour certains, à des phénomènes de toxicité.

Outre le C et l'O absorbés à partir de gaz issus de l'atmosphère, la plante absorbe la majeure partie des éléments minéraux essentiels au niveau racinaire sous la forme d'anions (NO_3^-, $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-}, MoO_4^{2-}, Cl^{-}, etc), de cations (NH_4^+, Na+, K^+, Ca^+, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}, Na^+, etc) ou encore de molécules neutres telles que l'acide borique ($B(OH)_3$) (**Tableau II-4**). L'importante similarité structurelle et chimique de certains éléments fait qu'une part importante de l'absorption est assurée par des canaux à cations ou à anions aspécifiques, capables de transporter plusieurs éléments en fonction de leur valence. D'autre part, l'absorption peut être assurée par des transporteurs spécifiques d'un élément ou d'un groupe d'éléments. De façon non exhaustive, compte tenu de l'abondante littérature scientifique sur le sujet, l'absorption racinaire des cations et anions assurés par des transporteurs est décrite ci-dessous.

Tableau II-4 : Principales formes d'absorption des éléments minéraux essentiels.
Adapté de (Mengel *et al.*, 2001; Marschner, 2012)

	Nutriments	**Forme d'absorption**
Groupe 1	C, H, O, N, S	En tant qu'ions à partir de la solution du sol ou gaz à partir de l'atmosphère CO_2, HCO_3^-, H_2O, O_2, NO_3^-, NH_4^+, N_2, SO_4^{2-}, SO_2
Groupe 2	P, B, Si	Phosphates, acide borique ou borate, acide silicique de la solution du sol
Groupe 3	K, Na, Ca, Mg, Mn, Cl	Sous forme d'ions à partir de la solution du sol
Groupe 4	Fe, Cu, Zn, Mo	Sous forme d'ions ou de chélates de la solution du sol

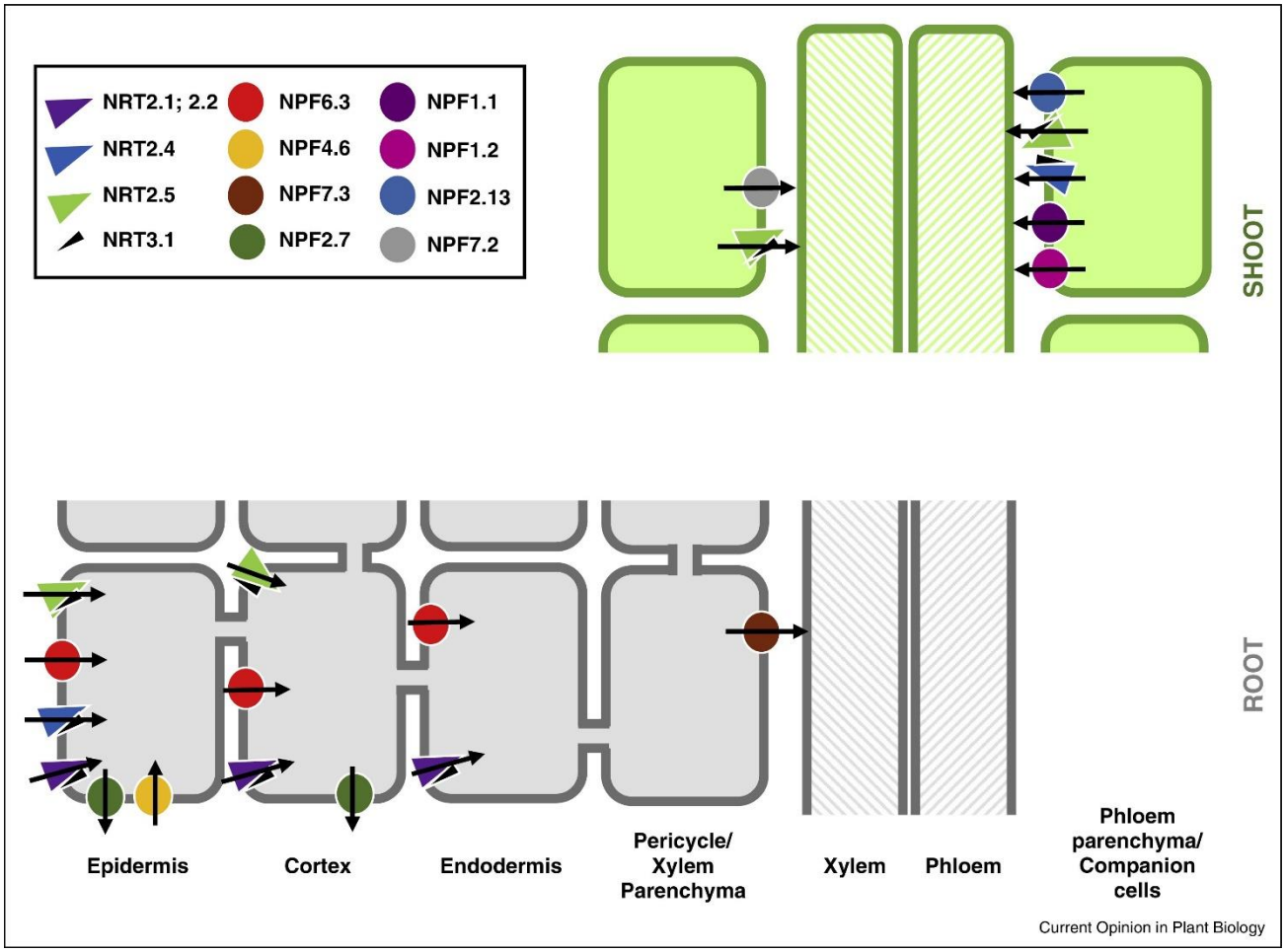


Figure II-5. Localisations racinaire et aérienne des transporteurs de nitrate chez *Arabidopssis thaliana*. Les membres des familles NRT2, NRT3 et de la famille des transporteurs de nitrate/peptide NPF sont impliqués dans l'absorption racinaire (*i.e.* influx) du nitrate du sol, dans son exportation (*i.e.* efflux) des racines vers le sol et dans la distribution du nitrate entre les différents tissus et organes de la plante. A l'exception de NRT2.4, aucune localisation polarisée de ces transporteurs n'a été observée. Figure issue de Krapp (2015) et adaptée de (Wang et al., 2012).

b. *L'absorption des anions monovalents*

L'azote est prélevé par les racines principalement sous forme de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) mais peut également être absorbé sous forme d'acides aminés ou de peptides (Ganeteg *et al.*, 2017) et peut, de plus, via des associations microbiennes telle que celle retrouvée entre les légumineuses (Fabacées) et les rhizobiums, être fixé en quantité substantielle dans des organes racinaires particuliers appelés nodules. L'absorption de ces différentes formes de N est médiée par une myriade de protéines de transport possédant des spécificités et des affinités contrastées, comprenant un système de transport à faible (LATS) et haute affinité (HATS). Ce dernier, fait notamment intervenir pour le nitrate, un transport actif (antiport $2H^+/NO_3^-$) couplé au fonctionnement de pompe H^+ ATPase.

Les premiers transporteurs de nitrate ont été identifiés et caractérisés fonctionnellement depuis plus de 20 ans (Tsay *et al.*, 1993) et ces derniers font toujours l'objet d'études afin d'en comprendre les rôles, fonctionnements, localisations et régulations complexes (Wang *et al.*, 2012; Nacry *et al.*, 2013; Krapp, 2015; Fan *et al.*, 2017; Xuan *et al.*, 2017). En effet, le NO_3^- est généralement la source la plus abondante d'azote dans les sols aérobies, mais cette forme anionique est facilement dissoute dans l'eau et très mobile dans le sol, des propriétés à l'origine d'importantes pertes par lessivage. L'absorption sous forme de NO_3^- par la plante est assurée par un réseau de transporteurs (**Figure II-5)** comprenant quatre familles décrites chez *Arabidopsis. thaliana* :

i) **NPF** (NRT1/PTR[1] Family), une nouvelle nomenclature proposée par Léran *et al.* (2014) sur la base de relations phylogénétiques comprenant des transporteurs de nitrate (ancienne nomenclature NRT1 ou encore initialement CHL1) capables de transporter d'autres molécules (peptides, acides aminés, dicarboxylates, glucosinolates, acide indolacétique (IAA) et abscissique ABA : Léran *et al.*, 2014) ; ii) **NRT2** (nitrate transporter 2) iii) **CLC** (chloride channel) et iv) **SLAC/SLAH** (slow anion channel associated homologs : Krapp *et al.*, 2014).

L'expression des gènes codant les transporteurs de NO_3^- est dépendante du statut azoté de la plante et de la disponibilité de l'azote dans la solution du sol. En quelques minutes seulement, les plantes réagissent aux changements de niveau externe de NO_3^- en modifiant l'expression de centaines à plusieurs milliers de gènes (de Bang *et al.*, 2021).

[1] Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter Family

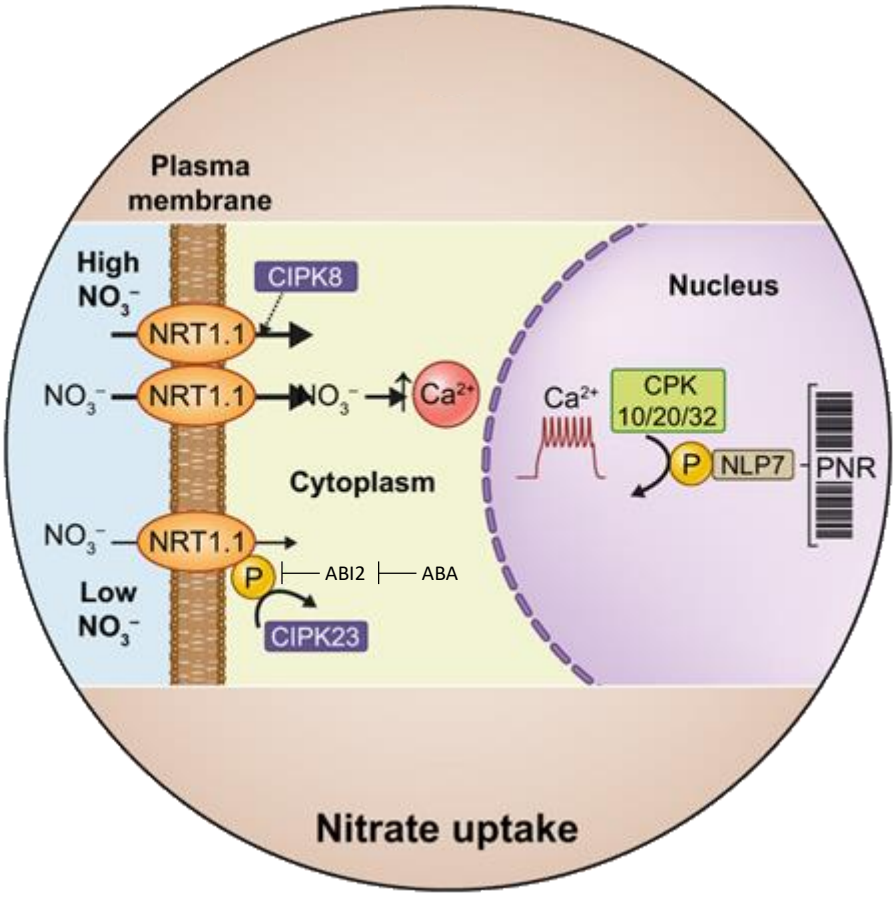


Figure II-6. Régulation du transporteur de NO_3^- à double affinité NPF6.3 (NRT1.1). NPF6.3 est un transporteur de nitrate à double affinité capable de détecter les concentrations externes de nitrate. À des niveaux élevés de NO_3^-, la protéine kinase 8 (CIPK8) régule la déphosphorylation de NRT1.1, provoquant une dimérisation de ce dernier dans un état de faible affinité. La détection du nitrate par NRT1.1 déclenche une cascade de signalisation médiée par le Ca^{2+} transmise par trois protéines kinases capteur de calcium (CPK) CPK10, CPK30 et CPK32, qui se déplacent vers le noyau et sont à l'origine de la phosphorylation de la protéine 7 de type Nin (NLP7) dans le noyau et ayant pour conséquence, l'expression de centaines de gènes dans le cadre de la réponse primaire au nitrate (PNR). À faible niveau externe de NO_3^-, CIPK23 phosphoryle NRT1.1 résultant en un état monomère présentant une forte affinité. Les effets de CIPK23 sont contrebalancés par l'ABI2, une phosphatase inhibée par l'acide abscissique (ABA). D'après de Bang *et al.* (2021)

Par exemple, le transporteur de nitrate à double affinité NPF6.3 (NRT1.1), dont la fonction est modulée par phosphorylation (**Figure II-6**) détecte les concentrations externes de nitrate (Krapp *et al.*, 2014). Chez *Arabidospsis*, l'expression du gène *NRT1.1* est induite par la présence de nitrate, et est réprimée lors d'une période de carence (Lejay *et al.*, 1999). De plus, les produits de l'assimilation du nitrate tels que l'ammonium et les acides aminés exerceraient une régulation négative de ce transporteur (Vidmar *et al.*, 2000), quand certains issus de la photosynthèse, comme le saccharose, exerceraient une régulation positive (Lejay *et al.*, 1999). Plus récemment enfin, le rôle de NRT1.1 dans le transport d'auxine et son impact sur la croissance des racines latérales a également été mis en évidence (Krouk *et al.*, 2010).

Les protéines NRT2, sont également capables de transporter les ions NO_3^- et leur activité supplante celle de NRT1 à mesure que la disponibilité en azote diminue. Appartenant au système HATS, sept transporteurs de nitrate de haute affinité (NRT2.1-NRT2.7) ont ainsi été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2012) et plus récemment 17 membres ont été détectés chez *Brassica napus* (Tong *et al.*, 2020). Chez *Arabidpsosis,* ces gènes sont bien décrits et comprennent trois catégories :

i. Des gènes dont l'expression augmente dans un premier temps en réponse à la présence de NO_3^-, avant d'être réprimés (*AtNRT2.1 et AtNRT2.2)*
ii. Des gènes dont l'expression est réprimée en présence de NO_3^- (*AtNRT2.4* et *AtNRT2.7*).
iii. Des gènes exprimés de façon constitutive ne présentant aucun phénomène d'induction par le NO_3^- (*AtNRT2.5* et *AtNRT2.6*).

À ce jour, AtNRT2.1, AtNRT2.2 et AtNRT2.4 sont connus pour être directement impliqués dans l'absorption de NO_3^- par les racines quand, pour sa part, AtNRT2.4 contribue également au chargement des vaisseaux du phloème (**Figure II-5**). De nombreux membres de la famille NRT2 sont néanmoins incapables de transporter le NO_3^- seul et nécessitent une protéine partenaire, NAR2 (nitrate assimilation related protein) également nommée NRT3 (**Figure II-5**).

Derniers types de transporteurs de nitrate, les protéines SLAC/SLAH et CLC comprennent des canaux à anions monovalents capables de transporter à la fois les ions NO_3^- et Cl^-. La famille des premières comprend cinq membres présentant une forte affinité pour le NO_3^-, SLAC1 et SLAH1–SLAH4 (Krapp *et al.*, 2014). Les gènes *SLAC1* et *SLAH3* codent pour des canaux anioniques retrouvés dans les cellules de garde et sont impliqués dans la fermeture des stomates (Geiger *et al.*, 2009) tandis que *SLAH2* est exprimé au niveau racinaire et facilite la

translocation de NO_3^- des racines aux parties aériennes (Maierhofer *et al.*, 2014). Les seconds présentent à l'inverse une forte affinité pour les ions Cl^- et comptent sept membres chez *Arabidospsis*, dont CLCa, un anti-porteur 2 NO_3^-/1 H^+ localisé au niveau du tonoplaste et dont le rôle est essentiel dans l'accumulation de NO_3^-dans la vacuole (De Angeli *et al.*, 2006, 2009).

Enfin, une fois absorbé, l'azote est soit réduit pour être assimilé directement dans les racines, soit stocké dans la vacuole, soit transféré aux parties aériennes via le xylème. Le NO_3^- est d'abord réduit en NO_2^- par la nitrate réductase (NR) dans le cytosol, puis réduit et converti en NH_4^+ par la nitrite réductase (NiR) dans les plastes ou les chloroplastes. Le NH_4^+ formé est, avec celui généré par d'autres processus tels que la photorespiration, le catabolisme des protéines et la biosynthèse de la lignine, assimilé en glutamine par la glutamine synthétase (GS). Dans les parties aériennes, l'azote est stocké, métabolisé ou encore transféré via le phloème vers des puits d'azote, tels que les feuilles, les racines, les fruits et les graines en développement. La majorité de l'azote est alors retrouvé dans les chloroplastes au sein de la RuBisCo, de protéines du photosystème et de la chlorophylle.

Le phosphore est un élément structurel essentiel aux biomolécules impliquées dans le métabolisme énergétique (ATP, NADP), au sein des acides nucléiques (ADN, ARN) et des phospholipides des membranes cellulaires. De plus, l'hydrolyse de la liaison P–O–P dans l'adénosine triphosphate (ATP) pour produire de l'ADP et du phosphate inorganique (Pi) est la principale source d'énergie biochimique de la cellule (Kamerlin *et al.*, 2013). Enfin, de nombreuses enzymes catalysent des processus de phosphorylation et déphosphorylation faisant intervenir des groupements phosphates. En effet, environ un tiers de toutes les protéines de la cellule végétale sont phosphorylées à un moment donné (Manning *et al.*, 2002), affectant ainsi leur activité afin de les stabiliser, faciliter ou inhiber leur mouvement entre compartiments subcellulaires, réguler les interactions protéine-protéine ou encore conduire à leur dégradation.

Tout comme l'azote, le phosphore est donc notamment prélevé sous forme d'anion monovalent $H_2PO_4^-$ mais également sous la forme d'anion bivalent HPO_4^{2-} (Schachtman *et al.*, 1998). L'acquisition du phosphore par les plantes est soumise à plusieurs contraintes. Au niveau du sol d'abord, seul le phosphate inorganique (Pi) est assimilable directement par la plante et ce dernier est présent en très faibles concentrations (moins de 0,01 mmol/L). Le phosphate organique quant à lui, est présent en plus grande quantité, mais est largement adsorbé sur les particules du sol et nécessite d'être hydrolysé avant de pouvoir être absorbé, notamment par des phosphatases exsudées par les racines ou issues de microorganismes du sol (Lambers and Plaxton, 2015). De plus, l'acquisition du P est finement régulée au niveau racinaire, son

absorption en trop grande quantité engendre une phytotoxicité chez la plante et restreint l'absorption d'autres éléments, phénomènes qui seront explicités dans la partie III-1-a. Les transporteurs de Pi sont regroupés en cinq sous-familles phylogénétiquement distinctes, désignées PHT1 à PHT5. L'absorption du Pi est principalement assurée par des symporteurs $H_2PO_4^-/H^+$ appartenant à la famille PHT1 et est donc étroitement associée à l'activité de pompes H^+-ATPase, à l'origine d'un gradient de protons à travers la membrane (Nussaume *et al.*, 2011, page 1; Li *et al.*, 2019, page 1). Cette famille de transporteurs PHT1 est codée par une famille multigénique, chez Arabidopsis par exemple, elle comprend neuf membres (*AtPHT1;1* à *AtPHT1;9*) dont huit sont exprimés aux niveau racinaire (excepté *AtPHT1;6)* (Lapis-Gaza *et al.*, 2014). C'est par le biais de la génétique inversée que le rôle prépondérant des transporteurs de la famille PHT1 a été mis en évidence. Chez *Arabidopsis thaliana,* en présence d'une concentration élevée de Pi, les mutants knock-out (KO) *AtPHT1;1* et *AtPHT1;4* absorbent respectivement 20% et 40% moins de Pi que le type sauvage, le double mutant atteignant quant à lui 75% de réduction de l'absorption (Shin *et al.*, 2004). Dans un milieu appauvri en Pi, le rôle d'*AtPHT1;4* est alors prépondérant, ce dernier est responsable de plus d'un tiers de l'absorption de Pi par la plante, *AtPHT1;1* ne contribuant plus qu'à environ 15% de son acquisition. L'expression des gènes de la famille PHT1 est induite lors d'un faible apport de P (Gojon *et al.*, 2009) et leur régulation suit un schéma complexe récemment revue par Gu *et al.* (2016). Le Pi acquis par les racines via ces transporteurs est ensuite acheminé vers les parties aériennes suite à son chargement dans le xylème, processus impliquant son exportation grâce à une autre famille de transporteurs nommée PHO1 (Hamburger *et al.*, 2002).

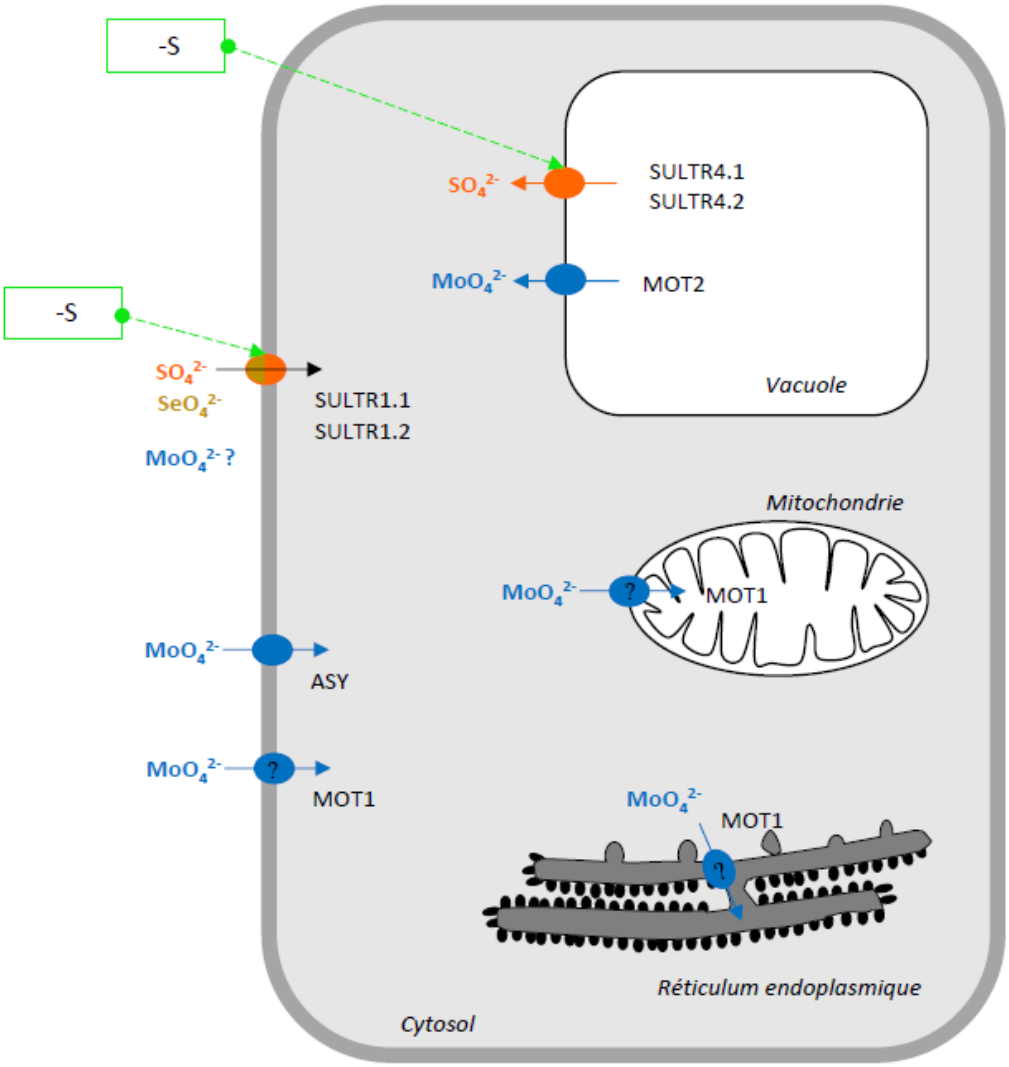


Figure II-7. Principaux transporteurs de S (orange), Mo (bleu) et Se (jaune) identifiés ainsi que leurs localisations cellulaires supposées. Le sens du transport (influx ou efflux) de l'élément est indiqué par une flèche. Les points d'interrogation désignent les localisations hypothétiques du transporteur MOT1. L'effet d'une carence en S sur la surexpression des gènes codant les transporteurs pointés est indiqué par des flèches vertes. D'après (Gigolashvili et Kopriva, 2014).

c. *L'absorption des anions bivalents*

Parmi les éléments prélevés sous forme d'anion bivalents, sont notamment retrouvés le **soufre**, le **molybdène** et le **sélénium** prélevés principalement sous formes de sulfate (SO_4^{2-}), de molybdate (MoO_4^{2-}) et de sélénate (SeO_4^{2-}) à partir de la solution du sol.

Les plantes possèdent une famille de transporteurs de SO_4^{2-} nommé SULTR (sulfate transporter), qui interviennent dans son absorption au niveau racinaire et sa distribution au sein des différents tissus (Smith *et al.*, 1995). Les SULTR sont composés de quatre sous-familles présentant une importante similarité (60%) de séquence : les sous-familles SULTR1 (haute affinité) et SULTR2 (faible affinité) sont principalement responsables de l'absorption du SO_4^{2-} au niveau racinaire et de son transport des racines aux parties aériennes (Takahashi *et al.*, 2000); les SULTR3 facilitent l'absorption du SO_4^{2-} dans les chloroplastes (Cao *et al.*, 2013) mais possèdent également des rôles encore non élucidés à ce jour; enfin, les SULTR4 sont localisés au niveau du tonoplaste et permettent la libération du SO_4^{2-} stocké au niveau vacuolaire dans le cytosol (Kataoka *et al.*, 2004) (**Figure II-7**). Ces transporteurs sont couplés au mouvement d'ions H^+ (symports H^+/SO_4^{2-}) et possèdent un domaine cytosolique C-terminal nommé STAS (Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist) (Wang *et al.*, 2021) important afin d'assurer leur incorporation dans la membrane, leur activité et leurs interactions avec d'autres protéines (Shibagaki and Grossman, 2006). Initialement, plusieurs gènes présentant des similitudes de séquences avec les SULTR mais ne possédant pas de domaine STAS constituaient alors un cinquième groupe, requalifié aujourd'hui en transporteurs de molybdène puisque leur rôle dans le transport de sulfate n'a pas été confirmé.

Ainsi, SULTR5.2 a donc été renommé MOT1, depuis qu'il a été identifié comme le premier transporteur de molybdate chez *Clamydomonas reinhardtii* (Tejada-Jiménez *et al.*, 2007) et *A. thaliana* (Tomatsu *et al.*, 2007; Baxter *et al.*, 2008*a*). La localisation de MOT1 reste encore à confirmer, outre une localisation au niveau de la membrane plasmique, MOT1 a également été retrouvé dans des vésicules du système endomembranaire et au niveau mitochondrial (Baxter et al. 2008) (**Figure II-7**). La transcription et l'activité de *CrMOT1* ne dépendent pas de la disponibilité du Mo, mais sont régulées par la présence du nitrate (Tejada-Jiménez *et al.*, 2007), l'enzyme nitrate réductase (NR) étant en partie composée de Mo. Un autre transporteur de Mo (MOT2), localisé au niveau vacuolaire, est quant à lui impliqué dans l'exportation du Mo vers le cytosol (**Figure II-7**). Contrairement à CrMOT1, la transcription de CrMOT2 est augmentée lors d'une disponibilité réduite de Mo.

Une recherche d'homologie a ainsi révélé, sur la base de similarités de séquences, que le gène *ASY* (Abnormal Shoot in Youth) code chez le riz, un homologue du gène *CrMOT2* responsable du transport de molybdate (Hibara *et al.*, 2013). Son absorption est également assurée par SHST1, un transporteur de sulfate du groupe 1, caractérisé chez *Stylosanthes hamata* (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Ces relations étroites avec les transporteurs de S ont été largement discutées dans la littérature, révélant également la possibilité d'une absorption non spécifique de Mo via des transporteurs de sulfate (Maillard *et al.*, 2016*b*). En effet, l'absorption du sulfate est régulée en fonction du statut nutritionnel de la plante et de la disponibilité en S. Une diminution de cette dernière entraîne une surexpression des gènes codant les transporteurs de sulfate afin d'augmenter sa capacité d'absorption (Davidian and Kopriva, 2010) mais entraine donc également lors de carence une importante élévation de la teneur en Mo des tissus (Maillard *et al.*, 2016*b*). Il en est de même pour le Se, pour lequel à l'heure actuelle, aucun transporteur spécifique n'a été identifié et qui est donc principalement absorbé via deux transporteurs de sulfate SULTR1;1 et SULTR1;2, (White, 2018).

d. L'absorption des cations monovalents

L'azote, comme indiqué dans la partie absorption des anions monovalents, est également prélevé sous forme d'ammonium NH_4^+. Ce dernier est principalement absorbé par les transporteurs à haute affinité codés par la famille des gènes AMT1. Chez Arabidopsis, cette famille comprend cinq membres dont les plus étudiés sont *AtAmt1.1*, *AtAmt1.2* et *AtAmt1.3* (Gazzarrini *et al.*, 1999). En effet, l'expression de ces gènes est principalement régulée par la concentration en N du sol (Gansel *et al.*, 2001), le niveau de transcrits de *AtAmt1.1* et *AtAmt1.3* par exemple, augmente fortement lors d'une carence azotée (Rawat *et al.*, 1999).

Le **potassium** et le **sodium** présentent d'importantes similarités structurelle et chimique, ces deux éléments sont notamment absorbés sous forme de cations monovalents : K^+ et Na^+ (Benito *et al.*, 2014). Le **potassium** est le cation le plus abondant dans les cellules végétales, sa concentration dans la solution du sol varie entre 1 et 10 mM alors que sa concentration intracellulaire est maintenue à 100-200 mM. Par conséquent, l'absorption de K à partir du sol s'effectue contre un gradient de concentration (Anschütz *et al.*, 2014). Les transporteurs supposés de K^+ sont alors regroupés en quatre familles : HAK/KT/KUP (symporteurs K^+/H^+), HKT (symporteurs K^+/Na^+), CHX (antiporteurs cation/H^+) et les canaux de Shaker (Nieves-Cordones *et al.*, 2014). La famille HAK/KT/KUP comprend des transporteurs de haute affinité (HATS, High-affinity transporter system) dont, chez Arabidopsis, 10 des 13 gènes codant KT/KUP sont exprimés au niveau des poils absorbants et participent activement à l'influx de

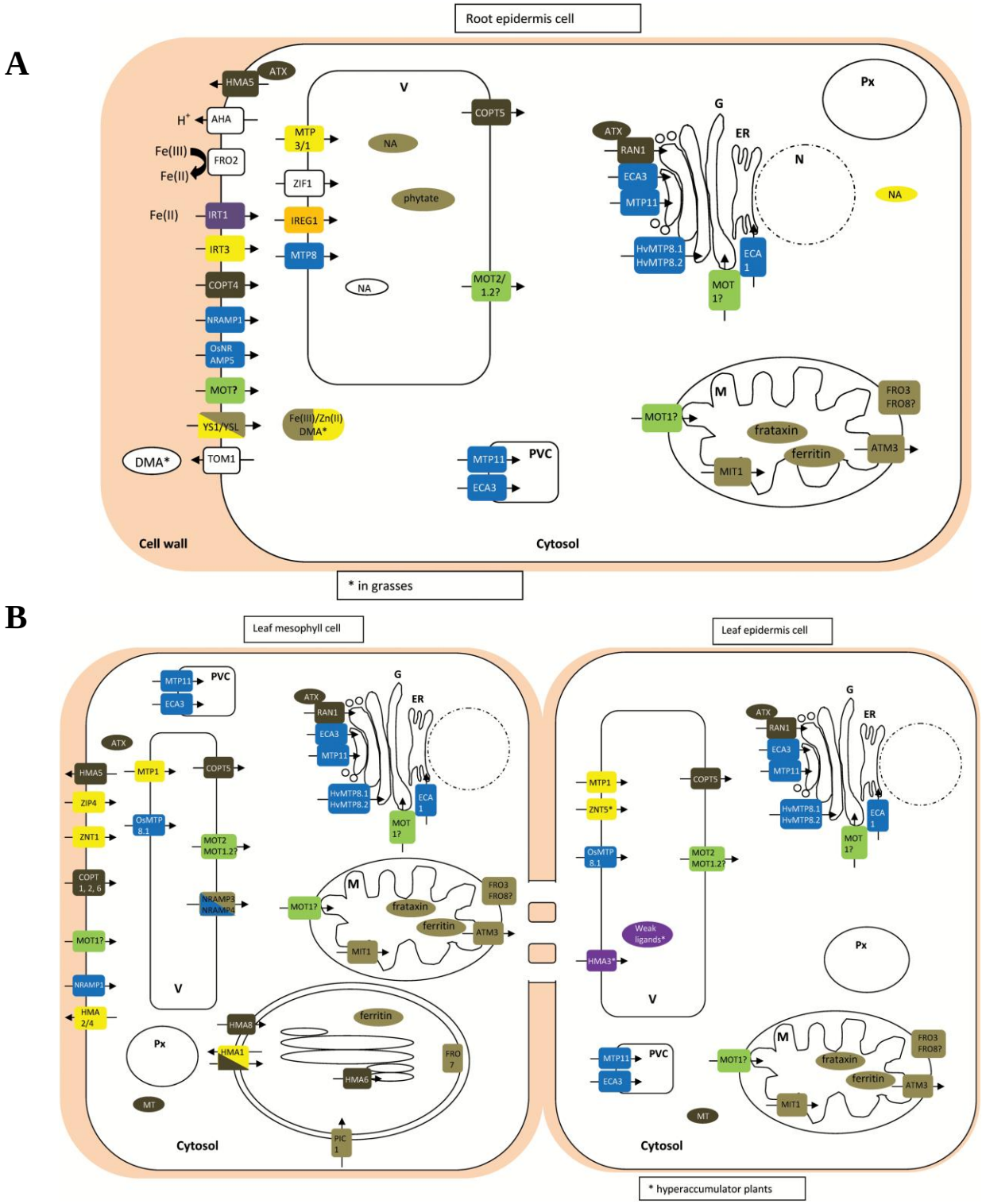


Figure II-8. Principaux transporteurs de microéléments et leur ligand éventuel dans une cellule d'épiderme racinaire (A) ou une cellule épidermique associée à une cellule du mésophylle d'une feuille (B). Les rectangles représentent les transporteurs membranaires et les objets ovales leur ligand respectif. Les principaux ions métalliques transportés sont représentés comme suit : gris foncé, Cu; brun , Fe; bleu, Mn ; vert, Mo ; orange, Ni; jaune, Zn; violet, large gamme de substrats; blanc, indirectement impliqué dans le transport des métaux. Les transporteurs comportant deux couleurs indiquent les deux métaux principalement transportés. La direction des flèches indique la direction du transport : à l'intérieur ou hors de la cellule/organite. V, vacuole ; PVC, compartiment pré-vacuolaire ; M, mitochondrie ; G, réseau de Golgi ; RE, réticulum endoplasmique ; N, noyau ; Px, peroxysome. Les transporteurs ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (pas de préfixe), sauf mention contraire (Os, *Oryza sativum*, Hv, *Hordeum vulgare*). D'après Andresen *et al*. (2018)

K^+ dans les racines depuis le sol. De leur côté, les canaux de Shaker codés notamment par *AtAKT1* et *AtKC1* chez Arabidopsis, affichent une très forte sélectivité pour le K. Ainsi, les transporteurs HAK/KT/KUP et les canaux de Shaker sont responsables de la quasi-totalité de l'influx de K dans les racines (Nieves-Cordones *et al.*, 2014). En effet, l'importance des transporteurs HKT dans l'absorption de K n'est pas encore parfaitement établie. La famille HKT, initialement caractérisée chez le blé comme des symporteurs H^+/K^+ possède aujourd'hui une dénomination qui ne semble plus adaptée puisque ces derniers sont également capables de se comporter comme des symporteurs K^+/Na^+ et présentent, de plus, une affinité élevée pour le Na^+ lorsque la concentration de ce dernier augmente dans le milieu (Benito *et al.*, 2014; Véry *et al.*, 2014). Ainsi, plusieurs types de transporteurs sont donc impliqués dans l'absorption des deux éléments, c'est effectivement le cas des HKT (high-affinity K^+ transporters), mais également de certains HAK (high affinity K^+ transporters), LCT (low-affinity cation transporter) ou NSC (non-selective cation channels) (Schachtman et Liu, 1999). Quant à LCT, ce type de transporteur pourrait également faciliter l'absorption du Ca (White and Broadley, 2003).

Le **cuivre** enfin, est également absorbé, en partie, sous forme de cation monovalent Cu^+. Au niveau racinaire, son transport est assuré, entre autres, par des transporteurs de haute affinité de la famille COPT (Copper transporter) comptant six membres identifiés chez Arabidopsis (Andrés-ColÁs *et al.*, 2010). Alors que *COPT1*, *COPT2* et *COPT6* ont des niveaux d'expression plus élevés dans les feuilles, *COPT3* et *COPT5* sont principalement exprimés dans les tiges et *COPT4* dans les racines (**Figure II-8**) (Andresen *et al.*, 2018). L'absorption de Cu est également en partie assurée par les transporteurs de la famille HMA (Heavy Metal transporting P1B-type ATPases) au nombre de 8 chez *A. thaliana*. Parmi ces derniers, HMA 1 et HMA 5 à 8 sont impliqués dans le transport de cations monovalents tel que le Cu^+, contrairement à HMA 2 à 4, impliqués dans le transport de cations bivalents tels que Cd^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Co^{2+}) (**Figure II-8B)**. Outre des transporteurs spécifiques, les membres de la famille des protéines de type ZRT-IRT (Zinc-Regulated Transporter et Iron-Regulated Transporter) également dénommée ZIP peuvent également intervenir dans l'absorption et le transport du Cu chez *Arabidopsis* (del Pozo *et al.*, 2010) (**Figure II-8)**.

e. L'absorption des cations divalents

Le **fer**, le **zinc**, le **cuivre**, le **manganèse**, le **nickel**, le **magnésium** et le **calcium** sont majoritairement prélevés à partir de la solution du sol sous forme de cations bivalents. Ce

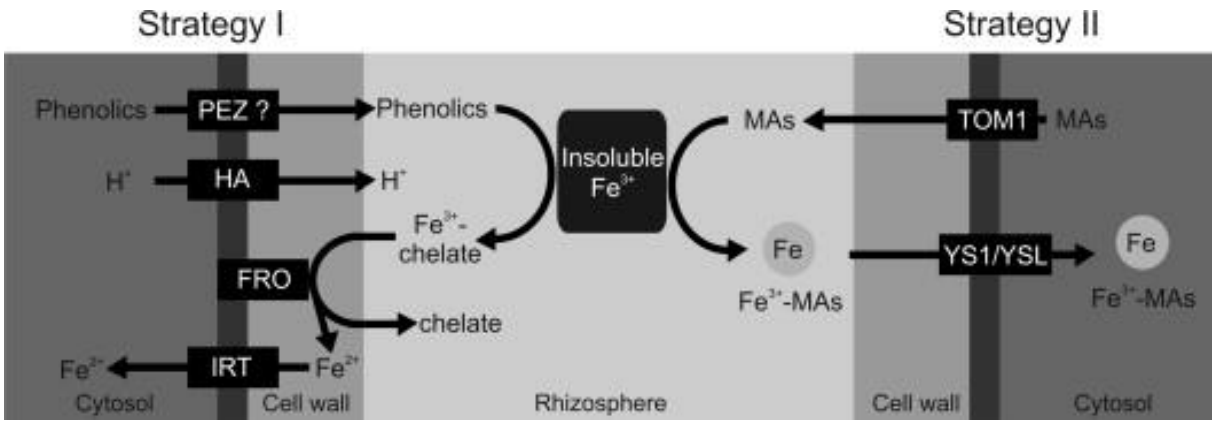


Figure II-9. Stratégies d'acquisition du Fe chez les plantes. Deux grandes catégories peuvent être distinguées selon les espèces végétales : stratégie I chez les plantes non graminées et stratégie II chez les plantes graminées (poacées). Les principaux processus de la **Stratégie I** (rencontrée notamment chez la plante modèle *A. thaliana*) concernent i) l'excrétion de protons et de composés phénoliques par les racines dans la rhizosphère, ii) la réduction des chélates ferriques (Fe^{3+}-chélate) à la surface des racines et iii) l'absorption du fer ferreux (Fe^{2+}) par des transporteurs membranaires. Pour cela, des transporteurs H^+-ATPase (HA) permettent un efflux de protons afin de provoquer l'acidification de la rhizosphère et les PEZ (phénoliques efflux zéro) identifiés notamment chez le riz (Bashir *et al*., 2011) sont impliqués dans la sécrétion des phénols. Ces plantes dépendent de l'activité d'enzymes (notamment FRO2) afin de réduire les chélates ferriques à la surface des racines, puis de transporteurs (IRT1, IRT2 et IRT3 notamment) pour absorber le Fe^{2+} à travers la membrane plasmique de la racine (Vert *et al.*, 2002; Barberon *et al.*, 2014, page 20). La **Stratégie II**, utilisée par les graminées (blé, maïs et riz par exemple), dépend de la biosynthèse et de la sécrétion de phytosidérophores (PS) tels que les acides muginéiques (MA) qui mobilisent Fe grâce notamment à l'expression des gènes *OsTOM1* et *HvTOM1* identifiés respectivement chez le riz et l'orge (Nozoye *et al.*, 2011). Les MAs sécrétées dans la rhizosphère stimulent la solubilisation de Fe^{3+}, permettant la formation de complexes Fe-PS qui peuvent être absorbés par les transporteurs Yellow Sripe (YS) et Yellow Stripe-like (YSL). Bien qu'elles emploient la Stratégie II, certaines graminées peuvent néanmoins présenter des transporteurs permettant l'absorption de Fe^{2+} en plus de son absorption sous forme de Fe^{3+}-MA de Fe. C'est par exemple le cas du riz chez qui les gènes OsIRT1, OsNRAMP1 et OsNRAMP5 ont été identifiés (Ishimaru *et al.*, 2012). D'après Pinto et Ferreira (2015).

transport des métaux divalents s'effectue grâce à un grand nombre de protéines transmembranaires qui présentent, dans leur ensemble, une faible spécificité pour les ligands pris en charge. De façon non exhaustive, seront présentés ci-dessus les principaux systèmes de transports impliqués (**Figure II-8**), récemment détaillés dans la littérature par Pinto et Ferreira (2015) et Andresen *et al.* (2018).

De façon globale, les principales familles de protéines impliquées sont les suivantes (Krämer *et al.*, 2007) : les ZIP (zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter protein), les CDF (Cation Diffusion Facilitator), les NRAMP (Natural Resistant Associated Macrophage Proteins), la famille YSL (Yellow Strip-like), la famille CCC1 (Ca^{2+}-sensitive cross - complementer 1), la famille IREG (iron-regulated protein) ou Férroportine, les CAX (cations exchangers), la famille VIT et les HMA2 à 4. Sont également concernées, trois sous-familles des transporteurs ABC (ATP-binding Cassette) : MRP (Multidrug Resistance-associated Proteins), ATM (ABC Transporters of the Mitochondria) et PDR (Pleiotropic Drug Resistance) dans le transport actif des métaux bivalents en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP.

Parmi ces éléments, le fer est un cas particulier. Bien qu'il soit le métal de transition le plus abondant dans la croûte terrestre, le Fe est principalement présent sous la forme ferrique Fe^{3+}, qui précipite et forme des hydroxydes et des oxydes peu solubles qui par conséquent, sont très peu biodisponibles pour les plantes. Pour assurer l'acquisition de Fe, deux stratégies physiologiques distinctes ont donc émergé chez les plantes, l'une basée sur la réduction de Fe^{3+} et l'autre sur la chélation de Fe^{3+} et nommées respectivement stratégie I et II (**Figure II-9**) (Marschner, 2012). Chez les plantes non graminéennes, qui utilisent la stratégie I, le Fe^{3+} est donc réduit en Fe^{2+} via une réductase des chélates de fer ferrique nommée FRO2, avant que ce dernier ne soit pris en charge par différentes familles de transporteurs de cations divalents. Chez les poacées (stratégie II), les complexes Fe-Phytosidérophore sont quant à eux absorbés par la famille YSL (Yellow Strip – like) (Thomine and Vert, 2013) (**Figure II-8)**. Cette famille de transporteurs est également capable de faire transiter d'autres éléments complexés aux phytosidérophores comme le Zn, le Mn ou encore le Cu.

Les protéines de la famille **ZIP** (ZRT-IRT-like Proteins) sont des transporteurs non spécifiques d'un grand nombre de métaux tels que Fe^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+} et Co^{2+} (**Figure II-8)**. Au sein de cette dernière, le transporteur IRT1 représente la principale voie d'absorption des ions Fe^{2+} chez les plantes non graminéennes telle que la plante modèle *A. thaliana* (Vert *et al.*, 2002). Néanmoins, son manque de spécificité a été révélé lors des premiers travaux sur la

surexpression d'IRT1, qui se produit notamment lors d'une carence en Fe, une absorption concomitante d'autres ions tel que Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} et Cu^{2+} (Korshunova *et al.*, 1999). L'absorption de Zn^{2+} dans les cellules racinaires est quant à elle principalement assuré par IRT3, également peu spécifique et capable d'opérer le transport du Fe^{2+} en plus du Zn^{2+} (**Figure II-8)**. L'expression d'IRT3 est en outre, fortement augmentée en réponse à une carence en Zn. Dans cette famille, le gène *AtZIP4* partage plus de 50 % d'homologie avec *AtIRT1* et code quant à lui, un transporteur impliqué dans le mouvement de Zn^{2+} et de Cu^{2+}. Un autre transporteur ZIP2 serait quant à lui impliqué dans l'acquisition racinaire du Cu. Les gènes *ZIP2* et *ZIP4* sont surexprimés en cas de carence en Zn et en Cu. Bien qu'importants et omniprésents pour le transport de nombreux ions métalliques, aucune structure tridimensionnelle de protéines ZIP n'est encore détaillée, leur mécanisme de transport des métaux est par conséquent, encore largement inconnu (Andresen *et al.*, 2018).

Les **NRAMP** (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) constituent également une famille de protéines ubiquistes retrouvées au sein de tous les règnes phylogénétiques et impliquées dans le transport des ions métalliques. Chez la plante, NRAMP1 s'est avéré être essentiel pour l'absorption du Mn par *A. thaliana* (Cailliatte *et al.*, 2010) (**Figure II-8)**. NRAMP1 est également un transporteur peu sélectif, capable de faire transiter le Fe et d'assurer la survie d'un mutant *IRT1*. En lien avec cette faible sélectivité, des travaux ont alors également démontré le rôle des protéines AtNRAMP1 mais également 3 et 4 dans l'absorption du Cd (Thomine *et al.*, 2000), la surexpression d'*AtNRAMP3* provoquant chez *A. thaliana* une phytotoxicité en raison d'un transport accru du Cd vacuolaire vers le cytosol (Thomine *et al.*, 2003). Néanmoins, ces derniers possèdent un rôle prépondérant, notamment lors de la germination, NRAMP3 et NRAMP4 localisés au niveau du tonoplaste sont impliqués dans le déchargement de la vacuole en Fe (Lanquar *et al.*, 2005) et les gènes codant ces transporteurs sont induits en cas de carence en Fe.

Les gènes de la **famille CCC** (Ca^{2+}-sensitive cross complementer) codent pour des transporteurs dont le rôle est quant à eux, opposé à celui des NRAMP, permettant l'accumulation vacuolaire des éléments. Chez la levure, le transporteur CCC1 est, par exemple, capable de transporter le Fe^{2+} et le Mn^{2+} depuis le cytosol vers la vacuole. Chez *Arabidopsis*, l'homologue identifié de CCC1 (58 % de similarité de séquence) est nommé VIT1 (Grotz and Guerinot, 2006).

Les gènes de la **famille CDF** (cations diffusion facilitator) également nommés **MTP** (Metal Tolerance Protein) encodent des antiports H^+/cation bivalent dont les membres contrôlent également le transport des métaux dans la vacuole (Colangelo and Guerinot, 2006). Le premier

transporteur de la famille CDF à avoir été identifié est ZAT1, dorénavant renommé MTP1, qui avec MTP3 (**Figure II-8)** permettent la séquestration vacuolaire du Zn lorsque celui-ci est retrouvé en excès.

Trois protéines de la famille **IREG** ou **ferroportines** ont été identifiées chez *A. thaliana*. *AtIREG1* code un transporteur localisé dans la membrane plasmique des cellules de la stèle et pourrait être impliqué dans la distribution longue distance des métaux (Morrissey *et al.*, 2009) Le second, IREG2, est un transporteur tonoplastique permettant l'influx vacuolaire du Fe, du Ni et du Co et enfin IREG3, également nommé MAR1, est impliqué dans l'influx chloroplastique du Fe (Yruela, 2013). Le gène *AtMAR1* codant ce dernier, est sous-exprimé lors d'une carence en Fe, alors qu'à l'inverse, *AtIREG2* est quant à lui surexprimé (Schaaf *et al.*, 2006; Conte and Lloyd, 2010).

Les transporteurs de la famille **CAX** (calcium exchanger) sont des antiports qui échangent le Na^+ ou un proton H^+ contre des cations tels que Ca^{2+}, Mn^{2+} ou Cd^{2+}. Onze gènes ont été identifiés à ce jour chez *A. thaliana*, dont les protéines codées assurent notamment un rôle important dans la séquestration vacuolaire des métaux retrouvés en excès dans le cytoplasme (Krämer *et al.*, 2007). Le Ca peut également être transporté par un grand nombre de familles de transporteurs parmi lesquelles deux familles de pompes ioniques à Ca^{2+} ont été plus particulièrement décrites (White and Broadley, 2003). Quatre membres de la première (ECA1 à ECA4) et dix membres de la seconde (ACA1, 2 et 4 et ACA7 à ACA13) ont été identifiés chez *Arabidopsis*, avec des localisation diverses (membrane plasmique, tonoplaste, système endomembranaire et plaste) (**Figure II-8)**. Il existe également des canaux perméables au Ca classés en trois familles : DACC (depolarization-activated cation channels), HACC (hyperpolarization-activated cation channels) et VICC (voltage-independant cation channels) dont pour cette dernière, tous les membres sont perméables à la fois aux cations divalents et aux cations monovalents. Enfin, plusieurs canaux hautement sélectifs au Ca (IP3, IP6 ou cADPR), localisés dans le tonoplaste, contrôlent l'influx du Ca^{2+} dans le cytoplasme.

Enfin, la famille **MGT (**magnesium transport) code des transporteurs à haute affinité localisés au niveau de la membrane plasmique chez *A. thaliana* et qui seraient responsables de la plus grande part de l'absorption du Mg (Li *et al.*, 2001). Au sein de cette famille, MGT2 et MGT3 sont impliqués dans le stockage vacuolaire de Mg^{2+} (Conn *et al.*, 2011), MGT5 dans l'influx de Mg^{2+} dans les mitochondries (Li *et al.*, 2008), MGT7 serait localisé au niveau du système endomembranaire des cellules racinaires (Mao *et al.*, 2008) et MGT10 est retrouvé au niveau de la membrane plastidiale (Drummond *et al.*, 2006).

II. Le ionome

1. Quantification multiélémentaire et émergence de la notion de ionome

La notion de ionome, initialement proposée par Lahner *et al.* (2003), se définit comme l'étude des composés métalliques, non métalliques et métalloïdes dans les organismes vivants, rendue possible par l'émergence de technologies d'analyses élémentaires à haut débit. Néanmoins, l'analyse de ce contenu nécessite une instrumentation sophistiquée pour effectuer la mesure quantitative et simultanée d'un grand nombre d'éléments dans des échantillons d'origines diverses. Les techniques d'analyses employées en ionomique se divisent en deux groupes, celles qui reposent principalement sur les propriétés électroniques (spectroscopie d'émission, d'absorption et de fluorescence) ou nucléaires (ratio isotopique) de l'atome.

Au cours des deux dernières décennies, c'est donc le développement et la calibration de techniques d'analyses telles que la spectrométrie optique ICP-OES (Inductively coupled Plasma Optical Emission Spectrometry), de masse ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) ou à fluorescence X (XRF) qui ont permis la mise en œuvre de quantifications rapides et simultanées d'une grande quantité d'éléments minéraux à partir de tissus végétaux. Alliant un débit relativement élevé à une diminution progressive des coûts, l'analyse ionomique a alors gagné en popularité en tant qu'outil permettant d'étudier le métabolisme et l'homéostasie de divers ions ou minéraux dans un large spectre d'espèces végétales comme animales. Par conséquent, la notion de ionome a progressivement évolué, définie par Salt *et al*. (2008) comme "la composition élémentaire d'une structure subcellulaire, d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme […] composée par l'ensemble des éléments nutritifs minéraux et oligo-éléments", dont l'étude permet également, selon ses auteurs, de capturer des informations permettant de définir l'état fonctionnel d'un organisme dans différentes conditions environnementales (stress biotiques et abiotiques), sous le contrôle des facteurs génétiques et développementaux.

Effectivement, l'analyse ionomique revêt progressivement un fort potentiel permettant d'étudier non seulement un ionome dit "fonctionnel" défini comme "tous les éléments minéraux essentiels à la vie" (White *et al.*, 2017), mais également pour l'analyse de sa régulation via l'étude fonctionnelle des gènes et des réseaux de gènes qui contrôlent directement le ionome (Whitt *et al.*, 2020), ainsi que les réseaux de gènes, plus étendus, qui contrôlent le développement de la plante. Afin de prendre en compte cette notion dynamique du ionome, ce dernier est définis par Baxter (2009) comme "un réseau d'éléments minéraux contrôlé par un réseau de gènes essentiels pour l'absorption, la liaison, le transport et la séquestration"



Figure II-10. Les applications de la ionomique pour la santé humaine et l'agriculture. D'après Ali et al. (2021).

mécanismes qui sont eux-mêmes dépendants de facteurs génétiques et environnementaux (Salt *et al.*, 2008; Baxter, 2009; Williams and Salt, 2009).

Au sens plus large, l'étude du ionome d'un organisme vise donc à quantifier autant d'éléments que possible afin de déterminer comment le métabolisme, la génétique, le développement et l'environnement influencent la composition élémentaire d'organismes, d'organes, de tissus et de différents types cellulaires (Salt, 2004; Salt *et al.*, 2008; Baxter, 2009; Williams et Salt, 2009; White *et al.*, 2017)

2. Le ionome : outil d'étude du statut nutritionnel

La ionomomique, dont la définition a progressivement évolué ces deux dernières décennies, se révèle aujourd'hui être bien plus que l'observation simultanée de la teneur d'un grand nombre d'éléments (**Figure II-10**). Elle se mue aujourd'hui en un domaine multidisciplinaire permettant d'étudier les interactions entre éléments (Kumar *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2021), de détecter le statut nutritionnel de la plante (Baxter *et al.*, 2008*b*) ou encore de mettre en évidence des gènes (Sasaki *et al.*, 2016; Whitt *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2021) liés à l'absorption des éléments, leur transport et leur rôle dans la résilience des plantes aux contraintes biotiques et abiotiques (Ali *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2021).

En effet, en partant du postulat que les interactions génotype x environnement sont à même d'influencer la disponibilité des éléments ou les mécanismes impliqués dans leur absorption, ces dernières pourraient engendrer des variations spécifiques du ionome qu'il serait possible d'identifier. L'une des premières démonstrations de cette possibilité résulte alors des travaux de Baxter *et al.* (2008), démontrant qu'une carence en Fe ou en P conduit à des modifications typiques du ionome foliaire d'*Arabidopsis thaliana*. Chez cette espèce en effet, la carence en Fe n'engendre pas de modification de la teneur de cet élément au niveau foliaire, cette dernière est finement régulée pour être maintenue stable, notamment grâce à des remobilisations à partir d'autres tissus. En revanche, elle se traduit par une élévation caractéristique des teneurs foliaires en Mn, Co, Zn et Cd résultant, d'après les auteurs, d'une surexpression au niveau racinaire d'un transporteur de fer (IRT1) capable de transporter également ces éléments (Baxter *et al.*, 2008*b*). Cette étude soulève également le fait que la seule étude de l'élément concerné (ici le Fe dans la carence en Fe), ne permet pas de révéler la présence de la contrainte étudiée.

Des analyses ionomiques et physiologiques de la variation de la teneur en Cd au sein de génotypes de maïs démontrent une accumulation de proline, de composés phénoliques et d'antioxydants, associée à une absorption et une translocation plus élevées de N, P, K, Ca, Mg, Zn et Fe chez le cultivar tolérant (Abbas *et al.*, 2021). Chez la tomate (*Solanum lycopersicum*

L.), l'élévation des teneurs en K^+ et Mg^{2+} s'est révélée être un marqueur ionomique de la tolérance à la combinaison d'un stress salin et thermique (Lopez-Delacalle *et al.*, 2020). L'importante accumulation de Mo au sein du ionome foliaire du colza, se révèle être un indicateur pertinent de la carence en S (Maillard *et al.*, 2016*b*), ne résultant pas du fait d'un transporteur de Mo (MOT1) mais de l'induction de transporteurs de S (SULTR1.1 et SULTR1.2). Enfin, le profilage ionomique chez l'olivier (*Olea europaea L.)* soumis à un stress hydrique, démontre le rôle de l'acide salicylique (SA) dans l'augmentation de l'absorption des macro et microéléments (P, Fe, Mn et Zn) qui, de par leur rôle dans la régulation stomatique, la photosynthèse, le maintien de la stabilité membranaire ou encore l'accumulation d'osmolytes, permettent d'améliorer la résilience des plantes au manque d'eau (Brito *et al.*, 2019).

Le profilage ionomique se prête également au phénotypage à haut débit, qui, lorsqu'il est associé à des approches de génétique quantitative telles que la cartographie des locus de caractères quantitatifs (QTL) ou des études d'association à l'échelle du génome, devient un outil puissant pour la découverte de gènes et potentiellement de leurs fonctions. Chez le maïs, 25 QTL en lien avec les concentrations de neuf éléments minéraux dans les grains ont été détectés et apparaissent comme des cibles privilégiées pour les programmes de biofortification (Baxter *et al.*, 2013). Plus récemment, une analyse de meta-QTL révèle l'identification de 33 QTL en lien avec le ionome chez *Arabidopsis*, dont les régions les plus stables sont notamment retrouvées sur les chromosomes 1, 3 et 5 (Shariatipour *et al.*, 2021).

Enfin, l'association de l'approche ionomique à celle des technologies de génotypage à haut débit, offre également des perspectives quant à l'identification de gènes et réseaux de gènes qui contrôlent de manière coordonnée l'accumulation des éléments et leur répartition au sein de la plante. Combinées, ces approches permettent de mieux comprendre les relations entre les différents éléments (Kumar *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2021) et les réponses de la plante aux conditions environnementales à différents stades de croissance et de développement. Les transporteurs et le réseau qu'ils composent, sont au centre de la plupart des travaux impliqués dans la caractérisation du ionome des plantes (Williams and Salt, 2009). L'identification et la caractérisation de l'ensemble de ces transporteurs restent à l'heure actuelle, encore partielles. A la genèse de la notion de ionome, l'étude du génome *d'Arabidopsis thaliana* de Lahner *et al.* (2003) révélait l'existence d'environ 1 000 transporteurs non caractérisés d'un point de vue fonctionnel, les auteurs estimant qu'environ 5% du génome serait impliqué dans la composition ionomique de feuilles de plantes non stressées. Aujourd'hui, dans le sillon de la mégabase de données ionomiques IonomicHub (Université Purdue, West Lafayette, USA) issus du criblage de mutants d'*Arabidopsis* et d'études sur la variation naturelle du ionome (Bus *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2017, 2021;

Neugebauer *et al.*, 2018), de nombreux gènes régulateurs du ionome ont été identifiés (Sasaki *et al.*, 2016; Whitt *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2021) permettant l'émergence d'une première nomenclature (Know Ionomic Gene) listant 1764 gènes au total, à partir des données obtenues chez *Arabidopsis thaliana* (136), *Oryza sativa* (141), *Medicago truncatula* (176), *Triticum aestivum* (267), *Zea mays* (152) et *Glycine max* (268). Progressivement, la recherche dans le domaine de la ionomique se structure et elle est également associée à l'apparition de nouveaux outils tel qu'IonExplorer (Université de Nottingham, Angleterre) et de modèles de conception de dispositif expérimental et de normalisation de traitement des données (Campos *et al.*, 2021).

Ainsi, le ionome, en particulier foliaire, est considéré comme un outil pertinent afin d'évaluer l'état physiologique des végétaux (Baxter et al., 2008 ; 2009, Salt et al., 2008, Pii et al., 2015). Sous l'influence de multiples processus physiologiques débutant au niveau racinaire et se terminant au niveau aérien, la moindre altération des mécanismes en lien avec l'absorption ou le transport est susceptible de se refléter au niveau du ionome foliaire. Associé à une accessibilité accrue en comparaison aux racines, l'établissement de signatures ionomiques comme marqueurs d'états physiologiques particuliers se révèle être une perspective de recherche prometteuse (Baxter *et al.*, 2008*b*; Pii *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2019; Stich *et al.*, 2020). Elle présuppose d'identifier comment les contraintes biotiques ou abiotiques (carences minérales, stress hydrique, stress thermiques, teneur en CO_2, ozone) affectent de façon spécifique ou non, le ionome des végétaux.

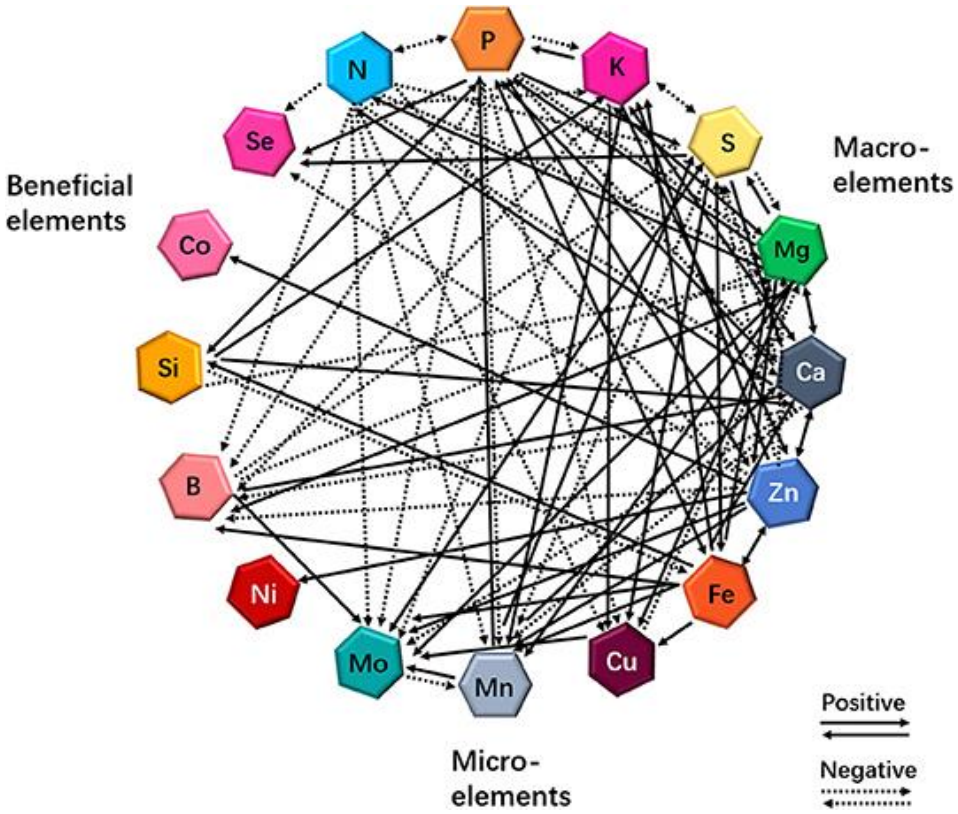


Figure II-11. Interactions entre macroéléments, microéléments et éléments bénéfiques chez les plantes en réponse à une carence minérale individuelle. Les interactions résultant d'une carence en un seul élément conduisent à une absorption accrue (lignes pleines) ou réduite (lignes pointillées) d'autres minéraux. D'après (Fan et al., 2021).

III. Modification du ionome et mécanismes potentiellement impliqués

Un stress abiotique, se définit comme un facteur environnemental contribuant à limiter la croissance et/ou le développement optimal d'un organisme. Ainsi, l'ensemble des facteurs exogènes à même d'intervenir dans la croissance et le développement des plantes peuvent, dans des conditions particulières, devenir des contraintes abiotiques. Il s'agit entre autres de la quantité de lumière interceptée, des fluctuations extrêmes de la disponibilité en eau (sécheresse ou excès d'eau), de la température (stress thermique, stress froid ou gélif), des teneurs atmosphériques en CO_2 et ozone (O_3) ou encore de la carence en éléments minéraux indispensables (détaillé ci-après) ou de leur excès dans le sol (phytotoxicité ou stress salin).

1. Lors de carences minérales

Afin de maintenir l'homéostasie nutritionnelle des plantes, un équilibre finement ajusté de la teneur en minéraux des tissus est obtenu grâce à la régulation des transporteurs racinaires (Andresen *et al.*, 2018) couplée à une translocation des racines aux parties aériennes assurée en partie à travers les cadres de Caspary (Barberon *et al.*, 2016; Barberon, 2017). Les analyses ionomiques permettent de confirmer l'existence d'interactions complexes entre les éléments minéraux dans les plantes. Elles révèlent lors de l'étude de carences nutritionnelles, des interférences qui entrainent une stimulation ou une réduction de l'accumulation d'éléments, à même de modifier la composition ionomique des tissus végétaux. De façon non exhaustives, seront évoquées ci-dessous, certaines des interactions (**Figure II-11**) décrites dans la littérature, qui ont récemment fait l'objet de revues dédiées (Kumar *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2021).

a. Implication des transporteurs racinaires

Il a été démontré chez *Arabidopsis thaliana* que les carences en macroéléments tels que N, K ou S sont associées à une augmentation de l'expression d'un ensemble de gènes modulant la quantité et l'activité des transporteurs racinaires afin d'optimiser l'absorption du macroélément manquant (Gojon *et al.*, 2009). Une carence peut alors provoquer une augmentation de l'expression de gènes codants des transporteurs spécifiques ou non spécifiques de l'élément considéré. Dans ce dernier cas, ces transporteurs conduisent alors, indirectement, à l'absorption d'autres éléments minéraux disponibles.

Parmi les exemples connus de la littérature, il existe des interactions Na/K pour lesquelles des systèmes d'absorption non sélectifs de cations sont capables de transporter à la fois les ions K^+ et Na^+. C'est notamment le cas de HKT1 (high affinity potassium transporter), LCT1 (low-affinity cation transporter) ou encore NSC (non-selective cation channels) identifiés dans les cellules radiculaires d'espèces halophiles (Schachtman et Liu, 1999).

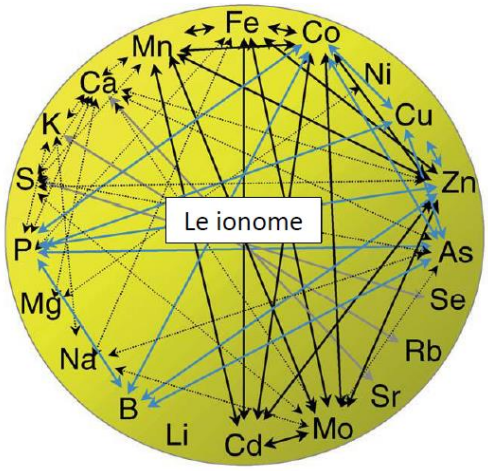


Figure II-12. Interactions élémentaires d'origine génétiques, physiologiques ou chimiques du Fe et du P. Interaction connues du Fe (noir) et P (bleu) mesurées à partir du contenu élémentaire d'*Arabidospsis thaliana* soumis à différents apports de Fe et P. Les analogies chimiques entre éléments sont représentées par des flèches grises comme par exemples celle existant entre K et Rb, Ca et Sr ou S et Se. Cette représentation schématique ne fournit qu'une partie des interactions entre éléments relevées dans la littérature. D'après Baxter *et al.* (2008) et Baxter (2009)

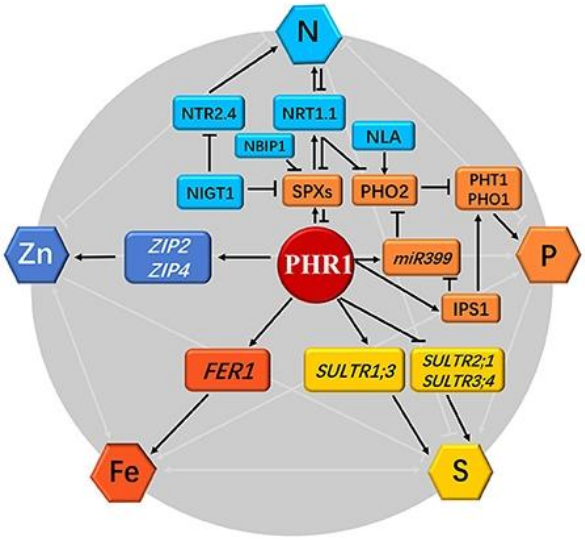


Figure II-13. Représentation schématique de l'effet d'une carence minérale individuelle sur l'homéostasie de N, P, S, Zn et Fe via les réseaux de régulation des gènes chez les plantes. Les flèches unidirectionnelles et les lignes à extrémités plates indiquent respectivement les interactions antagonistes et synergiques. Le facteur de transcription induit par la carence en Pi (PHR1) agit comme un intégrateur des signaux issues de l'homéostasie des éléments N, P, S, Zn et Fe chez les plantes : (1) Au cours d'une carence en Pi, l'activation de PHR1 induit l'expression des transporteurs de Pi PHT1 et PHO1 ainsi que les gènes de réponse à la carence en Pi SPXs, miR399 et IPS1 via les voies PHR1-IPS1 et PHR1-miR399-PHO2. (2) L'approvisionnement en N favorise l'activité de PHR1, cependant, l'expression des SPX est directement réduite dans un tel scénario par NIGT1 (d'après Hu et al., (2019) OsSPX4 chez le riz est dégradé en réponse à l'approvisionnement en N par l'interaction de OsNRT1.1B et OsNBIP1) . Simultanément, l'expression de PHO2 est réprimée en réponse à un N élevé par NIGT1 et NRT1.1. En conséquence, la privation de N entraîne une diminution de l'absorption de Pi dans les plantes en raison de l'inhibition de PHR1 et de l'accumulation de SPX et de PHO2. (3) PHR1 sert également de régulateur transcriptionnel des transporteurs de sulfate. (4) L'homéostasie du Fe végétal dépend également du PHR1, qui régule directement l'expression de la protéine de stockage du Fe FER1. (5) Le transport et l'homéostasie du Zn sont également impliqués d'une manière dépendante de PHR1 ; sous Pi, PHR1 régule positivement l'expression des gènes transporteurs de zinc ZIP2 et ZIP4 en se liant aux éléments cis de P1BS dans ces promoteurs de gènes (Briat et al., 2015 ; Kumar et al., 2021). Les flèches et les lignes plates indiquent les influences positives et négatives, respectivement.

En effet, dans le sol, l'absorption par la plante de chaque cation est largement dépendante de la présence d'autres cations dans la rhizosphère, en particulier pour l'accumulation des métaux alcalins retrouvés en grande quantité comme le K et le Na, respectivement 8^{e} (~2.1%) et 6^{e} (~2.4%) éléments les plus retrouvés au sein de la croûte continentale. Ces derniers partagent des propriétés physicochimiques similaires et entrent en compétition pour les sites de fixation des transporteurs (Benito *et al.*, 2014). Ainsi, lorsqu'il est contenu en forte concentration dans le sol, les plantes vont préférentiellement prélever le Na au détriment du K (Malvi, 2011). En effet, certains transporteurs tels que HKT fonctionnent comme des symporteurs Na^+/K^+ à faibles concentrations externes en Na^+ et K^+, mais ne transportent plus de K^+, devenant ainsi des uniporteurs de Na^+, lorsque la concentration externe de ce dernier augmente (Benito *et al.*, 2014). Contrairement au K, le Na n'est essentiel que pour certaines espèces végétales, mais peut également être bénéfique pour la croissance des plantes à des concentrations relativement faibles ou devenir toxique à des concentrations élevées. De nombreuses plantes non halophytes sont capables d'utiliser métaboliquement le Na mais, dans de nombreux processus biochimiques, ce dernier n'est pas aussi efficace que le K, raison pour laquelle une trop grande substitution de K par Na finit par être délétère au bon fonctionnement des processus biologiques de la cellule végétale (Mateus *et al.*, 2021*a*,*b*; Erel *et al.*, 2014). Contrairement à la cellule animale, il n'y a chez les plantes, aucune évidence nette de la présence de canaux hautement sélectifs en Na^+ faisant dire à Schachtman et Liu (1999) que la majorité du Na^+ pénètre dans le cytoplasme par les canaux potassiques.

Des interactions ont également été mises en évidence, à plusieurs niveaux, entre P et Fe (**Figure II-12 et 13** : Baxter et al., 2008). Au niveau du sol d'abord, le phosphate sous sa forme d'ion HPO_4^{2-} (ou phosphate inorganique Pi) forme un complexe Pi-Fe qui précipite dans le sol et influence négativement la biodisponibilité des deux éléments. Cette interaction peut également avoir lieu au niveau racinaire, entrainant alors cette fois une diminution de la translocation du Pi vers les parties aériennes (Briat *et al.*, 2015).

La faible concentration en Pi entraine également chez *Arabidopsis*, une augmentation de la teneur foliaire en Zn, Fe et arsenic (As) ainsi qu'une diminution des teneurs en B, P, Co et Cu, une modification spécifique du ionome foliaire, qui a d'ailleurs permis de l'établir comme une signature du statut nutritionnel du P (Baxter *et al.*, 2008*b*) sans pour autant que les mécanismes sous-jacents ne soient clairement explicités. Souvent étudiées groupe d'éléments par groupe d'éléments, ces nombreuses interactions impliquant le P ont plus récemment fait l'objet de travaux confirmant ces dernières à l'échelle plus globale du ionome chez *Brassica napus* (Wang

et al., 2020). Rouached *et al.* (2011) révèlent quant à eux, l'effet d'une carence en P se traduisant par une augmentation racinaire concomitante à une diminution foliaire de la teneur en S (SO_4^{2}) sous le contrôle d'un facteur de transcription PHR1 (Phosphate Deficiency Response 1). En définitive, chez le blé et le maïs (Verma and Minhas, 1987) et plus récemment chez *Arabidopsis* (Khan *et al.*, 2014), le P présente également une relation antagoniste avec le Zn, l'augmentation de la concentration de l'un entrainant la diminution de l'autre. Décrite par Marschner (2012) comme une carence en Zn induite par l'élévation du Pi, un déséquilibre de la teneur de ces éléments peut alors se révéler délétère pour la plante, la carence en Zn pouvant provoquer une toxicité du Pi au niveau foliaire qui, en retour, provoque chez le maïs, une séquestration du Zn au niveau racinaire (Bouain *et al.*, 2014).

Les ions sulfate (SO_4^{2-}), molybdate (MoO_4^{2-}) et sélénate (SeO_4^{2-}) quant à eux, sont des anions qui entrent en compétition au niveau des sites de fixation des transporteurs de sulfate (Shinmachi *et al.*, 2010; Schiavon *et al.*, 2012). Chez le colza, la surexpression de gènes codant pour des transporteurs de sulfate racinaire (*Sultr1.1* et *Sultr1.2*) provoquée par une carence en S, entraine une absorption de MoO_4^{2-} et SeO_4^{2-} qui conduit à une augmentation de la teneur de ces derniers au sein des tissus végétaux (Maillard *et al.*, 2016*a*).

Chez le riz, les protéines membranaires permettant l'influx de Si dans les racines, nommées Lsi1 (Ma *et al.*, 2006; Ma and Yamaji, 2006) et les membres de la famille NIP (Nod26-like intrinsic proteins) transportent non seulement le Si, mais aussi potentiellement le Se (Zhao *et al.*, 2010)

Enfin, si de nombreux transporteurs de N et notamment de nitrate (**Figure II-5**) ont été mis en évidence, l'un des membres de la famille des CLC (large chloride channel) d'*Arabidopsis* (AtCLCa) retrouvé au niveau du tonoplaste et caractérisé comme un échangeur d'ion chlorure Cl^-/H^+, se révèle capable d'engendrer l'accumulation spécifique du nitrate dans la vacuole en réponse à sa concentration cytosolique (De Angeli et al., 2009).

L'un des exemples d'homéostasie les plus fréquemment décrit dans la littérature concernant les microéléments est celui du Fe. Chez les plantes dicotylédones, la régulation de la concentration en Fe est en partie réalisée grâce à l'expression d'un transporteur racinaire nommé IRT1 (Vert *et al.*, 2002), un membre de la famille des transporteurs de métaux ZIP (Zrt / Irt-like protein) (Henriques *et al.*, 2002). Cependant, IRT1 est également impliqué dans l'absorption de cations divalents (Korshunova *et al.*, 1999) tels que Ni^{2+} (Nishida *et al.*, 2011), Cu^{2+} (Waters and Armbrust, 2013) , Zn^{2+} et Co^{2+} (Jayakumar and Jaleel, 2009) et engendre donc

leur accumulation, particulièrement lors d'une carence en fer, où la surexpression d'IRT1 est connue pour être l'une des réponse adaptatives, comme rapporté chez le maïs (Li *et al.*, 2013).

Dans ce cas de figure, le Co illustre bien l'importance des interactions ayant lieu lors de l'absorption des éléments. S'il est supposé être un élément bénéfique (dont la fonction chez les plantes non légumineuses reste d'ailleurs à établir), il est retrouvé en quantité non négligeable chez de nombreuses espèces, bien qu'à ce jour il ne semble qu'aucun transporteur spécifique de Co n'ai été mis en évidence. Il semble donc que le transport de Co s'effectue en partie via cette interaction avec IRT1 (Korshunova *et al.*, 1999; Zelazny and Vert, 2015).

La surexpression d'IRT1 lorsque les plantes sont confrontées à une carence en Fe est donc, entre autre, à l'origine d'une fluctuation du ionome des tissus végétaux (Baxter *et al.*, 2008*b*). Le Fe a reçu beaucoup d'attention et il constitue la cible de nombreuses études, ce qui s'illustre notamment par le fait que près d'un tiers (52/176) des gènes ionomiques (KIG, Known Ionomic Genes) référencés par Whitt *et al.* (2020) sont associés à l'absorption, l'accumulation ou la distribution du Fe.

Enfin, d'autres co-transporteurs racinaires de microéléments ont été rapportés dans la littérature (Sasaki *et al.*, 2016; Alejandro *et al.*, 2020) comme par exemple AtNRAMP1 (Curie *et al.*, 2000) et OsNRAMP5 (Sasaki *et al.*, 2012), qui appartiennent à la famille NRAMP (Natural resistance-associated macrophage protein). Ces derniers sont impliqués dans le transport du Mn mais entrainent également l'accumulation du Cd et du Fe, notamment lors d'une carence en Fe où leur expression est régulée positivement. Pour AtNRAMP1, ce phénomène est aussi constaté lors d'une privation de Mn.

L'ensemble de ces exemples suggèrent que chez les plantes soumises à un environnement minéral fluctuant, les interactions existantes entre les systèmes d'absorption des nutriments sont susceptibles de s'accompagner d'interactions nutritionnelles entraînant de grandes fluctuations de leur composition élémentaire interne. Ils illustrent la nécessité de prendre en compte une analyse ionomique fonctionnelle complète lors de l'examen de l'adaptation des plantes soumises à des contraintes. Dans cette entreprise, l'application de carences en élément minéraux se révèle donc être une approche pertinente et un préalable indispensable afin d'identifier toutes les interactions potentielles, qui permettront, dans un second temps, d'identifier des indicateurs utilisables pour le pilotage de la fertilisation minérale ou d'étudier l'influence d'autres contraintes sur la nutrition minérale.

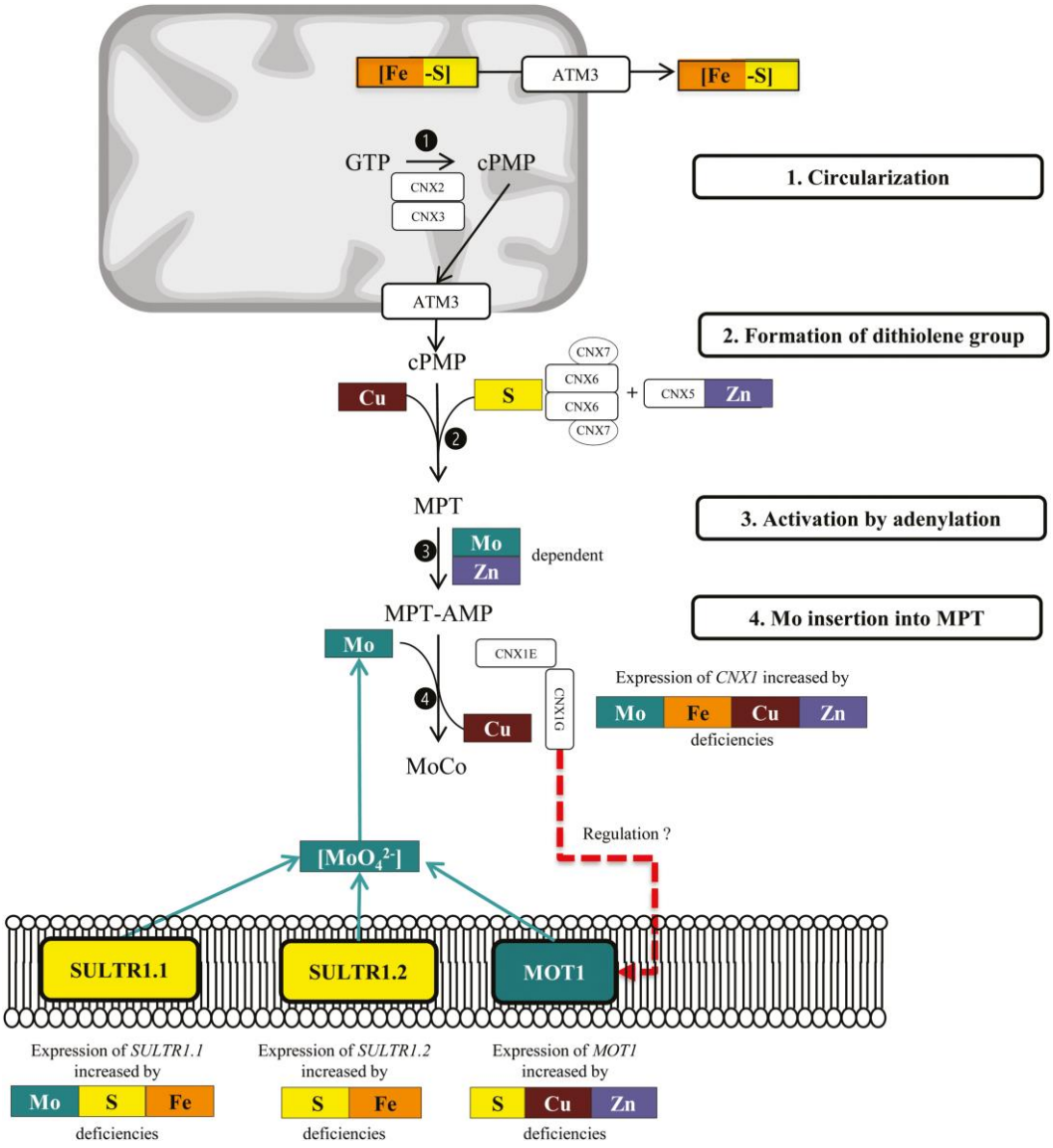


Figure II-14. Interaction entre S, Fe, Cu, Zn et Mo au cours de la synthèse du cofacteur Mo (Moco). Les interactions de ces nutriments sont présentées au niveau biochimique (les étapes de la synthèse Moco et les protéines catalytiques nécessaires) et au niveau de la régulation de l'expression des gènes (*SULTR1.1*, *SULTR1.2*, *MOT1*, *CNX1*). En cas de carence en S, Fe et Mo, l'augmentation de l'absorption de Mo semble être un effet de la régulation à la hausse de *BnaSutr1.1* et *BnaSutr1.2*, codant des transporteurs de sulfate racinaire. En revanche, en cas de carences en Cu et Zn, l'accumulation de Mo pourrait être due à des signaux de rétroaction provenant de perturbations de la synthèse de Moco (en raison de faibles teneurs en Cu et Zn), ce qui pourrait induire une régulation à la hausse de *BnaMot1* (codant le transporteur MOT1). L'implication de S, Fe, Cu, Zn et Mo est présentée séquentiellement dans les quatre étapes de la voie de biosynthèse de Moco. (**1**) Les protéines CNX2 et CNX3 catalysent la conversion du GTP en cPMP. Le cPMP est ensuite exporté des mitochondries par le transporteur mitochondrial ATM3. (**2**) Dans le cytosol, la MPT synthase composée de sous-unités CNX6 et CNX7 transfère deux atomes de S à cPMP pour former 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 au MPT pour protéger le dithiolate réactif avant l'insertion de Mo. (**3**) Le MPT est activé par adénylation pour former MPT-AMP. Cette étape est dépendante du Mo et du Zn. (**4**) Dans l'étape finale, 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 Moco. ATM, transporteurs ABC des mitochondries ; cPMP, pyranoptérine monophosphate cyclique; [Fe-S], amas fer-soufre; MOT, transporteur de molybdène ; MPT, molybdopterine; MPT-AMP, molybdoptérine adénylée; SULTR, transporteur de sulfate. D'après Courbet et al. (2019), adapté de Billard et al. (2014) et Maillard et al. (2016a, 2016b).

b. *Implication de plusieurs éléments dans un nœud ou réseau métabolique*

Les exemples s'intéressant aux nœuds métaboliques impliquant plusieurs éléments sont plus rares dans la littérature, il est néanmoins possible de citer deux exemples illustratifs. L'accumulation de Mo et ses différents rôles permet d'illustrer un premier exemple de réseaux impliquant plusieurs nutriments. En effet, Maillard *et al.* (2016*a*) révèlent une augmentation de l'absorption racinaire de Mo ainsi que de sa concentration tissulaire lors de carences en S, Mn, Zn, Fe ou Cu chez le colza. Une fois absorbé, le Mo est principalement utilisé pour la synthèse du cofacteur Mo (MoCo) (**Figure II-14**), impliqué dans la structure d'enzymes essentielles telles que la nitrate réductase, l'aldéhyde oxydase et la xanthine déshydrogénase (Zimmer and Mendel, 1999; Bittner, 2014). Dans les mitochondries, la biosynthèse du MoCo (Kaufholdt *et al.*, 2017) nécessite non seulement du Cu (Billard *et al.*, 2014), mais également du Fe (Bittner, 2014), du Zn et du S (Maillard *et al.*, 2016*b*) et c'est donc un exemple caractéristique de nœud métabolique dans lequel un maillage d'interactions entre macroéléments et microéléments s'avère indispensable au bon fonctionnement de nombreux processus.

La récente description des interactions nutritives se produisant lors d'une carence en S (Courbet et al., 2019) illustre un second exemple, qui révèle chez les espèces légumineuses fixatrices d'azote, d'autres interactions existantes avec cet élément (N, Fe, Cu, Mo ou Zn). Au niveau biochimique le S interagit notamment avec le Fe pour former des clusters fer-soufre (Fe-S) ayant un rôle dans le transfert d'électrons de nombreuses réactions d'oxydoréduction. La carence en S provoque alors, une réduction de l'activité photosynthétique et l'apparition de chlorose (Courbet *et al.*, 2019; de Bang *et al.*, 2021). L'analyse du transcriptome racinaire d'*Arabidospsis* met en évidence un système complexe de coordination de l'absorption de S et Fe (Forieri *et al.*, 2017).

c. *Remobilisation des éléments et mécanismes associés*

La plupart des éléments peuvent être stockés à plus ou moins long terme, sous des formes organiques (protéines par exemple) ou minérales dans la vacuole, qui agit alors comme un organite tampon entre l'absorption et l'utilisation métabolique, avant que l'élément ne soit transporté à longue distance via les vaisseaux conducteurs (Peng and Gong, 2014). Ce transport et cette redistribution des nutriments, appelés remobilisation, se produit notamment lors du stade reproducteur mais aussi au cours du stade végétatif à partir d'organes source (comme les feuilles matures) pour maintenir la croissance active des nouveaux tissus puits telles que les jeunes feuilles et afin par exemple, de contrebalancer une réduction transitoire de l'absorption racinaire (Malagoli *et al.*, 2005; Abdallah *et al.*, 2010). Les processus impliqués dans la

remobilisation d'un élément donné dépendent fortement de sa forme de stockage (organique ou inorganique) dans les tissus végétaux. A titre d'exemple, les protéines constituent chez de nombreuses espèces végétales, la principale forme de stockage de N, de sorte que la remobilisation de N nécessite donc de nombreuses protéases spécifiquement impliquées durant le processus de sénescence des feuilles (James *et al.*, 2018). Le S quant à lui est principalement stocké dans la vacuole sous forme de SO_4^{2-} (Sarda *et al.*, 2013), sa remobilisation nécessite alors une activité accrue de transporteurs tonoplastiques pour permettre sa redistribution depuis la vacuole vers les tissus à forte demande (Abdallah *et al.*, 2010; Girondé *et al.*, 2014). Il a par ailleurs été suggéré que la remobilisation du SO_4^{2-} vacuolaire conduit à une réduction de sa contribution osmotique compensée par une accumulation de Cl et dans une moindre mesure de P (Sorin *et al.*, 2015). Ce dernier exemple montre donc que les processus de remobilisation d'un élément tel que S, impacte l'accumulation d'autres éléments comme le Cl et le P.

Outre N et S, les autres macroéléments tels que Mg, P et K sont presque toujours remobilisés à partir des feuilles matures tant chez le colza que chez le blé (Maillard *et al.*, 2015; Etienne *et al.*, 2018). Ce dernier est considéré comme une espèce dont l'efficience de remobilisation est importante et démontre même une capacité à mouvoir le Ca, pourtant souvent décrit comme un élément peu mobile dans les vaisseaux du phloème, contrairement aux autres macroéléments (Maillard *et al.*, 2015; Etienne *et al.*, 2018). Peu d'études ont revanche à ce jour, envisagé la remobilisation éventuelle des microéléments. Celle de Maillard *et al* (2015) démontre par exemple chez huit espèces végétales cultivées au champ ou lors de l'application de carences en cultures hydroponiques, la remobilisation possible de ces derniers, dont l'efficience varie principalement selon l'espèce considérée. Par conséquent, le stockage et/ou la remobilisation en tant que processus permettant une redistribution des nutriments minéraux d'un tissu à un autre, peuvent être à l'origine de modifications tissulaires de la teneur élémentaire, non seulement de l'élément considéré, mais aussi potentiellement d'autres éléments.

2. Lors de contraintes abiotiques telle qu'un manque d'eau

a. Gérer le manque d'eau, un enjeu majeur pour l'agriculture

Parmi les stress abiotiques, la disponibilité de l'eau est depuis longtemps considérée comme le principal facteur limitant en agriculture (Boyer, 1982). Selon l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques) et la FAO (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture), l'agriculture mondiale devra dans les quarante prochaines années relever le défi colossal de produire 50% de plus que la production actuelle en 2030, puis 100% en 2050 pour parvenir à nourrir de manière durable une population mondiale croissante, qui devrait atteindre 8,5 milliards d'habitants dès 2030 (Cleland, 2013; Roser *et al.*, 2013). Dans le même temps, une augmentation de la variabilité du climat est à prévoir selon le GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat), avec un accroissement de la fréquence d'événements météorologiques extrêmes, telles que les sécheresses et précipitations intenses, sur la plupart des zones terrestres continentales à moyenne latitude, principales zones de productions agricoles dans le monde. Selon Aqueduct, plate-forme de données gérée par l'organisation de recherche environnementale WRI (World Resources Institute), en France, les bassins de production du blé et du colza connaitront un risque de déficit hydrique plus élevé d'un facteur moyen de 1,4 à 2 à l'horizon 2030 et 2040, en raison d'une diminution de la quantité d'eau de surface disponible d'un facteur 1,2 à 1,4 par rapport à la moyenne 1950-2010 (Gassert *et al.*, 2015).

Ainsi, actuellement 40 à 60 % des pertes totales de rendement estimées des cultures dans le monde sont dûes au manque d'eau (Shao *et al.*, 2008). Chez le colza, le stress hydrique a des effets délétères au cours des phases de croissance végétative et reproductive et c'est lors de cette dernière qu'il est considéré comme le plus préjudiciable (Ghobadi *et al.*, 2006). Néanmoins, le manque d'eau est également à même de retarder la levée, entraînant bien souvent une densité de peuplement faible et/ou hétérogène qui pénalise la culture dès son implantation (Debaeke *et al.*, 1996), phénomène fréquemment constaté en France ces dernières années.

Pour cette culture, comme pour le blé, l'enjeu dans les années à venir réside donc dans le fait de devoir cultiver avec moins d'eau disponible. Outre l'irrigation, les leviers agronomiques développés pour faire face à ces conditions de déficit hydrique reposent principalement sur l'usage de régulateurs de croissance (Ahmadi *et al.*, 2015), de solutés osmoprotectants (Raza *et al.*, 2012) ou de nutriments appliqués au niveau foliaire (Aown *et al.*, 2012; Raza *et al.*, 2013), de couverture du sol ou de paillage (Ahmad *et al.*, 2015) et de méthodes de semis alternatives (Aiken *et al.*, 2015).

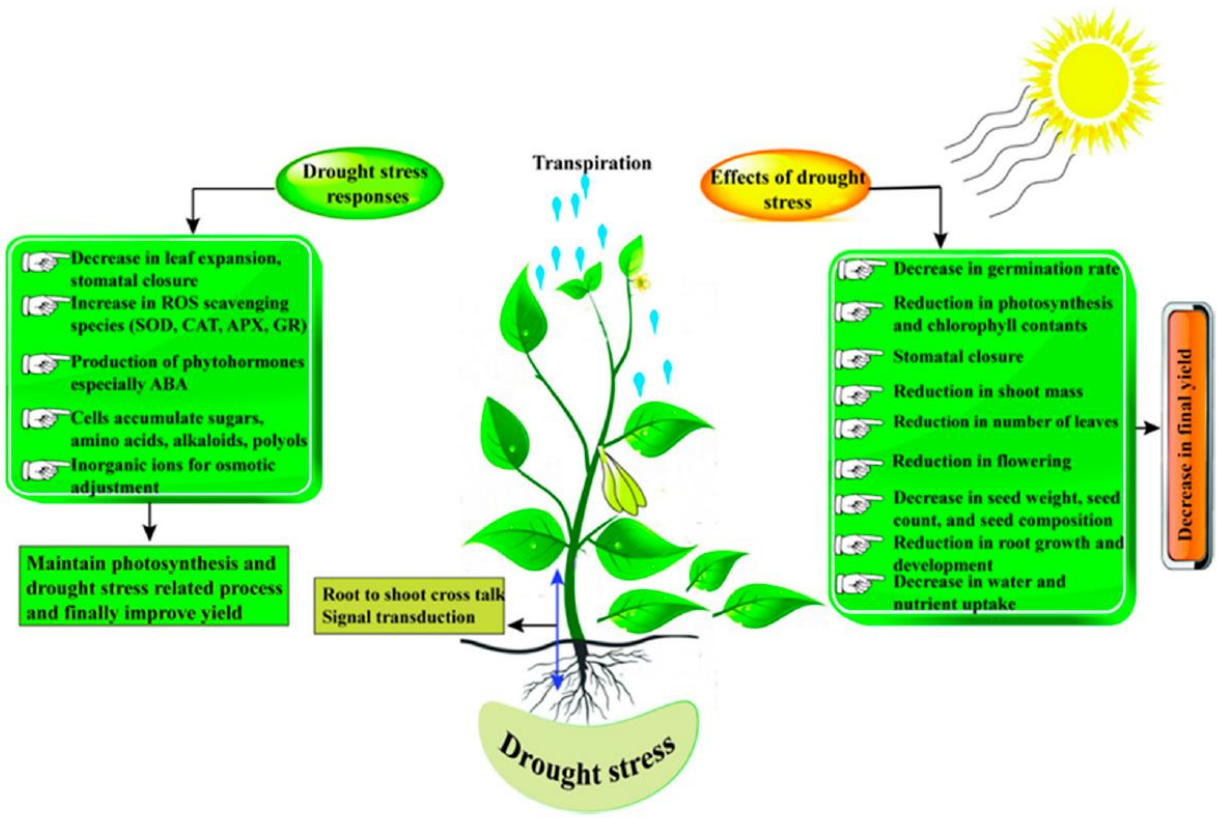


Figure II-15. Synthèse des effets du stress hydrique chez les végétaux et réponses possibles. D'après Nadeem *et al.* (2019).

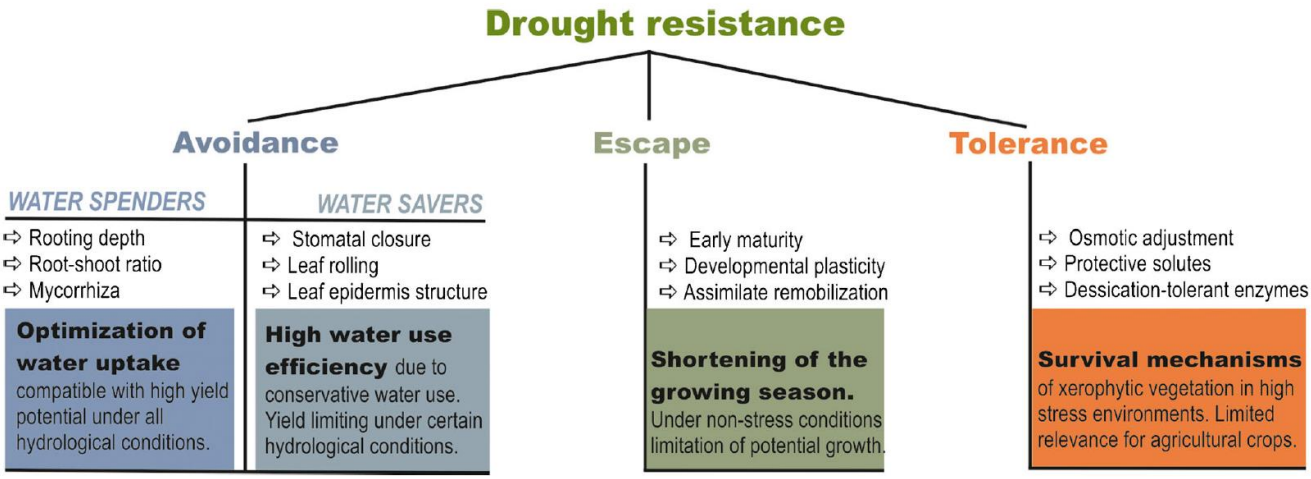


Figure II-16. Stratégies de résistance à la sécheresse selon Levitt (1980). Les différentes stratégies de résistance et leur traits adaptatifs associés chez les végétaux ainsi que leur limitation ou potentielle utilisation pour les cultures agricoles. Il en résulte agronomiquement, grâce à une absorption efficace de l'eau, que l'évitement de la sécheresse (avoidance) offre le potentiel le plus compatible avec des exigences de rendements élevés des cultures. D'après Bodner et al. (2015) adapté de Levitt (1980).

b. Effets morphologiques et physiologiques du stress hydrique

Ce travail de recherche vise notamment à étudier l'effet d'une contrainte comme le manque d'eau sur la composition ionomique de deux espèces cultivées (colza et blé), seront donc présentés en préalable, mais de façon certes non exhaustive, les principaux effets d'un manque d'eau chez les végétaux supérieurs ainsi que les adaptations les plus décrites (**Figure II-15**).

Le stress hydrique se définit comme un déséquilibre existant entre le niveau d'évapotranspiration de la plante et l'eau disponible dans le sol (Tardieu *et al.*, 2011). Selon les terminologies employées, le terme de déficit hydrique définit généralement un état sans modification du potentiel hydrique des feuilles; la contrainte hydrique correspond à une diminution du potentiel hydrique sans ajustements physiologiques ; enfin le stress hydrique à proprement parler définit une diminution du potentiel hydrique suffisamment importante pour qu'elle engendre une modification de l'état physiologique de la plante et une réponse adaptive pour maintenir la teneur en eau des tissus.

Lorsque les conditions environnementales sont défavorables, la plante se doit afin d'assurer sa survie et sa reproduction, de mettre en place des réponses adaptatives pouvant être dissociées en trois grandes catégories (**Figure II-16**) :

- L'échappement (escape) confère une plasticité développementale accrue permettant à la plante une modification de la durée du cycle de développement végétatif et/ou reproductif. L'échappement consiste généralement en une accélération de la phénologie de la plante, lui permettant de raccourcir son cycle de développement pour échapper à la période de stress hydrique.
- L'évitement (avoidance) consiste à la mise en place de mécanismes permettant à la plante de pallier à l'apparition d'un manque d'eau. Selon Tardieu and Simonneau (1998), il est ainsi possible de distinguer deux catégories de comportements différenciant des espèces dites (i) anisohydrique (soja, tournesol, blé, orge) dont la stratégie se base sur la maximisation de la croissance à haut risque de défaillance hydraulique (Bodner *et al.*, 2015) et (ii) isohydriques (maïs, pois, peuplier), dont la stratégie peut être qualifiée de conservatrice (sécurité élevée à faible potentiel d'assimilation du CO_2).

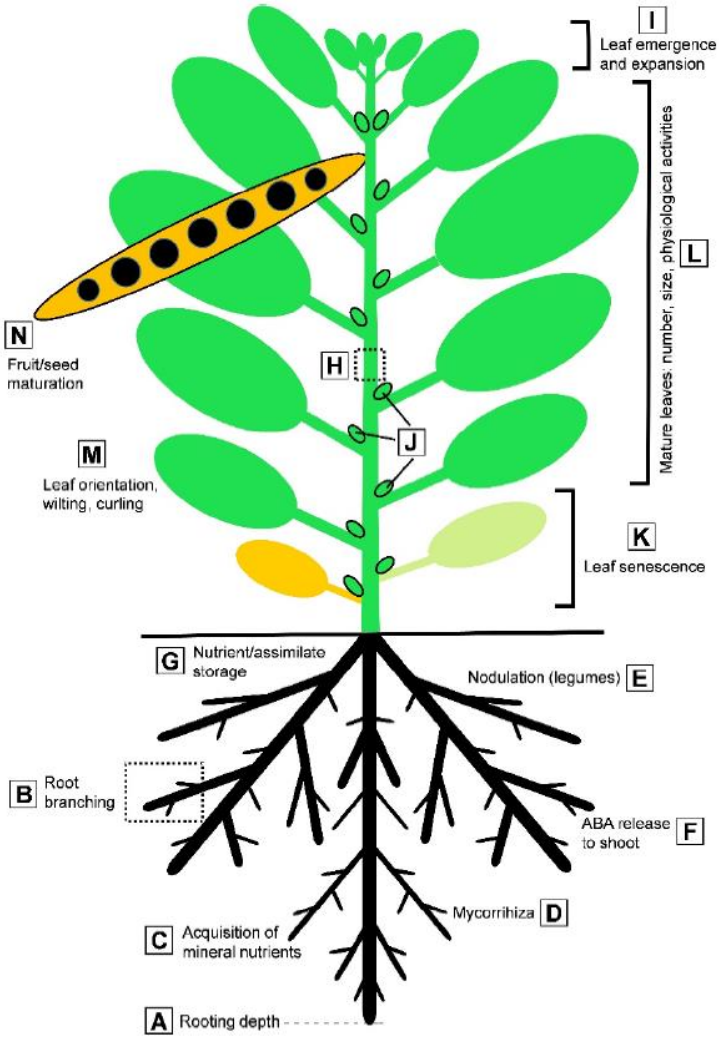


Figure II-17. Synthèse des modifications morphologiques et physiologiques des cultures annuelles en réponses à la sécheresse. **A** : profondeur d'enracinement (avant et pendant la période de stress) ; **B** : ramification racinaire ; **C** : absorption de nutriments minéraux et translocation vers les parties aériennes ; **D** : interactions avec les mycorhizes ; **E** : nodulation et activité nodulaire (chez les légumineuses) ; **F** : production d'acide abscissique (ABA) et transport dans les parties aériennes ; **G** : stockage des éléments minéraux et des assimilats dans les racines/rhizomes/bulbes ; **H** : transport des éléments minéraux / assimilats / phytohormones via le xylème et le phloème ; **I** : émergence et expansion de nouvelles feuilles ; **J** : production de nouvelles feuilles à partir des bourgeons axillaires ; **K** : sénescence des feuilles plus âgées ; **L** : Variation du nombre, de la taille et/ou des propriétés morphologiques/physiologiques des feuilles matures ; **M** : orientation spatiale, enroulement et flétrissement des feuilles matures ; **N** : maturation des fruits. D'après Simova-Stoilova *et al.* (2016).

i) Les premières maintiennent une évapotranspiration et un flux d'eau important au sein de la plante. Il en résulte une réallocation préférentielle de carbone afin de soutenir, voire de favoriser le développement du compartiment racinaire, se traduisant alors par une modification du ratio de biomasse entre les parties aériennes et les racines. L'augmentation du nombre et/ou de la longueur des racines favorise la prospection et augmente la surface d'échange avec le sol.

ii) Les secondes, augmentent l'efficience d'utilisation de l'eau disponible par la mise en place de mécanismes ayant principalement pour but de limiter les pertes en eau par évapotranspiration. Globalement il s'agit de conserver l'eau en diminuant la surface d'évaporation (enroulement des feuilles, fermeture des stomates) ou en protégeant la surface foliaire (cire et épaississement épicuticulaire).

- La tolérance ou résistance traduit la capacité d'une plante à supporter une faible teneur en eau des tissus et consiste à maintenir la croissance malgré l'importante diminution du potentiel hydrique de la plante. Elle passe par des ajustements osmotiques faisant intervenir la néosynthèse de composés osmo-protecteurs et antioxydants permettant de pallier les effets du manque d'eau sur la turgescence cellulaire (Basu *et al.*, 2016).

Les effets d'un manque d'eau sur le fonctionnement physiologique des végétaux a fait l'objet d'un grand nombre d'études qu'il n'est pas possible d'énumérer dans ce document et notamment d'un nombre élevé d'articles de synthèse (Hu and Schmidhalter, 2005; Farooq *et al.*, 2009; Bodner *et al.*, 2015; Basu *et al.*, 2016; Raza *et al.*, 2017; Nadeem *et al.*, 2019). Le manque d'eau altère ainsi de nombreux traits morphologiques et physiologiques de la plante (**Figure II-17**) qui concourent *in fine* à une modification ou une altération de la croissance parmi lesquels :

La germination

L'eau permet l'imbibition des tissus de la graine en activant les processus biochimiques à l'origine de l'entrée en germination. Elle est un prérequis indispensable et le manque d'eau entraine une diminution du taux de germination qui conditionne alors la densité de peuplement finale (nombre de plantes par unité de surface) de la culture lors de son implantation. Le stress hydrique engendre également un allongement de la durée de la phase de germination, ainsi qu'une diminution de la taille de la radicule et de la jeune plantule de colza (Chun-jie *et al.*, 2007)

La croissance foliaire

La croissance des parties aériennes s'effectue principalement grâce à la prolifération puis l'expansion cellulaire qui permet l'augmentation du volume des cellules (auxèse). Cette expansion implique une absorption d'eau en grande quantité couplée à une extension de la paroi. Naturellement, ce processus est très sensible au stress hydrique qui provoque alors un retard de croissance à l'origine d'une diminution de la biomasse aérienne et de la réduction de la taille de la plante (Hosseini and Hassibi, 2011). Jouant un rôle prépondérant dans l'activité photosynthétique de la plante, la feuille revêt un rôle prépondérant dans la production d'assimilats et le maintien de la croissance. Afin de maintenir son fonctionnement optimal, une accumulation de solutés dans les cellules foliaires permet de maintenir son potentiel osmotique lors du stress hydrique. Ce dernier provoque également l'accumulation de composés tel que l'ABA (acide abscisique), inhibiteur de la croissance cellulaire qui face au manque d'eau, limite l'expansion cellulaire au niveau foliaire (Achard *et al.*, 2006), permettant ainsi de limiter la surface foliaire totale et par conséquent les pertes en eau par évapotranspiration (Casadebaig *et al.*, 2008). A terme, l'augmentation croissante de la concentration en ABA peut engendrer une senescence et une abscision prématurées des feuilles (Munné-Bosch and Alegre, 2004). Chez le colza, cette diminution significative de la surface foliaire est observée à tous les stades de croissance (Raza *et al.*, 2015).

La croissance racinaire

Tout comme les parties aériennes, la croissance des racines est affectée par le manque d'eau, cependant c'est l'intensité du stress qui va principalement impacter cette dernière. En effet, l'absorption d'eau s'effectuant principalement au niveau racinaire, la croissance de ce compartiment peut être favorisé lors d'un stress modéré (maintien de la croissance ou stimulation) au détriment de celle de la partie aérienne entraînant alors une diminution du ratio de biomasse des parties aériennes sur les racines chez le pois (*Pisum sativum*) (Prudent *et al.*, 2016), le soja (*Glycine max*) (Kunert *et al.*, 2016) et le colza (Ashraf *et al.*, 2013).
Néanmoins, la longueur des racines et la biomasse racinaire totale diminuent progressivement avec une intensité graduelle du stress hydrique lorsque celui-ci devient sévère.

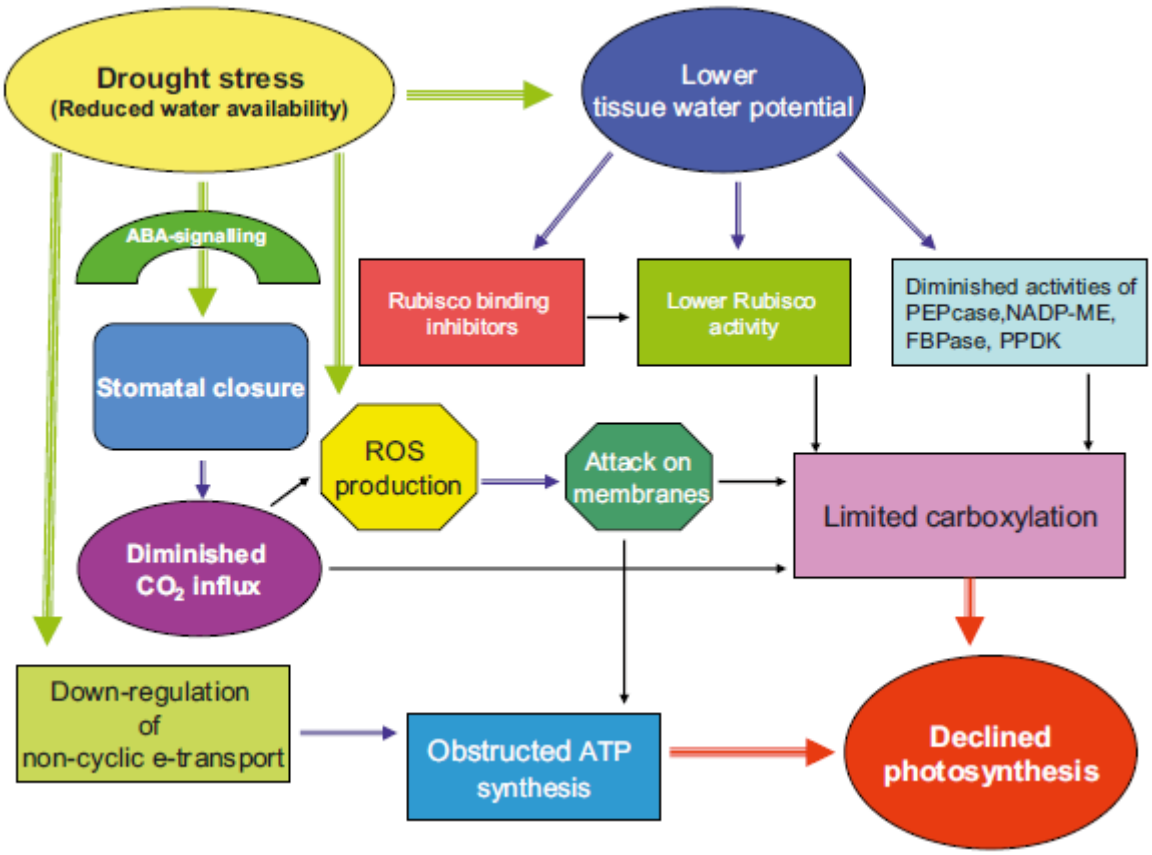


Figure II-18. Régulation de la photosynthèse et mécanismes altérés conduisant à une réduction de la photosynthèse lors d'un stress hydrique. Le stress hydrique perturbe l'équilibre entre production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et défense antioxydante, provoquant l'accumulation de ROS. Lors d'une réduction de la quantité d'eau disponible, les plantes ferment leurs stomates (via une voie de signalisation dépendante de l'ABA), ce qui a pour effet de diminuer l'afflux de CO_2. Cette réduction de diffusion du CO_2 réduit non seulement la carboxylation de façon directe, mais entraine également une accumulation d'électrons propice à la formation de ROS. Les conditions sévères de sécheresse limitent la photosynthèse en raison d'une diminution de l'activité de nombreuses enzymes : la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco), la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCase), l'enzyme NADP-malique (NADP-ME), la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) et la pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK). Elle induit également une activité accrue des inhibiteurs de la Rubisco. De plus, le transport des électrons est régulé à la baisse pour répondre à la réduction de production de NADPH, ce qui en retour, induit une réduction de la synthèse d'ATP limitant le métabolisme énergétique. D'après Farooq et al. (2009).

Cette réduction de la croissance foliaire et racinaire est la résultante de l'altération d'un grand nombre de processus physiologiques provoquée par le manque d'eau :

Le contrôle de la conductance stomatique

De façon exogène, l'apparition du manque d'eau entraine une augmentation de la concentration des solutés dans la solution du sol qui aboutit à un efflux d'eau depuis les racines par osmose. Cette déshydratation provoque alors au sein de la plante, une augmentation de la concentration de solutés dans la cellule végétale, dont certains sont accumulés pour contrebalancer les effets du manque d'eau et favorisent ainsi l'ajustement osmotique, stabilisent les protéines et les lipides membranaires ou participent au piégeage des espèces réactives de l'oxygène. Parmi ces derniers sont retrouvés des osmoprotecteurs importants, de petites molécules organiques telles que la glycinebétaïne, le tréhalose, les sucres solubles ou encore la proline (Farooq *et al.*, 2009). La dérégulation du potentiel osmotique qui en résulte provoque alors très rapidement un contrôle de la fermeture stomatique, identifié comme un mécanisme précoce de la réponse au stress hydrique. Associé à une augmentation de la synthèse d'ABA, ces mécanismes aboutissent à une limitation de la diffusion et de l'absorption du CO_2 chez les plantes en C3 (Martínez *et al.*, 2007). De plus, le stress hydrique provoque également des carences en éléments minéraux essentiels, (qui feront l'objet d'un paragraphe spécifique à la suite de cette partie) notamment en K dont le rôle dans la régulation osmotique et dans la diminution de la conductance stomatique a déjà été décrit (Mengel *et al.*, 2001).

L'altération de la chlorophylle

Le stress hydrique entraine une dégradation de la chlorophylle, qui devient alors un facteur limitant pour la photosynthèse. Ce symptôme couramment observé est dû en partie à la diminution de l'activité de la chlorophyllase (enzyme impliqué dans la synthèse de la chlorophylle), ainsi qu'à la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) qui endommagent les chloroplastes (Gill and Tuteja, 2010; Ashraf *et al.*, 2013). La chlorophylle a est plus sensible que la chlorophylle b, ainsi chez le colza la diminution du ratio a/b peut atteindre 47% (Raza *et al.*, 2017).

La diminution de l'activité photosynthétique

Si la réduction de la conductance stomatique précédemment décrite, médiée notamment par l'augmentation de la concentration en ABA, permet de réduire les pertes en eau, elle entraine également une réduction de la diffusion du CO_2 et de la fixation du carbone à l'origine d'une diminution de l'activité photosynthétique (Chaves *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2010) (**Figure II-18**).

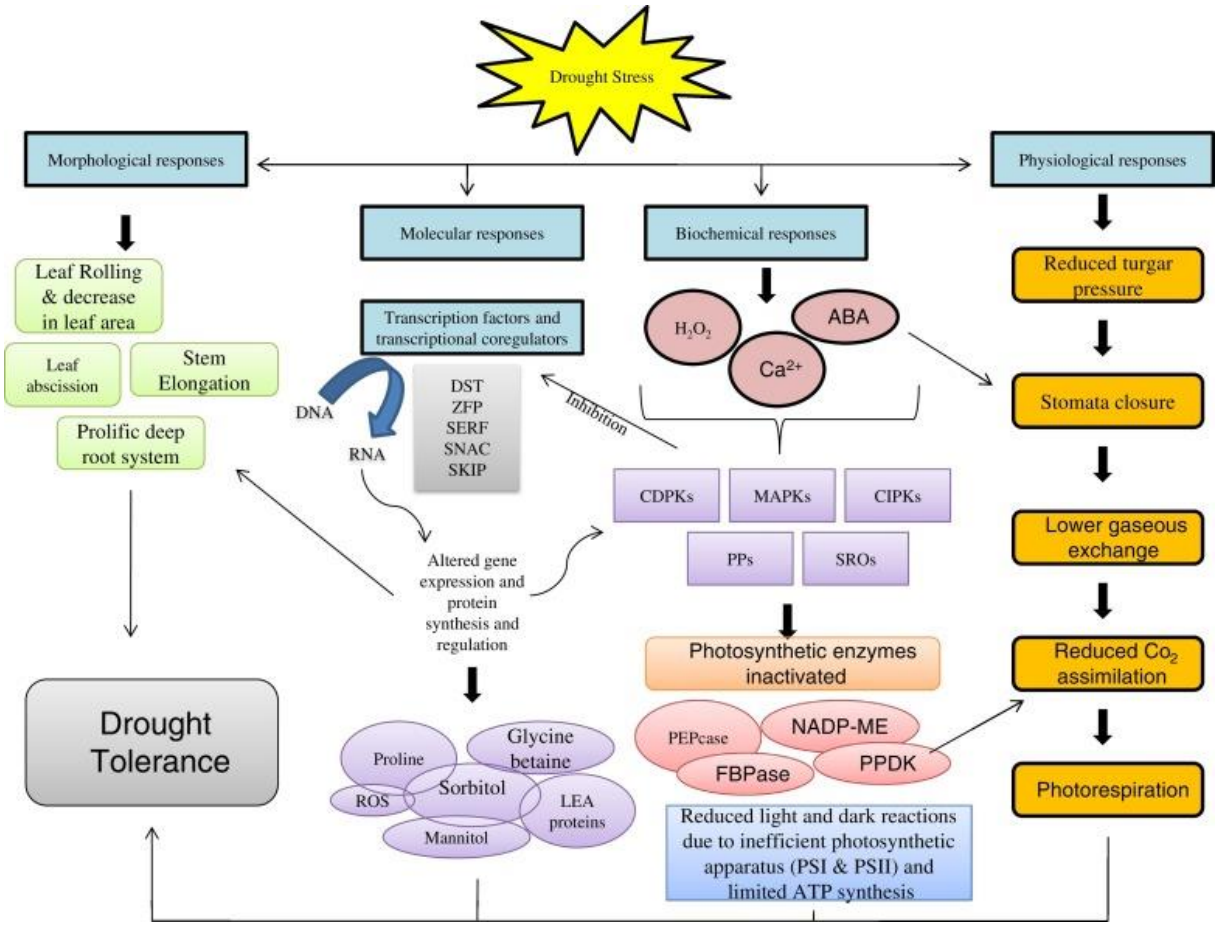


Figure II-19. **Interconnexion des réponses morphologiques, physiologiques, biochimique et moléculaire lors d'un stress hydrique. D'après Zargar *et al.* (2017).** DST: drought and salt tolerance, ZFP: zinc finger transcription factor, SERF: serum response factor, SNAC: stress responsive NAC transcription factor, SKIP: ski-interacting protein, ROS: reactive oxygen species, LEA: late embryogenesis abundant proteins, ABA: abscisic acid, CDPKs: calcium dependent protein kinases, PPs: protein phosphatases, SROs: similar to RCD-ONE, MAPKs: mitogen activated protein kinases, CIPKs: CBL interacting protein kinases, PPDKs: pyruvate phosphate dikinases, PEPcase: phosphoenol pyruvate carboxylase, FBPase: fructose 1,6-bisphosphatase, NADP-ME: NADP malic enzyme.

La baisse de la photosynthèse est d'autant plus importante que le stress hydrique entraîne également une baisse de l'activité d'enzymes clés telles que la Rubsico (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase), la PPDK (pyruvate phosphokinase) ou encore la PEPCase (phospho-énol pyruvate carboxylase) (Farooq *et al.*, 2009; Carmo-Silva *et al.*, 2012). En effet, le stress hydrique provoque notamment une accumulation d'inhibiteurs spécifiques de la Rubisco qui influencent négativement son activité catalytique au cours du stress hydrique (Parry *et al.*, 2002). Il engendre une diminution de la régénération du RuBP (ribulose-1,5-bisphosphate). Le stress hydrique provoque également une surexcitation des centres réactionnels des photosystèmes II. La surproduction d'électrons qui en découle endommage les structures de l'appareil photosynthétiques et altère le rendement de la photosynthèse.

Génération d'espèces réactives de l'oxygène et stress oxydatif

La fuite de ces électrons, aboutit à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Asada, 1999) à l'origine de l'apparition d'un stress oxydatif dans les cellules végétales. Ces ROS, telles que le radical superoxyde (O^{-}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{-}) ou encore l'oxygène singulet ($^1O_2$), sont extrêmement nocifs lorsque leur concentration dépasse un seuil limite et provoquent des dommages structurels aux différents organites cellulaires, inactivent certaines enzymes, oxydent les acides nucléiques, les pigments photosynthétiques (chlorophylle et caroténoïdes) et les lipides (peroxydation lipidique), conduisant à un dysfonctionnement global de la cellule menant, *in fine*, à la mort cellulaire (Mittler, 2002). Cet effet est amplifié par l'accumulation d'ABA, qui entraîne la fermeture des stomates, provoquant ainsi une plus grande production de ROS. Certaines molécules, comme le glutathion, participe alors au piégeage des ROS (Hasanuzzaman *et al.*, 2019) pour lutter contre les effets du stress hydrique.

L'ensemble de ces processus morphologiques et physiologiques, est sous le contrôle d'un réseau complexe de voies de régulations moléculaires, faisant intervenir des facteurs de transcription ou des médiateurs de la réponse des plantes (ABA, Ca), récemment synthétisé par Zargar *et al.* (2017) (**Figure II-19).**

c. *Effets spécifiques du stress hydrique sur la nutrition minérale*

Le stress hydrique est à l'origine de l'altération de nombreux processus physiologiques et biochimiques, dont les réponses sont au sein de la plante, coordonnées selon l'intensité et la durée du stress (Levitt, 1980; Farooq *et al.*, 2009). Néanmoins, s'il existe en fonction du cas de figure rencontré un compromis chez la plante entre maintien du statut hydrique et maintien de la croissance, la nutrition minérale est indispensable à ces deux processus et elle est intrinsèquement liée à la présence d'eau. Cette dernière est en effet le solvant permettant la diffusion passive des éléments à travers les membranes et constitue via le flux de masse, le vecteur permettant leur translocation et leur distribution, des racines aux parties aériennes. A cet égard, il est surprenant de constater que, si les effets physiologiques et morphologiques du stress hydrique ont largement été documentés (Farooq *et al.*, 2009; Tardieu, 2012; Simova-Stoilova *et al.*, 2016; Raza *et al.*, 2017; Nadeem *et al.*, 2019), les effets d'un manque d'eau sur la nutrition minérale font l'objet d'un nombre bien plus restreint de travaux de synthèse (Hu and Schmidhalter, 2005; da Silva *et al.*, 2011), d'autant plus lorsqu'il s'agit d'étude globale de la composition élémentaire ou du ionome (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010; Acosta-Gamboa *et al.*, 2017; Fischer *et al.*, 2019). Bien souvent, les effets du stress hydrique sont alors décrits au travers du rôle spécifique de chaque élément (Hu and Schmidhalter, 2005; da Silva *et al.*, 2011; Waraich *et al.*, 2011) dont les teneurs sont impactées par les processus cités ci-dessous.

Les effets du stress hydrique sur la nutrition minérale peuvent être décrits selon deux composantes, exogène et endogène à la plante. Si la première décrit les effets de la diminution de la teneur en eau du sol sur la disponibilité et la mobilité des ions dans le compartiment racinaire, la seconde s'attache à décrire par quels processus ce manque d'eau et d'éléments biodisponibles, impacte *in fine* le statut nutritionnel de la plante.

De façon exogène, une teneur réduite en eau dans le sol, entraîne une diminution de la mobilité (Amtmann and Armengaud, 2009) et du taux de diffusion des éléments du sol au compartiment racinaire (Hu *et al.*, 2007) dû en partie à ses propriétés physicochimiques. La plupart des éléments interagissent avec les particules du sol en formant des complexes ioniques et leur biodisponibilité pour la plante est alors intrinsèquement liée à leur concentration dans la solution du sol (Hinsinger *et al.*, 2009). Cette diminution potentielle de la biodisponibilité de certains éléments, observée lors de carences nutritionnelles, se traduit chez certaines espèces par des réponses adaptatives visant à maintenir l'homéostasie des éléments, notamment par exsudation de composés au niveau racinaire, tels que des chélates permettant de faciliter leur absorption ou bien par efflux de protons à même d'acidifier la rhizosphère. En effet, la

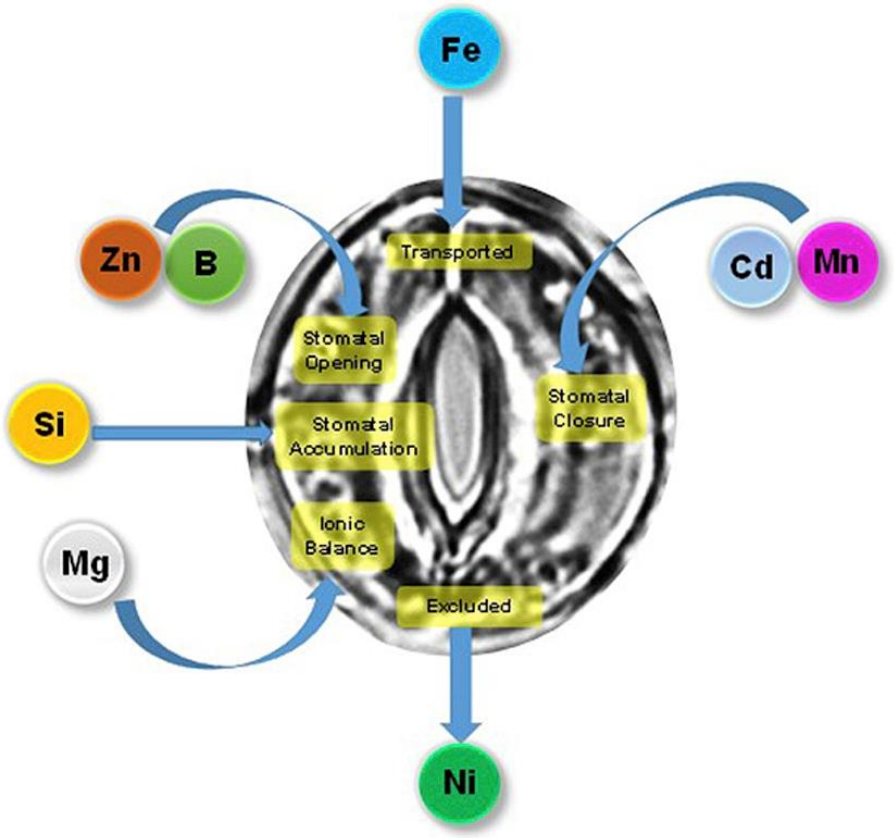


Figure II-20. Schéma illustrant le rôle potentiel de certains cations majeurs dans la physiologie des cellules de garde. Le Ni est exclu des cellules de garde et le Fe est simplement transporté à travers les stomates. Le Cd et le Mn jouent un rôle dans la modulation de la fermeture des stomates, contrairement au Zn et au B associés à leur ouverture. Le Mg est impliqué dans le maintien de l'équilibre ionique et le rôle de l'accumulation de Si dans les stomates reste encore inconnu. D'après Misra *et al.* (2019).

biodisponibilité des éléments dépend également du pH du sol (Marschner, 2012). Son acidification permet à la plante, notamment dans les sols neutres ou alcalins, d'augmenter la disponibilité du P, du Fe et d'autres métaux afin de maintenir leur homéostasie, mais également de celle de l'Al dont l'élévation excessive de la concentration tissulaire peut être à l'origine de toxicité (He *et al.*, 2011; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). Lors d'une carence en Fe, l'absorption de Mn, Co, Zn, Cd et Mo est affectée (Baxter *et al.*, 2008*b*), elle résulte en partie de l'acidification de la rhizosphère augmentant la solubilité des premiers mais diminuant celle du Mo, induisant alors, indirectement, une carence secondaire en Mo. Qu'il s'agisse de l'effet direct de la diminution de la teneur en eau du sol ou indirect via des mécanismes adaptatifs au travers des différents exemples cités, le stress hydrique engendre donc une modulation de la biodisponibilité des éléments du sol qui, associés au effets endogènes décrits ci-après, est à l'origine de modifications du ionome.

Du point de vue endogène, le stress hydrique réduit à la fois l'absorption des éléments par les racines et leur transport depuis les racines aux parties aériennes, principalement en raison d'une diminution concomitante du flux transpiratoire, du transport actif ainsi que de la perméabilité membranaire (Hu and Schmidhalter, 2005; da Silva *et al.*, 2011). En effet, la diminution de la conductance stomatique est décrite chez certaines espèces, comme l'une des premières réponses adaptatives au manque d'eau. Elle peut être considérée comme le point de départ de la réduction du taux d'évapotranspiration, conduisant à une altération de la translocation des éléments depuis les racines aux parties aériennes, en réduisant le flux de masse et donc les capacités d'absorption des racines (Hu et al., 2007, Farooq et al., 2009).

A cet égard, les cellules de garde jouent un rôle primordial dans le contrôle de la conductance stomatique. Ces cellules qui entourent les stomates, régulent le mouvement des gaz et de l'eau, sous le contrôle de stimuli externes (stress biotique et abiotique) et de signaux endogènes (CO_2, hormones et ions). Les mouvements stomatiques sont médiés par l'accumulation et la libération, dans et depuis la vacuole des cellules de garde, des ions K^+ équilibrés par des ions Cl^- dont les rôles ont depuis longtemps été mis en évidence dans la littérature (Cosgrove and Hedrich, 1991). Ainsi, lors d'un stress hydrique, les stomates se ferment notamment en raison d'une perte de turgescence due à l'efflux de ces deux ions. Au vu du rôle fondamental de ces structures, une récente méta-analyse du ionome des cellules de garde (Misra *et al.*, 2019) révèle également le rôle potentiel d'autre éléments dans leur fonctionnement (**Figure II-20**).

Lorsqu'elles sont affectées par un manque d'eau, les plantes doivent donc maintenir la turgescence de leurs cellules et stabiliser la perméabilité des membranes, en maintenant la

rétention d'eau par des ajustements osmotiques (Wang *et al.*, 2013) se traduisant notamment par l'élévation du contenu en K, Cl ou encore Na. L'augmentation de la teneur en K serait liée à son rôle dans le maintien du potentiel hydrique, ainsi que dans l'atténuation des dommages oxydatifs, via l'inhibition de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) induits par le stress hydrique (Cakmak, 2005; Wang *et al.*, 2013). En contrepartie, au stade végétatif, le manque d'eau induit une diminution de la concentration de la majeure partie des éléments dans les feuilles d'*Arabidopsis*, dont le Fe, Zn, Mn, Ca et Mg (Ghandilyan *et al.*, 2009), qui d'après ces auteurs, s'expliquerait par une allocation préférentielle de ces éléments au niveau racinaire. Lorsque le stress hydrique s'intensifie, l'effet principalement observé correspond donc à une diminution de l'absorption des éléments chez de nombreuses plantes telles que le riz (*Oryza sativa*), le maïs (*Zea mays*), le soja (*Glycine max*) et le blé (*Triticum aestivum*) (Tanguilig *et al.*, 1987; Hu *et al.*, 2007). Plus récemment, une méta-analyse semble confirmer les effets délétères du stress hydrique à court terme sur le contenu en N et P (He and Dijkstra, 2014).

Néanmoins, peu d'études décrivent les fluctuations de la teneur en éléments directement à partir de l'estimation ou de la quantification de l'absorption racinaire. Avec les données habituellement fournies, il est alors difficile d'évaluer si les réductions de l'absorption ou plus généralement du contenu des tissus en minéraux, est un effet direct de l'application du stress hydrique ou une conséquence d'une croissance bien souvent réduite par rapport au témoin étudié. De plus, les conséquences du stress hydrique via l'étude de l'ensemble de la composition ionomique restent jusqu'à présent relativement rare (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010; Acosta-Gamboa *et al.*, 2017; Fischer *et al.*, 2019). Toutes décrivent un changement de la composition ionomique dont la tendance est liée à la sévérité du stress appliqué. A titre d'exemple, la composition élémentaire et le rendement des graines d'*Arabidopsis* diffèrent selon les régimes hydriques appliqués et se traduit par une accumulation de Na et une diminution de la teneur en Fe, Ca et Mg, croissante lorsque la limitation en eau augmente (Acosta-Gamboa *et al.*, 2017). Si lors d'un stress hydrique modéré, l'absorption racinaire de cinq cultivars de tomates cerises (*Solanum lycopersicum*) entraîne une fluctuation relativement limitée de la concentration en macro et microéléments au niveau foliaire (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010), chez le maïs (*Zea mays*), ces dernières ont principalement augmenté (Fischer *et al.*, 2019). Cependant, chez cette dernière espèce, une restriction hydrique sévère entraine une baisse généralisée de la concentration en éléments des grains.

Enfin, le stress hydrique est également à l'origine du phénomène de sénescence foliaire à même de provoquer la remobilisation des éléments d'un tissu à l'autre par l'intermédiaire de pools vacuolaires régulés de façon dynamique afin de pallier au manque d'eau (Etienne *et al.*,

2018). Bien que d'un point de vue mécanistique, la manière dont le stockage vacuolaire et le transport à longue distance sont impactés par le stress hydrique reste méconnue, la plupart des éléments du ionome fonctionnel peuvent être remobilisés (Abdallah *et al.*, 2010; Maillard *et al.*, 2015; Etienne *et al.*, 2018).

Ainsi, l'ensemble de ces études suggèrent donc que le stress hydrique, tout en affectant l'absorption des nutriments par les racines, modifie de façon globale le contenu élémentaire de la plante, de ses tissus et différents types cellulaires. Il n'en subsiste pas moins que la bibliographie sur ce sujet reste peu abondante, et son analyse conduit à des conclusions hétérogènes, si ce n'est parfois opposées comme en atteste une récente synthèse bibliographique décrivant les effets de stress hydrique sur la composition minérale des grains, principalement chez les poacées (Etienne *et al.*, 2018). S'appuyant sur les travaux de Lawlor (2013) et He et Dijkstra (2014), elle soulève également le problème de l'hétérogénéité des dispositifs expérimentaux afin de soumettre les plantes à un manque d'eau. Sur de nombreux points tels que l'intensité et la durée du stress appliqué, la disponibilité des nutriments dans le substrat, les conditions d'application du stress (champ, conditions contrôlées, utilisation de polyéthylène glycol ou mannitol en solution nutritive) ou encore la méthode employée (réduction progressive de la teneur en eau du sol, arrêt complet de l'arrosage, cycle de dessiccation/réhydratation du sol, etc), la conception de standards expérimentaux pourraient aboutir à une recherche plus pertinente dans le domaine des effets du stress hydrique.

Ces données révèlent donc la nécessité de ré-évaluer de façon globale l'effet d'un stress hydrique, en prenant en compte l'établissement progressif de la contrainte hydrique (modérée puis sévère), couplée à une analyse plus fonctionnelle prenant en compte l'absorption racinaire, le transfert des racines vers les feuilles, et finalement la composition des différents tissus. Cette possibilité est notamment offerte par l'étude du ionome et dans ce cadre, le couplage d'une telle approche avec des analyses transcriptomiques et métaboliques permettrait alors de repositionner la régulation de la nutrition minérale parmi les grandes fonctions physiologiques affectées ou déjà identifiées comme processus adaptatifs au manque d'eau.

IV. Objectifs de la thèse et stratégies expérimentales

Dans un contexte global de changement climatique et face aux défis de la malnutrition minérale, la compréhension de l'écophysiologie des plantes, en particulier pour le prélèvement des éléments minéraux revêt une nécessité accrue. Si de nombreuses et complexes interactions ont été mises en évidence dans la littérature lors de carences nutritionnelles, peu d'études se sont focalisées sur l'effet spécifique d'un manque d'eau sur la nutrition minérale. De plus, l'étude du ionome a démontré ces deux dernières décennies, son intérêt afin d'évaluer de façon plus globale le maillage d'interactions existant entre éléments, et devrait se révéler utile dans le diagnostic du statut nutritionnel de la plante en permettant de mettre en évidence des systèmes de régulation et des gènes spécifiques, impliqués directement ou indirectement dans la nutrition minérale.

Les résultats obtenus et décrits dans les pages suivantes répondent donc aux objectifs suivants :

- Quantifier et expliciter les modifications du ionome en mettant en évidence toutes les interactions potentielles entre éléments minéraux, avant toute réduction de la croissance chez deux espèces végétales (*Brassica napus* et *Triticum aestivum*), contrastées et de fort intérêt agronomique, soumises à 18 carences nutritionnelles uniques en système de cultures hydroponiques (**Chapitre III**). Cette approche a également permis, via l'identification de signatures ionomiques spécifiques de chaque carence, d'éprouver la capacité de l'approche ionomique en tant qu'outils de diagnostic précoce d'une carence minérale.

- Évaluer les effets d'un stress hydrique modéré ou sévère, chez les mêmes espèces végétales (**Chapitre IV**), sur des indicateurs physiologiques et morphologiques du stress hydrique (analyse d'imagerie, échanges gazeux, discrimination du ^{13}C, accumulation de phytohormones) au regard de l'absorption racinaire nette et du contenu tissulaire des 20 éléments du ionome fonctionnel. Nous avons pu bénéficier dans ce cadre d'une plateforme de phénotypage permettant également de piloter finement la contrainte hydrique appliquée à des plantes cultivées sur un sol. De plus, chez le colza, les modifications du ionome foliaire issus du stress hydrique ont été examinées à la lumière de l'expression d'une liste de gènes i) identifiés à partir de la Gene Ontology comme impliqués dans le transport des ions et ii) connus dans la littérature pour être en lien avec la variation du ionome (Whitt et *al.*, 2020).

- Tenter d'identifier toujours chez le colza, grâce à des approches métabolomiques et transcriptomiques, les mécanismes susceptibles d'expliquer la précocité et les variations de la composition ionomique induites par un manque d'eau (**Chapitre V)** relativement à d'autres processus physiologiques (impliquant par exemple l'ABA, la proline, ou les formes actives de l'oxygène) déjà largement décrits dans la littérature.

Chapitre III

-

Spécificité et plasticité du ionome fonctionnel de *Brassica napus* et *Triticum aestivum* exposés à des carences nutritionnelles

De part un réseau complexe de transporteurs dont la majeure partie sont non spécifiques, les carences nutritionnelles sont susceptibles d'être à l'origine d'importantes variations de l'absorption des éléments se traduisant par des modifications de leur teneur au sein des différents tissus. Afin de mettre en évidence de telles interactions et ainsi accroitre les connaissances relatives à la nutrition minérale des plantes, l'étude du ionome fonctionnel de deux espèces de grande culture, le colza (*Brassica napus*) et le blé (*Triticum aestivum*) soumises à 18 carences nutritionnelles uniques en macroéléments (N, Mg, P, S, K et Ca) ainsi qu'en microéléments (B, Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn et Mo) et éléments bénéfiques (Na, Si, Co et Se) a été réalisée en condition hydroponique. Afin d'identifier des variations précoces du ionome, les plantes ont été récoltées après 10 (macroéléments) et 22 jours (microéléments/éléments bénéfiques), c'est-à-dire avant toute réduction significative de la croissance par rapport aux plantes témoins. L'absorption racinaire, les teneurs des racines et des tissus aériens dont la croissance s'est effectuée avant ou pendant l'application de la carence ont ainsi été analysées. Sur la base des variations de teneurs observées, l'identification des éléments contribuant le plus à la discrimination des carences par analyse PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) a permis de proposer des signatures ionomiques spécifiques de nombreuses carences nutritionnelles.

Résultats majeurs :

Ces résultats ont été publiés sous la forme de deux articles dans Frontiers in Plant Science, intitulés "Specificity and plasticity of the functional ionome of *Brassica napus* and *Triticum aestivum* subjected to macronutrient deprivation" et "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 ignatures".

Ces articles démontrent l'ampleur de la plasticité du ionome foliaire et racinaire, engendrée par d'importantes élévations ou diminutions de l'absorption des éléments, révélant une myriade d'interactions au sein du ionome des feuilles lors d'une carence unique en macroéléments (93 chez le blé, 66 chez le colza, dont 48 communes aux deux espèces) ou en microéléments et éléments bénéfiques (148 chez le blé, 120 chez le colza, dont 26 communes aux deux espèces). Alors que certaines interactions ont déjà été décrites (absorption accrue de Na en cas de carence en K ou de Mo et Se en cas de carence en S), un certain nombre de nouvelles interactions ont été mises en évidence. C'est le cas d’une forte réduction de l'influx de Na lors d’une carence en N, qui semble fonctionnellement liée à l'absorption du nitrate, notamment via NRT2.1 ou encore de l'absorption accrue de V lors d’une carence en S, probablement médiée par une

expression plus importante des transporteurs racinaires de sulfate tels que SULTR1.1 et SULTR1.2.

Les variations de teneurs qui résultent de ces interactions, étaient alors suffisamment spécifiques pour mettre en évidence des signatures ionomiques spécifiques de carences en N, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, Si ou Se chez les deux espèces, ainsi que lors de carences en Mg, Cl, Cu ou Mo chez le blé. Ces dernières ont été déterminées à partir des feuilles dont la croissance s'est déroulée au cours de la carence et s'avère, comme suggéré dans la littérature sur un nombre bien plus restreint de contraintes nutritionnelles, être le tissu le plus pertinent pour l'étude du ionome et pour son utilisation en tant qu'outil de diagnostic. Enfin, l'analyse concomitante des microéléments et éléments bénéfiques augmente considérablement le niveau de précision de la détermination du statut nutritionnel et participe grandement à la caractérisation de ces signatures, prônant ainsi l'étude d'un ionome dit "fonctionnel", comprenant l'ensemble des éléments, essentiels ou non à la vie de l'organisme.

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

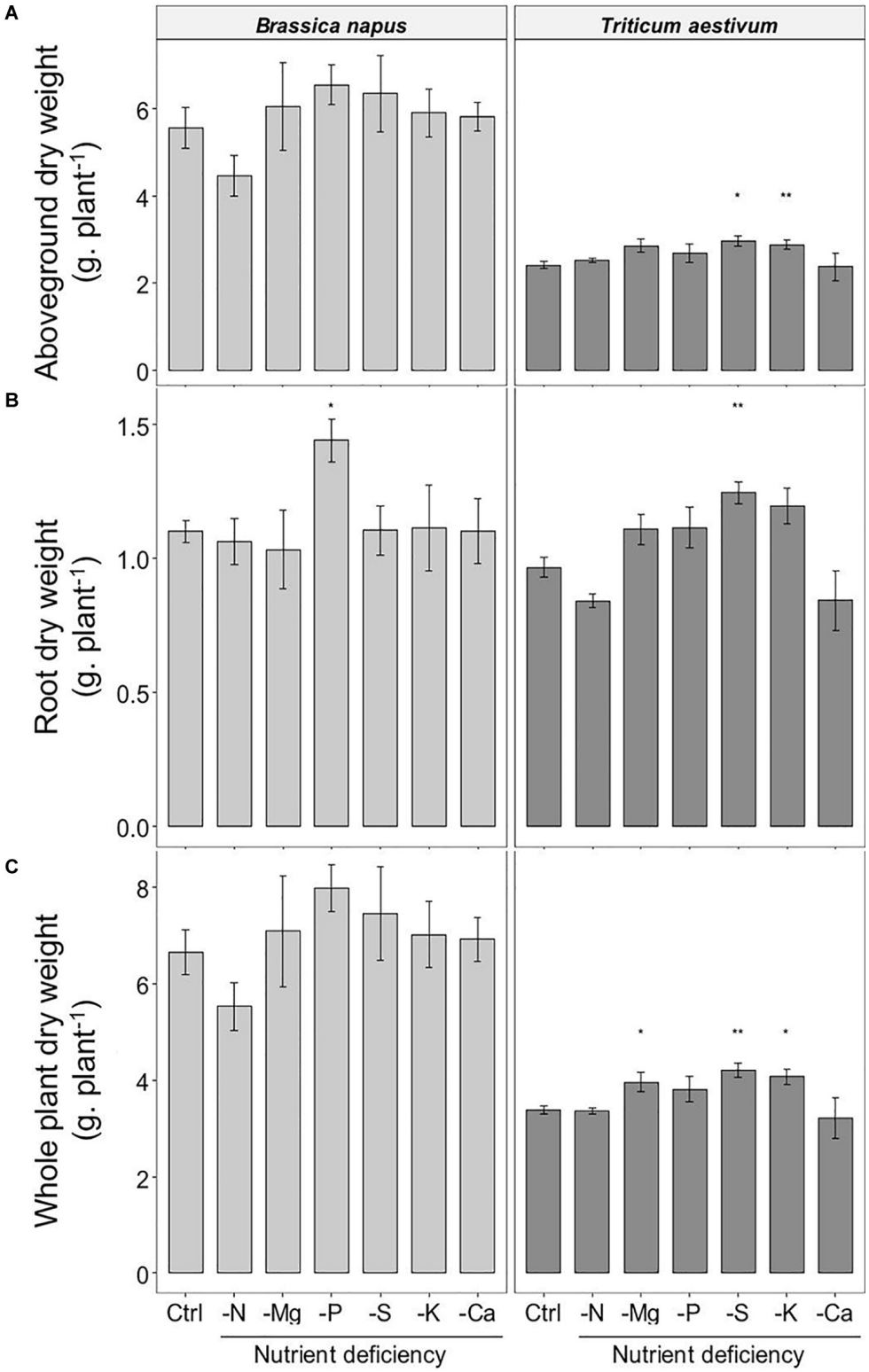


FIGURE 1 | Accumulated dry weight **(A)** aboveground; **(B)** roots; **(C)** whole plant) of *B. napus* and *T. aestivum* plants, 10 days after macronutrient deprivation under hydroponic conditions. Data are given as the mean ± S.E. ($n = 5$) and significant differences between control and macronutrient-deprived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

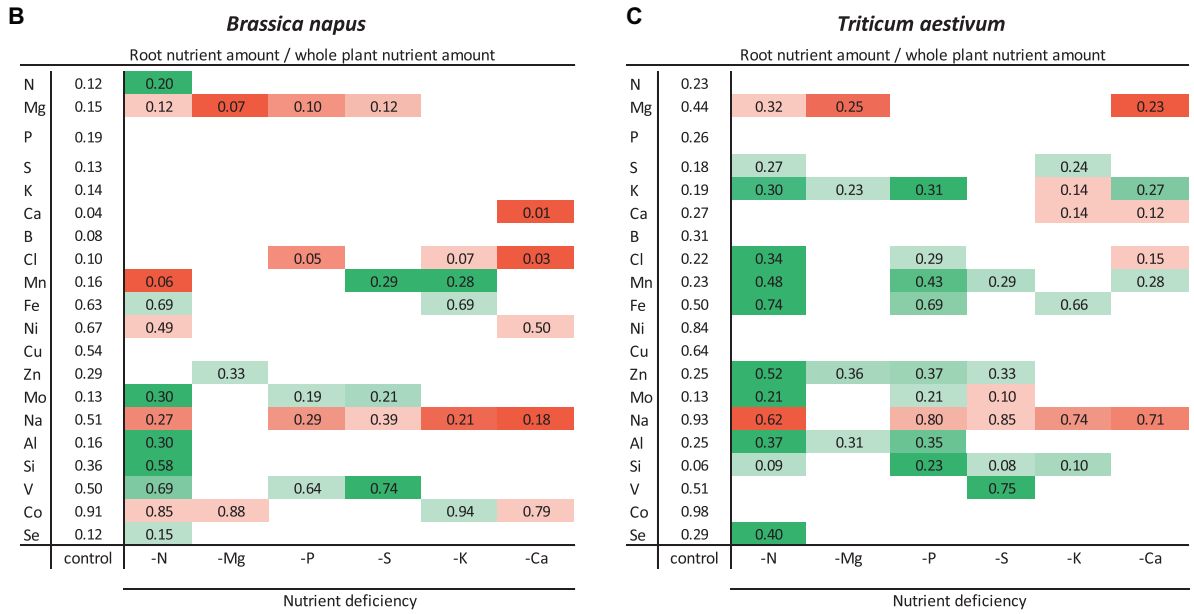


FIGURE 2 | Ratio of roots to whole plant biomass **(A)** and relative root nutrient contents of *B. napus* **(B)** and *T. aestivum* **(C)** plants after 10 days of macronutrient deprivation calculated as the ratio of nutrient content in roots/entire plant. Increases (green) or decreases (red) in relative 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

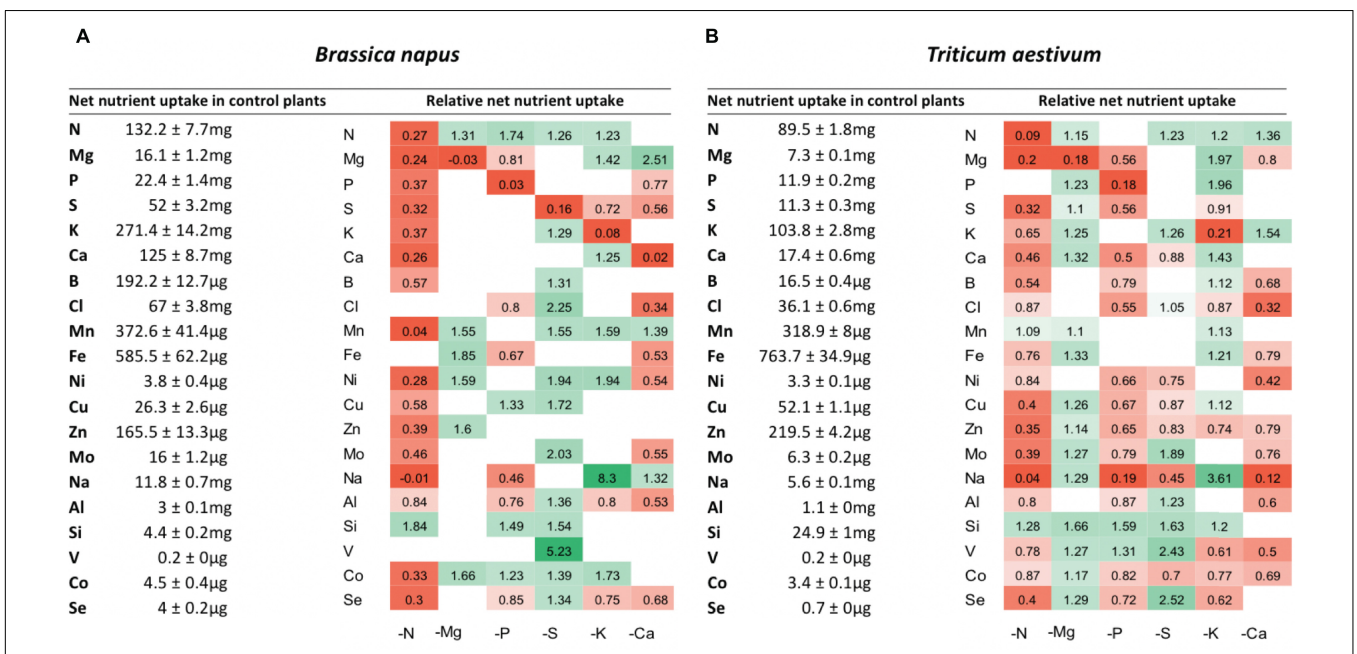


FIGURE 3 | Net uptake of mineral nutrients by control plants over 10 days (left side) and heatmaps (right side) of relative mineral nutrient uptake by *B. napus* **(A)** and *T. aestivum* **(B)** plants after 10 days of macronutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative mineral nutrient 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.

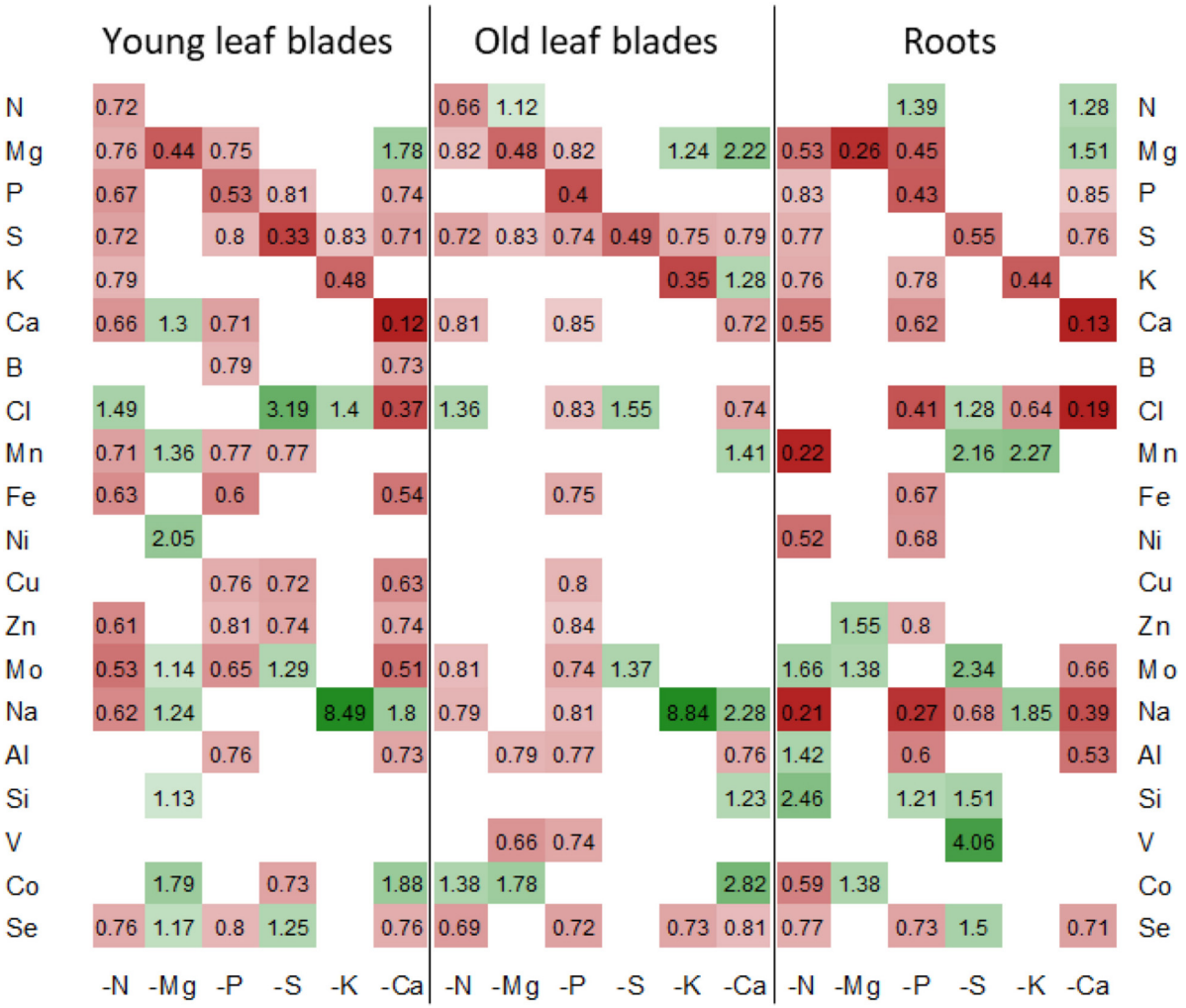


FIGURE 4 | Heatmap of relative mineral nutrient concentrations in *B. napus* plants after 10 days of macronutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative mineral nutrient concentration was calculated (see section "Materials and Methods") as the ratio of nutrient concentration in deprived plants/nutrient 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

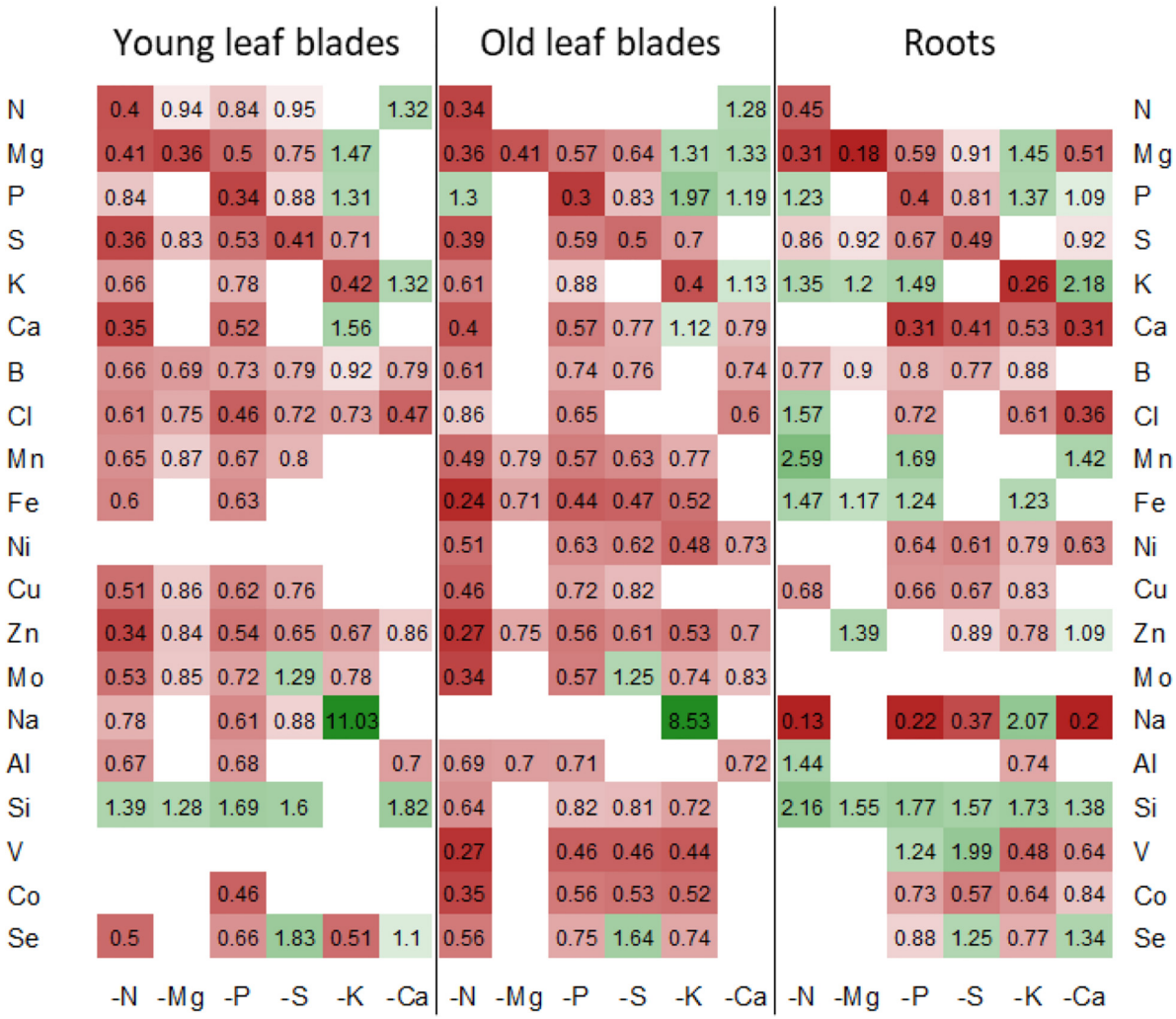


FIGURE 5 | Heatmap of relative mineral nutrient concentrations in *T. aestivum* plants after ten days of macronutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative mineral nutrient concentration was calculated (see section "Materials and Methods") as the ratio of nutrient concentration in deprived 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

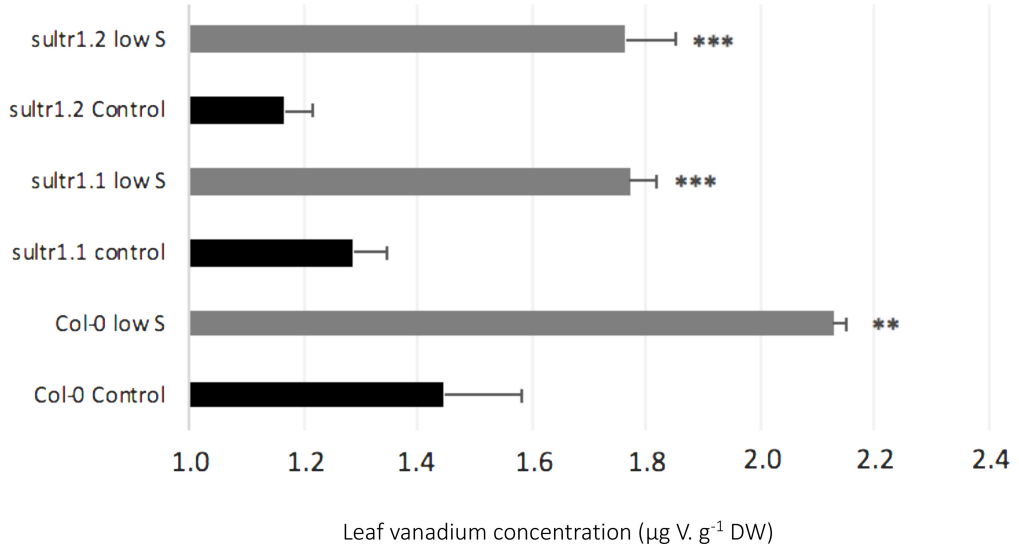


FIGURE 6 | Effects of S deficiency on vanadium concentration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants, wild type Col-0 and the mutants AtSultr1.1 (KO) and AtSultr2.1 (point mutated, Shibagaki et al., 2002), grown under sufficient S supply (Control) or under low S. Data are given as the mean ± SE (n = 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.

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

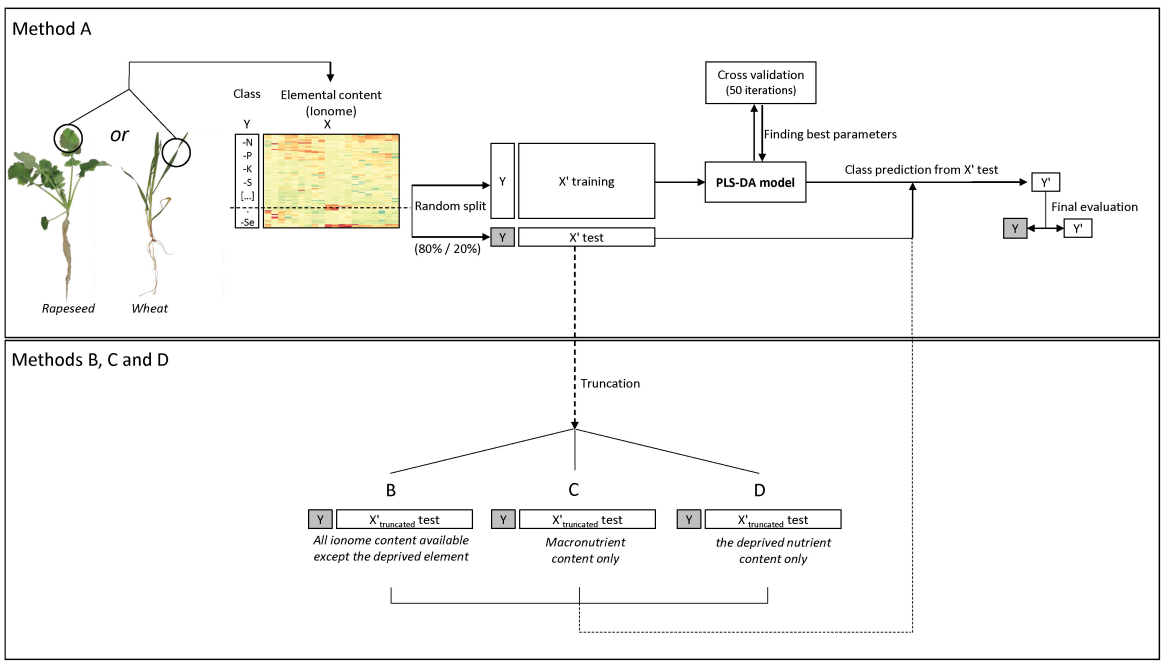


FIGURE 1 | Flow diagram of the ionomic data analysis procedure using the PLS-DA model. The dataset containing the elemental concentrations (i.e., the ionome) (X) and deficiency classes (Y) was randomly split ten times into a training set and a test set (80/20 percent, respectively). Each time a five-fold 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

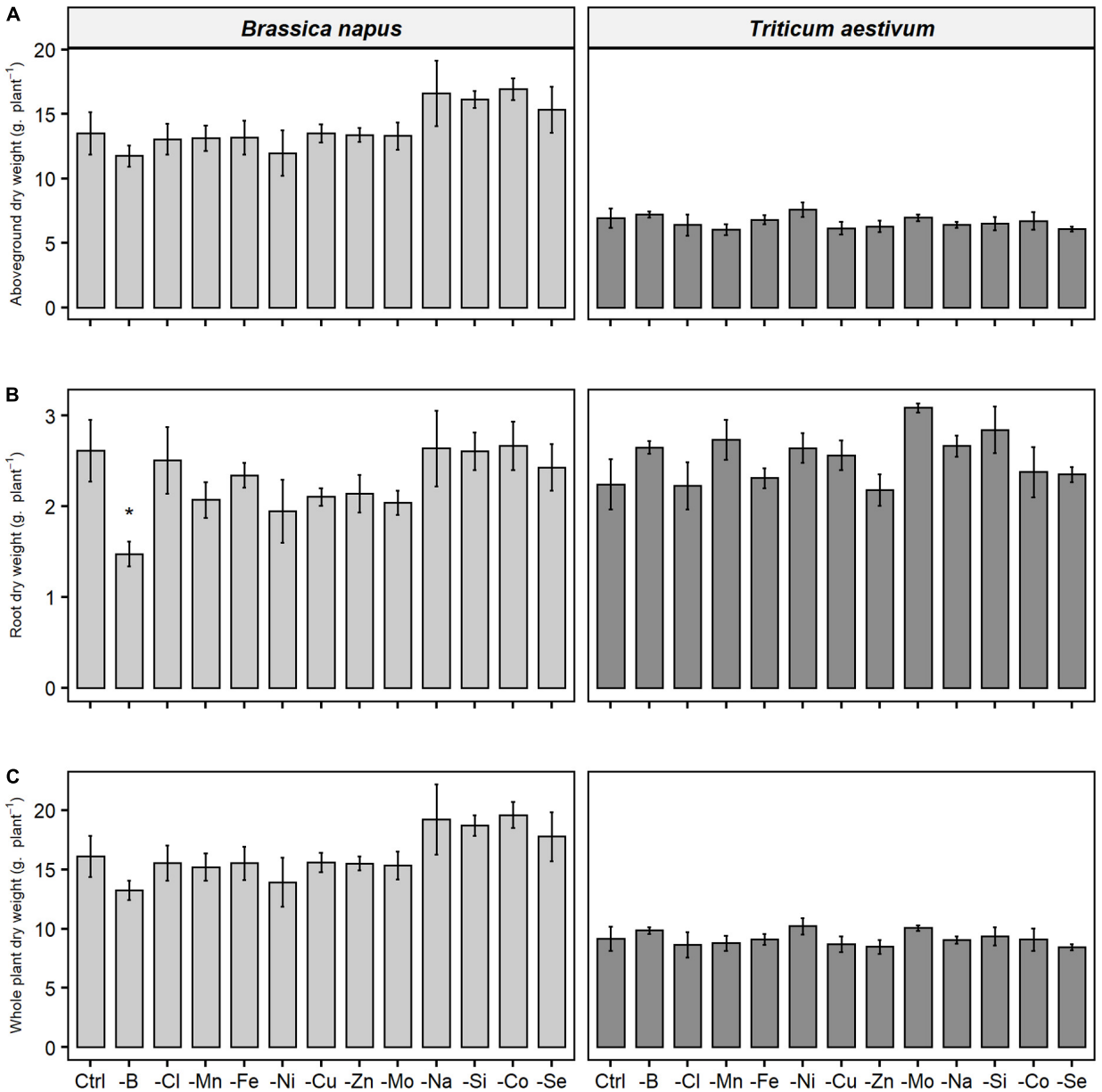
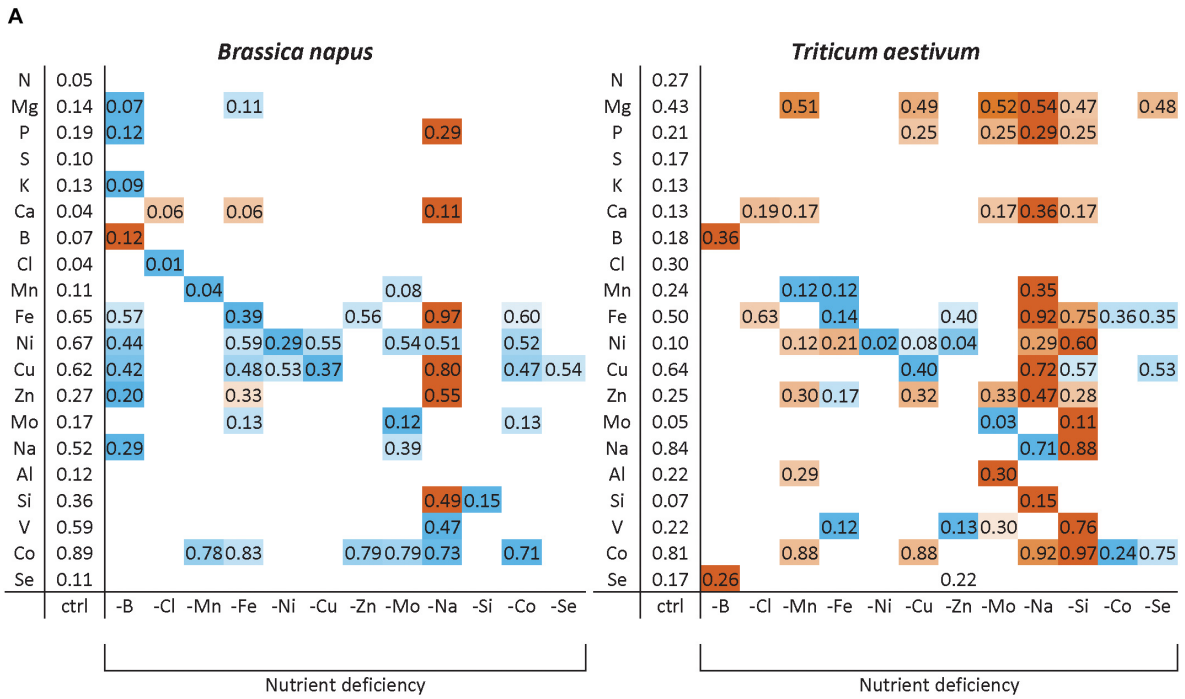


FIGURE 2 | (A) Aboveground, **(B)** root, and **(C)** whole plant dry weight of *B. napus* and *T. aestivum* plants after 22 days of micronutrient or beneficial nutrient deprivation under hydroponic conditions. Data are given as the mean ± SE (n = 5) and significant differences between control and nutrient-deprived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

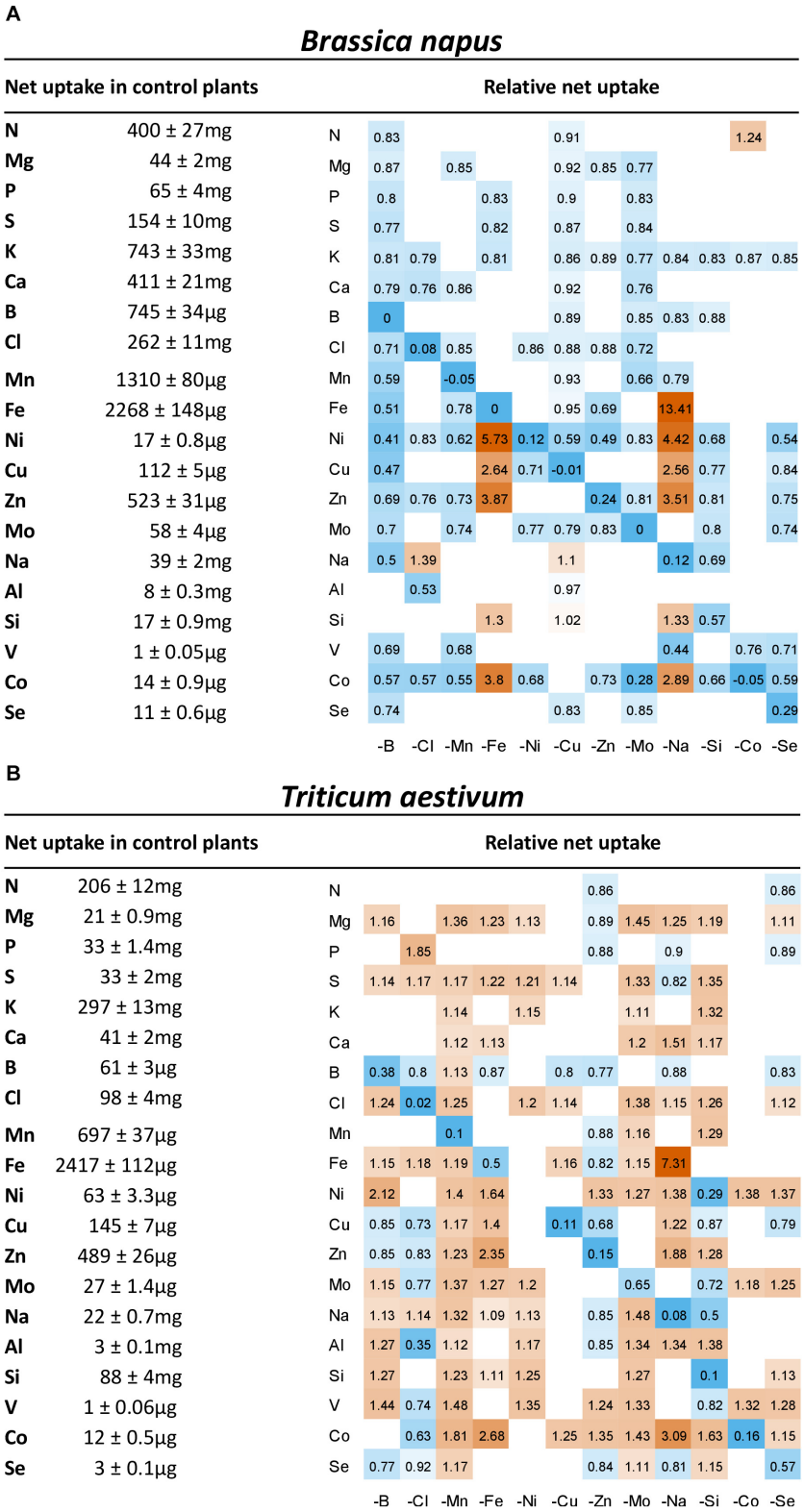


FIGURE 4 | Heatmap of relative net uptake by **(A)** *B. napus* and **(B)** *T. aestivum* plants after 22 days of micronutrient or beneficial nutrient deprivation under hydroponic conditions. Relative net nutrient uptake was calculated (see section "Materials and Methods") as the ratio of nutrients taken 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.

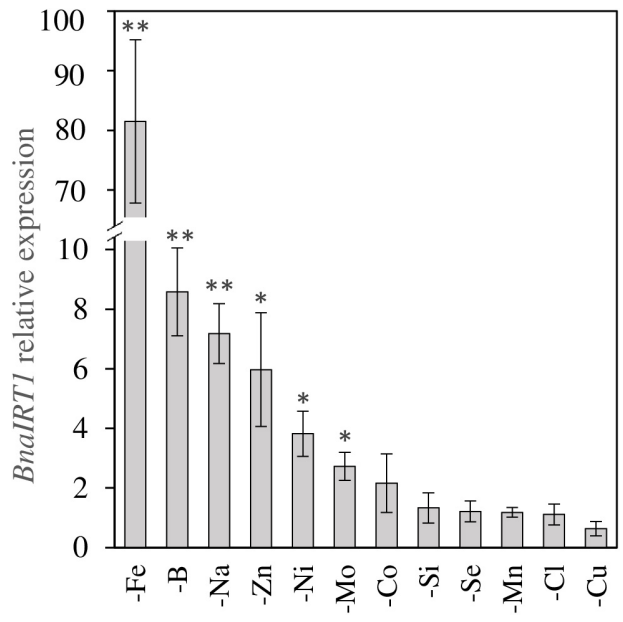


FIGURE 5 | *BnaIRT1* gene expression relative to control plants in roots of *B. napus* subjected to micronutrient or beneficial nutrient deprivation for 22 days. Values are given as the mean ± SE ($n = 5$) and significant differences between control and nutrient-deprived plants are indicated as follows: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

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).

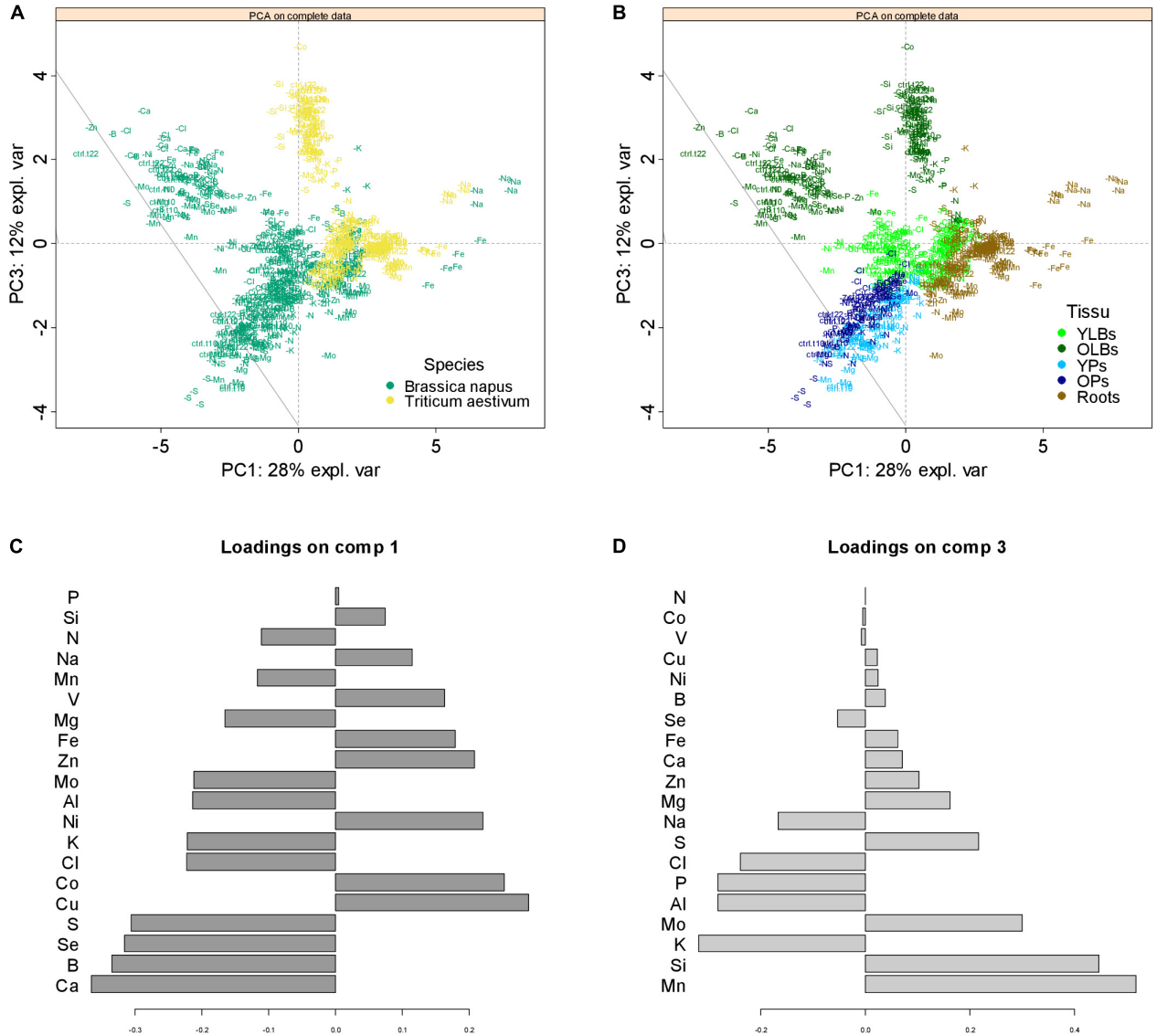


FIGURE 7 | Principal component analysis (PCA) score plots of the complete elemental content data. Projection of the data onto the subspace spanned by components 1 (PC 1) and 3 (PC3), which are colored according to species **(A)** or tissue **(B)**, with each individual labeled with its treatment class (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

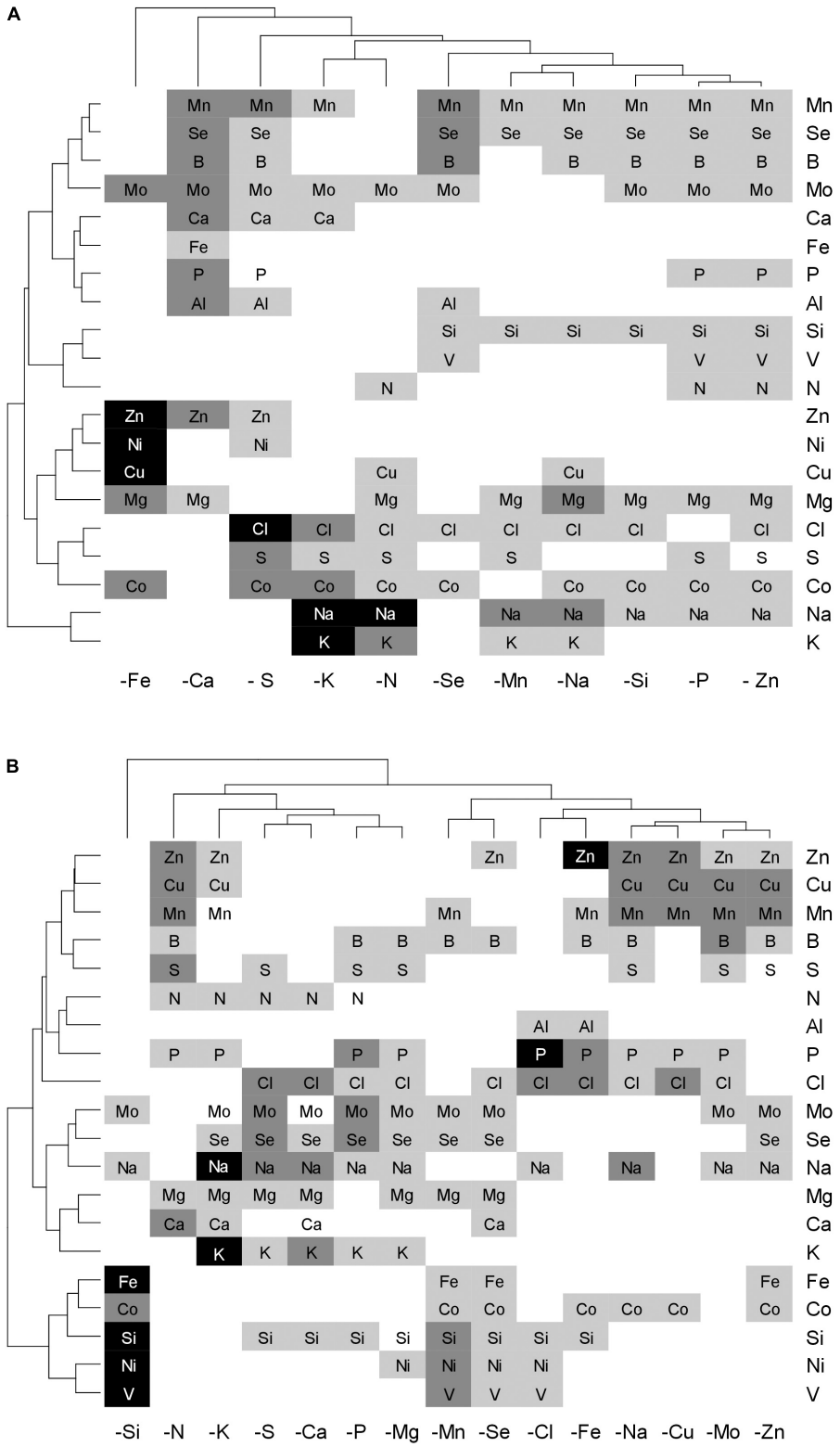


FIGURE 8 | Heatmap of the elements with the highest VIP scores for each deficiency applied to *B. napus* **(A)** and *T. aestivum* **(B)** which were retrieved from the PLS-DA model on YLBs samples. Elements with VIP scores ≥1 are significant (≥1, light gray; ≥1.5, mid gray; ≥2, dark gray) and indicate 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.

Chapitre IV

-

Le déficit hydrique altère spécifiquement et précocement la nutrition minérale de *Brassica napus* et de *Triticum aestivum* ainsi que l'expression de gènes foliaires impliqués dans le transport des éléments minéraux chez le colza.

Parmi les stress abiotiques, le stress hydrique est l'un des principaux facteurs limitant le rendement des cultures. Ces effets sur de nombreux processus physiologiques sont largement documentés, mais les recherches portant sur ses impacts sur la nutrition minérale sont beaucoup plus rares. Afin d'évaluer ces derniers, des cultures sur sol de colza (*Brassica napus*) et de blé (*Triticum aestivum*) ont été soumises à un déficit hydrique modéré ou sévère, afin d'évaluer le niveau d'absorption des éléments et sa répercussion sur les teneurs des différents tissus. Chez le colza, cette analyse a été couplée à l'étude du niveau d'expression foliaire de 183 gènes différentiellement exprimés et impliqués dans la régulation et/ou le transport des éléments minéraux, dont une partie appartient à la liste de KIG (known ionomic genes) récemment établie dans la littérature.

Résultats majeurs : De façon globale, les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence une forte diminution de l'absorption des éléments minéraux ainsi que d'importantes variations des teneurs de l'ensemble des tissus et ce, chez les deux espèces étudiées. Ces effets, sont particulièrement exacerbés pour un groupe d'éléments comprenant le Fe, le Mo, le Zn, le Cu ou encore le Mn. De plus, lors d'un stress modéré, cours ou prolongé, ces effets sont intervenus avant la modification significative d'un grand nombre de paramètres physiologiques mesurés (photosynthèse, synthèse d'ABA, échanges gazeux et biomasse) chez le colza, et dans une moindre mesure chez le blé, et se traduisent alors par une modification précoce de la composition ionomique. Ainsi, la réduction de l'absorption racinaire des éléments minéraux et ses répercussions sur leurs teneurs dans les différents tissus, ne peuvent être simplement attribuées à la diminution du flux de masse qui pourrait, par exemple, être issue d'une accumulation d'ABA et d'une diminution de la conductance stomatique. En effet, au sein des feuilles chez le colza, l'expression des gènes étudiés révèle principalement une régulation à la baisse, ou mixte de ces derniers, qui tranche avec celle observable lors de carences. Ainsi, si l'absorption et les teneurs sont négativement impactées par le stress hydrique, cette diminution ne semble pas perçue comme une carence, en tout cas pas en terme d'expression génique.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis pour publication en octobre 2021 à Plant Direct, intitulée " Drought specifically downregulates mineral nutrition: plant ionomic content and associated gene expression".

Title: Drought specifically downregulates mineral nutrition: plant ionomic content and associated gene expression

Aurélien D'Oria[1,2], Galatéa Courbet[1], Bastien Billiot[2], Lun Jing[2], Sylvain Pluchon[2], Mustapha Arkoun[2], Anne Maillard[2], Christine Paysant-Le Roux[3], Jacques Trouverie[1], 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

[3]Institut des Sciences des Plantes Paris-Saclay (IPS2), Université de Paris, CNRS, INRAE, Orsay, France

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

Keywords: water deficit, ionome, nutrient, transport associated genes, known ionomic genes, iron, zinc, manganese, molybdenum

Running head: Nutrition of wheat and rapeseed exposed to drought

Highlight

In wheat and rapeseed, drought down regulates the uptake of Fe, Mo, Zn and Mn before reduction of growth and this was associated with differential expressions of transport-related genes.

Author Contribution

A.D.O, A.O, S.D, P.E, M.A, and S.P designed the experiments. A.D.O performed the greenhouse experiments and acquired the data. G.C, A.M and AO provided technical assistance to A.D.O for sample harvest. B.B performed the treatment of image analysis. L.J performed phytohormone quantitative analysis. A.D.O performed RNA extraction and C.P.L.R performed RNA sequencing analysis. A.D.O analyzed all data supervised by J.T and P.E for transcriptomic data and by A.O and S.D for ionomic data. A.D.O wrote the article, supervised by S.D and A.O which completed the writing with contributions of all the authors. All authors approved the submitted version. A.O agrees to serve as the author responsible for contact and ensures communication.

Abstract

One of the main limiting factors of plant yield is drought, and while the physiological responses to this environmental stress have been broadly described, research addressing its impact on mineral nutrition is scarce. *Brassica napus* and *Triticum aestivum* were subjected to moderate or severe water deficit and their responses to drought were assessed by functional ionomic analysis, and derived calculation of the net uptake of 20 nutrients. While the uptake of most mineral nutrients decreased, Fe, Zn, Mn and Mo uptake were impacted earlier and at a larger scale than most physiological parameters assessed (growth, ABA concentration, gas exchanges and photosynthetic activity). Additionally, in *Brassica napus*, the patterns of 183 differentially expressed genes in leaves related to the ionome (known ionomic genes, KIGs) or assumed to be involved in transport of a given nutrient, were analyzed. This revealed three patterns of gene expression under drought consisting of up (transport of Cl and Co), down (transport of N, P, B, Mo and Ni) or mixed levels (transport of S, Mg, K, Zn, Fe, Cu or Mn) of regulation . The three patterns of gene regulations are discussed in relation to specific gene functions, changes of leaf ionomic composition and with consideration of the crosstalks that have been established between elements. It is suggested that the observed reduction in Fe uptake occurred via a specific response to drought, leading indirectly to reduced uptake of Zn and Mn, and these may be taken up by common transporters encoded by genes that were downregulated.

Introduction

Availability of water is often described as the major limiting factor in agriculture for plant growth and yield, and global climate change (Seneviratne et al., 2006) is expected to further threaten water resources and rainfall frequency (Mishra and Singh, 2010; Dai, 2013; Wilhite, 2016). The atmospheric fluctuations (i.e. CO_2, temperature or rainfall) that cause plant abiotic stress are also reported to disturb the mineral content in plants (Bouchereau et al., 1996; Fan et al., 2008; Loladze, 2014; Fischer et al., 2019; Soares et al., 2019) and thus challenge food safety (Allen, 2000; Rawat et al., 2013) through negative impacts on nutritional quality. Therefore, knowledge of water limitation and its effects on morphological, physiological, biochemical and molecular traits have been extensively documented in order to guide breeding for suitable characters (Verslues et al., 2006; Farooq et al., 2009; Tardieu, 2012; Simova-Stoilova et al., 2016; Zhu et al., 2016; Raza et al., 2017; Nadeem et al., 2019). Indeed, water stress, which can be defined as an imbalance between available water in the soil and the plant transpiration demand (Tardieu et al., 2011), causes decreases in the transpiration rate, photosynthesis and ultimately biomass production. The resulting loss in yield is dependent on

the species and genotype as well as the intensity and duration of the stress (Levitt, 1980; Bray, 1997; Chaves et al., 2003; Farooq et al., 2009). In response, plants cope with water limitation thanks to processes involving assimilate partitioning, solute accumulation, antioxidant synthesis and hormonal regulation, which can occur in combination (Farooq et al., 2009; Lee et al., 2009; Tardieu, 2013; Basu et al., 2016; Nadeem et al., 2019; Park et al., 2021).

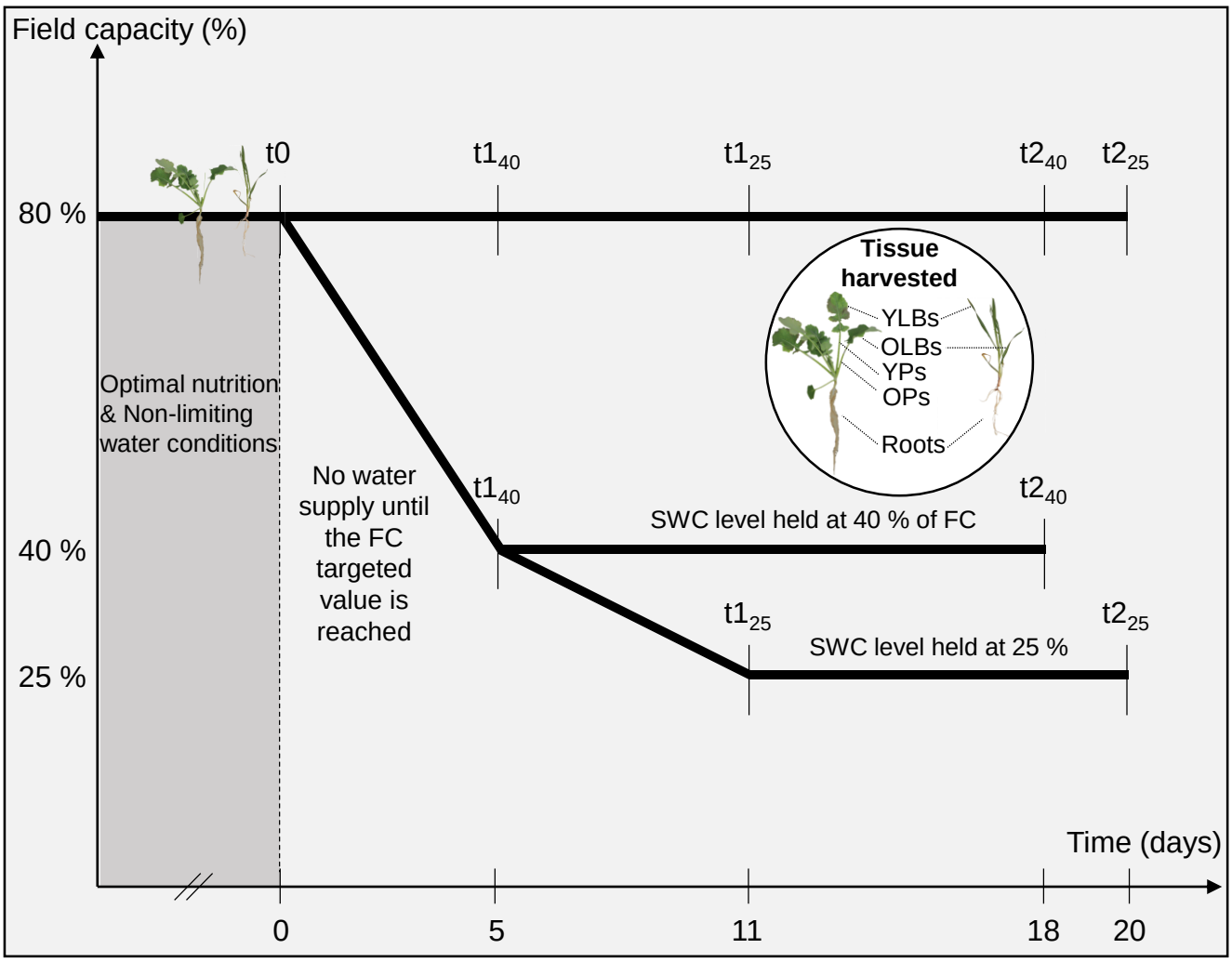
When affected by water limitation, plants need to maintain turgor and stabilize membrane permeability, maintaining water retention by osmotic adjustments (Wang et al., 2013). This could be partly achieved by changes in ion uptake and distribution (Etienne et al., 2018). Nevertheless, ion uptake can be affected by numerous endogenous and exogenous factors. For example, stomatal closure, which is one of the first responses to drought that can be considered as the starting point for transpiration reduction, leads to an alteration in root-to-shoot nutrient translocation by reducing the mass flow and thus root uptake capacities (Hu et al., 2007; Farooq et al., 2009). On the other hand, the reduced level of available water in the soil can lead to a decrease in the mobility (Amtmann and Blatt, 2009) and rate of diffusion of individual nutrients from the soil to the root surface (Hu et al., 2007), and this is partly due to its physiochemical properties. Beyond homeostasis, the twenty elements corresponding to the functional ionome (Lahner et al., 2003; Salt, 2004; Baxter, 2009) are essential or beneficial for plant growth and reproduction, and are integrated into important organic compounds or play key roles in plant metabolism. Therefore, it has been suggested that the whole ionomic composition of plant tissues might serve as a tool to reveal plant physiological status (Baxter et al., 2008; Salt et al., 2008; Baxter, 2015; Pii et al., 2015; Courbet et al., 2021; D'Oria et al., 2021) because the ionome is considered as a social network of elements, controlled by a network of genes responsible for uptake, binding, transport and sequestration (Baxter, 2009).

Actually, the consequences of water stress on the whole ionomic composition have received little attention so far. Few studies have described nutrient uptake or element content fluctuations under water deficit, leading to the conclusion that nutrient uptake mainly declines when water stress intensifies in many plants such as rice (*Oryza sativa*), corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), and wheat (*Triticum aestivum*) (Tanguilig et al., 1987; Hu et al., 2007). However, with data usually provided, it is difficult to assess whether reductions in mineral uptake or more generally in mineral tissue contents were an effect *per se* of drought or if they were only a consequence of reduced growth. Only a small number of reports have considered the whole ionomic composition and/or quantified root uptake under drought (Hu and Schmidhalter, 2005; Sánchez-Rodríguez et al., 2010; Acosta-Gamboa et al., 2017; Fischer et al., 2019). Nevertheless, all of them have described an ionomic shift whose trend is linked to

the severity of the stress applied, and as an example, the elemental composition and seed yield of Arabidopsis (Acosta-Gamboa et al. 2017) changed across the different water regimes tested, with under- (Fe, Ca, Mg) and over- (Na) accumulation of elements when water limitation increased. Similarly, even though a moderate water stress decreased nutrient uptake in five cultivars of *Solanum lycopersicum* (Sánchez-Rodríguez et al., 2010), it resulted in a limited fluctuation in the concentration of foliar macro- and micro- nutrients, whereas in maize the concentration was increased (Fischer et al., 2019). However, a severe water restriction caused a drop in grain nutrient concentration in the latter (Fischer et al., 2019).

Over the last few decades, "-omic" high-throughput techniques have been employed to simultaneously identify and quantify gene expression ("transcriptomics"), metabolites ("metabolomics") or elemental composition ("ionomics"), to decipher metabolic changes in response to biotic or abiotic stresses. These approaches have successfully identified genes controlling the accumulation of one element or a group of elements in different organisms (Lahner et al., 2003; Eide et al., 2005; Sasaki et al., 2016). Recently, Whitt et al., (2020) suggested a curated list of genes that affect the plant ionome and referred to as “Known Ionomic Genes” (KIGs). This list of genes was initially established from *Arabidopsis thaliana* (136 genes identified so far) according to the availability of published works showing that KO or overexpressor mutants were affected for at least one element of the ionome, and has since been extended to other species (ten species revealing 1588 orthologs). Genes that are included may be primarily involved in ion transport and homeostasis and secondarily in metal ion chelation and other types of transport or responses to ions. Nevertheless, this KIG list is limited by the knowledge available, and according to the authors, is over-represented with transporter genes and genes involved in altering the accumulation of iron and zinc. Contrastingly, genes potentially involved in Mg, Ca and predominantly related to N transport were under-represented in this KIG list. While this curated list is usable for deciphering how abiotic stresses affect ionomic composition, its enrichment using gene ontology with genes tagged for ion transport could be relevant to provide more complete information

Thus, in order to decipher the causal relationships resulting from water restriction, the aims of this work were to assess in two contrasting plant species of high agronomic interest (*Brassica napus* and *Triticum aestivum*) the effects of moderate or severe drought on i) growth coupled with physiological and morphological indicators of water stress (imaging analysis, gas exchange, ^{13}C discrimination, phytohormone accumulation) and ii) net root uptake and tissue



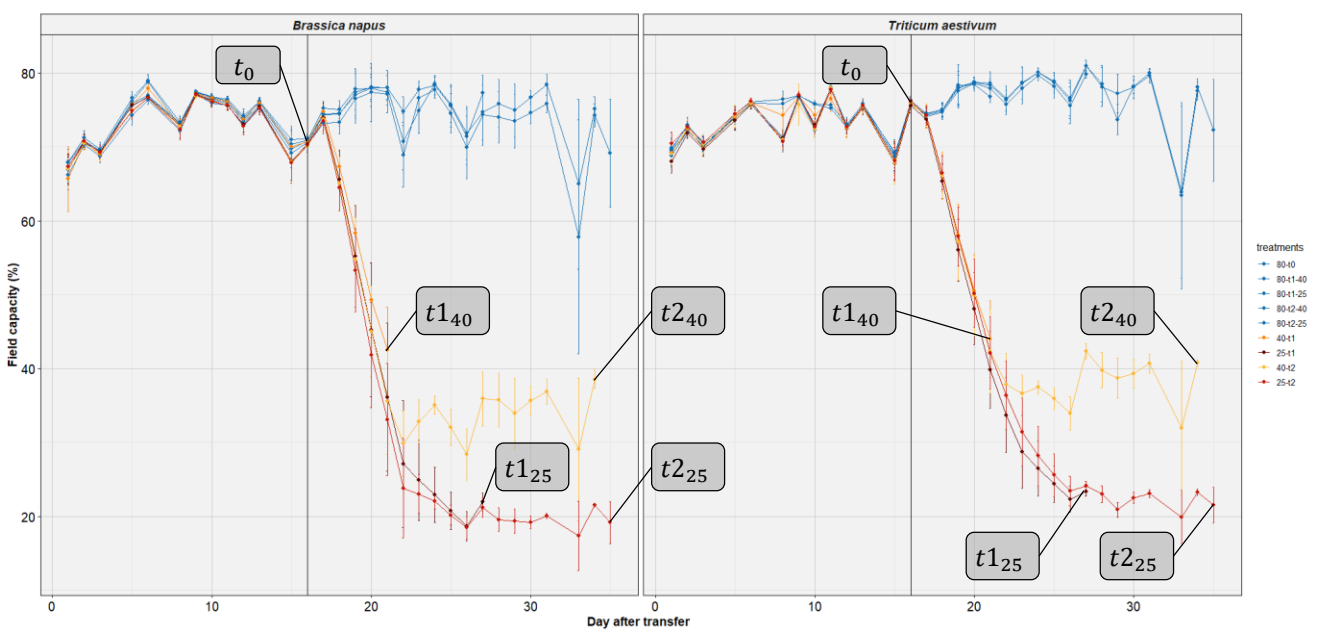


Figure 1. **(A)** Schematic representation of the experimental design. Thirty days after sowing (t_0) plants were divided into three subsets: i) well-watered control plants were kept at 80 % of field capacity (FC) while watering was stopped until the soil water content of all water deficit (WD) pots dropped to ii) 40 % ($t1_{40}$) or iii) 25 % ($t1_{25}$) of FC, which occurred after 5 and 11 days, respectively. These soil water contents were then maintained for 13 days ($t2_{40}$) or 9 days ($t2_{25}$) at 40 % and 25 % of FC, respectively, using automatic watering. **(B)** Soil water contents automatically recorded in the high-throughput phenotyping platform during the experiment. Each value corresponds to the lowest soil water content recorded daily. Control plants (blue) were kept at 80 % of FC until the end of the experiment; irrigation of water deficit condition pots was stopped until they reach 40 % of FC at $t1_{40}$ (orange) or 25 % of FC at $t1_{25}$ (dark red) and then maintained at 40 % (yellow) and 25 % (red) of FC, respectively, until the final harvests ($t2_{40}$ and $t2_{25}$). Data are given as the mean ± SE (n=10).

contents of the 20 elements forming the functional ionome. Furthermore, in *Brassica napus*, changes in the leaf ionome triggered by drought were examined in the light of the expression pattern of genes from the KIG list previously established by Whitt *et al.* (2020) and expanded with the "ion transport" annotated genes obtained from the Gene Ontology. The involvement of relevant genes was then interpreted at the light of change of nutrient uptake and ionomic composition triggered by drought and they were discussed according to previously reported effects of mineral nutrient deficiencies.

Materials and methods

Plant growth conditions and watering regimes

This study was conducted on wheat (*T. aestivum* cv. Bagou) and rapeseed (*B. napus* cv. Trezzor) grown in greenhouse conditions in the high-throughput plant phenotyping platform of the Centre Mondial de l'Innovation (Saint-Malo, France) during June and July of 2019. Seeds were germinated in trays filled with a potting soil mixture (NFU 44551, type 992016F1, Falienor S.A., Vivy,. France) of sandy loam (40 % v/v) and peat moss (60 % v/v) supplemented with clay (40 kg m^{-3}) and NPK (0.7 kg m^{-3} PG-MIX 14-16-18) (soil solution: pH 5,9 +/- 0.2 and Ec (1/1,5) 0,7 mS cm^{-1}) (composition given in **Supplementary Data 1**) in a growth chamber (16 h day / 8 h night at 20°C and 18°C respectively, at 80 % relative humidity). After the second leaf emergence, one rapeseed or three wheat seedlings were transplanted into 6.5 L pots (20.6 cm diameter) filled with 5000 g of the potting soil cited above and watered at 80 % of field capacity (FC) and were placed in a greenhouse with natural light supplemented with high-pressure sodium lamps (MST SON-T PIA Plus 400 W, Philips, Netherlands), to ensure at least 250 µmol m^{-2} s^{-1} of PAR at canopy height (16 h day / 8 h night at 25 °C/20 °C). Pots were then watered daily with tap water to keep 80 % FC and fertilized twice with 100 mL of a modified Hoagland solution (nutrient concentrations within demineralized water were kept balanced for an input equivalent to 40 kg N ha^{-1}, composition available in **Supplementary Data 2**) to ensure the plants' mineral needs until the end of the experiment according to estimations from previous experiments (Sorin et al. 2015; Maillard et al. 2016; D'Oria et al. 2021).

Thirty days after sowing (t_0) plants were divided into three subsets: i) well-watered control plants that were kept at 80 % of FC, and two water deficit (WD) treatments for which watering was stopped until water content (WC) reached ii) 40 % or iii) 25 % of FC, which occurred after 5 ($t1_{40}$) and 11 days ($t1_{25}$), respectively (**Figure 1A**). At these times (t_0 and t_1), one subset of

control and corresponding WD pots were harvested. These soil WC levels were then maintained in the remaining pots for 9 days ($t2_{25}$) and 13 days ($t2_{40}$), respectively, so that the t1 and t2 harvest times are considered as representative of short periods and extended periods of WD, respectively. The amount of water to be supplied was determined by automatic weighing twice a day (**Figure 1B**).

Plant sampling

In order to separate leaves at harvest time that were developed either before water shortage or during water shortage, the last-developed aboveground tissues (leaves for wheat and petioles for rapeseed) were identified at t_0 using a marker pen. At each date, five replicates, each consisting of two pots, were harvested. For rapeseed, leaf blades and petioles were separated, and tissues present before water shortage were described as old leaf blades (OLBs) or old petioles (OPs), and newer tissues were designated as young leaf blades (YLBs) and young petioles (YPs). Likewise, for wheat, OLBs and YLBs were considered (**Figure 1A**). Roots were separated from the shoot and broken roots that remained in the soil, were carefully harvested using tweezers. All roots were merged and thoroughly washed with demineralized water. They were only used for mineral content analysis. The number of newly developed leaves from t_0 and the total leaf number were recorded for rapeseed while the number of tillers was recorded for wheat.

Each fresh sample was weighed and separated into two homogeneous sub-samples, one immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for molecular analyses and the other was oven dried for 72h at 65°C for dry weight determination and finally ground for elemental content quantification.

Phenotyping

Plants were monitored using the high-throughput plant phenotyping platform of the Centre Mondial de l'Innovation (Saint-Malo, France). An imaging unit acquired images of each plant the day before each harvest. The imaging unit comprises top-mounted (results not shown in this study) and side-mounted high-definition RGB cameras and an LED light system (5500 K ± 500 K). For all pot images, a custom-made segmentation algorithm based on a machine learning technique was used to determine the mask of the plant and delete the background in order to compute the morphological and color parameters. The morphological parameters measured, which are linked to the development of plant architecture or result from a specific phenotype induced by biotic or abiotic stress, included the convex hull areas and projected areas for the

top and side views. For the color parameter, the ExG index was calculated (Excess Green Index Eq. 1) as:

$$ExG = \frac{2\,X\,G-(R+B)}{R+G+B} \quad (1)$$

Where G (green), B (blue) and R (red) correspond to mean color intensity by channel.

The net photosynthetic activity of rapeseed and wheat was estimated by instantaneous gas exchange measurements on the last fully-expanded leaf using a Li-6800 portable photosynthesis system (LI-COR, Lincoln, NE, United States) at 500 and 1000 µmol m^2 s^{-1} of photon flux density (PFD) one day before each harvest. Measurement of the CO_2 assimilation rate (A), transpiration rate (E) and stomatal conductance (g_s) were performed on the morning after 2h of illumination with air temperature and humidity in the chamber set to match environmental conditions. The photosynthetic water use efficiency (WUE) was determined as the ratio between A/E.

Elemental content analysis and calculations

Analytical methods used for elemental content quantification were previously detailed in Maillard et al. (2016) and calculation methods in D'Oria et al. (2021). Briefly, dried samples were ground to a fine powder using 4 mm diameter stainless steel beads in an oscillating grinder (Mixer Mill MM400, Retsch, Haan, Germany). After previous acid (HNO_3 with H_2O_2) digestion with 40 mg of dry weight samples, macronutrients (Mg, P, S, K, and Ca), micronutrients (B, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, and Mo), and beneficial elements (Na, Co, V, and Se) were quantified using high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS, Element 2™, Thermo Scientific) calibrated with internal and external standards. For total N concentration and ^{13}C abundance determination (considered as a long-term indicator of WUE), 1.5 mg of powder were analyzed by using a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS, Isoprime, GV Instruments, Manchester, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). In order to quantify Cl, Si, and Al, an X-ray-fluorescence spectrometer (XEPOS, Ametek, Berwyn, PA, United States) was used with approximately 1 g of dry weight powder using calibration curves obtained from international standards with known concentrations. The quantity (Q) of each element in each harvested tissue was calculated using the following equation:

$$Q = E_{i_t} \times DW_{i_t} \quad (2)$$

where E is the elemental content (ppm) in a given tissue i, at each harvest time t (t_0 or t' = $t1_{40}$, $t1_{25}$, $t2_{40}$ or $t2_{25}$) and DW is the corresponding dry weight. The accumulated Net Uptake (NU) from t_0 of a given element can therefore be estimated by the following equation:

$$\mathrm{NU} = \sum_{i=1}^{n} Q_{i_{t'}} - \sum_{i=1}^{n} Q_{i_{t_0}} \quad (3)$$

where Q is the amount of an element at t_0 or t' time 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 water deficit (WD) on elemental content or nutrient uptake, some of the results were expressed relative to control, using the ratios: $\frac{E_{WD}}{E_{control}}$ or $\frac{NU_{WD}}{NU_{control}}$

Determination of phytohormone profiles

Phytohormone profiles were assessed on rapeseed and wheat leaf samples collected at $t1_{40}$, $t1_{25}$, $t2_{40}$ and $t2_{25}$ and stored at -80 ºC. Abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) standards were purchased from Sigma (Lyon, France). The stable isotope-labeled internal standards, $^2H_4$-SA and $^2H_6$-ABA, were purchased from OlchemIn (Olomouc, Czech Republic). Twenty mg of ground frozen shoots were extracted with 1 mL of 70 % methanol (Optima LCMS grade, Fisher, UK) and 1 % formic acid (LCMS grade, Fluka analytics, Germany) in Milli-Q water containing isotope-labeled internal standards. After extraction, the samples were centrifuged at 12,600 rpm to collect the supernatant. After evaporation (SPE Dry 96, Biotage, Uppsala, Sweden), the extract was re-suspended in 2 % formic acid solution and purified thanks to an SPE ABN express column of 1 mL/30 mg (Biotage). The phytohormones were eluted with methanol and samples were evaporated and resuspended in a 0.1 % formic acid solution before injection into the UPLC-MS/MS system. The separation and detection were accomplished using a Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Japan) coupled to a QTrap 6500+ mass spectrometer (Sciex, Canada) equipped with an IonDrive turbo V electrospray source. Phytohormone separation was carried out by injecting 2 µL into a Kinetex Evo C18 core-shell column (100 x 2.1 mm, 2.6 µm, Phenomenex, USA) at a flow rate of 0.7 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 LCMS grade containing 0.1 % formic acid. The separation was achieved with the following gradient: linear gradient from 1 to 60 % B over 5 min, 60 to 100 % B from 5 to 5.5 min, maintained at 100 % B from 5.5 to 7 min, 100 to 1 % B from 7 to 7.5 min and maintained at 1 % until 9.6 min for column regeneration. The MS analysis was done

in scheduled MRM (multiple reaction monitoring) mode in negative mode. The MS acquisition was carried out with the following parameters: ion spray voltage -4500 V; source temperature 600 °C; curtain gas 35 psi; nebulizer gas 50 psi; heater gas 60 psi; collision gas medium; entrance potential - 10 V; MRM detection window 30 sec; and target scan time 0.075 sec. The targeted MRM transitions are m/z 136.9/92.9 (SA), 140.9/97.0 (D-SA), 263.0/153.0 (ABA) and 269.1/159.0 (D-ABA).

RNA extraction and RNA sequencing (RNA-seq)

Total RNAs from *B. napus* were extracted from 200 mg FW of leaf blades whose growth occurred after t0 in control plants or during water shortage in WD (YLBs). Samples were ground into powder using liquid nitrogen. The resulting powder was mixed with 750 µl extraction buffer (0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 1 mM EDTA and SDS 10 % (W/V) at pH 8) and 750 mM of hot phenol (80 °C, pH 4), then vortexed for 40 s. Chloroform/isoamylalcohol (24:1) was added and the homogenate was centrifuged at 15 000 g (5 min at 4°C). The supernatant was thereafter transferred into 750 µl of LiCl solution (4 M) and incubated overnight at 4 °C. After centrifugation (15 000 g for 30 min at 4 °C), the pellet was suspended in 20 µl of sterile water. Purification of RNAs including a step of DNA digestion by DNAse and was performed using RNA Clean & Concentrator Kits (RCC) according to the manufacturer's protocol (Zymo Research, Irvine, USA).

RNA-seq libraries were generated with the TruSeq Stranded mRNA protocol (Illumina®, California, U.S.A.) with an average size of 260bp 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 101040 genes (annotation V5 from Genoscope: http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/data/) was evaluated by unequivocal mapping of the PE reads to each gene. According to this method, 27 % of reads were excluded for null counts and 28 % of genes with low expression were filtered, which reduced the dataset to around 53000 genes.

Establishment of the transport-related and KIGs list

Genes annotated in the "ion transport" gene ontology (GO:0006811, 3018 genes) were extracted from the Amigo2 annotation tool (V 2.5.15) (Carbon et al., 2009) and were complemented with *B. napus* orthologs (448 genes) of the 111 *Arabidopsis thaliana* KIGs described by Whitt et al.

(2020) using the BioMart tool of the EnsemblPlants database (EnsembPlant genes 51 – *Arabidopsis thaliana* genes (Tair10) – *Brassica napus* genes (AT_PRJEB5043_v1). The list of 712 *B. napus* genes generated **(Supplementary Data 3)** was cleaned and the differentially expressed genes (DEGs) were filtered. Genes from the Whitt et al. (2020) review were assigned with the element(s) defined in the review, while in the case of the GO genes, we only retained those with an unambiguous relationship to the transport of one or more elements in *Arabidopsis* according to the Tair description. Ultimately, 183 genes (of which 103 belonged to the KIG list) were found to be differentially expressed in our experimental conditions considering the two WD treatments compared to the control **(Supplementary Data 3)**.

Statistical Analysis

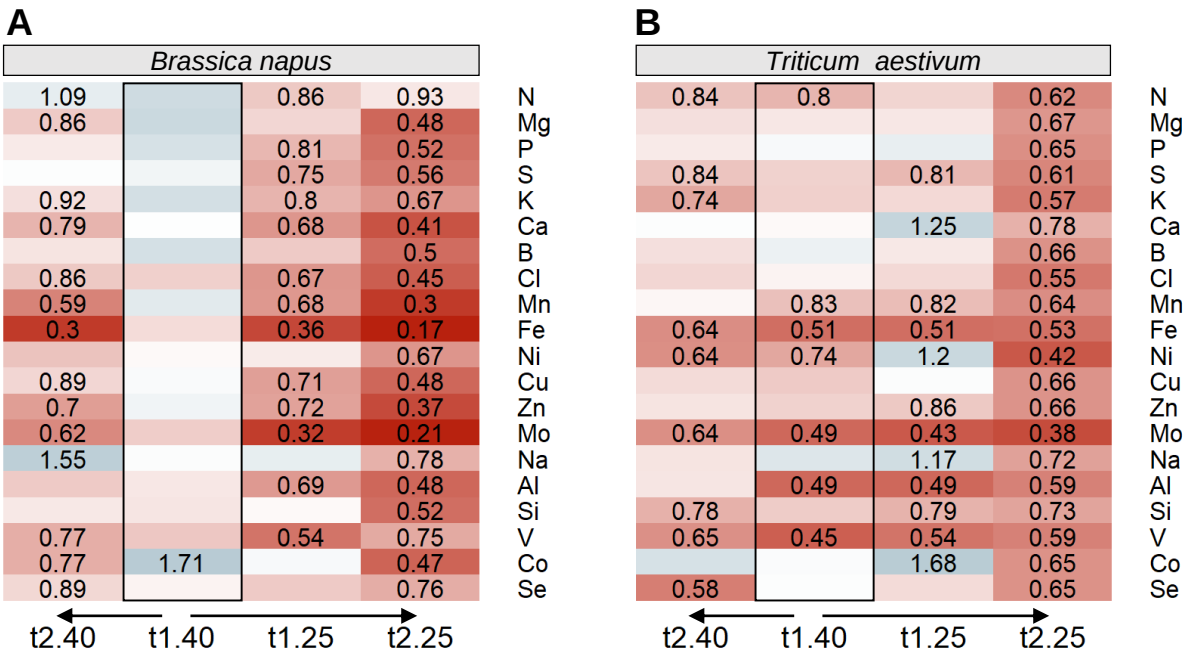
Univariate analysis

Statistical analyses were performed using R software (version 4.0.3: R Core Team, 2020) and RStudio (version 1.3.1093: RStudio Team, 2020). The variation in assimilation rate, transpiration rate, WUE, stomatal conductance, $\delta^{13}C$, side area, convex hull area, excess green index, tissue dry weight, ABA and SA concentrations were analyzed using ANOVA and Tukey's HSD *post-hoc* test at $\alpha = 0.05$. Data are given as the mean ± SE (standard error) for n = 5. Data were analyzed based on an experimental design that contained five independent replicates, each consisting of a pool of two or six individual plants for rapeseed and wheat, respectively. For each nutrient, net uptake (NU) from t_0 is given as the mean ± SE for n = 25, considering all random subtractive combinations of element quantity between two harvests of five replicates, according to the previously indicated Eq. 3.

RNA-Seq data analysis

Differential analysis of each gene followed the procedure described in Rigaill et al. (2018). Library size was normalized using the trimmed mean of M-value (TMM) method and the count distribution was modeled with a negative binomial generalized linear model. Dispersion was estimated by the edgeR method (V1.12.0, McCarthy, 2012). Expression differences were tested between WD and control plants using the likelihood ratio test, and p-values were adjusted by the Benjamini-Hochberg procedure to control False Discovery Rate (FDR, p-value < 0.05). Genes were considered as differentially expressed for an adjusted p-value ≤ 0.05, whatever the absolute value of "Log_2 fold change".

Heatmaps were generated using the ComplexHeatmap package (Gu et al., 2016) (version 2.6.2) and multivariate data analysis was performed using the mixOmics package (version 6.14.0).



C

	t1.40	t2.40	t1.25	t2.25
B.napus	1.06 ± 0.08	1.00 ± 0.07	0.91 ± 0.07	**0.67 ± 0.04**
T.aestivum	0.94 ± 0.05	0.88 ± 0.09	0.94 ± 0.09	**0.7 ± 0.04**

Figure 2. Heatmaps of relative net uptake (NU) from t_0 by **(A)** *B. napus* and **(B)** *T. aestivum* plants exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2) compared to control plants maintained at ≥ 80 % of FC. Only significant values for $p<0.05$ are given, with a color gradient indicating NU relative to control plants (blue, higher; red, lower). **(C)** The plant biomass ratios (WD/control) of the total plant dry weight are also given as the mean ± SE (n=5) in order to evaluate the magnitude of NU variations regardless of biomass. Only bold values differed significantly from control plants ($p<0.05$). Nutrient Net Uptake of control plants is provided in **Supplementary Data 4**.

Results

Effects of water deficit on plant phenotype

Aboveground and total plant dry weight were not significantly impaired in either *B. napus* or *T. aestivum* plants at 40 % of FC after a short ($t1_{40}$) or extended ($t2_{40}$) water deficit, nor after 11 days when the two species faced a drop in WD down to 25 % of FC ($t1_{25}$) (**Table 1**). Overall, plant growth was significantly reduced in both species only after an extended period of severe water restriction ($t2_{25}$). The aboveground biomass (in particular YLBs) and the whole plant biomass of both species were indeed significantly decreased, while root dry weight was significantly reduced only in rapeseed. These biomass reductions were concomitant with a significant decrease in the number of newly-appeared leaves (YLBs) during WD in rapeseed (decreased by 28 % compared to control) as well as with a lower tiller number in wheat (decreased by 29 % compared to control) (data not shown). Although differences were not significant, the root biomass of WD plants tended to increase compared to control plants in both species at $t2_{40}$ and $t1_{25}$.

Table 1 also reports the effects of water deficit on *B. napus* and *T. aestivum* biomass, gas exchange variables, ABA and SA concentrations, as well as on parameters computed from image analysis. Overall, water deficit mainly induced a significant decrease in all cited parameters relative to control plants, except water use efficiency (WUE), ^{13}C discrimination ($\delta^{13}C$) and ABA concentration, which were increased. At $t1_{40}$, five days after water supply was stopped, only the ABA concentration was increased in WD plants of both species (by 1.8 and 1.6 fold in rapeseed and wheat, respectively). The WUE was also slightly increased (1.4 fold) and excess green index (ExG) decreased in rapeseed, while the transpiration rate (E) was significantly reduced in wheat. From a kinetic point of view, at $t1_{25}$ and then $t2_{25}$, the number of significantly affected parameters was progressively increased. Indeed, gas exchange variables (E and $\delta^{13}C$), ABA concentration and parameters from images analysis (side area, convex hull and ExG) were strongly affected in both species (as well as assimilation rate (A), WUE and stomatal conductance (g_s) in rapeseed) as early as $t1_{25}$ (**Table 1**). Contrariwise, in both species, plants that were maintained at 40 % of FC (**Figure 1A**) showed fewer differences than plants subjected to soil WD reduced to 25 % of FC ($t1_{25}$) and then maintained at this level for 9 days ($t2_{25}$). Indeed, only the ABA and SA concentrations associated with convex hull and ExG distinguished WD rapeseed from control plants at $t2_{40}$, while A, $\delta^{13}C$ and side area also differed significantly in wheat. Since ABA concentration and ExG allowed discrimination of

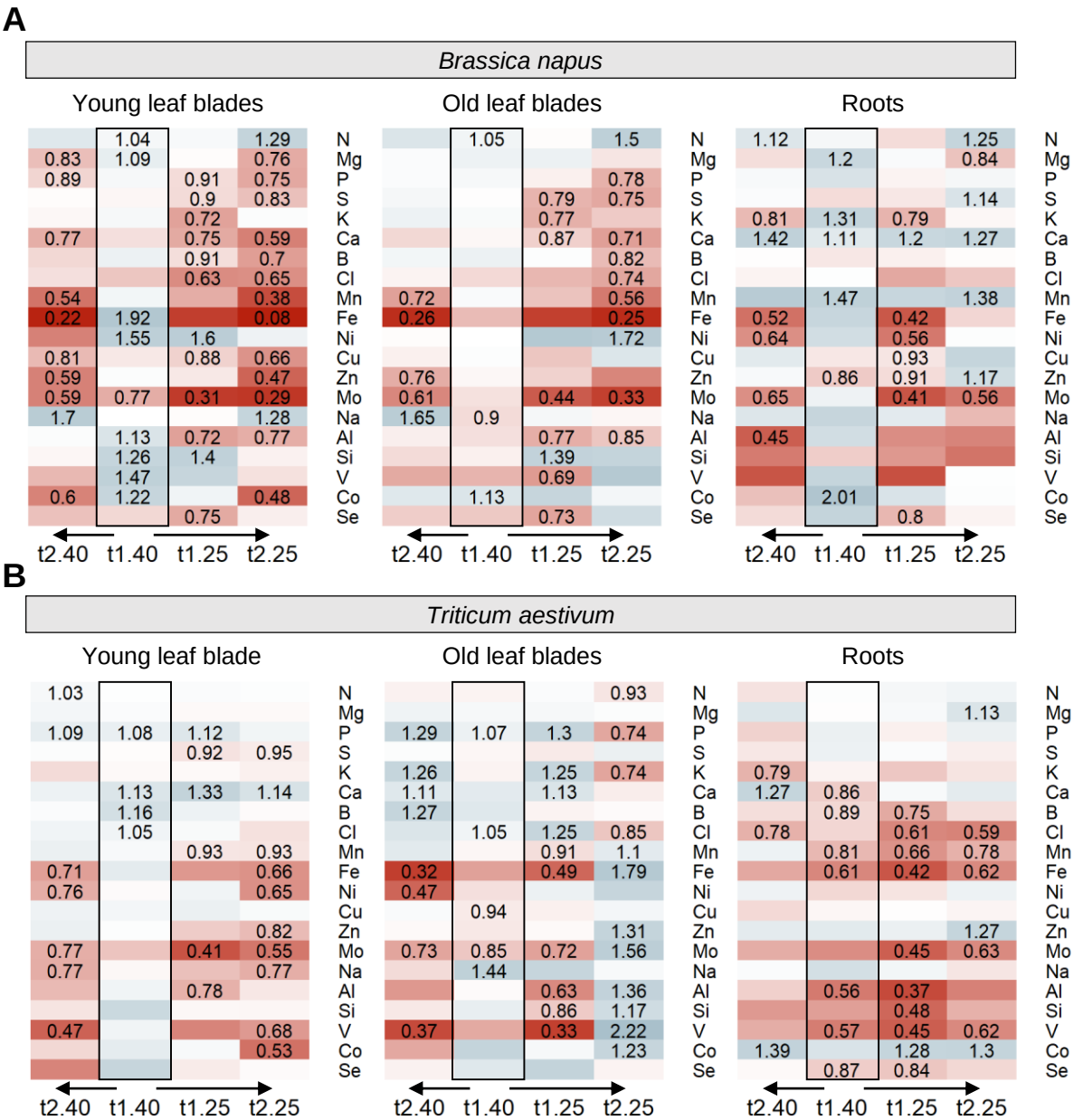


Figure 3. Heatmaps of relative nutrient concentration in **(A)** *B. napus* and **(B)** *T. aestivum* plants exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2) compared to control plants maintained at ≥ 80 % FC. Only significant values for $p<0.05$ are given, with a color gradient indicating relative concentration higher (blue) or lower (red) than control plants. Blank cells in heatmaps correspond to non-significant variations in concentration compared to control plants. Leaves developed before or after t_0 are indicated as old leaf blades (OLBs) and young leaf blades (YLBs), respectively. Nutrient concentrations of wheat and oilseed rape tissues (control plants) are given in **Supplementary Data 5**.

WD from well-watered pots at each harvest, these parameters seemed to be highly sensitive only five days after the restriction of water supply.

Variation in relative net uptake of mineral nutrients induced by water deficit and their concentration in plant tissues

Irrespective of the WD level and duration, water deficit treatments of *B. napus* and *T. aestivum* induced numerous decreases in the relative nutrient Net Uptake (NU) (**Supplementary Data 4)** from t_0 (**Figure 2**). Nevertheless, at the earliest harvest $t1_{40}$ (five days after the water supply was stopped), the relative NU in rapeseed was not significantly impaired (except for Co) (**Figure 2A**). Despite this lack of relative NU variation at $t1_{40}$ (**Figure 2A**), plant tissue composition (**Supplementary Data 5)** was already affected, particularly in YLBs where the Mo concentration was decreased and Fe, Ni, Al, Si, V and Co concentrations were increased compared to control plants (**Figure 3A**). Contrastingly, in wheat the relative NU of N, Mn, Fe, Ni, Mo, Al and V was already significantly affected at $t1_{40}$, and in some cases was reduced by nearly 50% compared to control plants (**Figure 2B**). This reduction in relative NU led to an ionome disruption that chiefly occurred in wheat roots, where the contents of four out of seven of these elements (Mn, Fe, Al and V) were significantly reduced (**Figure 3B)**. Nevertheless, except for a slight reduction in Mo content in OLBs, the elemental contents in aboveground tissues were not negatively affected.

Overall, WD induced relative NU reductions in most nutrients, which occurred gradually from $t1_{40}$ to $t2_{25}$ in both species. Among them, Fe, Mo, V, Al, Mn or Zn content showed similar trends in both species (**Figure 3)**. Compared to the 30 % total biomass reduction at $t2_{25}$ (WD/control ratio around 0.7) in both species (**Table 1**), the reduction in NU of most nutrients was much higher in rapeseed; specifically, the uptake of Fe, Mo, Mn, and Zn were reduced by 83 %, 79 %, 70 % and 63 % at $t2_{25}$ respectively, with the NU of Fe and Mo having already been affected to the same degree from $t1_{25}$. On the other hand, in wheat the reduction in NU values was similar to biomass for most nutrients, except for Ni, Fe and Mo, which were reduced by a greater amount (**Figure 2B**). This NU reduction observed at 25 % of FC led to massive decreases in the content of a large number of elements in all plant tissues in both plant species, with the exception of wheat OLBs (**Figure 3**). The most massive effects were found for Fe, Mo, Mn and Zn contents, and mostly in rapeseed. By contrast, plants that were maintained at 40 % of FC until $t2_{40}$ showed a lower number of significantly affected NU or nutrient contents, and the ones that were affected were closer to the values observed in control plants than in the $t2_{25}$ WD-treated plants.

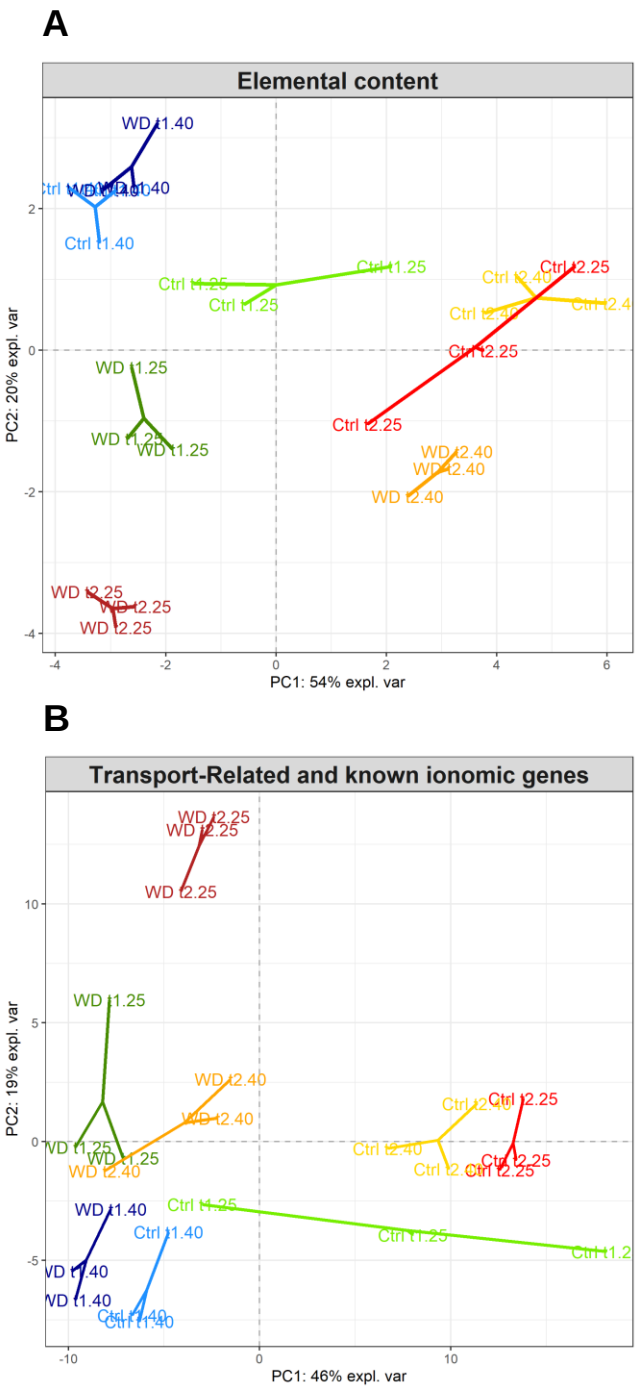


Figure 4. Principal component analysis (PCA) score plots of rapeseed YLBs. (**A**) elemental content raw data (ppm) and (**B**) RNAseq normalized counts of transport-associated genes (183 genes, among which 103 are Known Ionomic Genes (KIGs)) projected onto the subspace spanned by components 1 (PC 1) and 2 (PC2). Individuals are colored in pairs according to the water regime applied (light, control; dark, WD) at each harvest time.

In both species, the relative NU of a few nutrients was transiently increased by water supply restriction. This was the case for Co, Na, Ni and Ca uptake at $t1_{25}$ in wheat, whereas Co increased in rapeseed at $t1_{40}$ alone (**Figure 2**). This increased uptake of Co led at the same time, to an increase in root Co content in both species as well as in leaves of rapeseed (**Figure 3**). A similar trend was also observed for Na in rapeseed, resulting in increased content (1.7 fold increase) in YLBs and OLBs at $t2_{40}$ (**Figure 3A**).

Although some relative content differed between YLBs and OLBs, no opposing trends in nutrient content dynamics under WD were reported in leaves appeared before or after WD application, regardless of species. However, roots and leaves showed opposite trends for relative concentrations of Ca, Ni, S or Mn in rapeseed, and to a lesser extent for B, Cl and Co in wheat.

Expression of transport associated genes and KIGs in relation to ionomic changes under water deficit in *Brassica napus* leaves

Principal component analysis (PCA) of elemental content (**Figure 4A**) and the normalized count of transport-associated genes from RNA sequencing (**Figure 4B**) in rapeseed YLBs, indicated a high level of profile similarities. Along the first two principal components (PCs), the cumulative proportion of explained variance reached 74 % and 66 %, respectively, reflecting a similar discriminating power for both types of data. In both PCAs, the first PCs were mainly driven by elapsed time during the experiment and the water deficit applied. WD samples were well discriminated from the respective controls at each harvest, except at $t1_{40}$ where control and WD samples were much closer than the other control-treatment pairs (**Figure 4**). In both PCAs, the variability of the control appeared predominantly on PC1 where samples were well segregated from $t1_{40}$ to $t2_{25}$ (**Figure 4**). In the latter treatment, samples were closer to $t2_{40}$ in accordance with the sampling method whereby only 2 days separated the harvests (**Figure 1A**). In the same vein, WD samples were well segregated from each other along PC2 in relationship to the level and duration of WD treatments, and besides, both PCAs showed less distance between $t1_{25}$ and $t2_{40}$ compared to other samples. On PC2, elements that contributed the most to sample discrimination (**Figure 4A**) were P, Co, Se and Na, with lower P, Co and Se as well as higher Na levels in samples from the lower part of the PCA (loadings available in **Supplementary Data 6**) in accordance with previous observations (**Figure 3A**).

Amongst the 183 differentially expressed genes (DEGs) associated with transport functions or identified as KIGs in rapeseed, downregulated DEGs were predominant compared to upregulated DEGs for each harvest (**Figure 5**). The larger intersection profile corresponded to

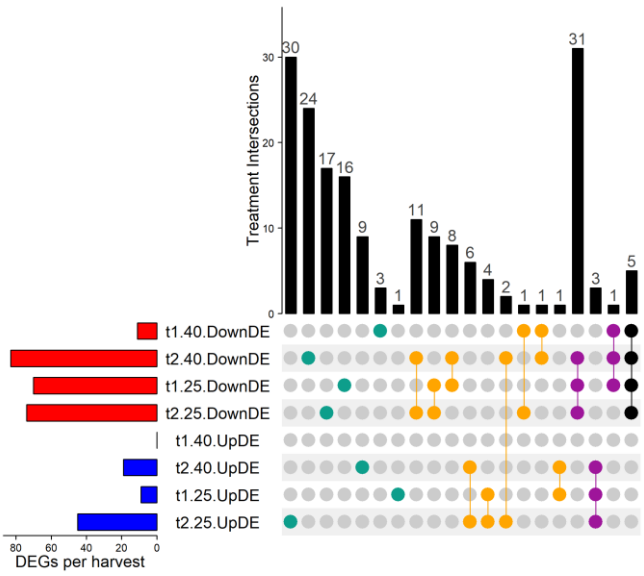


Figure 5. UpSet plot of interactions between upregulated and downregulated differentially expressed transport-associated genes found in *B. napus* exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2), compared to respective control plants maintained at ≥ 80 % of FC.

the expression of 31 DEGs that were specifically downregulated at $t1_{25}$, $t2_{40}$ and $t2_{25}$ (**Figure 5**). Among them, 43 % were related to the transport of a broad group of nutrients comprising Fe, Zn, Cu and Mn, and a third to P transport, whereas the remaining were linked to N, K, Ca and Ni transport (**Supplementary Data 3**). In addition, 24, 17 and 16 genes related to the same nutrient transports (i.e. P, K, Ca, Fe, Zn or Mn) appeared specifically downregulated at $t2_{40,}$ $t2_{25}$ and $t1_{25}$, respectively. On the other hand, amongst genes that were upregulated, around half were found to be differentially expressed at $t2_{25}$. Moreover, 30 DEGs specifically upregulated at $t2_{25}$ (**Figure 5**) were mainly related to macronutrient transport (59 %) and included S, Ca, K, P and Mg (16%, 16%, 13%, 8% and 6% respectively) as well as Fe, Cu, Zn and Mn, which in combination reached 37% (**Supplementary Data 3**).

Interestingly, although these proportions rely on the number of genes tagged for each element, there are contrasting trends when focusing on transporter genes and KIGs related to each nutrient (**Figure 6)**. Several patterns of differential gene expression can be found depending on the nutrient concerned.

The first pattern concerned Cl- and Co-associated genes (**Figure 6B**), which were mostly upregulated while the Cl and Co contents decreased with the length and intensity of WD. A second different pattern was found for N, P, B, Mo and Ni transport-related genes, which were mostly and steadily downregulated (**Figure 6A**). For example, the transport of all N forms such as ammonium, nitrate or urea was similarly affected, as most of the AMT1, NPF7.3 and NPF6.3 or even DUR3 homolog genes were downregulated, irrespective of the length or intensity of WD (**Figure 6A**). In the meantime, nitrogen content in the YLBs was higher in WD plants than in controls. For P, this was especially the case for most PHO1-H3 homologs, as well as PHT1-4 and MPT2, with some of the largest log2 fold changes relative to control plants (**Figure 6A**). Lastly, even though the relative Mo content was strongly decreased after $t1_{40}$ in rapeseed YLBs, the MOT1 transporter gene was always found to be downregulated. The third pattern of gene expression was found for macronutrients such as S, Mg, K and Ca, micronutrients such as Mn, Fe, Cu and Zn and beneficial elements such as Na and Se (**Figure 7**). DEGs showed a contrasting profile with simultaneously upregulated and downregulated genes at each harvest time. In such cases, the majority of significantly upregulated genes appeared exclusively at $t2_{25.}$ Except for Na, the relative content of these nutrients was mainly decreased in rapeseed YLBs (**Figure 3A**).

Amongst the 183 DEGs, only two genes encoding the nuclear protein MSA1 (More Sulphur Accumulation1) and associated with S and Se transport showed a significantly opposite pattern of expression between the two harvest dates (**Figures 7**). It is the exception which nevertheless

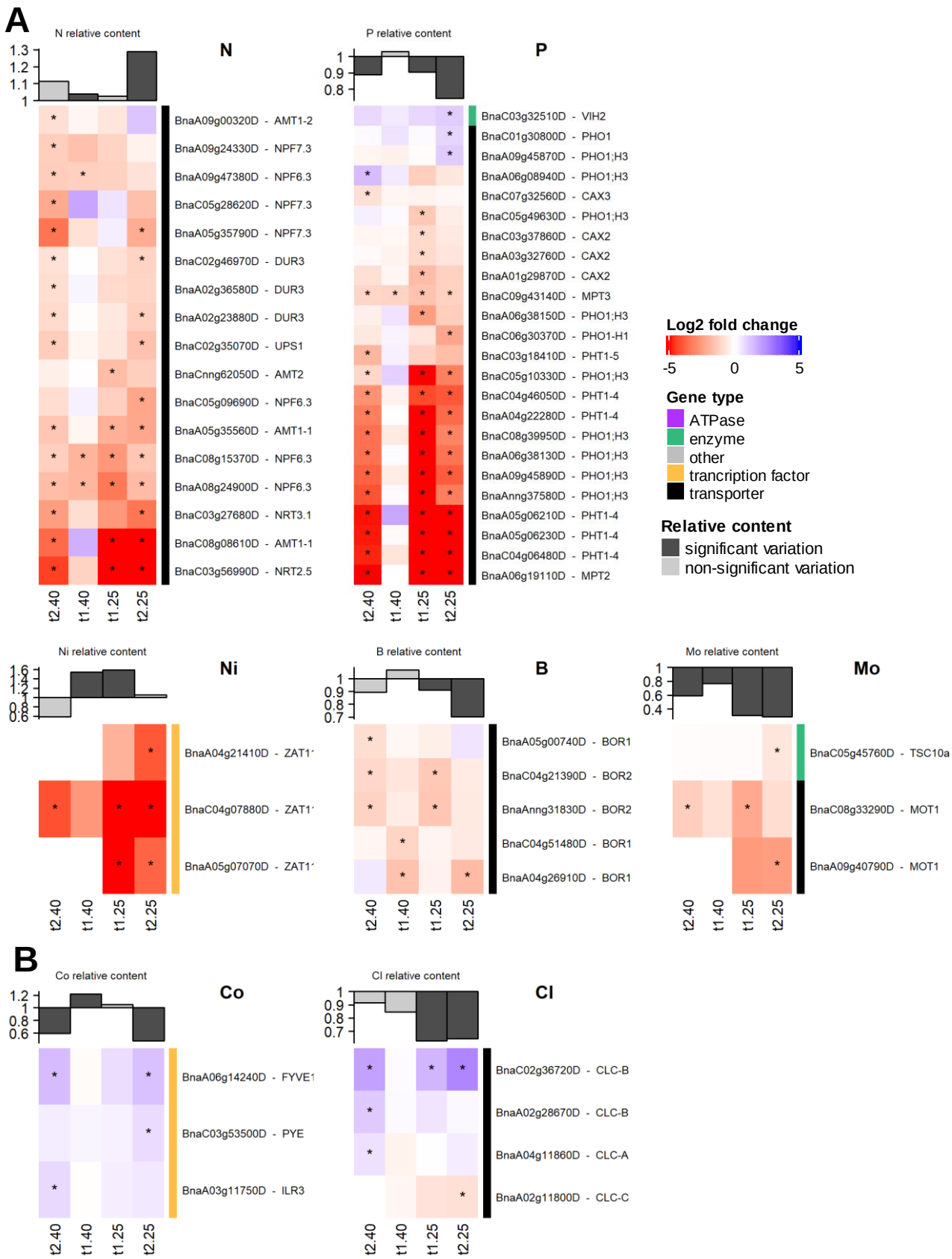


Figure 6. (**A**) Downregulated and (**B**) upregulated expression patterns of transport-related genes and Known Ionomic Genes (KIGs) across WD treatments. Log2 fold changes in differentially expressed genes (DEGs) are indicated with an asterisk "*" for adjusted p.value <0.05. The graph at the top of each panel represents the variation in the relative content (dark gray, significant; light gray, non-significant) of the element associated with each set of genes.

emphasizes specific profile found for S and Se in focused heatmaps (**Figures 7**), which showed opposite patterns of gene expression between $t2_{40}$ and $t2_{25}$. Indeed, two different sets of genes composed notably of ATPS1, APR2 and SULTR3;5 at $t2_{40}$ and SULTR family members (SULTR4;1 SULTR3;1 SULTR3;4) at $t2_{25}$, were mostly downregulated or upregulated, respectively, while the relative S content was significantly lower at $t2_{25}$ only.

Discussion

Drought, which is usually considered the main abiotic factor affecting plant growth and yield, has been described extensively in the literature in terms of its physiological consequences (Verslues et al., 2006; Farooq et al., 2009; Raza et al., 2017; Nadeem et al., 2019). However, studies considering mineral nutrition remain scarce (Hu and Schmidhalter, 2005; da Silva et al., 2011; Waraich et al., 2011) compared with those describing the deleterious effects on plant water balance (Tardieu, 2005), stomatal conductance (Tardieu, 2005; Tardieu et al., 2011), oxidative stress (Sharma and Dubey, 2005; Lee et al., 2009; Hasanuzzaman et al., 2013; Nakabayashi et al., 2014), photosynthesis (Reddy et al., 2004) and hormonal balance (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Klingler et al., 2010; Loutfy et al., 2012; Park et al., 2021). Hence, the main objective of this work was to obtain a detailed appraisal of the modulation of rapeseed and wheat mineral nutrition in response to a moderate or a severe water deficiency. This was achieved by analyzing the functional ionome coupled with the expression pattern of genes selected from the ionomic gene list curated by Whitt et al. (2020), which is enriched with genes related to transport of mineral nutrients

Drought significantly and precociously reduced mineral nutrient uptake leading to a specific ionomic composition of plants

The short term drought applied here (i.e. five days) with a soil WD that dropped from 80% to 40% of FC had already caused interesting ionomic fluctuations in both species before any alteration in most of the physiological parameters. Indeed, the increase in the ABA concentration was almost the only evidence of early perception (at $t1_{40}$) of a lower water availability, which has been previously reported to be a very early response to drought (Klingler et al., 2010; Ashraf et al., 2013). Even though gas exchange variables tended to be altered, the only significant variation observed in rapeseed was an increase in photosynthetic WUE (**Table 1**), which is also known to be one of the first responses under mild water deficit (Raza et al., 2017). In addition, a similar net uptake of nutrients (**Figure 2A**) was observed compared to control plants, except in the case of Co, and this indicated that water flow from root to shoot

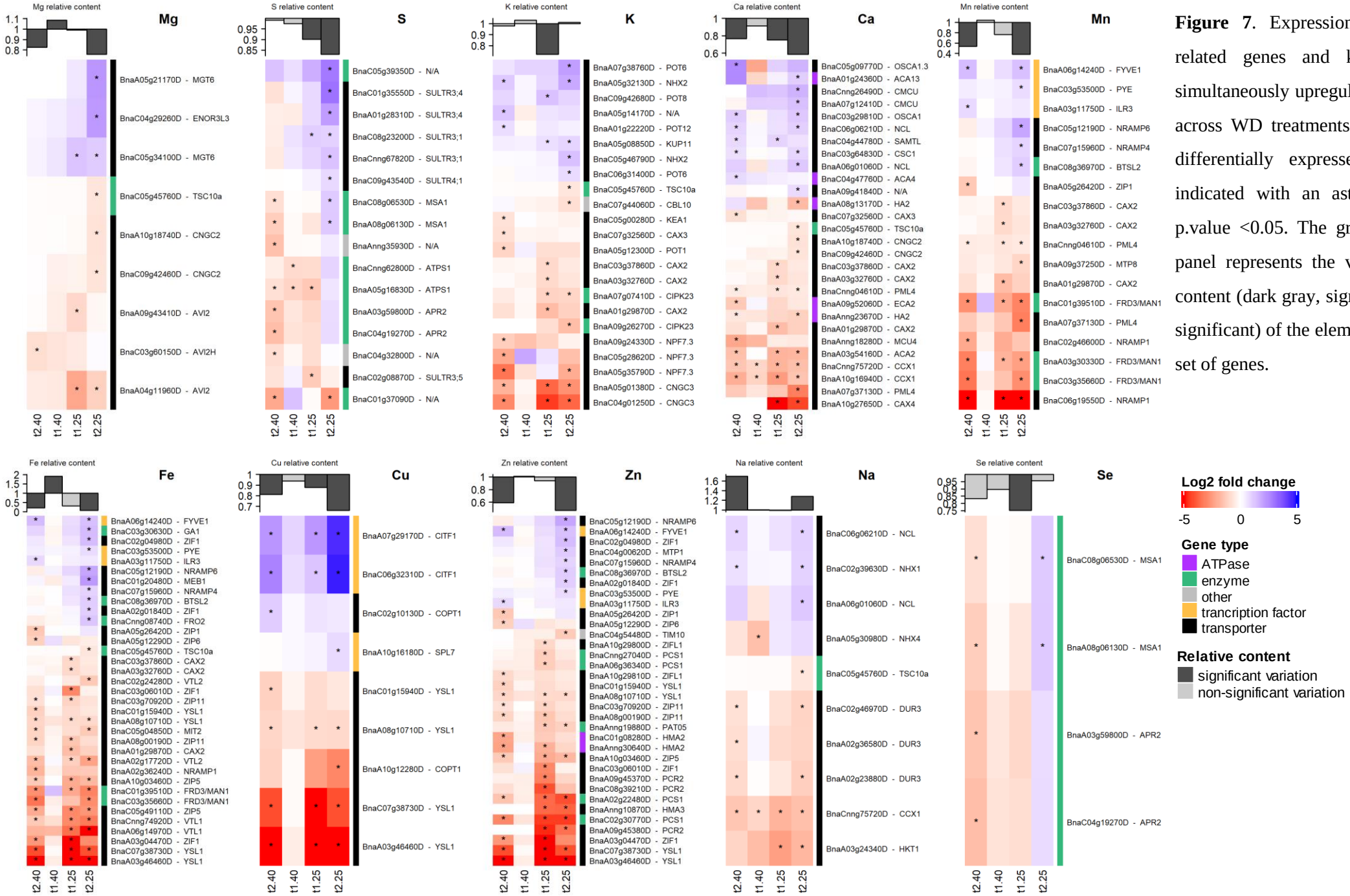


Figure 7. Expression pattern of transport-related genes and known ionomic genes simultaneously upregulated and downregulated across WD treatments. Log2 fold changes in differentially expressed genes (DEGs) are indicated with an asterisk "*" for adjusted p.value <0.05. The graph at the top of each panel represents the variation in the relative content (dark gray, significant; light gray, non-significant) of the element associated with each set of genes.

was not yet impaired, which is in accordance with stomatal conductance and ^{13}C discrimination (Farquhar et al., 1982) measured in WD treated plants (**Table 1**). At the ionomic level, root (Mg, K, Ca, Mn and Co) and YLB (N, Mg, Fe, Ni, Al, Si, V and Co) tissue had already shown elevated element content, whereas in OLBs the elemental contents remained stable (**Figure 3**). Meanwhile, at the molecular level, very few (11) genes were differentially expressed in YLBs compared to control (**Figure 5**). These included genes related to N (NPF6.3), P (MPT3), S (ATPS1), Ca (CCX1), B (BOR1) and Na (NHX4) (**Figure 6 and 7**) and all of them were downregulated.

For the early and moderate water deficit (i.e., $t1_{40}$, **Table 1**), observations where different for wheat. In fact, probably due to the significant increase in ABA concentration, stomatal conductance (g_s) and transpiration rate (E) were already significantly decreased, which may lead to a fall in the net uptake of Fe, Mo, Al and V (decreased by half compared to control), as well as N, Mn and Ni to a lesser extent. Since wheat is considered to be an efficient species for nutrient remobilization (Maillard et al., 2015), it is possible that the ion partitioning and remobilization during drought that was reported by Etienne et al. (2018) occurred in order to sustain YLBs growth, resulting in decreased root nutrient content (Ca, B, Mn, Fe, Al, V and Se). In contrast, the P, Ca, B and Cl content remained stable or increased in YLBs. Under this short-term and moderate water deficiency ($t1_{40}$), net nutrient uptakes in the two species differed (**Figure 2**) but resulted in an overall stable content in YLBs, although some contents were increased (**Figure 3**). Indeed, to ensure development of growing tissue, the leaf ionome is finely tuned and this has been supported by different studies. For example, while growth media was deprived in Fe, its content was not impaired in *Arabidopsis* shoots (Baxter et al., 2008); and in *Triticum aestivum*, concentrations of transition metal such as Fe, Mn, Cu and Zn were increased in the early phase of drought (Price and Hendry, 1991).

When soil WD dropped from 80 % to 25 % of FC (i.e. $t1_{25}$, after 11 days), most of the physiological and morphological parameters (**Table 1**) shifted towards the typical responses to drought. For example, we observed ABA accumulation and stomatal closure associated with a lower transpiration rate and a decrease in CO_2 diffusion that led to a reduction in CO_2 assimilation (Farquhar et al., 1982). Further, a loss of turgor revealed by convex hull analysis as well as disruption of chlorophyll content as measured with the excess green index (ExG) were observed and are widely reported physiological modifications (Tardieu, 2005; Farooq et al., 2009; da Silva et al., 2011; Simova-Stoilova et al., 2016; Nadeem et al., 2019), notably in *Brassica napus* (Raza et al., 2017). These physiological parameters were more deeply impacted after an extended period of WD (i.e. $t2_{25}$) and resulted in a biomass reduction (**Table 1**) 20 days

519 after the start of water restriction in both species. At the same time, net uptake of nutrients
520 drastically dropped (**Figure 2**), which was also shown in *Solanum lycopersicum* (Sánchez-
521 Rodríguez et al., 2010), leading to a massive decrease in aerial tissue nutrient contents (**Figure**
522 **3**), especially in YLBs. This is in agreement with a previous study reporting a decrease in Ca,
523 Mg and Fe contents in *Arabidopsis thaliana* subjected to severe drought (Acosta-Gamboa et
524 al., 2017). In comparison, plants maintained under an extended mild water deficit ($t2_{40}$) did not
525 show growth cessation (**Table 1**), but net uptake of nutrients (**Figure 2**) was also altered (to a
526 lesser extent than $t2_{25}$). As already reported in the literature, these results indicated that plants
527 facing a short and mild water deficit may maintain a transiently stable shoot ionomic content
528 or experience a slight increase in some elements (Acosta-Gamboa et al., 2017; Fischer et al.,
529 2019) but that a severe water deficit could rapidly affect all nutrients.
530 Overall, this study clearly demonstrates in two different plant species that mineral
531 nutrition is affected early by water deficit (even a moderate one), before most of the standard
532 parameters used to describe plant responses to drought are affected. More particularly, we found
533 that Fe, Mo, Mn and Zn content (**Figure 2**) decreased quickly and sustainably in both rapeseed
534 and wheat, and it is notable that such effects were observed before any significant consequences
535 for growth (i.e. at $t1_{25}$ or $t2_{40}$).
536 This ionomic fluctuation can be considered as a specific effect of drought on all mineral
537 nutrition, and this is supported by the fact that a substantial number of published articles have
538 reported the drought-alleviating benefits of remedial nutrient supplies such as foliar application
539 or seed priming (Ghafarian et al., 2013; Monjezi et al., 2013; Pourjafar et al., 2016; Kareem et
540 al., 2017; Zandipour et al., 2018). To the best of our knowledge, these findings originate from
541 empirical approaches under field conditions, where positive effects have been observed on
542 physiological parameters or yield components following compensatory supplies of Fe, Zn
543 (Monjezi et al., 2013; Zandipour et al., 2018; Ashkiani et al., 2020), Mn (Khan et al., 2016), or
544 Mo (Ghafarian et al., 2013; Kareem et al., 2017) in combination or alone, rather than by
545 demonstrations of i) how drought specifically affects the nutrient uptake and tissue content and
546 ii) how the nutrient input might counteract it. Indeed, while micronutrients such as zinc (Zn),
547 copper (Cu) manganese (Mn) and iron (Fe) are required in much lower amounts by the plant
548 (Marschner, 2012), they act as metal components or regulatory cofactors in a large number of
549 enzymes involved in photosynthesis and antioxidative metabolism (van Oijen et al., 2004;
550 Hänsch and Mendel, 2009; da Silva et al., 2011; Dalcorso et al., 2014; Andresen et al., 2018),
551 which may explain their beneficial effects. For Mo, which is required for enzymes involved in
552 S and N metabolism or in the synthesis of some phytohormones, a positive effect of Mo supply

has also been reported in wheat under drought stress, on water uptake via modifications in root morphology and aquaporin expression (Wu et al., 2019).

Patterns of gene expression involved in the ionomic composition of rapeseed were increasingly modified by duration and intensity of drought

In this study, the need to combine ionomic and gene expression analysis revealed some complexities in the results that require cautious interpretation. Firstly, there are differences in the time scales associated with each type of data: i) ionomic content is the result of longer term processes (root uptake and transport, accumulation, feedback regulation, modulation by biomass synthesis) and as such, can be considered as an integrative set of data, whereas ii) gene expression provides an instantaneous assessment of current regulation. Secondly, the interpretation of selected gene expression can exhibit very complex patterns that result from diverse forms of regulation according to each gene's function (root uptake, transport, assimilation enzymes, transcription factors or regulatory genes, amongst others), while the type of transport (influx or efflux through a given membrane) or the gene's localization (tissue, cellular and subcellular) may play crucial roles in the interpretation of the overall pattern. Thirdly, gene expression was quantified from leaf tissue and not from roots, and this was partly due to the poor accessibility of the root compartment of plants grown in soil and the difficulty in extracting quality RNA. Nevertheless, the expression of target genes in leaves may be used as a relevant proxy for nutritional status because we found for most nutrients that the root uptake was highly correlated with the leaf nutrient concentration (data not shown) and leaves have been reported as being relevant for determining plant nutritional status (Baxter et al. 2008; D'Oria et al. 2021).

According to Whitt et al. (2020), the KIG list was limited by the knowledge available at the time and over-represented with Fe- and Zn-related genes coding transporters and genes that alter the accumulation of these elements. Therefore, in order to decipher potential links between the ionome and the expression of transport-related genes and KIGs, we hypothesized that the response triggered by upregulation or downregulation of the expression of a given gene could influence the element content in a similar way to an *Arabidopsis* KO or over-expressor mutant, respectively, as noted by Sasaki et al. (2016) and Whitt et al. (2020).

In rapeseed, three expression patterns of transport associated genes and KIGs related to a given element can be observed: i) mostly upregulated, such as Cl- and Co-associated genes; ii) mostly decreased, such as N, P, B, Mo and Ni transport-related genes (**Figure 6);** or iii)

showing a simultaneous upregulation and downregulation, such as genes associated with Mg, S, K, Mn, Fe, Cu or Zn (**Figure 7)**. For the two latter patterns, while the relative content of these elements was decreased in rapeseed, this was not counterbalanced by upregulation of these transport-related genes as it could be observed under mineral deficiency. Indeed, he majority of significantly upregulated gene expression appeared exclusively under severe and extended water deficit (i.e. $t2_{25}$), but this group was a minority compared to the overall number of downregulated genes, except in the case of S- and Se-related genes. For Zn, Fe and Mn, the relative content in YLBs had not yet significantly decreased at $t1_{25}$, which might be related to the late upregulation found later on ($t2_{25}$). However, this was not the case for macronutrient associated-genes such as S, P, K or Ca, where the relative content had already decreased at $t1_{25}$, without evidence of upregulation of associated genes. For these elements, the relative content observed might be a result of a complex balance between upregulation and downregulation during the applied WD treatments.

Reduced nutrient uptake and associated modifications of ionomic composition can be explained by changes of gene expression involved in transport

Based on the ionomic composition, which revealed large decreases in most element contents and the modulation of gene expression during increased drought duration or intensity, it is tempting to interpret this with the current knowledge of transport gene regulation under specific nutrient deficiencies. It is generally accepted that the expression of genes encoding nutrient transporters, assimilation enzymes, and transcription or regulation factors, is usually upregulated following nutrient deprivation, or conversely, down-regulated under nutrient sufficiency. For example, this is the case for N (Krapp et al., 2014), S (*Sultr1.1; 1.2*; Shinmachi *et al.*, 2010 ; Courbet et al., 2018), K (Ashley et al., 2006; Wang et al., 2013) or Fe (*Irt1*, Vert et al., 2002). In our drought conditions, we found that S uptake (**Figure 2**) and S tissue content (**Figure 3**) were strongly decreased, and this was associated with an increased expression of MSA1 (**Figure 7**), a nuclear localized protein that regulates S homeostasis (Huang et al., 2016) and is associated with an increase in expression of genes encoding SO_4^{2-} transporters (*Sultr3.1, 3.4, 4.1*). In contrast, N content in the leaves remained stable (or increased) in water restricted plants (**Figure 3A**), probably as a consequence of increased remobilization of N from old to young leaves, which does not require the induction of the expression of genes encoding N transporters (*AMT1.1, AMT1.2, AMT2, DUR3, NRT2.5; NRT3.1, NFP6.3, NFP7.3*) in young leaves (**Figure 6A**). The case of Fe is more intriguing because its uptake was strongly reduced following drought (**Figure 2**), resulting in a massive decrease in its content in all tissues (except

in young leaves at $t1_{40}$; **Figure 3A**). According to the literature (Eide et al., 1996; Henriques et al., 2002; Nishida et al., 2012), it is expected that this strong decrease in Fe content should lead to an increased expression of IRT1. However, targeted IRT1 RT-Q PCR analysis (data not shown) performed on rapeseed shoots revealed no significant difference in IRT1 expression between water-stressed and control plants. This indicates that Fe acquisition was not controlled through *IRT1* expression under drought as assumed under Fe deficiency (it strongly increased in roots and in leaves), and suggests that other specific mechanisms could be involved during drought. On the ionomic side, several works have revealed numerous crosstalks between Fe and other nutrients (Forieri et al., 2013; Billard et al., 2014; Maillard et al., 2016b; Vigani and Briat, 2016; Courbet et al., 2019) and among these interactions are uptake systems that are able to transport Fe as well as other metals. Indeed, we found that several of these genes were down regulated after short- and long-term exposure to severe WD or extended moderate WD (**Figure 7**). Within this group of genes we can highlight: i) NRAMP1 (Cailliatte et al., 2010), which may transport Fe, Zn and Mn; ii) YSL1 (Waters et al., 2006), which is known to transport ligands and metal such as Fe, Zn, Mn and Cu; iii) ZIF1 (Haydon et al., 2012), which encodes a metal ligand transporter; and iv) FRD3/MAN1, which has a putative role in Fe homeostasis, and whose KO mutants exhibit Fe accumulation (Rogers and Guerinot, 2002). Consequently, we suggest that Fe uptake is down regulated under drought via reduced gene expression, and that secondary reductions occur in the uptake of Mn, Cu and Zn. Subsequently, i.e. after an extended period of severe drought ($t2_{25}$), the low leaf Fe concentration (**Figure 3**) is associated with the upregulation of genes related to Fe. This was certainly the case for ZIF1, which when over-expressed in *Arabidopsis* has been shown to lead to higher shoot Fe content (Haydon et al., 2012), and also PYE, a transcription factor that has been reported to positively regulate *Arabidopsis* growth under Fe deficiency (Long et al., 2010). Finally, another study (Rasheed et al., 2016) supports our observations that Fe transport and metabolism are specifically affected by drought, since *Arabidopsis* grown on soil has demonstrated that genes involved in Fe uptake such as IRT1, IRT3 and FRO2 are downregulated early in roots following water restriction.

At this stage, the specific down regulation of Mo uptake observed during drought in this study is more difficult to explain in terms of the regulation involved, other than it being a consequence of a reduction in MOT1 gene expression.

Overall the results clearly show that root nutrient uptake is specifically affected in the early stages by drought, and that it principally concerns Mo, Fe, Zn and Mn. However, the identification of specific and early modes of regulation remains difficult, although the changes

in the hormonal balance and oxidative status of the plant and/or the soil may be triggering factors (Lee et al., 2007; Rasheed *et al.*, 2016; Parks et al., 2021).

Acknowledgements:

This work, conducted under the EAUPTIC project, was supported by the Regional Council of Normandy (CRN, grant number 17P07231), The “Fond Unique Interministériel” (FUI, grant number 3870401/1) and the Centre Mondial de l'Innovation – Roullier Group (CIFRE grant to A. D'Oria). The authors acknowledge the PLATIN' (Plateau d’Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis used in this study, as well as the POPS (Plateforme transcriptOmique de l'iPS2, Paris-Saclay) for the RNAseq analysis. The authors thank Dr Laurence Cantrill for improving the English in this manuscript.

Table 1. Physiological, and morphological parameters of control plants and plants subjected to short-term (t1) or extended (t2) (see Materials and Methods for details) water deficit (WD) applied to *B. napus* and *T. aestivum* plants at 40% or 25% of field capacity (FC). Significant differences in the mean between WD treatment and corresponding control are indicated using asterisks as follows: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Gas exchange variables and phytohormone concentrations were measured from leaves whose growth occurred during the WD treatment (YLBs). YLBs, young leaf blades; OLBs, old leaves blades; A, assimilation rate of CO_2; E, transpiration rate; WUE, photosynthetic water use efficiency; g_s, stomatal conductance; $\delta^{13}C$, stable isotope ^{13}C abundance; ABA, abscisic acid; SA, salicylic acid; ExG, excess green index.

			B.napus				*T.aestivum*				
	Field capacity		40%		25%		40%		25%		
	Harvest time		t1	t2	t1	t2	t1	t2	t1	t2	unit
Dry weight	YLBs	control	0.6 ± 0.05	6.5 ± 0.57	3.2 ± 0.3	8.5 ± 0.34	0.5 ± 0.05	2.8 ± 0.23	1.4 ± 0.13	3.2 ± 0.19	
		WD	0.7 ± 0.06	6.9 ± 0.49	**2 ± 0.16** **	**5.5 ± 0.28** **	0.5 ± 0.03	2.2 ± 0.24	1.1 ± 0.11	**2 ± 0.08** **	
	OLBs	control	1.7 ± 0.18	3.4 ± 0.12	2.7 ± 0.36	3.3 ± 0.3	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.02	
		WD	1.7 ± 0.11	2.9 ± 0.16	2.9 ± 0.23	**2.7 ± 0.32** *	0.33 ± 0.02	0.4 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.35 ± 0.02	
	Aboveground	control	3.3 ± 0.3	14.9 ± 0.87	8.3 ± 0.98	18.7 ± 0.71	0.9 ± 0.07	3.2 ± 0.24	1.8 ± 0.14	3.5 ± 0.2	$g.plant^{-1}$
		WD	3.5 ± 0.25	14.5 ± 0.99	7.2 ± 0.5	**12.3 ± 0.75** ***	0.8 ± 0.04	2.6 ± 0.26	1.5 ± 0.13	**2.3 ± 0.1** **	
	Roots	control	0.3 ± 0.03	1.9 ± 0.13	1 ± 0.1	2.4 ± 0.18	0.2 ± 0.01	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0.6 ± 0.04	
		WD	0.3 ± 0.03	2.4 ± 0.26	1.2 ± 0.12	**1.8 ± 0.17** *	0.2 ± 0.01	0.6 ± 0.05	0.4 ± 0.06	0.6 ± 0.06	
	Total biomass	control	3.6 ± 0.33	16.9 ± 0.99	9.3 ± 1.08	21.1 ± 0.87	1.1 ± 0.08	3.7 ± 0.33	2.1 ± 0.15	4.1 ± 0.23	
		WD	3.8 ± 0.28	16.9 ± 1.25	8.4 ± 0.62	**14.1 ± 0.9** ***	1 ± 0.05	3.2 ± 0.31	1.9 ± 0.19	**2.9 ± 0.16** **	
Gas exchanges	A	control	15.8 ± 1.28	8.6 ± 1.22	15.5 ± 0.66	9.1 ± 0.97	11.9 ± 1.56	10.7 ± 1.16	6.4 ± 1.05	10.2 ± 0.91	$\mu mol\ C0_2\ m^{-2}\ s^{-1}$
		WD	13.7 ± 1.44	4.6 ± 2.14	**4.2 ± 0.81** ***	**1.7 ± 0.14** ***	7.6 ± 1.37	**7.2 ± 0.75** *	4.1 ± 0.82	6.8 ± 1.33	
	E	control	4 ± 0.48	2.4 ± 0.42	4.4 ± 0.48	2.9 ± 0.33	1.9 ± 0.23	1.7 ± 0.24	1 ± 0.15	1.9 ± 0.28	$mmol\ H_20\ m^{-2}\ s^{-1}$
		WD	2.5 ± 0.36	1.6 ± 0.7	**0.5 ± 0.08** ***	**0.3 ± 0.02** ***	**1.1 ± 0.21** *	1.3 ± 0.21	**0.6 ± 0.13** *	**0.9 ± 0.17** **	
	WUE	control	4 ± 0.22	3.8 ± 0.32	3.9 ± 0.41	3.3 ± 0.35	6.3 ± 0.26	6.4 ± 0.22	6.3 ± 0.43	5.7 ± 0.29	$\mu mol\ mmol^{-1}$
		WD	**5.6 ± 0.29** **	2.9 ± 0.63	**7.4 ± 0.64** **	**6.4 ± 0.48** ***	6.7 ± 0.51	5.8 ± 0.34	7.7 ± 0.5	**7.1 ± 0.49** *	
	g_s	control	0.34 ± 0.14	0.17 ± 0.07	0.38 ± 0.12	0.26 ± 0.08	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.13 ± 0.05	$mol\ H_20\ m^{-2}\ s^{-1}$
		WD	0.2 ± 0.08	0.12 ± 0.04	**0.04 ± 0.01** ***	**0.02 ± 0.01** ***	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.01	**0.06 ± 0.02** **	
	$\delta^{13}C$	control	-32.13 ± 2.24	-32.12 ± 1.34	-32.28 ± 2.24	-32.28 ± 2.24	-33.13 ± 1.79	-33.57 ± 2.24	-33.48 ± 1.79	-33.48 ± 1.79	‰
		WD	-31.86 ± 2.24	-31.93 ± 2.24	**-30.38 ± 2.24** **	**-30.04 ± 1.79** ***	-32.91 ± 2.24	**-32.41 ± 2.24** ***	**-31.34 ± 2.24** ***	**-30.57 ± 2.24** ***	
Phytohormones	ABA	control	38.1 ± 2.9	29.8 ± 3.9	33.7 ± 4.5	29.9 ± 2.1	6.8 ± 0.2	7.1 ± 0.6	7.1 ± 0.3	7.1 ± 0.4	
		WD	**69.1 ± 6.7** **	**76.7 ± 10** *	**148 ± 24** **	**189.7 ± 18.5** **	**10.9 ± 0.1** *	**10.8 ± 0.3** **	**16.7 ± 1** **	**38.1 ± 2.3** **	$pg\ mg^{-1}\ FW$
	SA	control	83.7 ± 16.2	333.5 ± 59	29 ± 4.4	229.5 ± 54.4	78.4 ± 5.8	73.8 ± 3.6	79.3 ± 5.6	64.7 ± 1.8	
		WD	98.2 ± 28.1	**33.8 ± 7** **	145 ± 74.1	**25.8 ± 1.5** **	89 ± 4.9	79.1 ± 4.2	103.2 ± 10.7	**114.7 ± 11.1** **	
Imaging analysis	Side area	control	336 ± 22	1095 ± 30	872 ± 36	1141 ± 38	236 ± 7	599 ± 12	419 ± 7	630 ± 7	
		WD	334 ± 26	1021 ± 38	**525 ± 24** ***	**628 ± 27** ***	233 ± 11	**469 ± 13** ***	**300 ± 7** ***	**330 ± 11** ***	cm^2
		control	561 ± 27	1427 ± 56	1192 ± 37	1492 ± 90	981 ± 54	2032 ± 66	1492 ± 59	2116 ± 54	
	Convex hull area	WD	576 ± 33	**1171 ± 92** *	**821 ± 42** **	**1088 ± 53** **	1035 ± 47	**1688 ± 95** **	**1098 ± 63** ***	**1206 ± 47** ***	
	ExG	control	0.2 ± 0.004	0.2 ± 0.003	0.21 ± 0.003	0.19 ± 0.002	0.23 ± 0.002	0.25 ± 0.002	0.25 ± 0.002	0.25 ± 0.003	/
		WD	**0.19 ± 0.005** ***	**0.18 ± 0.003** ***	**0.15 ± 0.001** ***	**0.15 ± 0.002** ***	0.23 ± 0.004	**0.23 ± 0.002** ***	**0.22 ± 0.003** ***	**0.21 ± 0.003** ***	

Figure legends

Figure 1. **(A)** Schematic representation of the experimental design. Thirty days after sowing (t_0) plants were divided into three subsets: i) well-watered control plants were kept at 80 % of field capacity (FC) while watering was stopped until the soil water content of all water deficit (WD) pots dropped to ii) 40 % ($t1_{40}$) or iii) 25 % ($t1_{25}$) of FC, which occurred after 5 and 11 days, respectively. These soil water contents were then maintained for 13 days ($t2_{40}$) or 9 days ($t2_{25}$) at 40 % and 25 % of FC, respectively, using automatic watering.
(B) Soil water contents automatically recorded in the high-throughput phenotyping platform during the experiment. Each value corresponds to the lowest soil water content recorded daily. Control plants (blue) were kept at 80 % of FC until the end of the experiment; irrigation of water deficit condition pots was stopped until they reach 40 % of FC at $t1_{40}$ (orange) or 25 % of FC at $t1_{25}$ (dark red) and then maintained at 40 % (yellow) and 25 % (red) of FC, respectively, until the final harvests ($t2_{40}$ and $t2_{25}$). Data are given as the mean ± SE (n=10).

Figure 2. Heatmaps of relative net uptake (NU) from t_0 by **(A)** *B. napus* and **(B)** *T. aestivum* plants exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2) compared to control plants maintained at ≥ 80 % of FC. Only significant values for $p<0.05$ are given, with a color gradient indicating NU relative to control plants (blue, higher; red, lower). **(C)** The plant biomass ratios (WD/control) of the total plant dry weight are also given as the mean ± SE (n=5) in order to evaluate the magnitude of NU variations regardless of biomass. Only bold values differed significantly from control plants ($p<0.05$). Nutrient Net Uptake of control plants is provided in **Supplementary Data 4**.

Figure 3. Heatmaps of relative nutrient concentration in **(A)** *B. napus* and **(B)** *T. aestivum* plants exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2) compared to control plants maintained at ≥ 80 % FC. Only significant values for $p<0.05$ are given, with a color gradient indicating relative concentration higher (blue) or lower (red) than control plants. Blank cells in heatmaps correspond to non-significant variations in concentration compared to control plants. Leaves developed before or after t_0 are indicated as old leaf blades (OLBs) and young leaf blades (YLBs), respectively. Nutrient concentrations of wheat and oilseed rape tissues (control plants) are given in **Supplementary Data 5**.

Figure 4. Principal component analysis (PCA) score plots of rapeseed YLBs. (**A**) elemental content raw data (ppm) and (**B**) RNAseq normalized counts of transport-associated genes (183 genes, among which 103 are Known Ionomic Genes (KIGs)) projected onto the subspace spanned by components 1 (PC 1) and 2 (PC2). Individuals are colored in pairs according to the water regime applied (light, control; dark, WD) at each harvest time.

Figure 5. UpSet plot of interactions between upregulated and downregulated differentially expressed transport-associated genes found in *B. napus* exposed to a soil water content of 40 % or 25 % of FC during a short (t1) or extended period (t2), compared to respective control plants maintained at ≥ 80 % of FC.

Figure 6. (**A**) Downregulated and (**B**) upregulated expression patterns of transport-related genes and Known Ionomic Genes (KIGs) across WD treatments. Log2 fold changes in differentially expressed genes (DEGs) are indicated with an asterisk "*" for adjusted p.value <0.05. The graph at the top of each panel represents the variation in the relative content (dark gray, significant; light gray, non-significant) of the element associated with each set of genes.

Figure 7. Expression pattern of transport-related genes and known ionomic genes simultaneously upregulated and downregulated across WD treatments. Log2 fold changes in differentially expressed genes (DEGs) are indicated with an asterisk "*" for adjusted p.value <0.05. The graph at the top of each panel represents the variation in the relative content (dark gray, significant; light gray, non-significant) of the element associated with each set of genes.

Supplementary Data

Supplementary Data 1. Physical and chemical soil properties

Supplementary Data 2. Composition of the nutrient solution derived from Hoagland nutrient solution and adapted to ensure the plants' mineral needs during the experiment. Elemental concentrations were kept balanced in solution to provide 40 kg N ha^{-1} to ensure a non-limiting mineral condition for all the experiments.

Supplementary Data 3. List of transport-related and known ionomic genes.

Supplementary Data 4. Nutrient net uptake (NU) from t_0 in *B. napus* and *T. aestivum* control plants maintained at ≥ 80 % of FC. Data are expressed as the mean ± SE (n=25) in µg $plant^{-1}$.

Supplementary Data 5. Mineral nutrient concentration of *B. napus* and *T. aestivum* control plants maintained at ≥ 80 % of FC. Tissues developed before or after water deficit treatment are indicated as follows: young leaf blades (YLBs), old leaf blades (OLBs), young petioles (YPs) and old petioles (OPs). Data are expressed as the mean ± SE (n=25) in parts per million (ppm).

Supplementary Data 6. Principal component analysis (PCA) and loading contribution plots that depict the importance of each element on component 1 (PC1) and 2 (PC), respectively. The bar length represents the regression coefficient with either a positive or negative sign. Variables are ranked according decreasing importance starting from the bottom.

References

Acosta-Gamboa LM, Liu S, Langley E, Campbell Z, Castro-Guerrero N, Mendoza-Cozatl D, Lorence A (2017) Moderate to severe water limitation differentially affects the phenome and ionome of Arabidopsis. Functional Plant Biology **44**: 94

Allen LH (2000) Ending hidden hunger: the history of micronutrient deficiency control. Background Analysis for the World Bank-UNICEF Nutrition Assessment Project World Bank. Washington, DC.

Amtmann A, Blatt MR (2009) Regulation of macronutrient transport. New Phytologist **181**: 35–52

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

Ashkiani A, Sayfzadeh S, Rad AHS, Valadabadi A, Masouleh EH (2020) Effects of foliar zinc application on yield and oil quality of rapeseed genotypes under drought stress. Journal of Plant Nutrition **43**: 1594–1603

Ashley MK, Grant M, Grabov A (2006) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. Journal of Experimental Botany **57**: 425–436

Ashraf M, Shahbaz M, Ali Q (2013) Drought-induced modulation in growth and mineral nutrients in canola (Brassica napus L.). Pak J Bot **45**: 93–98

Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A (2016) Plant adaptation to drought stress. F1000Research **5**.

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

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. PNAS **105**: 12081–12086

Billard V, Ourry A, Maillard A, Garnica M, Coquet L, Jouenne T, Cruz F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Etienne P (2014) Copper-Deficiency in Brassica napus Induces Copper Remobilization, Molybdenum Accumulation and Modification of the Expression of Chloroplastic Proteins. PLoS ONE **9**: e109889

Bouchereau A, Clossais-Besnard N, Bensaoud A, Leport L, Renard M (1996) Water stress effects on rapeseed quality. European Journal of Agronomy **5**: 19–30

Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science **2**: 48–54

Cailliatte R, Schikora A, Briat J-F, Mari S, Curie C (2010) High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for *Arabidopsis* Growth in Low Manganese Conditions. The Plant Cell **22**: 904–917

Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S (2009) AmiGO Hub, Web Presence Working Group. 2009. AmiGO: online access to ontology and annotation data Bioinformatics **25**: 288–289

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. Functional Plant Biol **30**: 239–264

Courbet G, D'Oria A, Lornac A, Diquélou S, Pluchon S, Arkoun M, Koprivova A, Kopriva S, Etienne P, Ourry A (2021) Specificity and plasticity of the functional ionome of Brassica napus and Triticum aestivum subjected to macronutrient deprivation. Front Plant Sci **12**: 78 doi: 10.3389/fpls.2021.641648

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

Dai A (2013) Increasing drought under global warming in observations and models. Nature Climate Change **3**: 52–58

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

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. Front Plant Sci **12**: 79. doi: 10.3389/fpls.2021.641678

Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences **93**: 5624–5628

Eide DJ, Clark S, Nair TM, Gehl M, Gribskov M, Guerinot ML, Harper JF (2005) Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in Saccharomyces cerevisiae. Genome biology **6**: R77

Etienne P, Diquelou S, Prudent M, Salon C, Maillard A, Ourry A (2018) Macro and Micronutrient Storage in Plants and Their Remobilization When Facing Scarcity: The Case of Drought. Agriculture **8**: 14

Fan M-S, Zhao F-J, Fairweather-Tait SJ, Poulton PR, Dunham SJ, McGrath SP (2008) Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **22**: 315–324

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development **29**: 185–212

Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA (1982) On the Relationship Between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves. Functional Plant Biol **9**: 121–137

Fischer S, Hilger T, Piepho H-P, Jordan I, Cadisch G (2019) Do we need more drought for better nutrition? The effect of precipitation on nutrient concentration in East African food crops. Science of The Total Environment **658**: 405–415

Forieri I, Wirtz M, Hell R (2013) Toward new perspectives on the interaction of iron and sulfur metabolism in plants. Front Plant Sci **4**: 357. doi: 10.3389/fpls.2013.00357

Ghafarian AH, Zarghami R, Zand B, Bayat V (2013) Wheat performance as affected by foliar application of molybdenum (Mo) under drought stress condition. International Journal of Agronomy and Plant Production **4**: 3050–3056

Gu Z, Eils R, Schlesner M (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. Bioinformatics **32**: 2847–2849

Hänsch R, Mendel RR (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). Current Opinion in Plant Biology **12**: 259–266

Hasanuzzaman M, Nahar K, Gill SS, Fujita M (2013) Drought Stress Responses in Plants, Oxidative Stress, and Antioxidant Defense. Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance. John Wiley & Sons, Ltd, pp 209–250

Haydon MJ, Kawachi M, Wirtz M, Hillmer S, Hell R, Krämer U (2012) Vacuolar Nicotianamine Has Critical and Distinct Roles under Iron Deficiency and for Zinc Sequestration in Arabidopsis. The Plant Cell **24**: 724–737

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

Hu Y, Burucs Z, von Tucher S, Schmidhalter U (2007) Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. Environmental and Experimental Botany **60**: 268–275

Hu Y, Schmidhalter U (2005) Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. Z Pflanzenernähr Bodenk **168**: 541–549

Huang X-Y, Chao D-Y, Koprivova A, Danku J, Wirtz M, Müller S, Sandoval FJ, Bauwe H, Roje S, Dilkes B, et al (2016) Nuclear Localised MORE SULPHUR ACCUMULATION1 Epigenetically Regulates Sulphur Homeostasis in Arabidopsis thaliana. PLOS Genetics **12**: e1006298

Kareem F, Rihan H, Fuller M (2017) The Effect of Exogenous Applications of Salicylic Acid and Molybdenum on the Tolerance of Drought in Wheat. stress **17**: 20

Khan R, Gul S, Hamayun M, Shah M, Sayyed A, Ismail H, Begum A, Gul H (2016) Effect of foliar application of zinc and manganese on growth and some biochemical constituents of Brassica junceae grown under water stress. J Agric Environ Sci **16**: 984–997

Klingler JP, Batelli G, Zhu J-K (2010) ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. Journal of Experimental Botany **61**: 3199–3210

Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A-S, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F (2014) Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **65**: 789–798

Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinot ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L, et al (2003) Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in Arabidopsis thaliana. Nature Biotechnology **21**: 1215–1221

Lee BR, Li LS, Jung WJ, Jin YL, Avice JC, Ourry A, Kim TH (2009) Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. Biologia plant **53**: 505–510

Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press.

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

Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN (2010) The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in *Arabidopsis* Roots. Plant Cell **22**: 2219–2236

Loutfy N, El-Tayeb MA, Hassanen AM, Moustafa MFM, Sakuma Y, Inouhe M (2012) Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (Triticum aestivum). J Plant Res **125**: 173–184

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

Maillard A, Etienne P, Diquélou S, Trouverie J, Billard V, Yvin J-C, Ourry A (2016a) 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, Diquélou S, Koprivova A, Kopriva S, Arkoun M, Gallardo K, Turner M, Cruz F, 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

Marschner P, ed. (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd Edition. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd Edition 1–651

Mishra AK, Singh VP (2010) A review of drought concepts. Journal of Hydrology **391**: 202–216

Monjezi F, Vazin F, Hassanzadehdelouei M (2013) Effects of iron and zinc spray on yield and yield components of wheat (Triticum aestivum L.) in drought stress. Cercetari agronomice in Moldova **46**: 23–32

Nadeem M, Li J, Yahya M, Sher A, Ma C, Wang X, Qiu L (2019) Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes: A Review. International Journal of Molecular Sciences **20**: 2541

Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, et al (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. The Plant Journal **77**: 367–379

Nishida S, Aisu A, Mizuno T (2012) Induction of IRT1 by the nickel-induced iron-deficient response in Arabidopsis. Plant signaling & behavior **7**: 329–331

van Oijen T, van Leeuwe MA, Gieskes WW, de Baar HJ (2004) Effects of iron limitation on photosynthesis and carbohydrate metabolism in the Antarctic diatom Chaetoceros brevis (Bacillariophyceae). European Journal of Phycology **39**: 161–171

Park S-H, Lee B-R, La VH, Mamun MA, Bae D-W, Kim T-H (2021) Drought Intensity-Responsive Salicylic Acid and Abscisic Acid Crosstalk with the Sugar Signaling and Metabolic Pathway in Brassica napus. Plants **10**: 610

Pii Y, Cesco S, Mimmo T (2015) Shoot ionome to predict the synergism and antagonism between nutrients as affected by substrate and physiological status. Plant Physiology and Biochemistry **94**: 48–56

Pourjafar L, Zahedi H, Sharghi Y (2016) Effect of foliar application of nano iron and manganese chelated on yield and yield component of canola (Brassica napus L.) under water deficit stress at different plant growth stages. Agricultural Science Digest **36**: 172–178

Price AH, Hendry G a. F (1991) Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. Plant, Cell & Environment **14**: 477–484

R Core Team (2020). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available online at: https: //www.R-project.org/

Rasheed S, Bashir K, Matsui A, Tanaka M, Seki M (2016) Transcriptomic Analysis of Soil-Grown Arabidopsis thaliana Roots and Shoots in Response to a Drought Stress. Front Plant Sci **7**: 180. doi: 10.3389/fpls.2016.00180

Rawat N, Neelam K, Tiwari VK, Dhaliwal HS (2013) Biofortification of cereals to overcome hidden hunger. Plant Breeding **132**: 437–445

Raza MAS, Shahid AM, Saleem MF, Khan IH, Ahmad S, Ali M, Iqbal R (2017) Effects and management strategies to mitigate drought stress in oilseed rape (Brassica napus L.): a review. Zemdirbyste **104**: 85–94

Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology **161**: 1189–1202

Rigaill G, Balzergue S, Brunaud V, Blondet E, Rau A, Rogier O, Caius J, Maugis-Rabusseau C, Soubigou-Taconnat L, Aubourg S, et al (2018) Synthetic data sets for the identification of key ingredients for RNA-seq differential analysis. Briefings in Bioinformatics **19**: 65–76

Rogers EE, Guerinot ML (2002) FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in Arabidopsis. The Plant Cell **14**: 1787–1799

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

Salt DE (2004) Update on Plant Ionomics. Plant Physiology **136**: 2451–2456

Salt DE, Baxter I, Lahner B (2008) Ionomics and the Study of the Plant Ionome. Annu Rev Plant Biol **59**: 709–733

Sánchez-Rodríguez E, del Mar Rubio-Wilhelmi M, Cervilla LM, Blasco B, Rios JJ, Leyva R, Romero L, Ruiz JM (2010) Study of the ionome and uptake fluxes in cherry tomato plants under moderate water stress conditions. Plant Soil **335**: 339–347

Sasaki A, Yamaji N, Ma JF (2016) Transporters involved in mineral nutrient uptake in rice. EXBOTJ **67**: 3645–3653

Seneviratne SI, Lüthi D, Litschi M, Schär C (2006) Land-atmosphere coupling and climate change in Europe. Nature **443**: 205–209

Sharma P, Dubey RS (2005) Drought Induces Oxidative Stress and Enhances the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings. Plant Growth Regul **46**: 209–221

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany **58**: 221–227

da Silva EC, Nogueira R, da Silva MA, de Albuquerque MB (2011) Drought stress and plant nutrition. Plant stress **5**: 32–41

Simova-Stoilova L, Vassileva V, Feller U (2016) Selection and Breeding of Suitable Crop Genotypes for Drought and Heat Periods in a Changing Climate: Which Morphological and Physiological Properties Should Be Considered? Agriculture **6**: 26

Soares JC, Santos CS, Carvalho SMP, Pintado MM, Vasconcelos MW (2019) Preserving the nutritional quality of crop plants under a changing climate: importance and strategies. Plant Soil **443**: 1–26

Sorin E, Etienne P, Maillard A, Zamarreño A-M, Garcia-Mina J-M, Arkoun M, Jamois F, Cruz F, Yvin J-C, Ourry A (2015) Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. J Exp Bot **66**: 6175–6189

Tanguilig VC, Yambao EB, O'toole JC, De Datta SK (1987) Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake of rice, maize, and soybean. Plant Soil **103**: 155–168

Tardieu F (2012) Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. Journal of Experimental Botany **63**: 25–31

Tardieu F (2013) Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. Front Physiol **4**: 17. doi: 10.3389/fphys.2013.00017

Tardieu F (2005) Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. Comptes Rendus Geoscience **337**: 57–67

Tardieu F, Granier C, Muller B (2011) Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? Current Opinion in Plant Biology **14**: 283–289

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J-K (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. The Plant Journal **45**: 523–539

Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat J-F, Curie C (2002) IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. The Plant Cell **14**: 1223–1233

Vigani G, Briat J-F (2016) Impairment of Respiratory Chain under Nutrient Deficiency in Plants: Does it Play a Role in the Regulation of Iron and Sulfur Responsive Genes? Front Plant Sci **6**: 1185. doi: 10.3389/fpls.2015.01185

Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S (2013) The critical role of potassium in plant stress response. International journal of molecular sciences **14**: 7370–7390

Waraich EA, Ahmad R, Ashraf MY (2011) Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. Australian Journal of Crop Science **5**: 764

Waters BM, Chu H-H, DiDonato RJ, Roberts LA, Eisley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) Mutations in Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 Reveal Their Roles in Metal Ion Homeostasis and Loading of Metal Ions in Seeds. Plant Physiology **141**: 1446–1458

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**: e00272

Wilhite DA, ed. (2016) Droughts: a global assesment. Routledge

Wu S, Sun X, Tan Q, Hu C (2019) Molybdenum improves water uptake via extensive root morphology, aquaporin expressions and increased ionic concentrations in wheat under drought stress. Environmental and Experimental Botany **157**: 241–249

Zandipour E, Norozei AH, Bostani A (2018) Effect of Zinc and Iron Foliar Application with Two Levels of Irrigation Water Acidity on the Quantitative and Qualitative Parameters of Wheat (triticum Aestivum L.). Appl Ecol Environ Res **16**: 3097–3112

Zhu M, Monroe JG, Suhail Y, Villiers F, Mullen J, Pater D, Hauser F, Jeon BW, Bader JS, Kwak JM, et al (2016) Molecular and systems approaches towards drought-tolerant canola crops. New Phytologist **210**: 1169–1189

Chapitre V

-

Réponses transcriptomiques, métabolomiques et ionomiques des feuilles de *Brassica napus* soumises à un déficit hydrique

Les résultats du chapitre précédent démontrent qu'un déficit hydrique engendre, de façon précoce, une dérégulation d'un important nombre de gènes impliqués dans le transport foliaire des éléments minéraux qui s'accompagne, dans le même temps, d'une forte diminution de l'absorption racinaire et de modifications conséquentes du ionome foliaire. Ces résultats ont ainsi conduit à une analyse globale des effets d'un déficit hydrique sur l'expression de l'ensemble des gènes au sein des jeunes feuilles de colza, grâce à des données transcriptomiques issues d'analyses RNAseq, couplée à une analyse métabolomique non ciblée et aux données ionomiques foliaires. Cette analyse a permis de positionner les effets du stress hydrique sur la nutrition minérale au regard d'autres processus clés, fréquemment décrits dans la littérature comme marqueurs de la contrainte hydrique, tels que la synthèse de phytohormones (ABA et JA), de proline et de glutathion.

Résultats majeurs :

Les analyses transcriptomiques et métaboliques révèlent un nombre croissant de gènes différentiellement exprimés (DEG) et de métabolites différentiellement accumulés lors d'un déficit hydrique modéré (525 DEG, 57 métabolites), puis sévère (5454 DEG, 78 métabolites) et sévère prolongé (9346 DEG, 95 métabolites). L'analyse de l'enrichissement des termes de Gene Ontology issus de ces gènes, révèle que le transport des ions est l'un des processus les plus rapidement affectés dès l’application d’un déficit hydrique modéré. En effet, les données transcriptomiques et métabolomiques suggèrent que les réponses précoces habituellement constatées lors d'une sécheresse, impliquant le métabolisme des phytohormones (ABA, JA), l'accumulation de proline et la défense contre le stress oxydatif, ont été induites plus tardivement que la répression des gènes liés au transport des ions. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que lors d'un déficit hydrique, la nutrition minérale est affectée très tôt au niveau des feuilles, en terme de contenu ionomique et de régulation des transporteurs d'ions, particulièrement pour un groupe d'éléments comprenant le Mo, le Fe, le Zn et le Mn.

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans l'International Journal of Molecular Sciences et intitulé "Transcriptomic, metabolomic and ionomic analyses reveal early modulation of leaf mineral content in *Brassica napus* under mild or severe drought".

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Transcriptomic, Metabolomic and Ionomic Analyses Reveal Early Modulation of Leaf Mineral Content in *Brassica napus* under Mild or Severe Drought

Aurélien D'Oria [1,2], Lun Jing [3], Mustapha Arkoun [2], Sylvain Pluchon [2], Stéphanie Pateyron [4,5], Jacques Trouverie [1], Philippe Etienne [1], Sylvain Diquélou [1] and Alain Ourry [1,*]

1 Unicaen, INRAE, UMR 950 Eva, SFR Normandie Végétal (FED4277), Normandie Université, 14000 Caen, France; aurelien.doria@unicaen.fr (A.D.); jacques.trouverie@unicaen.fr (J.T.); philippe.etienne@unicaen.fr (P.E.); sylvain.diquelou@unicaen.fr (S.D.)
2 Laboratoire de Nutrition Végétale, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France; mustapha.arkoun@roullier.com (M.A.); sylvain.pluchon@roullier.com (S.P.)
3 Plateformes Analytiques de Recherche, Agro Innovation International-TIMAC AGRO, 35400 Saint-Malo, France; lun.jing@roulier.com
4 Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), Université Paris-Saclay, CNRS, INRAE, Univ Evry, 91405 Orsay, France; stephanie.pateyron@inrae.fr
5 Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), Université de Paris, CNRS, INRAE, 91405 Orsay, France
* Correspondence: alain.ourry@unicaen.fr

check for updates

Citation: D'Oria, A.; Jing, L.; Arkoun, M.; Pluchon, S.; Pateyron, S.; Trouverie, J.; Etienne, P.; Diquélou, S.; Ourry, A. Transcriptomic, Metabolomic and Ionomic Analyses Reveal Early Modulation of Leaf Mineral Content in *Brassica napus* under Mild or Severe Drought. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 781. https://doi.org/10.3390/ijms23020781

Academic Editors: Tomasz Hura, Katarzyna Hura and Agnieszka Ostrowska

Received: 21 December 2021
Accepted: 7 January 2022
Published: 11 January 2022

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

Copyright: © 2022 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/).

Abstract: While it is generally acknowledged that drought is one of the main abiotic factors affecting plant growth, how mineral nutrition is specifically and negatively affected by water deficit has received very little attention, other than being analyzed as a consequence of reduced growth. Therefore, *Brassica napus* plants were subjected to a gradual onset of water deficits (mild, severe, or severe extended), and leaves were analyzed at the ionomic, transcriptomic and metabolic levels. The number of Differentially Expressed Genes (DEGs) and of the most differentially accumulated metabolites increased from mild (525 DEGs, 57 metabolites) to severe (5454 DEGs, 78 metabolites) and severe extended (9346 DEGs, 95 metabolites) water deficit. Gene ontology enrichment analysis of the 11,747 DEGs identified revealed that ion transport was one of the most significant processes affected, even under mild water deficit, and this was also confirmed by the shift in ionomic composition (mostly micronutrients with a strong decrease in Mo, Fe, Zn, and Mn in leaves) that occurred well before growth reduction. The metabolomic data and most of the transcriptomic data suggested that well-known early leaf responses to drought such as phytohormone metabolism (ABA and JA), proline accumulation, and oxidative stress defense were induced later than repression of genes related to nutrient transport.

Keywords: abscisic acid; genes related to transport; glutathione; ionome; jasmonic acid; mineral nutrition; proline; water deficit

1. Introduction

Drought is one of the most important environmental factors that limit plant growth and productivity. In the context of global climate change, the frequency and intensity of abiotic constraints faced by plants tend to increase [1], including water deficit, which negatively impacts not only crop yield [2–4] but also the quality of harvested products [5–9]. As the world population increases exponentially, research needs to contend with a double challenge, ensuring food security and safety [10–12]. Hence, numerous studies have been undertaken to explore the effects of water stress across diverse plant species, and these have enabled the identification of useful molecular and metabolic traits for breeding programs targeting improvements in plant resilience to drought [13–17].

Water deficit induces many changes at the morphological, biochemical, physiological, and molecular levels in all plant organs [18–21]. Overall, the plant response comprises a complex and dynamic process aimed at minimizing water loss and optimizing water uptake under suboptimal water regimes. The main alterations have included perception and signaling cascades [22], gene expression regulation [23–26], phytohormone induction [27–30], reactive oxygen species scavenging [31–33], cell membrane structure modulation, osmolyte synthesis, and activation of ion channels [34,35], as well as metabolic modifications involving carbohydrates [36–38], amino acids and fatty acids [39,40]. These modifications can result in marked accelerations in phenology, promotion of the growth and architectural modification of roots, negative impacts on shoot growth, induction of leaf rolling, and changes to stomatal density and cuticular wax content [21]. Water limitation also causes cell dehydration, which disturbs cellular homeostasis and, in turn, results in ionic and osmotic stress. Further, osmotic adjustment thus implies ion movements and accumulation of carbohydrate and osmoprotectant molecules [27,39]. In order to retain water, stomatal closure is mediated by ABA accumulation in particular [28], reducing the transpiration rate but negatively affecting CO_2 diffusion and ultimately leading to a decline in photosynthesis activity [23]. Moreover, water deficit also triggers oxidative stress, which produces reactive oxygen species (ROS) and causes damage to membranes, proteins, and DNA structures.

Over the last few decades, the emergence of high-throughput "omics" techniques has enabled analysis of changes in the transcriptome [41–45], metabolome [46], and proteome [40,47,48] of tolerant and susceptible cultivars and has given access to a more holistic view of plant responses to water stress. However, to our knowledge, relatively few studies have been performed on the specific effects of drought on mineral nutrition because it is usually implicitly assumed that reduced uptake of minerals is a direct consequence of reduced growth. Indeed, the negative impact of water stress on plant mineral content is essentially explained by a reduction in the transpiration rate [34] or through the multiple functions of ions that might be missing [49]. However, recent studies attempting to decipher the mechanistic adjustments in plants growing under nutrient deficiencies [50–53] have proven the potential interest to study ion uptake and transport regulation in cases of other abiotic stresses such as drought. For that purpose, novel approaches such as examination of the functional ionome comprising all mineral elements, whether essential or non-essential for plant life [54,55], has emerged as a field of investigation [55–61], and recently variation in ion profiles during drought periods have been revealed [62–64]. For example, *Arabidopsis* is affected by moderate or severe water stress, and it shows an accumulation of Mn, Na, and Cu in leaves while Fe content is strongly reduced [62]. In recent work conducted with *B. napus* and *T. aestivum* [65], drought had an earlier and more substantial negative impact on the uptake of Fe, Zn, Mn, and Mo than for most of the other physiological and morphological parameters assessed in the two species. Moreover, it was shown that genes encoding transporters for these elements were down-regulated (in the case of Mo) or indicated a mixed pattern combining up or down-regulation (for example, Fe, Zn, and Mn). Such molecular regulation was found well before a reduction in growth, suggesting that regulation of mineral nutrition was one of the earliest responses to drought. These works pave the way for a better understanding of ionomic changes under water constraint and offer research perspectives into genes and regulatory pathways that should enable improvements in plant resilience to water stress.

Therefore, because the mechanisms that lead to modifications of mineral nutrition in response to drought are currently poorly documented, this study in *Brassica napus* proposes to investigate them via broad transcriptomic and metabolic approaches coupled with quantification of the leaf ionome. Thus, some mechanisms already described as being involved early in adaptation to drought, such as ABA synthesis, proline accumulation, and responses to oxidative stress, were monitored kinetically alongside the expression of genes known to be involved in mineral nutrient transport. For this purpose, plants at the vegetative stage exposed to a gradual onset of water deficit managed with a high-

throughput phenotyping platform were used to study the chronology of molecular and ionomic modifications in the leaves of plants facing drought conditions.

2. Results

2.1. General Effect of Water Deficit on Growth

Compared to control plants, the shoot and root biomasses of *B. napus* were not significantly altered after 5 days (d) and 11 d in plants exposed to a water shortage (Figure 1), considered as either mild or severe water deficit (WD), respectively. Nevertheless, after 11 d a slight but non-significant increase in root biomass was observed compared to control plants. However, at 20 d, the WD exposure (corresponding to (i) 11 days of water shortage during which water content (WC) dropped to 25% of field capacity (FC) followed by (ii) 9 days maintained at this level by automatic watering (Figure 2), led to a significant decrease in both the shoot and the root biomass compared to the control. In shoots, this biomass decrease was mainly due to a one-third reduction in the number of newly developed leaves from the start of the WD exposure (data not shown).

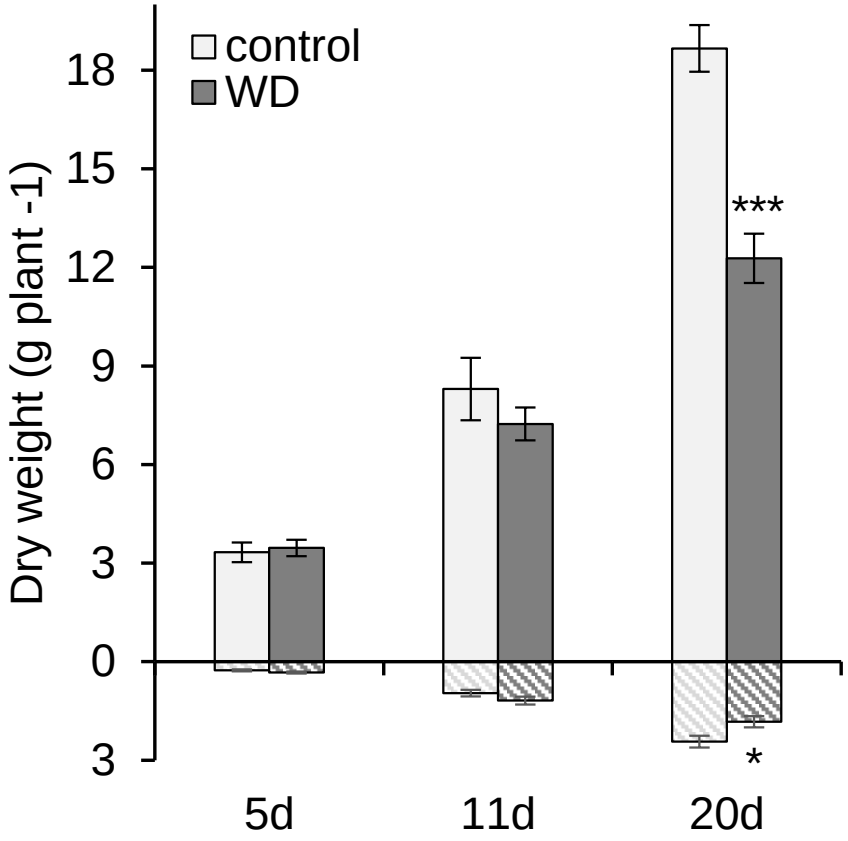


Figure 1. Shoot (plain) and root (hatch) biomasses of *B. napus* exposed for 5 d (mild), 11 d (severe), and 20 d (severe and extended) of water deficits (WD). Data are given as the mean ± SE (n = 5), and significant differences between control and plants exposed to WD are indicated as follows: *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$.

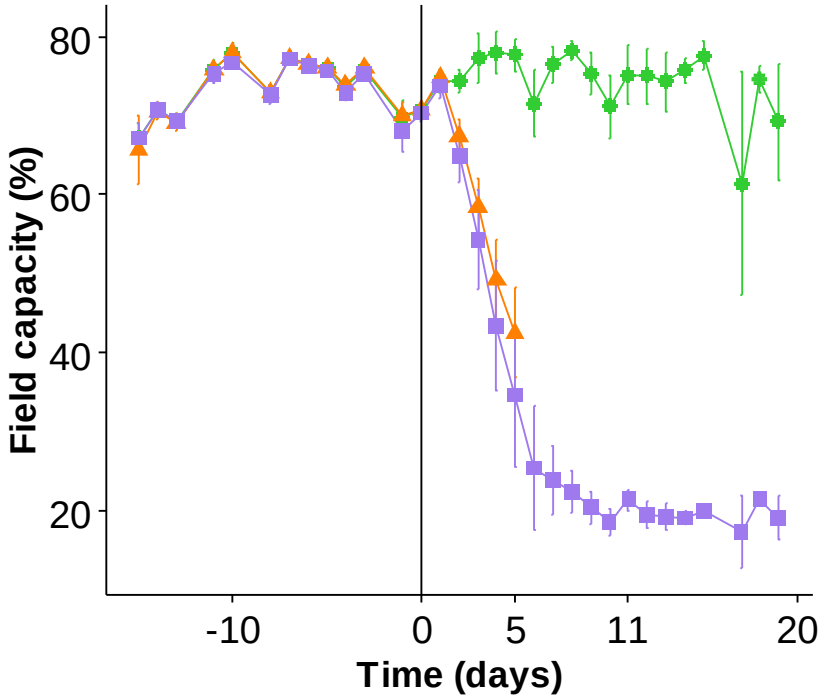


Figure 2. Soil water content was expressed as a percentage of field capacity (FC) during the experiment. After sowing, plants were kept at 80% FC for thirty days (until 0 d). Thereafter, well-watered control plants were kept at 80% FC until the end of the experiment, while watering was stopped at 0 d until the FC of all water deficit (WD) pots dropped to 40% FC (5 d) and then 25% FC (11 d). Consequently, from 11 d to 20 d, WD pots were held at 25% FC by automatic watering. Soil water contents, as well as the amount of water to be supplied, were automatically assessed with the high throughput phenotyping platform during the experiment, and each value corresponds to the lowest soil water content recorded daily or twice a day.

2.2. Overview of the Leaf Transcriptome and Metabolome of Brassica napus Exposed to Water Deficit

Principal component analysis (PCA) of the total RNA-sequencing (RNA-seq) normalized counts showed that samples were well discriminated along with the first two components (Figure 3A). The first one (PC1), which explained 30% of the variability in leaf transcriptome, was obviously driven by a time-dependent (developmental stage) factor from 5 d to 20 d, whereas the second one (PC2), which explained 20% of the variability was driven by the water deficit applied and well separated the control from WD plants. At 5 d, control and WD samples were almost clustered, indicating a more similar transcript expression profile at this time point than at 11 d and 20 d, which was related to the growing number of differentially expressed genes (DEGs) between the different sampling points (Figure 3B,C).

Indeed, after 5 d of water deficit, 525 genes were differentially expressed with nearly equivalent proportions of upregulated (294) and downregulated (231) DEGs (Figure 3B). In contrast, at 11 d days, the number of DEGs massively increased (10 fold), with an imbalance between upregulated and downregulated genes (2.5 fold more for the latter) in response to the WD. After 20 d, the transcriptome of WD plants compared to control was even more modulated, with 9346 DEGs (1.7 fold increase compared to 11 d) that again were in a balanced up/down ratio (1.2).

Evaluation of the distribution of the 11 747 DEGs identified across the three harvest times revealed that most of them were specifically up (3189) or down (2922) differentially expressed at 20 d (Figure 3C). Indeed, 65% of 20 d DEGs were only found at this time point, compared to 38% at 5 d and 40% at 11 d, meaning that the majority of DEGs characterized at these two first time points were also found at others. This is highlighted by the 2119 and

847 genes that were down and upregulated at both 11 d and 20 d, respectively. A much smaller number of DEGs overlapped between the three-time points and were always up (111) or down (66) differentially expressed during WD. Only a very small number of genes (22) changed their regulatory direction (i.e., up or down at different time points).

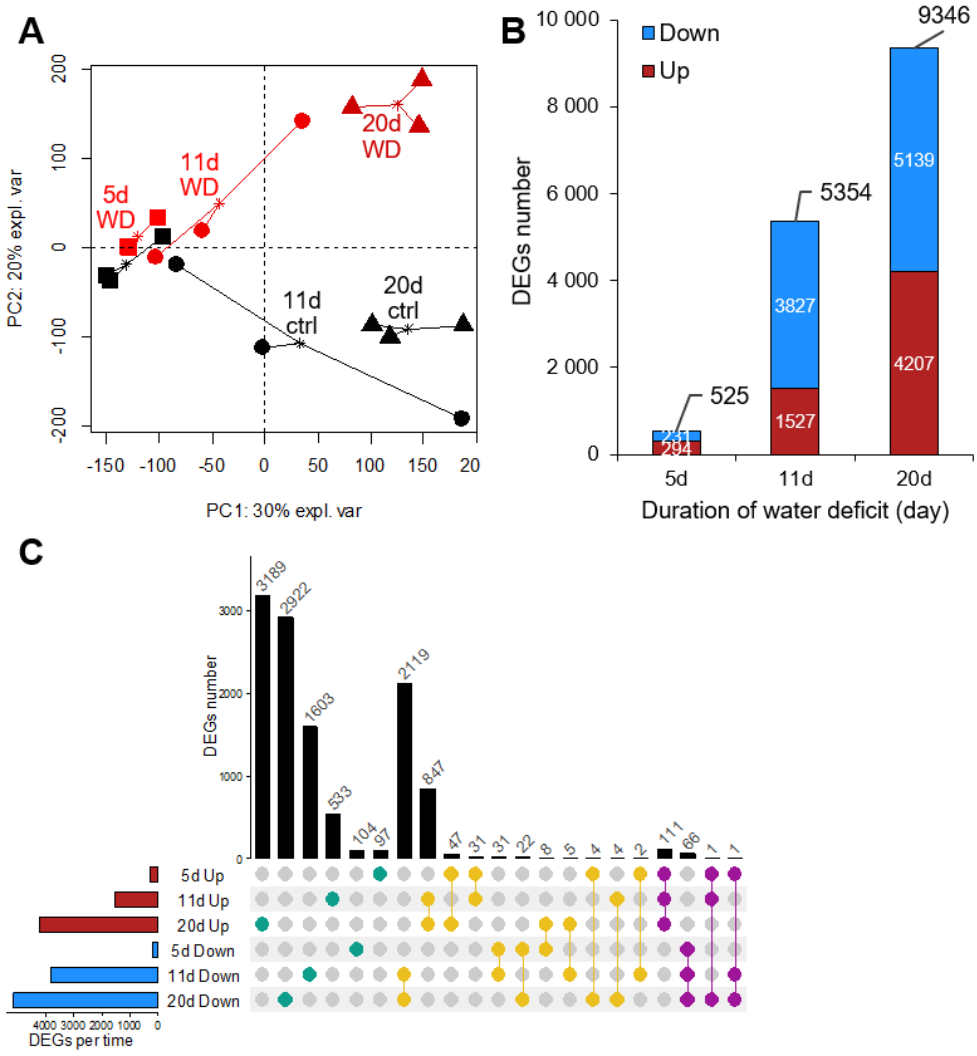


Figure 3. Exploratory data analysis of RNA-seq from *B. napus* leaves in response to a water deficit. (**A**) Principal Component Analysis score plot from leaf samples using normalized count data after 5 d (■), 11 d (●), and 20 d (▲) in control ("ctrl", black) or water deficit ("WD", red) exposed plants. (**B**) Overview of the number of total and up and down DEGs identified with RNA-seq analysis in *B. napus* exposed to 5 d (mild), 11 d (severe), and 20 d (severe and extended) water deficit. (**C**) Distribution of DEGs specific to a single date of water deficit (green) or overlapped between two (yellow) or three (purple) time points. DEGs up and down-regulated are indicated in red and blue, respectively.

These sets of genes were used to determine the significantly enriched gene ontology (GO) terms (in "biological process") with the g:Profiler tool (provided in Supplementary Data S1) and then summarized by removing redundant terms with REVIGO. The most enriched terms after 5, 11, and 20 d in *B. napus* exposed to water deficit are reported in Figure 4 and are all presented in Supplementary Figures S1–S3.

Interestingly, the 525 DEGs at 5 d mostly belong to processes involved in transport (anion transport, GO: 0006820; borate transport, GO: 0046713; L-ornithine transmembrane transport, GO: 1903352), carbohydrate metabolism (disaccharide metabolic process,

GO:0005984; oligosaccharide metabolic process, GO:0009311), proline (proline catabolic process, GO:0006562), and redox homeostasis (response to oxygen-containing compound, GO:1901700) (Figure 4A). Overall, these processes were also enriched at 11 d and particularly at 20 d (Figure 4B,C). At 11 d, a large proportion of specific DEGs were found to be related to phosphorylation (protein phosphorylation, GO:0006468; protein autophosphorylation, GO:0046777; phosphorus metabolic process, GO:0006793) and defense processes (defense response, GO:0006952), while the other DEGs, not specific to 11 d, were particularly related to amino acids (Figure 4B). After 20 d, in addition to previous processes cited, GO terms related to photosynthesis metabolism (photosynthesis, GO: 0015979; photosynthesis light-harvesting, GO: 0009765) seemed to be substantially enriched (Figure 4C). In fact, clear terms considered as being more specific to the water stress mainly appeared after 20 d (response to osmotic stress, GO:0006970; response to abiotic stimulus, GO:0009628; response to salt stress, GO:0009651).

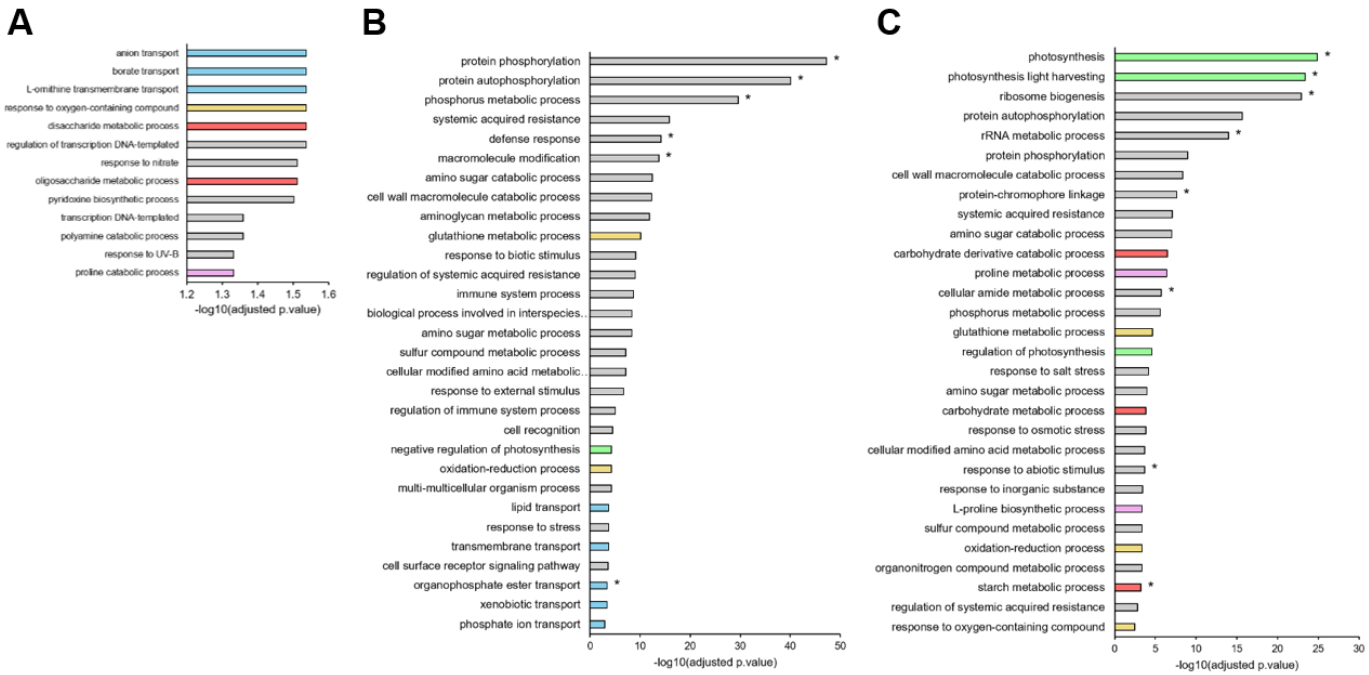


Figure 4. The most significantly enriched GO terms ("biological process") from DEGs in leaves of *B. napus* exposed to 5 d (mild) (**A**), 11 d (severe) (**B**), and 20 d (severe and extended) (**C**) of water deficit. GO terms associated with transport (blue), redox homeostasis (gold), carbohydrate (red), and proline (pink) metabolism as well as photosynthesis (green) are highlighted, and terms enriched from specific DEGs at each time point are indicated with an asterisk (*).

GO analysis from the 177 (111 up and 66 down) overlapping DEGs between 5 d, 11 d, and 20 d revealed that both "biological process"—and "molecular function"—enriched GO terms were related to proline metabolism, protein folding, and particularly redox homeostasis (Figure 5), in which Acyl-coenzyme A oxidase and flavine adenine dinucleotide (FAD) were involved in hydrogen peroxide synthesis (Figure 5B). Overlapping DEGs were also involved in phytohormone metabolism or steady regulation of phosphorus and nitrate transporters (Figure 5B).

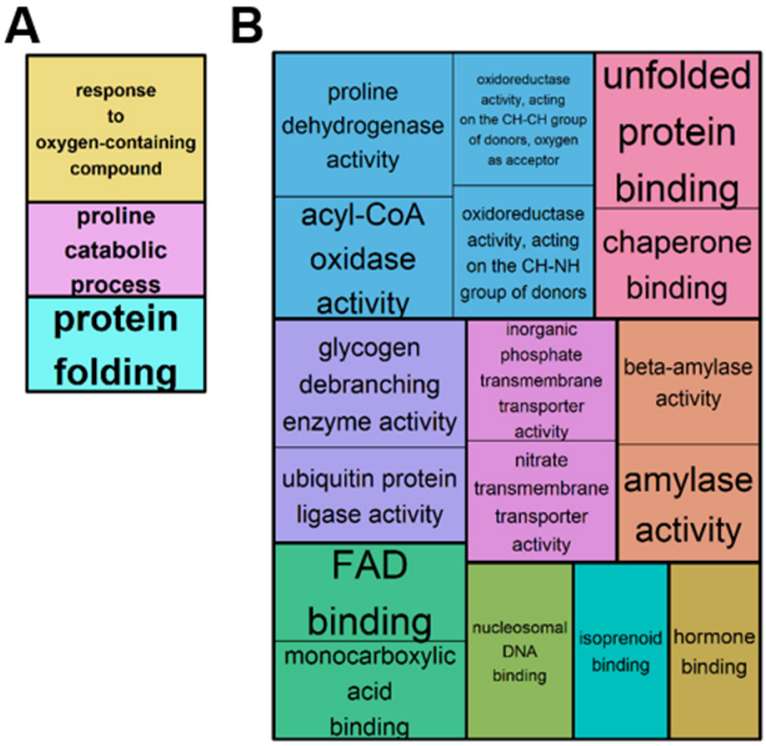


Figure 5. GO Enrichment analysis using g:Profiler then REVIGO for up and down DEGs overlapping between 5 d (mild), 11 d (severe), and 20 d (severe and extended) of WD compared to control plants. Significantly enriched GO terms in "biological process" (**A**) and "molecular function" (**B**) are represented in rectangles combined into superclusters with the most closely related terms, and sizes have been set to reflect the adjusted *p*-value ($p < 0.05$).

Ultimately, an analysis of metabolite enrichment was performed using an untargeted metabolomic approach in order to determine how leaf transcriptome modulations manifested at the metabolite scale. PLS-DA (Partial Least-Squares Discriminant Analysis) performed on data from control and plants exposed to a water deficit enabled the selection of the most discriminative metabolites. They were subsequently filtered using the variable importance in projection (VIP), with VIP scores > 2. Thus, 31, 51, and 61 metabolites in positive mode and 26, 27, and 34 metabolites in the negative mode were selected at 5 d, 11 d, and 20 d, respectively. The analysis of the relevant affected pathways was performed with the Metabolic Pathway Analysis tool of MetaboAnalyst, which combines results from a powerful pathway enrichment and topology analysis. Overall, similarities with transcriptomic data were found because most of the metabolic pathways impacted corresponded to enriched GO terms. As previously observed in GO analysis, pathways involving numerous amino acids, including their derived molecules such as phenylpropanoids, were highly altered (Figure 6). For example, there were early effects on phenylalanine metabolism at 5 d and 11 d (Figure 6B,C). The glutathione pathway was altered at 11 and 20 d (Figure 6B,C), while tryptophan was only at 20 d (Figure 6C). Nicotinate and nicotinamide metabolism, as well as TCA cycle metabolite enrichments, were constantly found during the water stress applied.

2.3. Chronology of Metabolic Events: The Case of ABA, JA, Glutathione, and Proline

Because both the transcriptomic (Figure 4) and metabolomic (Figure 6) data revealed early plant responses to water shortage, and especially through processes involving phytohormones, glutathione, and proline metabolisms, fine kinetic monitoring of sets of genes and metabolites related to the relevant pathways was performed.

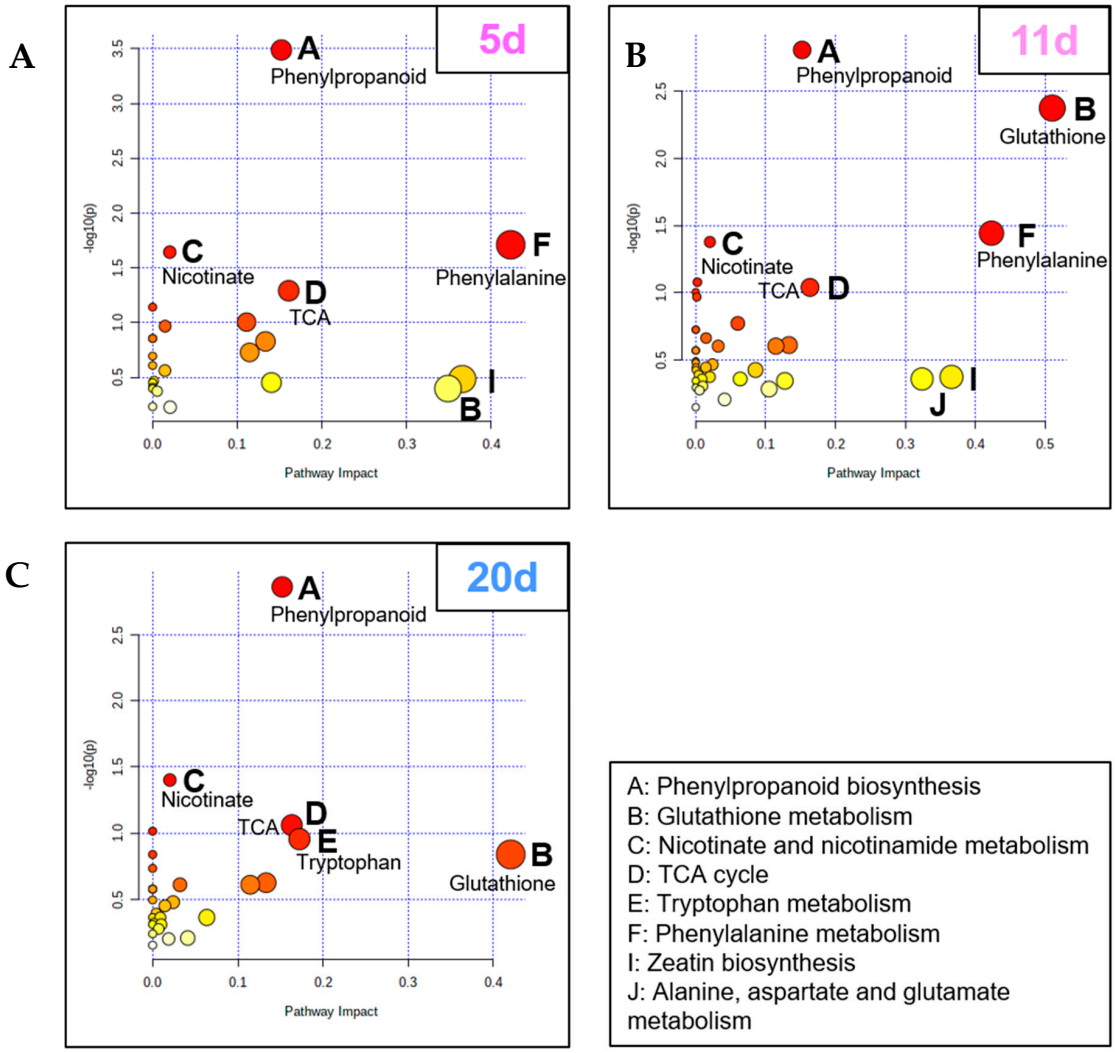


Figure 6. Metabolomic Pathway Analysis from leaves of *B. napus* exposed to 5 d (mild) (**A**), 11 d (severe) (**B**), and 20 d (severe and extended) (**C**) of water deficit relative to control plants. Pathways are displayed as circles whose coordinates correspond to their adjusted *p*-value expressed in −log10(*p*) (for example, $p < 0.05$ corresponds to $-\log10(p) > 1.3$) and their impact. For easier reading, low to high *p*-values are displayed with a white-yellow-orange to red gradient, with white representing the lowest values and red representing the highest; the size of the circle corresponds to the pathway impact score. Only the most impacted pathways having high statistical significance scores ($-\log10(p) > 1.3$) or pathway impact (>0.15) are identified.

At first, an early accumulation of abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) was observed as early as 5 d in leaves of *B. napus* exposed to water deficit (Figure 7A,B). However, at this time point, almost no variation in the transcript level of genes involved in either the biosynthesis or degradation pathways of the two hormones was noted. For JA, this accumulation may be linked to the down regulation of genes involved in hormone degradation due to conjugation with L-isoleucine (Figure 7B). Overall, the accumulation of ABA at 11 d was greater than at 5 d, but again was correlated with very few significant DEGs, even when the neoxanthin biosynthesis cofactor was clearly overexpressed. JA showed a similar trend at 11 d. Finally, at 20 d only, a myriad of genes involved in the biosynthesis of both phytohormones were overexpressed, while the degradation pathways of JA were repressed. For ABA, the expression levels of genes involved in degradation pathways did not allow the identification of a clear trend.

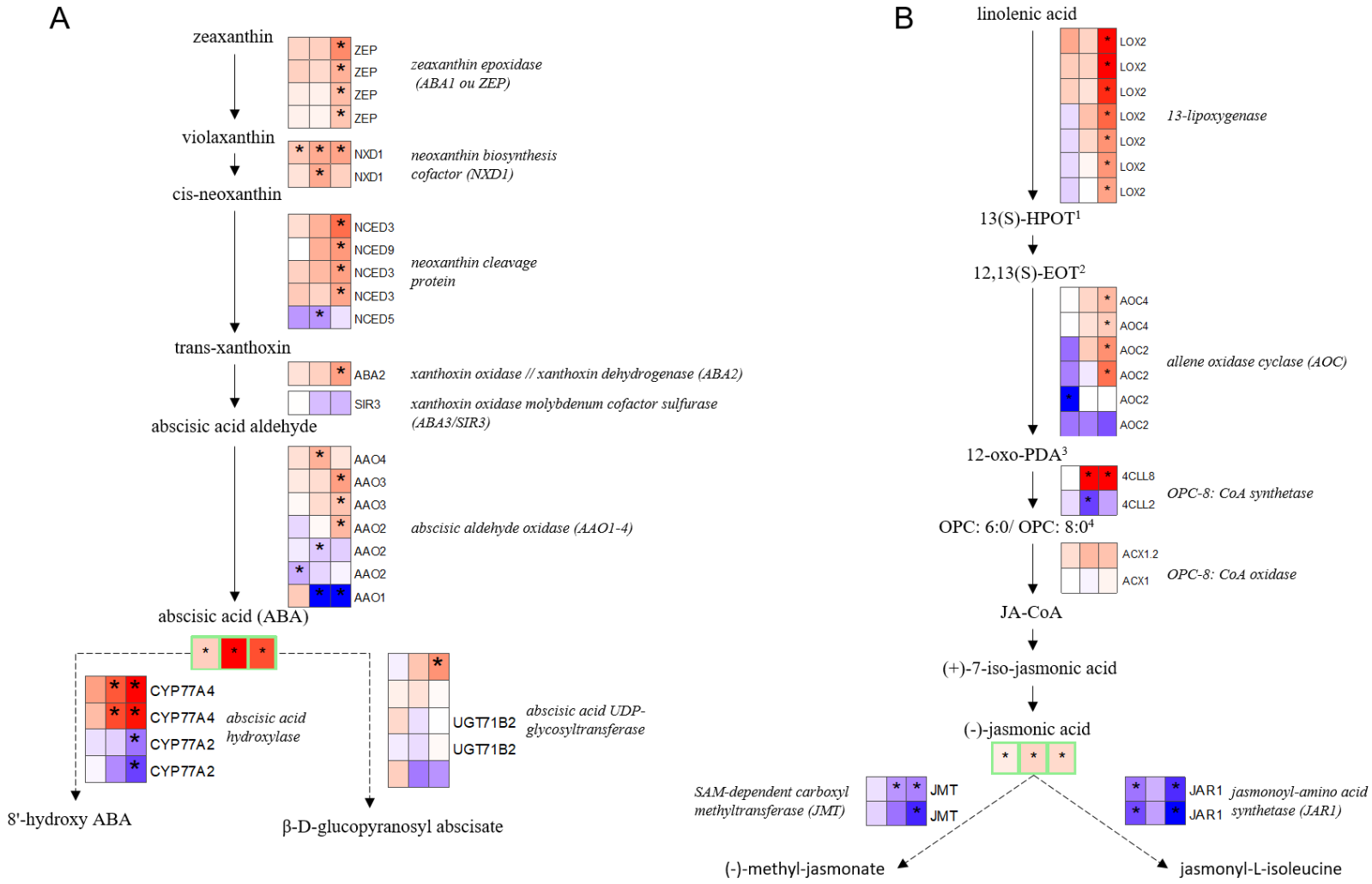


Figure 7. *Cont.*

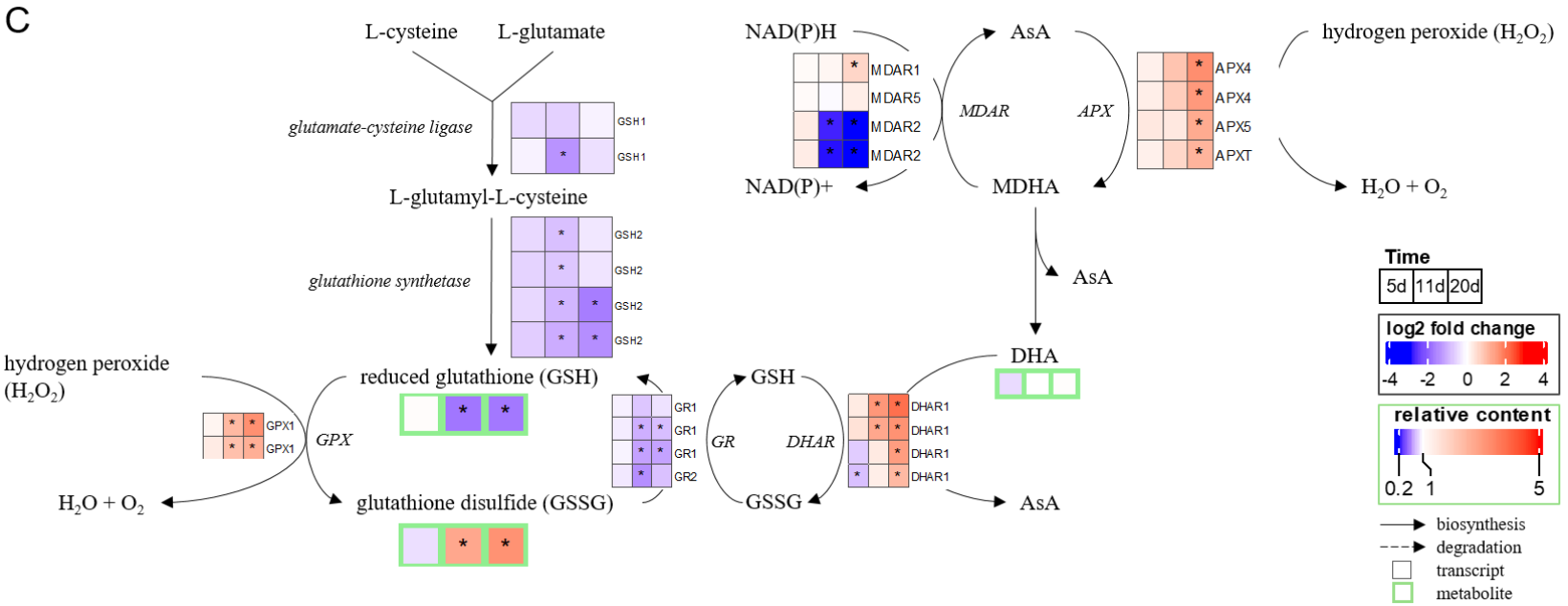


Figure 7. Summary schemes showing the main changes in leaves of *B. napus* induced by water deficit at the transcriptomic and metabolomics levels relative to control plants. *B. napus* plants were exposed to water deficit for 5 d (mild), 11 d (severe), and 20 d (severe and extended). Color-filled boxes indicate the log2 fold change of DEGs or the relative content of ABA (**A**), JA (**B**), and reduced and oxidized glutathione (**C**). Up and down modulations are indicated in red and blue, respectively. Significant variations in gene expression or metabolite levels between control and plants exposed to WD are indicated with an asterisk (*) for an adjusted *p*-value < 0.05. Solid and dashed lines indicate biosynthesis and degradation pathways, respectively. [1] hydroperoxylinolenic acid; [2] 12,13(S)-epoxylinolenic acid; [3] 2-oxo-phytodienoic acid; [4] oxo-pentenyll-cyclopentane; APX: ascorbate peroxidase; AsA: L-ascorbate; DHA: dehydroascorbic acid; DHAR: dehydroascorbate reductase; GPX: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; MDAR: monodehydroascorbate reductase; MDHA: monodehydroascorbate.

The levels of reduced and oxidized glutathione were not altered in plants exposed to a 5 d water deficit (Figure 7C), while the expression level of genes involved in its biosynthesis remains unchanged under WD and this, was also the case for genes involved in the hydrogen peroxide removal process. As revealed in the metabolomic overview, the level of reduced glutathione was decreased (two-fold), and the level of oxidized glutathione was significantly increased (three-fold) from 11 d up to 20 d. Interestingly, at the same time, the expression of genes involved in glutathione biosynthesis was mainly downregulated, whereas genes coding enzymes involved in the removal of hydrogen peroxides such as ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase were overexpressed (Figure 7C).

Finally, relative to control plants, the level of proline assayed in the leaf samples increased at 5 d, then skyrocketed at 11 d and remained considerably elevated at 20 d, by 5, 150, and 30 fold, respectively, in plants exposed to water deficit (Figure 8). This was concomitant with the downregulation of genes involved in proline catabolism to pyrroline-5-carboxylate (P5C) via the sequential action of proline dehydrogenase (PDH) or proline oxidase (POX). By contrast, genes coding a delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH), which converts P5C to glutamate, and a chloroplastic pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS1) involved in proline biosynthesis were significantly overexpressed.

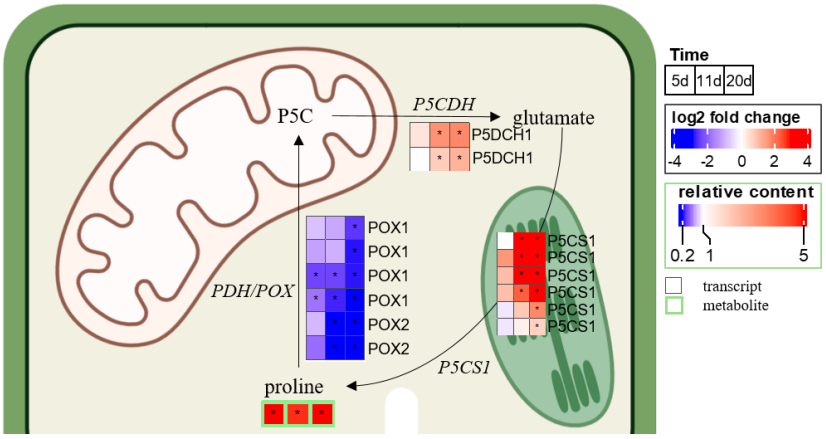


Figure 8. Log2-fold changes in DEGs and the proline content in leaves of *B. napus* exposed to water deficit for 5 d (mild), 11 d (severe), and 20 d (severe extended), relative to control plants. Significant variations between control and plants exposed to WD are indicated with an asterisk (*) for adjusted *p*-value < 0.05. P5C: pyrroline-5-carboxylate; P5CDH: delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase; P5CS1: pyrroline-5-carboxylate synthase; PDH: proline dehydrogenase; POX: proline oxidase.

2.4. Early Effects of Water Deficit on the Leaf Ionome

GO enrichment analysis also revealed an early response involving anion transporters in leaves of *B. napus* exposed to water deficit (Figure 4A). In order to deepen the understanding of this response, DEGs coding ion transporters and recently reported in a review [66] as genes with a known direct relationship to the plant elemental content were selected. This list was supplemented with a set of DEGs extracted from the "ion transport" (GO:0006811) GO term in order to study the expression profiles of 114 genes listed in Supplementary Data S2. The expression profiles of these genes confirmed that, as early as 5 d, the expression levels of nine genes associated with Ca, N, P, B, and Na transport were down-regulated (Figure 9). As previously described (Figure 5), genes associated with N and P were still substantially down-regulated for the duration of the water shortage (Figure 9A). However, the down regulation of these nine genes had no major impact on the element content examined in leaves at 5 d, whereas Fe and Mo content were already significantly increased and decreased, respectively (Figure 9B). At 11 d, the expression of a larger number of genes (64) was altered, the majority being downregulated, while significant decreases in macronutrient (Ca, K, P, and S) and micronutrient (B, Cl, Cu, and Mo) contents were

observed. Subsequently, the expression of 89 genes at 20 d was significantly modulated with a simultaneous up and down regulation of genes associated with the transport of Ca, K, Mg, S, Cl, Fe, Na, and Zn. These gene expression modulations were concomitant with a large decrease in the contents of almost all nutrients in *B. napus* leaves, except N and Na. At 20 d, the largest decreases in leaf nutrient content were found for Fe (−92%), Mo (−71%), Mn (−62%), and Zn (−53%), while the only mineral nutrients showing higher leaf concentrations were N and Na (+29%), despite a significant down expression of genes involved, for example, in N uptake, regardless of the N form involved (nitrate, ammonium or urea, as seen in Figure 9A and Supplementary Data S2).

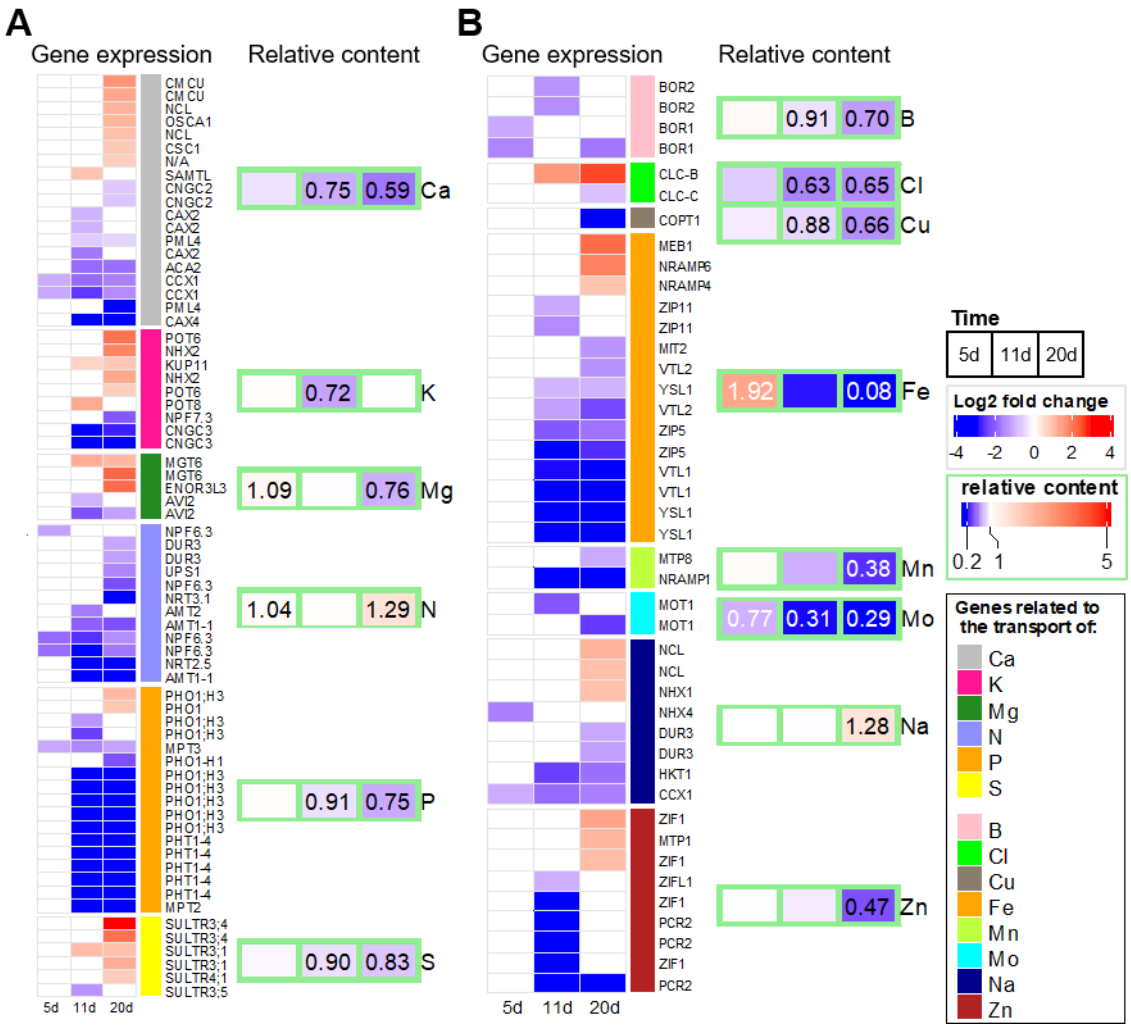


Figure 9. Expression profiles of 114 genes encoding macronutrient (**A**) or micronutrient (**B**) transporters and changes in mineral nutrient contents in leaves of *B. napus* exposed to 5, 11, and 20 d of water deficit, relative to control plants. Log2 fold changes in DEGs are colored in red (up) or blue (down), and non-significant variations in gene expression are blank (adjusted p-value < 0.05). Boxes indicate the relative content of nutrients as the ratio WD/control, and only significant variations are reported.

3. Discussion

In the context of climate change associated with world population growth, the double challenge of maintaining or improving yield as well as nutritional quality [6], including the mineral content of the harvested products, requires a greater understanding of plant responses to biotic stresses. This is particularly true for Brassica napus, a cultivated species with a high requirement in terms of fertilization [67,68] and whose seed quality may be

impaired by deficiencies [69–71], heat stress [72,73], elevated CO_2 [74], or drought [75]. While the effects of water stress on morphological, physiological, metabolomics, and molecular traits have been widely documented [14,18–20], little attention has been focused on its effects on mineral nutrition. A previous study [65] has shown in Brassica napus and Triticum aestivum that net uptake of Fe, Mn, Zn, and Mo was strongly reduced by water deficit and resulted in a drop in the contents of these nutrients in leaf tissue. Consequently, the leaf ionome has been used as a proxy to evaluate mineral nutrition. The main purpose of this study was then to position the alteration in the leaf ionome due to water deficit within processes that are already broadly documented. Therefore, the concomitant analyzes of transcriptomic, metabolomic, and ionomic data at the leaf level and after a gradual onset of water deficit were undertaken before a significant decrease in plant biomass (Figure 1).

3.1. Leaf Mineral Content Is Affected Early by Drought

In this study, the effect of water deficit on mineral nutrition was examined in two stages: the first stage consisting of withholding water until the soil water content dropped to 40% and then 25% of FC, reached after 5 d and 11 d respectively, and then a second stage with FC kept at 25% from 11 d to 20 d (Figure 2). Consequently, the three harvests can be considered as (i) mild, (ii) severe, and (iii) severe and extended water stress, respectively. These water regimes only led to a significant reduction in plant biomass at the last time point studied, i.e., under severe and extended water stress (20 d) (Figure 1). Interestingly, after only 5 d of water shortage, the mineral content of the leaves was found to be already altered for two elements, Fe whose content doubled, and Mo, whose content dropped by a third compared to the well-watered control plants (Figure 8B). After 11 days, the whole mineral composition of the leaves was negatively impacted overall by the water shortage before any effect on plants biomass (Figure 8). Lastly, at 20 d, plants exposed to an extended water deficit showed a significant biomass reduction, whereas, except for N and Na, the leaf ionome composition showed significant decreases in almost all element contents, particularly Fe, Mo, Zn, and Mn. These results are in line with a previous meta-analysis [76], showing that during drought imposed as a "prolonged drying", the N content was less altered than P and led to an increase in the N/P ratio, as also observed in the C3 grasses *A. pratensis* and *H. lanatus* [46]. On the other hand, a large increase in K concentrations has been shown in plants subjected to water stress [77], and initially, this was not observed in this study within leaves (Figure 8A). However, in the current work, the K content was close to the levels present in control plants, and this was probably linked to the fact that several genes encoding K transporters were overexpressed from 11 d (Figure 8A). Moreover, this could further explain the increase in leaf Na content (Figure 9B), a phenomenon also reported in the literature [62,78], which may result from the replacement of K by Na in photosynthesis and carbohydrate metabolic pathways [79] and as a result of K transporters converting into high-affinity Na transporters [80]. Unfortunately, very few studies have investigated the effects of water stress and assessed the uptake or tissue content of other elements, particularly micronutrients, which is necessary to progress towards ionomic studies. For example, a gradual decrease in Ca, Mg, and Fe have been reported in *Arabidopsis* [62] exposed to a mild (50% FC) or a severe (25% FC) drought, and this was also observed in the present study with rapeseed. Similarly, the same authors reported an early drop in the Na concentration followed by an elevation with increasing drought severity, the latter observation being found here for extended and severe water deficit. By contrast, an increase in Mn and Cu leaf contents reported [62] was not found under these experimental conditions. Paralleling other ionomic studies [63,64], this work supports an overall negative effect of water stress on the contents of almost all elements, and this was not obviously the result of a decrease in plant growth. Furthermore, these studies all agreed on the fact that the increase in intensity and/or duration of water stress had an overall negative impact on the ionomic content in plant tissue, including the edible parts, as also reported in the context of other abiotic stresses such as elevated CO_2 [74]. Nevertheless, these studies have also revealed opposite trends in the way water stress

altered the content of some elements [81], particularly under mild or short drought [62], and this underlines the influence of the experimental conditions on ionomic changes as previously reported [76] and demonstrated the need for homogenization of methodologies so that comparable results can be obtained.

3.2. At the Molecular Level, a Specific Down-Regulation of Genes Encoding Transporters Precedes the Modification of Leaf Ionomic Content

Overall, the result of the processes that took place between 5 d and 11 d at leaf level demonstrates a significant decrease in the content of a large number of elements together with the negative regulation of the expression of genes encoding the associated transporters. Indeed, only 5 d after the start of withholding water, a very early downregulation of the expression of several genes encoding N (NPF 6.3), Ca (CCX1), P (MPT3), B (BOR1), and Na (NHX4 and CCX1) transporters was observed, therefore preceding the modification of the associated contents in leaves that occurred after 11 d or 20 d (Figure 9). Six days later (11 d), these genes remained steadily downregulated alongside a significant decrease in Ca, P, and B content, while the N and Na contents remained similar to control plants. By contrast, at 5 d, the water deficit applied disturbed the Fe and Mo content, but the genes encoding the associated transporters were not impaired. In fact, it has been shown in *Chlamydomonas reinhardtii* that the transcription of the Mo transporter CrMOT1, also identified in *A. thaliana* [82], does not depend on the availability of Mo but is regulated by N levels [83], which seemed to have undergone little alteration here. Surprisingly, the short-term increase in Fe content in leaves was not associated with an overexpression of genes encoding Fe transporters in order to promote cell entry or vacuolar unloading. Conversely, Fe and Mo contents were negatively impaired from 11 d onwards, i.e., under severe water deficit, and genes encoding their associated transporters were considerably downregulated, as reported for Fe in a previous *A. thaliana* transcriptomic analysis [42].

Although it could be hypothesized that the lower elemental contents observed were perceived by the plant as a deficiency, the response at the transcriptomic level did not seem to match this because nutrient deficiencies are usually characterized by overexpression of a myriad of ion transporters. Indeed, the overexpression of IRT1, considered the main transport pathway of Fe in the plant, is a well-known feature of Fe deficiency [84], as is the overexpression of other members of the ZIP multigene family such as IRT3, ZIP2, and ZIP4 in Zn or Cu deficiency [84]. This is also the case for *NRAMP1*, an essential Mn transporter overexpressed during Mn deficiency in *A. thaliana* [85]. The overexpression of all these genes, which is known as a hallmark of nutrient deficiency, was not observed here when plants faced a water deficit, despite a massive decrease in the concentration of these elements in the leaves. Furthermore, the ionome seems to be finely regulated during a deficiency [56]; for example, in leaves of *A. thaliana*, Fe content remains constant, whereas under the water deficit tested conditions, the Fe content eventually declined, which was probably a consequence of a broad downregulation of the genes encoding Fe transporters (Figure 9B). Results suggest that during water stress, the response of plants in terms of expression of genes encoding nutrient transporters is specific and differs from a nutrient deficiency, even though drought results in a significant decrease in the overall content of elements. This hypothesis is also supported by a previous work [42], where a transcriptomic analysis of the differential response of *A. thaliana* roots and shoots also revealed that genes involved in Fe uptake machinery, such as *IRT1*, *IRT3*, and ferric reduction oxidase 2 (*FRO2*), were downregulated at the root level after five to nine days of drought. These authors reported a downregulation of the transcription factor *FIT1*, which specifically controls the expression of *FRO2* and *IRT1* in roots, and suggested that this regulation under drought alters the distribution of Fe within the plant. Although the expression of genes involved in Fe uptake may be subject to the control of phytohormones such as ABA and JA [86], these results evidenced an early and concomitant accumulation of ABA, JA and Fe in leaves of *B. napus* without variation in Fe transport-associated gene expression. Since it has been suggested [87] that ABA increases root to shoot translocation of Fe during deficiency in

Arabidospis, this might explain the transient and early Fe accumulation observed here under drought, but in that case, the mechanism still remains to be investigated.

3.3. Global Transcriptomic Analysis Revealed That Downregulation of Mineral Nutrition Is Elicited before Phytohormone and Proline Metabolism or the Occurrence of Oxidative Stress

It was firstly found using PCA analysis (Figure 3A) that transcriptomic data managed to discriminate plants exposed to water deficit compared to control plants. This was due to a large modification of transcriptome profiles resulting from mild, severe, and severe extended water deficits with 525 (231 down, 294 up), 5454 (3827 down, 1527 up), and 9346 (5139 down and 4207 up) DEGs identified, respectively (Figure 3B). Numerous transcriptomic and metabolomic analyses have tried to decipher the response of *Arabidopsis thaliana* [42], wheat (*Triticum astivum*) [36,40,88], potato (*Solanum tuberosum*) [89,90], common bean (*Phaseolus vulgaris*) [91], cotton (*Gossypium herbaceum*) [92,93], tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [94], or rapeseed (*Brassica napus* L.) [41,45] under drought. GO analysis in the majority of these studies reported large changes in the following metabolic classes: phytohormone regulation, defense responses, osmotic stress, salt stress, abiotic stimulus, oxygen-containing compounds and oxidative stress, and the metabolism of carbohydrates, amino acids, and lipids. Interestingly, a substantial number of these studies also reported GO terms related to ion transporters [41,42,88,89,91,93], but to the best of our knowledge, this aspect has not been an in-depth focus, as it was done for rapeseed subjected to saline stress [44]. In this study, it was thus decided to explore the effect of a water deficit on mineral nutrition in greater depth. Special attention was paid to the shift in the leaf ionome and the expression of genes coding ion transporters so as to compare their earliness with ABA, JA, glutathione, and proline responses, which comprise the most frequently reported processes in the studies cited above. Indeed, the GO analysis revealed that among the most enriched terms, ion transporters and especially borate transport are among the earliest forms of altered metabolism in plants subjected to drought (Figure 4), and this was confirmed through assessment of the gene expression of ion transporters (Figure 9). However, checking the increased expression of these transporters by proteomic analysis could be difficult for two main reasons: Firstly, these transport proteins may be accumulated at a very low level; secondly, the correlation between protein synthesis and corresponding gene expressions have shown low correlations, as has been reported for the wheat [95]. The harvest of plants after 5, 11, and 20 d revealed an alteration in the oxygen-containing compound content as early as 5 d (Figure 4). Indeed, under drought, it has been reported that oxidative stress is accompanied by the formation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals, which cause cellular damage and inhibition of photosynthesis [20]. At the metabolomic level, glutathione metabolism was progressively altered, but mainly after 11 d and 20 d of WD (Figure 6B,C), while the nicotinamide metabolism, which is the precursor of NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) and NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), two cofactors involved in all of the plant's redox reactions, was always altered irrespective of the severity or the length of the water deficit (Figure 6). Nevertheless, at the molecular level, there was no evidence before 11 d that a variation in gene expression was involved in glutathione synthesis, nor was there evidence of enzymes that scavenge hydrogen peroxide (Figure 7C).

Since ROS damages membranes and drought decreases the leaf water content, the response of plants comprises osmotic adjustment, and especially via osmoprotectants including carbohydrates and proline biosynthesis. In accordance with a reported meta-analysis [39], raffinose was significantly accumulated in leaves in this study (10 fold, data not shown) while proline greatly increased (150 fold) at the same time (Figure 8). Indeed, proline accumulation has been reported to play a crucial role in plant stress tolerance and may contribute to drought tolerance [96,97]. This accumulation peak was concomitant with the downregulation of genes contributing to proline degradation to pyrroline-5-carboxylate (P5C); and overexpression of genes orthologous to *A. thaliana* P5CS1, which encodes the delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase enzyme that catalyzes the rate-limiting step

of proline biosynthesis [98]. In *B. napus*, *P5CS1* was notably identified among putative candidate genes for water stress tolerance [43]. If proline was accumulated early (at 5 d), at the molecular level again, almost no gene expression variation was observed.

This data supports the notion that regulation of proline and accumulation of carbohydrates may be mediated by ABA accumulation [32], and some authors [27] have proposed a model of crosstalk between ABA and carbohydrate metabolism being involved in hexose accumulation, mainly due to starch degradation. Surprisingly, the GO analysis undertaken here revealed no terms linked to phytohormones even though early ABA and JA accumulations were found. Moreover, their early accumulation might not have resulted from the overexpression of genes involved in their biosynthesis or down-regulation of genes involved in the degradation of ABA (Figure 7A,B). Instead, increased ABA concentrations in leaves could have resulted from cell dehydration rather than its de novo synthesis [99].

Overall, the results of this study clearly show that during drought, mineral nutrition is affected early at the leaf level in regards to ionomic content and downregulation of ion transporters. While often attributed to reductions in K and Ca contents, which are the two major elements involved in osmotic adjustments and the signaling cascade [44], respectively, in most cases, the contents of all elements seemed to become impaired eventually, but without the transcriptomic responses that are normally found under nutrient deficiencies [53]. This underscores the need for further studies to decipher the mechanisms involved in such differential regulation. Among the future targets is the role of phytohormones such as ABA in regulating plant nutrient uptake, which was previously revealed through exogenous application studies [100], or examination of the differential expression of upstream transcription factors [41]. Additionally, since numerous studies have highlighted the differential regulation that occurs in shoots and roots during drought [41,42], new research addressing all plant compartments may allow explanation of such leaf ionomic variations.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material and Growth Conditions

Seeds of rapeseed (*Brassica napus* cv. Trezzor) were germinated in trays filled with a potting soil mixture (NFU 44551, type 992016F1, Falienor S.A., Vivy, France) composed of sandy loam (40% v/v) and peat moss (60% v/v) supplemented with clay (40 kg m^{-3}) and NPK fertilizer (0.7 kg m^{-3} PG-MIX 14-16-18) with a soil solution at pH 5.9 (+/−0.2) (composition given in Supplementary Table S1) in a growth chamber (16 h/8 h light/dark cycle at 20 °C and 18 °C respectively, at 80% relative humidity). After the emergence of the second leaf, each seedling was transplanted into a 6.5 L pot (20.6 cm diameter) filled with 5000 g of the potting soil cited above and watered to 80% of field capacity (FC), and was then placed in greenhouse conditions (16 h day/8 h night at 25 °C/20 °C) in the high-throughput plant phenotyping platform of the Centre Mondial de l'Innovation (Saint-Malo, France), with natural light supplemented with high-pressure sodium lamps (MST SON-T PIA Plus 400 W, Philips, Amsterdam, The Netherlands) to ensure at least 250 µmol m^{-2} s^{-1} of PAR at canopy height.

Based on the data provided by automatic weighing twice a day, pots were then watered to maintain 80% FC and fertilized twice with 100 mL of a modified Hoagland solution (corresponding to 40 kg N ha^{-1}, composition available in Supplementary Table S2) to ensure the plants' needs until the end of the experiment, according to estimations from previous experiments [61,101,102].

Thirty days after sowing, well-watered control plants were kept at 80% FC, while watering was stopped until FC dropped to 40% FC (after 5 d) and then 25% FC (after 11 d) (Figure 2). Afterward, from 11 d to 20 d, water inputs were restarted in order to maintain 25% FC until the end of the experiment.

Plants were sampled at 5 d, 11 d, and 20 d with five replicates, each consisting of two plants. At 0 d, the last-developed aboveground tissues were identified using a marker pen on the petiole so as to only examine leaves that were developed during water shortage for analysis. The number of newly developed leaves from 0 d and the total leaf number per

plant were recorded. Each fresh sample was weighed and separated into two homogeneous batches: one immediately frozen in liquid nitrogen before being stored at −80 °C for transcriptomic and metabolomic analyses, the other oven-dried for 72 h at 65 °C for dry weight determination and element analysis.

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

According to the previously described protocols [103], total RNAs were extracted from 200 mg of fresh leaves developed during a water shortage and powdered prior to analysis using a mortar containing liquid nitrogen. In brief: 750 µL of hot phenol (80 °C, pH 4.3) and 750 µL of extraction buffer (0.1 M TRIS, 0.1 M LiCl, 0.01 M 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 4 M LiCl solution (*w*/*v*) was 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 and 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 1 x 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 a 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 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 leaves of plants exposed to a water deficit was calculated relative to the control with the ΔΔCt method using the following equation:

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

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, the relative expression in the leaves of the target gene in the control sample was equal to 1 [104].

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

As previously described [53], the RNA-seq samples were obtained from three independent replicates of total RNA extracted as described above with an Illumina NexSeq500 at the POPS platform of the Institute of Plant Science (IPS2) in Paris-Saclay (France). RNA-seq libraries were constructed using the TruSeq Stranded mRNA library prep kit (Illumina®, San Diego, CA, USA) according to the supplier's instructions. The libraries were sequenced in paired-end (PE) mode with 75 bases for each read on an Illumina NextSeq500 to generate approximately 19 million PE reads per sample. Adapter sequences and bases with a Q-Score below 20 were trimmed out from reads using Trimmomatic (version 0.36, Illumina®, San Diego, CA, USA [105]) and reads shorter than 30 bases after trimming were discarded. Reads corresponding to rRNA sequences were removed using sortMeRNA (version 2.1, CRISTAL, Lille, France) [106]) against the silva-bac-16s-id90, silva-bac-23s-id98, silva-euk-18s-id95, and silva-euk-28s-id98 databases. Filtered reads

were then mapped and counted using STAR (version 2.7.3a, [107]) with the following parameters –alignIntronMin 5 –alignIntronMax 60000 –outSAMprimaryFlag AllBestScore –outFilterMultimapScoreRange 0 –outFilterMultimapNmax 20– alignEndsType Local on the *Brassica napus* genome (annotation V5 from Genoscope accessed on 2nd February 2021: http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/data/) and its associated GTF annotation file. Between 90% and 93% of the reads were associated with annotated genes. Next, genes with less than 0.6 read per million in at least 3 of the samples were discarded, using the filterByExp function of the edgeR package. The resulting raw count matrix was fed into edgeR [108] for differential expression testing by fitting a negative binomial generalized log-linear model (GLM), including a replicate factor, a treatment factor, a time factor, and an interaction between treatment and time to the TMM-normalized read counts for each gene. Gene expression was compared between control and plants subjected to drought. The distribution of the resulting *p*-values followed the quality criterion previously described [109]. Genes with an adjusted *p*-value (FDR, Benjamini-Hochberg adjustment [110]) below 0.05 were considered as differentially expressed.

Genes were considered to be differentially expressed (DEG) for an adjusted *p*-value ≤ 0.05, whatever the absolute value of the "Log2 fold change" (Supplementary Data S2 and S3). 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 mixOmics package (mixomics.org) (version 6.14.0), within R (R-project.org) (version 4.0.3) using log2-transformed normalized expression data. RNA-seq expression data were validated by using four 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 Supplementary Figure S4.

4.4. RNA-Seq Bioinformatic Analysis

Gene ontology enrichment analysis from Differentially Expressed Genes (DEGs) (Supplementary Data S3) was performed using the free web server of g:Profiler (biit.cs.ut.ee/gprofiler) [111] (version e104_eg51_p15_3922dba) with the Benjamin et Hochberg FDR correction method (threshold = 0.05). Then GO terms and associated adjusted *p*-values obtained from g:Profiler was inputted into the REVIGO tool in order to summarize the lists of GO terms [112] (version 01 February 2021, the setting was medium allowed similarity) (Supplementary Data S1).

Transporter-associated genes were selected from the *Arabidopsis thaliana* curated list of KIG [66] using the BioMart tool of the Ensembl Plants database (from Ensembl Plants Genes 51—*Arabidopsis thaliana* genes (Tair10)—*Brassica napus* genes (AT_PRJEB5043_v1) in order to find *Brassica napus* orthologs, and these were supplemented with a set of DEGs belonging to the GO term "ion transport" (GO:0006811) extracted from Amigo2 and unambiguously related to the transport of elements (Supplementary Data S2).

Genes associated with biosynthesis and degradation of ABA, SA, GSH, GSSG, DHA, and proline were identified using the BIN hierarchical functional categories of the MapMan software (version 3.6.0RC1) [113,114], with genes mapped on *Brassica napus* annotation (version X4.2 brassica_napus from Ensembl Plants Genes 44) placed on summarized pathways according to the Plant Metabolic Network databases [115].

4.5. Untargeted Metabolic Profiling Using UPLC-MS/MS

The method used has been previously described [53]. Briefly, ground frozen leaf tissues (50 mg) were used for extraction, and the 1mL buffer for metabolite extraction contains 70% MeOH (Optima LCMS grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 29% H_2O (Milli-Q, 18.2 MΩ·cm, Millipore, MA, USA) and 1% formic acid (LCMS grade, Honeywell Fluka, Seelze, Germany). Samples were then centrifuged, and the supernatant was used for analysis by UPLC-MS/MS (Ultra performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry). Separation and detection were performed using an Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) linked to a Xevo G2-S QTof mass spectrometer (Waters)

equipped with a LockSpray electrospray ionization (ESI) source. Sample separation was accomplished by injecting 10 µL into an HSS T3 C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm column (Waters), kept at 40 °C, at a flow rate of 0.5 mL min^{-1}. The mobile phases were composed of two solvents (A: Milli-Q water containing 0.1% formic acid, and B: acetonitrile containing 0.1% formic acid). Optimal separation was obtained using 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. Mass spectrometry analysis was performed in positive and negative ionization modes using 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 MS^E mode from 50 to 1200 m/z at 0.1 s $scan^{-1}$. The ramp collision energy was set at 25 to 40 V. Samples were injected in randomized order. A quality control (QC) sample was prepared from an equal mix of all collected samples. The QC sample was injected every six samples to assess system stability.

After acquisition, metabolomic data were processed using Progenesis QI software (Version 3.0, Waters, Milford, MA, USA). Identification was carried out using the online open-source: Plant Metabolic Pathway Databases-Plant Metabolic Network (plantcyc.org) (Version 15.0.1) [116] with a mass tolerance of 10 ppm. For identified metabolites, the experimental MS^2 spectrum was compared to the MS-DIAL reference MS/MS database, CompMS-MS-DIAL (riken.jp) (Version 14) [117] when possible; otherwise, it was compared to the theoretical fragmentation spectrum. The fragment mass tolerance is set at 10 ppm. Only identified metabolites were kept for further multivariate analysis.

Multivariate analysis was performed using EZInfo software (Version 3.0.3.0, Umetrics, Umeå, Sweden). Raw data were mean-centered, and Pareto scaled [118]. For each duration of water restriction, partial least squares discriminant analyses (PLS-DA) [119] were performed between water-deficient samples and their corresponding control samples. For each comparison, the influence of each metabolite on the classification was calculated by the variable influence on projection (VIP) [119,120]. Metabolites with VIP > 1 have an above-average influence. In this study, only metabolites with VIP > 2 were considered as being differentially expressed for further analyses. The metabolites list can be found in Supplementary Data S4.

For a better understanding of metabolic regulation induced by each duration of water restriction, pathway analysis was performed using the online open-source software, MetaboAnalyst 5.0 (metaboanalyst.ca) [121]. For each pathway, the *p*-values of metabolite set enrichment analysis and pathway impact of topology analysis were calculated using the KEGG database [122].

4.6. Phytohormone Analysis

Profiles of phytohormones were quantified on leaf samples harvested after 0, 5, 11, and 20 d of water restriction, with the samples being stored at −80 °C prior to analysis. Jasmonic acid (JA) and abscisic acid (ABA) standards were obtained from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI, USA), and the internal standard was labeled with stable isotopes ($^2H_5$-JA and $^2H_6$-ABA) from OlchemIn (Olomouc, Czech Republic). Ground frozen leaves (20 mg) were extracted with 1 mL buffer containing 70% methanol (Optima LCMS grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% formic acid (LCMS grade, Honeywell Fluka, Seelze, Germany), and 29% Milli-Q water containing internal standards labeled with stable isotope. The extracts were then centrifuged at 17,927× *g*, and the supernatants were collected. The supernatants were evaporated (SPE Dry 96, Biotage, Uppsala, Sweden) and resuspended in 2% formic acid solution and purified using an SPE ABN express column of 1 mL/30 mg (Biotage, Uppsala, Sweden). Phytohormones were then eluted using methanol, and samples were evaporated. Before injection into the UPLC-MS/MS system, the extract was resuspended in a 0.1% formic acid solution. Separation and detection were performed using a Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) linked to a QTrap 6500+ mass spectrometer (SCIEX, Concord, ON, Canada) equipped with an IonDrive turbo V

electrospray source. Two µL were injected into a Kinetex Evo C18 core-shell column kept in an oven at 40 °C (100 × 2.1 mm, 2.6 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) at a flow rate of 0.7 mL min^{-1} in order to separate phytohormones. The mobile phases were composed of 2 solvents (A: Milli-Q water containing 0.1% formic acid and B: acetonitrile LCMS grade containing 0.1% formic acid). Separation was done using the following gradient: a linear gradient from 1 to 60% B over 5 min; 60 to 100% B from 5 to 5.5 min; maintained at 100% B from 5.5 to 7 min; 100 to 1% B from 7 to 7.5 min; and maintained at 1% until 9.6 min for column regeneration. Analysis by mass spectrometry was achieved in negative mode and scheduled multiple reaction monitoring modes (MRM). Mass spectrometry acquisition was performed using the following parameters: ion spray voltage −4500 V; source temperature 600 °C; curtain gas 35 psi; nebulizer gas 50 psi; heater gas 60 psi; collision gas medium; entrance potential -10 V; MRM detection window 30 s; target scan time 0.075 s. The targeted MRM transitions are 209.0/59.0 (JA), 214.1/62.2 (D-JA), 263.0/153.0 (ABA), and 269.1/159.0 (D-ABA).

4.7. Proline Quantitative Analysis

The proline quantification method was adapted from Troll and Lindsley 1955 [123]. Fifty mg of ground frozen leaf tissues were extracted using 1 mL of ethanol (VWR, Rosny-sous-Bois, France). After extraction, samples were dried and resolubilized with 250 µL of water. After centrifugation, 100 µL of supernatant was added to 1 mL of 0.1 g/L ninhydrin solution in 60% acetic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MI, USA). The mix was heated at 95 °C for 20 min, and 3 mL of toluene (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to the mix after cooling. The organic (toluene) phase containing the red chromophore formed by ninhydrin and proline was kept for spectrophotometric measurement at 520 nm (SpectraMax i3x, Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

4.8. Element Content Analysis by Mass Spectrometry and X-ray Fluorescence

Dried leaf samples were ground using 4 mm diameter inox beads in an oscillating grinder (Mixer Mill MM400, Retsch, Haan, Germany). The concentrations of most elements (Mg, P, S, K, Ca, B, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo Na, Co, V, and Se) were quantified using the procedure previously described [102] using 40 mg of dry powder per sample that was submitted to acid digestion and mineralization. The resulting solutions were then analyzed by high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR-ICP-MS, Element 2^{TM}, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

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

The remaining elements (Cl, Si, and Al) were quantified with approximately 1 g of dry weight powder analyzed with an X-ray-fluorescence spectrometer (XEPOS, Ametek, Berwyn, PA, USA) using calibration curves obtained from international standards with known concentrations.

In this study, elemental content is expressed as the ratio WD/control plants following the calculation method described [61].

4.9. Statistical Analysis

The experiment was performed with 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 is indicated as the mean ± S.E. (n = 5), while nutrient content was given as the ratio WD/control (n = 5).

Statistical analyses were performed using the free acess R software (R-project.org) (version 4.0.3: R Core Team, 2020) and its extension RStudio (rstudio.com) (version 1.3.1093: RStudio Team, 2020). Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), and mean values were compared using Tukey's HSD post-hoc test.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23020781/s1.

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

Funding: This work conducted under the EAUPTIC project was supported by the Regional Council of Normandy (CRN, grant number 17P07231), the "Fond Unique Interministériel" (FUI, grant number 3870401/1), the Centre Mondial de l'Innovation (CMI) of the Roullier Group (Ph.D. CIFRE grant number 2018/0276 to A.D.).

Data Availability Statement: RNAseq data were submitted to the Gene Expression Omnibus (GEO) international repository: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo accessed on 23 July 2021; GEO accession: GSE179022.

Acknowledgments: The authors thank the POPS transcriptomic platform supported by Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007) for undertaking RNAseq, Julie Frémont for RT-qPCR analysis, the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element analysis used in this study, and Frank Jamois for supervising the biochemical and metabolomic analyses at the Analytical research platforms of Roullier and Laurence Cantrill for improving the English in this manuscript.

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

References

1. Dai, A. Increasing Drought under Global Warming in Observations and Models. *Nat. Clim. Chang.* **2013**, *3*, 52–58. [CrossRef]
2. Qaderi, M.M.; Kurepin, L.V.; Reid, D.M. Growth and Physiological Responses of Canola (*Brassica napus*) to Three Components of Global Climate Change: Temperature, Carbon Dioxide and Drought. *Physiol. Plant.* **2006**, *128*, 710–721. [CrossRef]
3. Champolivier, L.; Merrien, A. Effects of Water Stress Applied at Different Growth Stages to *Brassica napus* L. Var. Oleifera on Yield, Yield Components and Seed Quality. *Eur. J. Agron.* **1996**, *5*, 153–160. [CrossRef]
4. Ghobadi, M.; Bakhshandeh, M.; Fathi, G.; Gharineh, M.H.; Alami-Said, K.; Naderi, A.; Ghobadi, M.E. Short and Long Periods of Water Stress during Different Growth Stages of Canola (*Brassica napus* L.): Effect on Yield, Yield Components, Seed Oil and Protein Contents. *J. Agron* **2006**, *5*, 336–341.
5. Branka, K.; Bosko Andrija, G.; Angelina, T.; Goran, D. Yield and Chemical Composition of Soybean Seed under Different Irrigation Regimes in the Vojvodina Region. *Plant Soil Environ.* **2017**, *63*, 34–39. [CrossRef]
6. Soares, J.C.; Santos, C.S.; Carvalho, S.M.P.; Pintado, M.M.; Vasconcelos, M.W. Preserving the Nutritional Quality of Crop Plants under a Changing Climate: Importance and Strategies. *Plant Soil* **2019**, *443*, 1–26. [CrossRef]
7. Myers, S.S.; Smith, M.R.; Guth, S.; Golden, C.D.; Vaitla, B.; Mueller, N.D.; Dangour, A.D.; Huybers, P. Climate Change and Global Food Systems: Potential Impacts on Food Security and Undernutrition. *Annu. Rev. Public Health* **2017**, *38*, 259–277. [CrossRef] [PubMed]
8. Haberle, J.; Svoboda, P.; Raimanova, I. The Effect of Post-Anthesis Water Supply on Grain Nitrogen Concentration and Grain Nitrogen Yield of Winter Wheat. *Plant Soil Environ.* **2008**, *54*, 304–312. [CrossRef]
9. Guzmán, C.; Autrique, J.E.; Mondal, S.; Singh, R.P.; Govindan, V.; Morales-Dorantes, A.; Posadas-Romano, G.; Crossa, J.; Ammar, K.; Peña, R.J. Response to Drought and Heat Stress on Wheat Quality, with Special Emphasis on Bread-Making Quality, in Durum Wheat. *Field Crops Res.* **2016**, *186*, 157–165. [CrossRef]
10. Fan, M.-S.; Zhao, F.-J.; Fairweather-Tait, S.J.; Poulton, P.R.; Dunham, S.J.; McGrath, S.P. Evidence of Decreasing Mineral Density in Wheat Grain over the Last 160 Years. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2008**, *22*, 315–324. [CrossRef]
11. Velu, G.; Guzman, C.; Mondal, S.; Autrique, J.E.; Huerta, J.; Singh, R.P. Effect of Drought and Elevated Temperature on Grain Zinc and Iron Concentrations in CIMMYT Spring Wheat. *J. Cereal Sci.* **2016**, *69*, 182–186. [CrossRef]
12. Rawat, N.; Neelam, K.; Tiwari, V.K.; Dhaliwal, H.S. Biofortification of Cereals to Overcome Hidden Hunger. *Plant Breed.* **2013**, *132*, 437–445. [CrossRef]
13. Simova-Stoilova, L.; Vassileva, V.; Feller, U. Selection and Breeding of Suitable Crop Genotypes for Drought and Heat Periods in a Changing Climate: Which Morphological and Physiological Properties Should Be Considered? *Agriculture* **2016**, *6*, 26. [CrossRef]

14. Tardieu, F. Any Trait or Trait-Related Allele Can Confer Drought Tolerance: Just Design the Right Drought Scenario. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 25–31. [CrossRef] [PubMed]
15. Zhu, M.; Monroe, J.G.; Suhail, Y.; Villiers, F.; Mullen, J.; Pater, D.; Hauser, F.; Jeon, B.W.; Bader, J.S.; Kwak, J.M.; et al. Molecular and Systems Approaches towards Drought-Tolerant Canola Crops. *New Phytol.* **2016**, *210*, 1169–1189. [CrossRef]
16. Araus, J.L.; Slafer, G.A.; Reynolds, M.P.; Royo, C. Plant Breeding and Drought in C3 Cereals: What Should We Breed For? *Ann. Bot.* **2002**, *89*, 925–940. [CrossRef]
17. Lawlor, D.W. Genetic Engineering to Improve Plant Performance under Drought: Physiological Evaluation of Achievements, Limitations, and Possibilities. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 83–108. [CrossRef]
18. Farooq, M.; Wahid, A.; Kobayashi, N.; Fujita, D.; Basra, S.M.A. Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *Agron. Sustain. Dev.* **2009**, *29*, 185–212. [CrossRef]
19. Nadeem, M.; Li, J.; Yahya, M.; Sher, A.; Ma, C.; Wang, X.; Qiu, L. Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2541. [CrossRef]
20. Raza, M.A.S.; Shahid, A.M.; Saleem, M.F.; Khan, I.H.; Ahmad, S.; Ali, M.; Iqbal, R. Effects and Management Strategies to Mitigate Drought Stress in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.): A Review. *Zemdirbyste* **2017**, *104*, 85–94. [CrossRef]
21. Bodner, G.; Nakhforoosh, A.; Kaul, H.-P. Management of Crop Water under Drought: A Review. *Agron. Sustain. Dev.* **2015**, *35*, 401–442. [CrossRef]
22. Rodríguez, M.; Canales, E.; Borrás-Hidalgo, O. Molecular Aspects of Abiotic Stress in Plants. *Biotecnol. Apl.* **2005**, *22*, 1–10.
23. Zargar, S.M.; Gupta, N.; Nazir, M.; Mahajan, R.; Malik, F.A.; Sofi, N.R.; Shikari, A.B.; Salgotra, R.K. Impact of Drought on Photosynthesis: Molecular Perspective. *Plant Gene* **2017**, *11*, 154–159. [CrossRef]
24. Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Gene Networks Involved in Drought Stress Response and Tolerance. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 221–227. [CrossRef]
25. Chen, L.; Ren, F.; Zhong, H.; Jiang, W.; Li, X. Identification and Expression Analysis of Genes in Response to High-Salinity and Drought Stresses in *Brassica napus*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2010**, *42*, 154–164. [CrossRef] [PubMed]
26. Chaves, M.M.; Maroco, J.P.; Pereira, J.S. Understanding Plant Responses to Drought—From Genes to the Whole Plant. *Funct. Plant Biol.* **2003**, *30*, 239–264. [CrossRef]
27. Park, S.-H.; Lee, B.-R.; La, V.H.; Mamun, M.A.; Bae, D.-W.; Kim, T.-H. Drought Intensity-Responsive Salicylic Acid and Abscisic Acid Crosstalk with the Sugar Signaling and Metabolic Pathway in Brassica Napus. *Plants* **2021**, *10*, 610. [CrossRef] [PubMed]
28. Qaderi, M.M.; Kurepin, L.V.; Reid, D.M. Effects of Temperature and Watering Regime on Growth, Gas Exchange and Abscisic Acid Content of Canola (*Brassica napus*) Seedlings. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *75*, 107–113. [CrossRef]
29. Liu, S.; Lv, Z.; Liu, Y.; Li, L.; Zhang, L. Network Analysis of ABA-Dependent and ABA-Independent Drought Responsive Genes in *Arabidopsis Thaliana*. *Genet. Mol. Biol.* **2018**, *41*, 624–637. [CrossRef] [PubMed]
30. Chhaya; Yadav, B.; Jogawat, A.; Gnanasekaran, P.; Kumari, P.; Lakra, N.; Lal, S.K.; Pawar, J.; Narayan, O.P. An Overview of Recent Advancement in Phytohormones-Mediated Stress Management and Drought Tolerance in Crop Plants. *Plant Gene* **2021**, *25*, 100264. [CrossRef]
31. Gill, S.S.; Tuteja, N. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, *48*, 909–930. [CrossRef]
32. La, V.H.; Lee, B.-R.; Islam, M.T.; Park, S.-H.; Jung, H.; Bae, D.-W.; Kim, T.-H. Characterization of Salicylic Acid-Mediated Modulation of the Drought Stress Responses: Reactive Oxygen Species, Proline, and Redox State in *Brassica napus*. *Environ. Exp. Bot.* **2019**, *157*, 1–10. [CrossRef]
33. Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M.H.M.B.; Anee, T.I.; Parvin, K.; Nahar, K.; Mahmud, J.A.; Fujita, M. Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. *Antioxidants* **2019**, *8*, 384. [CrossRef] [PubMed]
34. Ashraf, M.; Shahbaz, M.; Ali, Q. Drought-Induced Modulation in Growth and Mineral Nutrients in Canola (*Brassica napus* L.). *Pak. J. Bot* **2013**, *45*, 93–98.
35. Hu, Y.; Schmidhalter, U. Drought and Salinity: A Comparison of Their Effects on Mineral Nutrition of Plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **2005**, *168*, 541–549. [CrossRef]
36. Bagherikia, S.; Pahlevani, M.; Yamchi, A.; Zaynalinezhad, K.; Mostafaie, A. Transcript Profiling of Genes Encoding Fructan and Sucrose Metabolism in Wheat Under Terminal Drought Stress. *J. Plant Growth Regul.* **2019**, *38*, 148–163. [CrossRef]
37. Durand, M.; Porcheron, B.; Hennion, N.; Maurousset, L.; Lemoine, R.; Pourtau, N. Water Deficit Enhances C Export to the Roots in *Arabidopsis Thaliana* Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots. *Plant Physiol.* **2016**, *170*, 1460–1479. [CrossRef]
38. Hou, J.; Huang, X.; Sun, W.; Du, C.; Wang, C.; Xie, Y.; Ma, Y.; Ma, D. Accumulation of Water-Soluble Carbohydrates and Gene Expression in Wheat Stems Correlates with Drought Resistance. *J. Plant Physiol.* **2018**, *231*, 182–191. [CrossRef]
39. Fàbregas, N.; Fernie, A.R. The Metabolic Response to Drought. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 1077–1085. [CrossRef] [PubMed]
40. Michaletti, A.; Naghavi, M.R.; Toorchi, M.; Zolla, L.; Rinalducci, S. Metabolomics and Proteomics Reveal Drought-Stress Responses of Leaf Tissues from Spring-Wheat. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5710. [CrossRef]
41. Liu, C.; Zhang, X.; Zhang, K.; An, H.; Hu, K.; Wen, J.; Shen, J.; Ma, C.; Yi, B.; Tu, J.; et al. Comparative Analysis of the *Brassica napus* Root and Leaf Transcript Profiling in Response to Drought Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18752–18777. [CrossRef] [PubMed]

42. Rasheed, S.; Bashir, K.; Matsui, A.; Tanaka, M.; Seki, M. Transcriptomic Analysis of Soil-Grown *Arabidopsis Thaliana* Roots and Shoots in Response to a Drought Stress. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 180. [CrossRef] [PubMed]
43. Zhang, J.; Mason, A.S.; Wu, J.; Liu, S.; Zhang, X.; Luo, T.; Redden, R.; Batley, J.; Hu, L.; Yan, G. Identification of Putative Candidate Genes for Water Stress Tolerance in Canola (*Brassica napus*). *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 1058. [CrossRef] [PubMed]
44. Yong, H.-Y.; Zou, Z.; Kok, E.-P.; Kwan, B.-H.; Chow, K.; Nasu, S.; Nanzyo, M.; Kitashiba, H.; Nishio, T. Comparative Transcriptome Analysis of Leaves and Roots in Response to Sudden Increase in Salinity in *Brassica napus* by RNA-Seq. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, e467395. [CrossRef] [PubMed]
45. Wang, P.; Yang, C.; Chen, H.; Song, C.; Zhang, X.; Wang, D. Transcriptomic Basis for Drought-Resistance in *Brassica napus* L. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40532. [CrossRef] [PubMed]
46. Gargallo-Garriga, A.; Sardans, J.; Pérez-Trujillo, M.; Rivas-Ubach, A.; Oravec, M.; Vecerova, K.; Urban, O.; Jentsch, A.; Kreyling, J.; Beierkuhnlein, C.; et al. Opposite Metabolic Responses of Shoots and Roots to Drought. *Sci. Rep.* **2015**, *4*, 6829. [CrossRef] [PubMed]
47. Mohammadi, P.P.; Moieni, A.; Komatsu, S. Comparative Proteome Analysis of Drought-Sensitive and Drought-Tolerant Rapeseed Roots and Their Hybrid F1 Line under Drought Stress. *Amino Acids* **2012**, *43*, 2137–2152. [CrossRef] [PubMed]
48. Li, Y.; Zhang, L.; Hu, S.; Zhang, J.; Wang, L.; Ping, X.; Wang, J.; Li, J.; Lu, K.; Tang, Z.; et al. Transcriptome and Proteome Analyses of the Molecular Mechanisms Underlying Changes in Oil Storage under Drought Stress in *Brassica napus* L. *GCB Bioenergy* **2021**, *13*, 1071–1086. [CrossRef]
49. Waraich, E.A.; Ahmad, R.; Ashraf, M.Y. Role of Mineral Nutrition in Alleviation of Drought Stress in Plants. *Aust. J. Crop Sci.* **2011**, *5*, 764.
50. 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*, 385. [CrossRef]
51. Forieri, I.; Wirtz, M.; Hell, R. Toward New Perspectives on the Interaction of Iron and Sulfur Metabolism in Plants. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 357. [CrossRef]
52. Gupta, S.; Yadav, B.S.; Raj, U.; Freilich, S.; Varadwaj, P.K. Transcriptomic Analysis of Soil Grown T. Aestivum Cv. Root to Reveal the Changes in Expression of Genes in Response to Multiple Nutrients Deficiency. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1025. [CrossRef] [PubMed]
53. 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. [CrossRef]
54. White, P.J.; Bowen, H.C.; Parmaguru, P.; Fritz, M.; Spracklen, W.P.; Spiby, R.E.; Meacham, M.C.; Mead, A.; Harriman, M.; Trueman, L.J.; et al. Interactions between Selenium and Sulphur Nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 1927–1937. [CrossRef]
55. Salt, D.E.; Baxter, I.; Lahner, B. Ionomics and the Study of the Plant Ionome. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 709–733. [CrossRef] [PubMed]
56. 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] [PubMed]
57. Stich, B.; Benke, A.; Schmidt, M.; Urbany, C.; Shi, R.; von Wirén, N. The Maize Shoot Ionome: Its Interaction Partners, Predictive Power, and Genetic Determinants. *Plant Cell Environ.* **2020**, *43*, 2095–2111. [CrossRef]
58. Cao, Y.; Ye, S.; Yao, X. Leaf Ionome to Predict the Physiological Status of Nitrogen, Phosphorus, and Potassium in *Camellia oleifera*. *Pak. J. Bot* **2019**, *51*, 1349–1355. [CrossRef]
59. Campos, A.C.A.; Kruijer, W.; Alexander, R.; Akkers, R.C.; Danku, J.; Salt, D.E.; Aarts, M.G. Natural Variation in *Arabidopsis Thaliana* Reveals Shoot Ionome, Biomass, and Gene Expression Changes as Biomarkers for Zinc Deficiency Tolerance. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 3643–3656. [CrossRef]
60. Pii, Y.; Cesco, S.; Mimmo, T. Shoot Ionome to Predict the Synergism and Antagonism between Nutrients as Affected by Substrate and Physiological Status. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, *94*, 48–56. [CrossRef]
61. 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*, 79. [CrossRef]
62. Acosta-Gamboa, L.M.; Liu, S.; Langley, E.; Campbell, Z.; Castro-Guerrero, N.; Mendoza-Cozatl, D.; Lorence, A. Moderate to Severe Water Limitation Differentially Affects the Phenome and Ionome of Arabidopsis. *Funct. Plant Biol.* **2017**, *44*, 94. [CrossRef]
63. Sánchez-Rodríguez, E.; del Mar Rubio-Wilhelmi, M.; Cervilla, L.M.; Blasco, B.; Rios, J.J.; Leyva, R.; Romero, L.; Ruiz, J.M. Study of the Ionome and Uptake Fluxes in Cherry Tomato Plants under Moderate Water Stress Conditions. *Plant Soil* **2010**, *335*, 339–347. [CrossRef]
64. Fischer, S.; Hilger, T.; Piepho, H.-P.; Jordan, I.; Cadisch, G. Do We Need More Drought for Better Nutrition? The Effect of Precipitation on Nutrient Concentration in East African Food Crops. *Sci. Total Environ.* **2019**, *658*, 405–415. [CrossRef]

65. D'Oria, A.; Courbet, G.; Billiot, B.; Jing, L.; Pluchon, S.; Arkoun, M.; Paysant-Le Roux, C.; Trouverie, J.; Etienne, P.; Diquélou, S.; et al. Drought Specifically Downregulates Mineral Nutrition: Plant Ionomic Content and Associated Gene Expression. *Plant Direct* **2022**. submitted.
66. Whitt, L.; Ricachenevsky, F.K.; Ziegler, G.Z.; Clemens, S.; Walker, E.; Maathuis, F.J.M.; Kear, P.; Baxter, I. A Curated List of Genes That Affect the Plant Ionome. *Plant Direct* **2020**, *4*, e00272. [CrossRef]
67. 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]
68. Grant, C.A.; Bailey, L.D. Fertility Management in Canola Production. *Can. J. Plant Sci.* **1993**, *73*, 651–670. [CrossRef]
69. 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]
70. Girondé, A.; Dubousset, L.; Trouverie, J.; Etienne, P.; Avice, J.-C. 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.* **2014**, *5*, 695. [CrossRef]
71. Rathke, G.-W.; Christen, O.; Diepenbrock, W. Effects of Nitrogen Source and Rate on Productivity and Quality of Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Grown in Different Crop Rotations. *Field Crops Res.* **2005**, *94*, 103–113. [CrossRef]
72. Magno Massuia de Almeida, L.; Avice, J.-C.; Morvan-Bertrand, A.; Wagner, M.-H.; González-Centeno, M.R.; Teissedre, P.-L.; Bessoule, J.-J.; Le Guédard, M.; Kim, T.H.; Mollier, A.; et al. High Temperature Patterns at the Onset of Seed Maturation Determine Seed Yield and Quality in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) in Relation to Sulphur Nutrition. *Environ. Exp. Bot.* **2021**, *185*, 104400. [CrossRef]
73. Baux, A.; Colbach, N.; Allirand, J.M.; Jullien, A.; Ney, B.; Pellet, D. Insights into Temperature Effects on the Fatty Acid Composition of Oilseed Rape Varieties. *Eur. J. Agron.* **2013**, *49*, 12–19. [CrossRef]
74. Loladze, I. Hidden Shift of the Ionome of Plants Exposed to Elevated CO2 Depletes Minerals at the Base of Human Nutrition. *eLife* **2014**, *3*, e02245. [CrossRef] [PubMed]
75. Bouchereau, A.; Clossais-Besnard, N.; Bensaoud, A.; Leport, L.; Renard, M. Water Stress Effects on Rapeseed Quality. *Eur. J. Agron.* **1996**, *5*, 19–30. [CrossRef]
76. He, M.; Dijkstra, F.A. Drought Effect on Plant Nitrogen and Phosphorus: A Meta-Analysis. *New Phytol.* **2014**, *204*, 924–931. [CrossRef]
77. Cakmak, I. The Role of Potassium in Alleviating Detrimental Effects of Abiotic Stresses in Plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2005**, *168*, 521–530. [CrossRef]
78. Wang, M.; Zheng, Q.; Shen, Q.; Guo, S. The Critical Role of Potassium in Plant Stress Response. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 7370–7390. [CrossRef]
79. Erel, R.; Ben-Gal, A.; Dag, A.; Schwartz, A.; Yermiyahu, U. Sodium Replacement of Potassium in Physiological Processes of Olive Trees (Var. Barnea) as Affected by Drought. *Tree Physiol.* **2014**, *34*, 1102–1117. [CrossRef]
80. Malvi, U.R. Interaction of Micronutrients with Major Nutrients with Special Reference to Potassium. *Karnataka J. Agric. Sci.* **2011**, *24*, 1102–1117.
81. Etienne, P.; Diquelou, S.; Prudent, M.; Salon, C.; Maillard, A.; Ourry, A. Macro and Micronutrient Storage in Plants and Their Remobilization When Facing Scarcity: The Case of Drought. *Agriculture* **2018**, *8*, 14. [CrossRef]
82. Baxter, I.; Muthukumar, B.; Park, H.C.; Buchner, P.; Lahner, B.; Danku, J.; Zhao, K.; Lee, J.; Hawkesford, M.J.; Guerinot, M.L. Variation in Molybdenum Content across Broadly Distributed Populations of *Arabidopsis thaliana* Is Controlled by a Mitochondrial Molybdenum Transporter (MOT1). *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000004. [CrossRef] [PubMed]
83. Tejada-Jiménez, M.; Llamas, Á.; Sanz-Luque, E.; Galván, A.; Fernández, E. A High-Affinity Molybdate Transporter in Eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20126–20130. [CrossRef]
84. Puig, S.; Andrés-Colás, N.; García-Molina, A.; Peñarrubia, L. Copper and Iron Homeostasis in Arabidopsis: Responses to Metal Deficiencies, Interactions and Biotechnological Applications. *Plant Cell Environ.* **2007**, *30*, 271–290. [CrossRef]
85. Cailliatte, R.; Schikora, A.; Briat, J.-F.; Mari, S.; Curie, C. High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for Arabidopsis Growth in Low Manganese Conditions. *Plant Cell* **2010**, *22*, 904–917. [CrossRef]
86. Kobayashi, T.; Itai, R.N.; Ogo, Y.; Kakei, Y.; Nakanishi, H.; Takahashi, M.; Nishizawa, N.K. The Rice Transcription Factor IDEF1 Is Essential for the Early Response to Iron Deficiency, and Induces Vegetative Expression of Late Embryogenesis Abundant Genes. *Plant J.* **2009**, *60*, 948–961. [CrossRef]
87. Lei, G.J.; Zhu, X.F.; Wang, Z.W.; Dong, F.; Dong, N.Y.; Zheng, S.J. Abscisic Acid Alleviates Iron Deficiency by Promoting Root Iron Reutilization and Transport from Root to Shoot in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* **2014**, *37*, 852–863. [CrossRef] [PubMed]
88. Dugasa, M.T.; Feng, X.; Wang, N.-H.; Wang, J.; Wu, F. Comparative Transcriptome and Tolerance Mechanism Analysis in the Two Contrasting Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars in Response to Drought and Salinity Stresses. *Plant Growth Regul.* **2021**, *94*, 101–114. [CrossRef]
89. Chen, Y.; Li, C.; Yi, J.; Yang, Y.; Lei, C.; Gong, M. Transcriptome Response to Drought, Rehydration and Re-Dehydration in Potato. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 159. [CrossRef]

90. Gong, L.; Zhang, H.; Gan, X.; Zhang, L.; Chen, Y.; Nie, F.; Shi, L.; Li, M.; Guo, Z.; Zhang, G.; et al. Transcriptome Profiling of the Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Plant under Drought Stress and Water-Stimulus Conditions. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128041. [CrossRef]
91. Mar, C. Transcriptomic Response to Water Deficit Reveals a Crucial Role of Phosphate Acquisition in a Drought-Tolerant Common Bean Landrace. *Plants* **2020**, *9*, 445.
92. Padmalatha, K.V.; Dhandapani, G.; Kanakachari, M.; Kumar, S.; Dass, A.; Patil, D.P.; Rajamani, V.; Kumar, K.; Pathak, R.; Rawat, B.; et al. Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Cotton under Drought Stress Reveal Significant down-Regulation of Genes and Pathways Involved in Fibre Elongation and up-Regulation of Defense Responsive Genes. *Plant Mol. Biol.* **2012**, *78*, 223–246. [CrossRef] [PubMed]
93. Ranjan, A.; Pandey, N.; Lakhwani, D.; Dubey, N.K.; Pathre, U.V.; Sawant, S.V. Comparative Transcriptomic Analysis of Roots of Contrasting *Gossypium Herbaceum* Genotypes Revealing Adaptation to Drought. *BMC Genom.* **2012**, *13*, 680. [CrossRef] [PubMed]
94. Iovieno, P.; Punzo, P.; Guida, G.; Mistretta, C.; Van Oosten, M.J.; Nurcato, R.; Bostan, H.; Colantuono, C.; Costa, A.; Bagnaresi, P.; et al. Transcriptomic Changes Drive Physiological Responses to Progressive Drought Stress and Rehydration in Tomato. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 371. [CrossRef]
95. Duncan, O.; Trösch, J.; Fenske, R.; Taylor, N.L.; Millar, A.H. Resource: Mapping the *Triticum aestivum* Proteome. *Plant J.* **2017**, *89*, 601–616. [CrossRef] [PubMed]
96. Verslues, P.E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J.; Zhu, J.-K. Methods and Concepts in Quantifying Resistance to Drought, Salt and Freezing, Abiotic Stresses That Affect Plant Water Status. *Plant J.* **2006**, *45*, 523–539. [CrossRef] [PubMed]
97. Bhaskara, G.B.; Yang, T.-H.; Verslues, P.E. Dynamic Proline Metabolism: Importance and Regulation in Water Limited Environments. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 484. [CrossRef]
98. Szabados, L.; Savouré, A. Proline: A Multifunctional Amino Acid. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 89–97. [CrossRef]
99. Zhang, J.; Jia, W.; Yang, J.; Ismail, A.M. Role of ABA in Integrating Plant Responses to Drought and Salt Stresses. *Field Crops Res.* **2006**, *97*, 111–119. [CrossRef]
100. Liu, H.; Ren, X.; Zhu, J.; Wu, X.; Liang, C. Effect of Exogenous Abscisic Acid on Morphology, Growth and Nutrient Uptake of Rice (*Oryza sativa*) Roots under Simulated Acid Rain Stress. *Planta* **2018**, *248*, 647–659. [CrossRef]
101. 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]
102. 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]
103. 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]
104. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef] [PubMed]
105. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [CrossRef] [PubMed]
106. Kopylova, E.; Noé, L.; Touzet, H. SortMeRNA: Fast and Accurate Filtering of Ribosomal RNAs in Metatranscriptomic Data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 3211–3217. [CrossRef] [PubMed]
107. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [CrossRef]
108. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139–140. [CrossRef]
109. 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. *Brief. Bioinform.* **2018**, *19*, 65–76. [CrossRef]
110. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Methodol.)* **1995**, *57*, 289–300. [CrossRef]
111. 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]
112. Supek, F.; Bošnjak, M.; Škunca, N.; Šmuc, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21800. [CrossRef]
113. Usadel, B.; Poree, F.; Nagel, A.; Lohse, M.; Czedik-Eysenberg, A.; Stitt, M. A Guide to Using MapMan to Visualize and Compare Omics Data in Plants: A Case Study in the Crop Species, Maize. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32*, 1211–1229. [CrossRef] [PubMed]
114. Thimm, O.; Bläsing, O.; Gibon, Y.; Nagel, A.; Meyer, S.; Krüger, P.; Selbig, J.; Müller, L.A.; Rhee, S.Y.; Stitt, M. Mapman: A User-Driven Tool to Display Genomics Data Sets onto Diagrams of Metabolic Pathways and Other Biological Processes. *Plant J.* **2004**, *37*, 914–939. [CrossRef]

115. Hawkins, C.; Ginzburg, D.; Zhao, K.; Dwyer, W.; Xue, B.; Xu, A.; Rice, S.; Cole, B.; Paley, S.; Karp, P.; et al. Plant Metabolic Network 15: A Resource of Genome-Wide Metabolism Databases for 126 Plants and Algae. *J. Integr. Plant Biol.* **2021**, *63*, 1888–1905. [CrossRef] [PubMed]
116. Schläpfer, P.; Zhang, P.; Wang, C.; Kim, T.; Banf, M.; Chae, L.; Dreher, K.; Chavali, A.K.; Nilo-Poyanco, R.; Bernard, T.; et al. Genome-Wide Prediction of Metabolic Enzymes, Pathways, and Gene Clusters in Plants. *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 2041–2059. [CrossRef] [PubMed]
117. Tsugawa, H.; Cajka, T.; Kind, T.; Ma, Y.; Higgins, B.; Ikeda, K.; Kanazawa, M.; VanderGheynst, J.; Fiehn, O.; Arita, M. MS-DIAL: Data-Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis. *Nat Methods* **2015**, *12*, 523–526. [CrossRef] [PubMed]
118. van den Berg, R.A.; Hoefsloot, H.C.; Westerhuis, J.A.; Smilde, A.K.; van der Werf, M.J. Centering, Scaling, and Transformations: Improving the Biological Information Content of Metabolomics Data. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 142. [CrossRef]
119. Eriksson, L. *Introduction to Multi-and Megavariate Data Analysis Using Projection Methods (PCA & PLS)*; Umetrics AB: Umeä, Sweden, 1999.
120. Trygg, J.; Wold, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* **2002**, *16*, 119–128. [CrossRef]
121. Pang, Z.; Chong, J.; Zhou, G.; de Lima Morais, D.A.; Chang, L.; Barrette, M.; Gauthier, C.; Jacques, P.-É.; Li, S.; Xia, J. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the Gap between Raw Spectra and Functional Insights. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W388–W396. [CrossRef]
122. Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Sato, Y.; Morishima, K. KEGG: New Perspectives on Genomes, Pathways, Diseases and Drugs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D353–D361. [CrossRef] [PubMed]
123. Troll, W.; Lindsley, J. A Photometric Method for the Determination of Proline. *J. Biol. Chem.* **1955**, *215*, 655–660. [CrossRef]

Chapitre VI

-

Discussion générale et perspectives

I. Principaux résultats et discussion générale

Dans un contexte global associant l'occurrence accrue de contraintes abiotiques, résultant en partie de perturbations climatiques, et la nécessité de maintenir la qualité des produits récoltés, les objectifs de ce travail de thèse visaient donc principalement à améliorer la compréhension des réponses du colza et du blé à une nutrition minérale contrainte et des effets du manque d'eau sur la nutrition minérale de ces espèces de grandes cultures. A ces fins, l'étude du ionome fonctionnel, correspondant à la quantification simultanée de 20 éléments au sein des différents tissus de la plante, s'est révélée être un outil pertinent tant dans l'évaluation des effets du stress hydrique ou de carences minérales sur l'absorption des éléments, que dans la mise en évidence de mécanismes de régulations précoces impliquant des transporteurs d'ions.

Dès lors, une première étude menée sur deux espèces végétales contrastées (*Brassica napus* et *Triticum aestivum)*, notamment sur le plan des mécanismes d'absorption des éléments minéraux, soumises à 18 carences nutritionnelles uniques en système hydroponique, a dans un premier temps été réalisée (**Chapitre III**). Cette étude visait à mettre en évidence toutes les interactions potentielles entre les éléments minéraux et à quantifier leurs impacts sur la teneur de l'ensemble des éléments au sein des parties aériennes et racinaires de la plante. Cette approche a ensuite permis, comme le suggérait la littérature, l'identification de signatures ionomiques spécifiques de carences, confirmant l'opportunité de l'usage du ionome en tant qu'outil permettant une détection précoce et spécifique d'une carence minérale.

Dans un second temps, une seconde étude menée sur ces deux mêmes espèces a permis d'évaluer les effets graduels de l'application d'un déficit hydrique grâce, notamment, à l'usage de la plateforme de phénotypage du Centre Mondial de l'Innovation du groupe Roullier, qui procure l'avantage d'un pilotage fin de la contrainte hydrique appliquée aux plantes cultivées sur sol tout en permettant leur suivi en temps réel. Outre la mise en évidence des modifications du ionome et de l'absorption des éléments induites par le stress hydrique chez le colza, cette étude a été complétée par l'apport de données transcriptomiques et métabolomiques. Ensemble, ces résultats suggèrent des pistes de recherche tournées vers la compréhension de la régulation des mécanismes impliqués dans l'absorption des éléments lors d'un stress hydrique, permettant d'expliquer notamment la précocité et la chronologie des phénomènes observés.

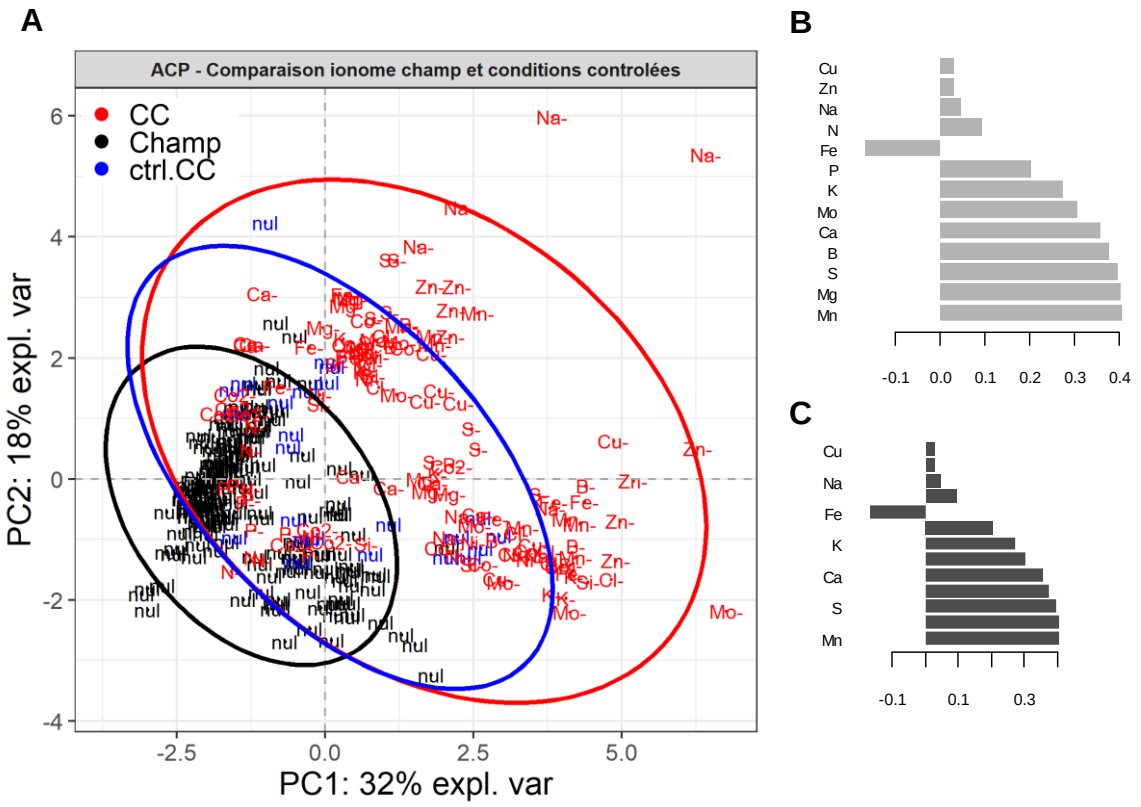


Figure VI-1. Analyse en composantes principales (ACP) de la composition élémentaire d'échantillons de feuilles de colza issus d'expérimentations au champ et en conditions contrôlées en hydroponie (CC). Représentation de la répartition des individus (**A**) et variables contribuant le plus à leur discrimination sur la composante 1 (PC1) (**B**) et composante 2 (PC2) (**C**). L'analyse a été effectuée en utilisant les teneurs en N, Mg, P, S, K, Ca, B, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo et Na de feuilles récoltées au champ (Sarda *et al.* 2013; Maillard *et al*. 2016b) et en condition contrôlées (CC) en système de culture hydroponique (Maillard et *al.* 2015). Chaque individu est étiqueté selon la condition de traitement effectuée : aucun ("nul") ou carencé en un élément (élément suivis du suffixe "–"). Ellipses correspondante à un intervalle de confiance de 95%.

1. Etude du ionome lors de carences nutritionnelles : mise en évidence d'interactions connues ou nouvelles permettant un diagnostic précoce du statut nutritionnel de la plante

a. Quelques réflexions sur la méthodologie employée

Dans la continuité des travaux précédemment réalisés au sein de l'UMR EVA révélant le potentiel de l'étude du ionome afin d'identifier des interactions nutritionnelles intervenant lors de l'absorption des éléments (Maillard *et al.*, 2016*a*) et de leur remobilisation (Maillard *et al.*, 2015) en cas de carence, les travaux effectués lors de cette thèse avaient pour but de préciser et d'approfondir ces études, notamment via une réflexion autour de deux volets distincts de la méthodologie employée.

Le premier volet méthodologique concernait la remise en cause de la composition de la solution nutritive de Hoagland (Hoagland et Arnon, 1950) classiquement utilisée par de très nombreuses équipes de recherche lors de cultures hydroponiques. En effet, si cette solution nutritive permet une croissance optimale de la plante, une étude comparative du ionome d'échantillons de feuilles de colza issues de précédentes expérimentations au champ (Sarda *et al.*, 2013; Maillard *et al.*, 2016*b*) ou en conditions contrôlées en hydroponie (Maillard *et al.*, 2015), a révélé une importante variation du contenu élémentaire (**Figure VI-1**). Cette comparaison, volontairement large, visait à étudier de façon globale, la variabilité de la teneur des éléments du ionome fonctionnel au sein : i) d'échantillons de feuilles provenant de plantes cultivées sur de nombreuses parcelles comprenant des sols hétérogènes qui, malgré l'apport de fertilisation minérale, présentent donc des pools variables d'éléments bio disponibles (à même dans certains cas d'être à l'origine de carences) et ii) des échantillons issus de plantes cultivées en hydroponie dans des conditions optimales de croissance (solution Hoagland complète) ou de carences nutritionnelles. En effet, en condition de culture hydroponique optimale, les plantes sont confrontées à des apports pléthoriques, résultant d'une part de la concentration en sels minéraux de la solution nutritive mais aussi de la fréquence de son renouvellement, également à même d'influencer la composition du ionome. Cette comparaison ne visait en aucun cas à obtenir des teneurs en éléments rigoureusement identiques entre champ et conditions de cultures hydroponiques, mais d'établir l'ordre de grandeur des variations observées.

Cette analyse révèle ainsi d'importantes disparités des teneurs pour de nombreux éléments : la plupart des macroéléments (N, Mg, P, S, K et Ca) ainsi que certains microéléments tels que le B, le Cl, le Mn, le Mo et le Zn étaient plus élevées en conditions contrôlées, quand le Fe, le Ni, le Na, l'Al, le Si, le Co et le Se présentaient des teneurs inférieures à celles retrouvées au

Tableau VI-1. Comparaison des teneurs élémentaires d'échantillons de feuilles de colza issues d'expérimentation en champ et en conditions contrôlées. Les teneurs sont indiquées en ppm (partie par million) ± l'écart type (ET). Les ratios 1 et 2 indiquent respectivement les ratios des valeurs moyennes obtenues en hydroponie dans Maillard *et al.* (2015) et Courbet *et al.* 2021 - D'Oria *et al.* (2021) sur les valeurs moyennes au champ (field grown plants). L'abondance d'un élément par rapport au champ (rouge) ou sa faible teneur (bleu) en hydroponie est comparée et une indication de la correction, souhaitée ("expected correction") ainsi que de la correction obtenue ("résulting correction") sont indiquées dans les deux dernières colonnes ("=", pas de modification ; "↗", augmentation du ratio ; "↘", diminution du ratio)**.** Les concentrations des éléments de la solution nutritive employée dans le cadre des expérimentations de carences nutritionnelles au sein du projet EAUPTIC et dans Maillard *et al.* (2015) sont indiquées en µM.
Mean, moyenne ; n, effectif.

	Teneurs de plantes cultivées au champ d'après Sarda *et al.* (2013) et Maillard *et al.* (2016b)			Teneurs de plantes cultivées en hydroponie Maillard et *al.* (2015)			Teneurs de plantes cultivées en hydroponie dans cette étude								
	moyenne	ET	n=	moyenne	ET	n=	moyenne	ET	n=	ratio 1	ratio 2	Composition solution Maillard *et al.* (2015)	Composition solution dans cette étude	Correction attendue	Correction obtenue
N	24 059	± 8804	151	42 286	± 13315	166	43 374	± 10953	200	1.76	1.80	3754.2	3500	↘	=
Mg	1 274	± 580	194	3 761	± 2196	166	4 237	± 2407	200	2.95	3.33	500	400	↘	↗
P	2 830	± 978	194	4 354	± 2350	166	5 426	± 2172	200	1.54	1.92	250	200	↘	↗
S	6 228	± 3755	194	10 944	± 5403	166	14 895	± 5723	200	1.76	2.39	508.7	507	↘	↗
K	23 195	± 9042	194	30 797	± 10975	166	44 996	± 12391	200	1.33	1.94	1750	1500	↘	↗
Ca	33 569	± 19496	194	42 432	± 26961	166	34 792	± 20955	200	1.26	1.04	4500	2110	↘	↘
B	29	± 18	194	44	± 20	166	69	± 27	200	1.50	2.37	10	10	↘	↗
Cl	7 298	± 3520	41	10 301	± 5598	35	12 741	± 6162	200	1.41	1.75	2750.28	2001	↘	↗
Mn	64	± 44	194	186	± 104	166	150	± 77	200	2.91	2.36	5	3	↘	↘
Fe	652	± 708	192	103	± 46	166	121	± 42	200	0.16	0.19	400	100	↗	↗
Ni	1.4	± 1.6	191	0.26	± 0.11	30	0.9	± 1.16	200	0.18	0.62	0.04	0.15	↗	↗
Cu	3.7	± 1.8	194	4.0	± 3.1	166	6.9	± 6.1	200	1.09	1.87	0.7	0.7	=	↗
Zn	29	± 22	188	40	± 30	161	49	± 25	200	1.39	1.67	3	3	↘	↗
Mo	2.1	± 1.8	194	177	± 176	166	4.5	± 2.1	200	84.71	2.18	4.9	0.56	↘↘	↘↘
Na	1 055	± 1391	194	600	± 1240	166	1 391	± 1965	200	0.57	1.32	477.6	500	↗	↗
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	100	1100	↗	↗
Co	0.33	± 0.34	192	0.11	± 0.06	31	0.25	± 0.29	200	0.33	0.76	0.1	0.1	↗	↗
Se	0.14	± 0.14	194	0.05	± 0.03	32	0.90	± 0.34	200	0.34	6.55	0	0.01	↗	↗

champ (**Tableau VI-1**). Parmi les éléments les plus impactés, la teneur moyenne en Fe (divisée par 5) et en Mo (multipliée par 84) des feuilles de colza cultivé en hydroponie apparaissaient très éloignées de celles retrouvées au champ (**Tableau VI-1**). Avec la volonté d'obtenir une gamme de variation de la teneur de chaque élément plus proche de celle mesurée en condition de plein champ, un ajustement de la composition de la solution nutritive a donc été opéré (**Chapitre III et Tableau VI-1**). Cette modification s'est traduite par i) une réduction massive de l'apport de Mo (-89%) et de Ca (-53%) en solution, accompagné ii) d'une diminution de la concentration de l'ensemble des macroéléments (excepté S), du Cl, du Mn et du Fe et iii) d'un apport de Se et d'une augmentation importante de l'apport de Si. En résulte alors une nette amélioration du contenu des feuilles en Mo et également, mais dans une moindre mesure, des teneurs en Ca, Mn, Fe, Ni, Na ainsi que celles d'éléments bénéfiques dont il sera fait mention dans les lignes ci-dessous tels que Si, Al et Co (**Tableau VI-1)**. Concernant le Fe, des essais préliminaires ont également démontré qu'apporter cet élément uniquement sous la forme chélatée telle que le Na-Fe-EDTA, comme cela est le cas dans la solution de Hoagland, aboutissait à une teneur en Fe des plantes plus faible que l'association Na-Fe-EDTA / Na-Fe-EDDHA. Néanmoins, ces résultats mettent également en évidence des perspectives d'amélioration de la solution nutritive utilisée. De façon intéressante et quand bien même des pistes d'amélioration aient été explorées en termes de formes de Fe apportées en solution, ces résultats révèlent notamment une faible teneur en Fe des feuilles de colza alors que cet élément semble s'accumuler au niveau racinaire (**Chapitre III**). Des mécanismes contrôlant la translocation du Fe des racines aux parties aériennes et impliquant le niveau de subérisation des cellules endodermiques, restreignant l'accès d'éléments comme le Fe à la membrane plasmique ou à l'apoplasme racinaire ont été suggérés (Barberon *et al.*, 2016) et pourraient constituer des pistes d'explications, qu'il serait nécessaire d'approfondir. De façon non exhaustive, d'autres observations permettent d'identifier d'autres voies d'amélioration : c'est notamment le cas de l'explosion de la teneur en Se des feuilles après un apport de seulement 0,01µM en solution, démontrant toute la complexité d'élaborer une solution nutritive complète, afin notamment d'étudier le rôle des éléments bénéfiques comme le Se (Feng *et al.*, 2013; White, 2018) ; ou encore de l'effet d'une diminution de la concentration des macroéléments en solution aboutissant *in fine* à une augmentation globale de leur teneurs au sein des feuilles. Cette baisse de la concentration de la solution en macroéléments, n'est toutefois pas efficace compte tenu du renouvellement régulier des solutions nutritives (concentrations versus quantités). Cet aspect avait d'ailleurs déjà été envisagé par d'autres auteurs (Macduff *et al.*, 1993) qui proposaient un apport en macroéléments calculé à partir, soit du taux de croissance de la plante (nommé

"relative addition rate"), soit de l'absorption mesurée en temps réel à partir de la baisse de la concentration de la solution nutritive ("flowing nutrient solution").

Le second volet d'amélioration méthodologique résidait dans l'étude d'un plus grand nombre d'éléments et de carences. En effet, comme indiqué dans la synthèse bibliographique, la notion de ionome a progressivement évolué ces deux dernières décennies et le ionome fonctionnel est aujourd'hui défini par White *et al.* (2017) comme constitué de tous les éléments minéraux, qu'ils soient essentiels ou non à la vie. Cette définition, associée à l'émergence d'un nombre grandissant d'études démontrant les rôles d'éléments bénéfiques, notamment du Si (Chen *et al.*, 2011; Haddad *et al.*, 2018; Bukhari *et al.*, 2020; Saja-Garbarz *et al.*, 2021) ou encore du Se (Feng *et al.*, 2013; Nawaz *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2020; Ahmad *et al.*, 2021), ont abouti, en plus des éléments quantifiés et carences appliquées dans Maillard *et al.* (2016*a*), à une stratégie d'analyse comprenant également la quantification du Cl, Fe, Ni, Si, Al, V, Co et Se ainsi que l'application de six carences supplémentaires (–Cl, –Ni, –Na, –Si, –Co et –Se). Les carences en V et en Al, n'ont pu être appliquées car ces éléments ne sont pas apportés dans la solution nutritive, ils sont présents uniquement sous forme de traces présentes dans l'eau utilisée pour l'élaboration de celle-ci. La quantification de ces éléments fait appel à trois techniques d'analyses combinées et complémentaires : i) la spectrométrie de masse à ratio isotopique (IRMS) pour l'analyse du N, ii) la spectrométrie de masse haute résolution à couplage inductif avec une torche plasma (HR-ICP-MS) pour la majorité des éléments et enfin iii) la spectrométrie par fluorescence des rayons X (XRF), nouvelle technique d'analyse récemment développée au sein de PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) permettant la quantification des éléments dans des matrices végétales, notamment du Cl, du Si et de l'Al.

L'ensemble de ces éléments méthodologiques constituent alors une approche originale, basée sur la quantification des éléments présents en très faible quantité au sein des tissus végétaux et envisageant un éventail d'éléments plus large que celui utilisé par d'autres groupes de recherches internationaux, comme par exemple, les équipes de l'université Purdue (West Lafayette, Indiana, Etats-Unis) pionnière dans l'étude du ionome. En effet, les quantifications usuellement retrouvées dans la littérature reposent uniquement sur des analyses par ICP-MS ne fournissant aucune donnée sur : i) le N (élément volatil non quantifiable par ICP) ; ii) le Cl, non quantifiable par ICP-MS en raison des interférences de masse avec le gaz plasmogène et vecteur, l'argon ; iii) d'éléments présents à de faibles concentrations nécessitant une ICP-MS haute résolution comme le V (quantification développée plus récemment au sein de la plateforme PLATIN') ; et enfin iv) d'éléments comme l'Al ou le Si qui nécessitent, pour une quantification précise par

ICP-MS, une minéralisation préalable de l'échantillon avec de l'acide fluorhydrique (manipulation dangereuse) ce qui a motivé dans notre cas l'utilisation d'une technologie alternative : l'XRF.

Enfin, lors de cette expérimentation, un important dispositif de phénotypage a également été déployé, pour lequel une faible proportion des données a été utilisée dans le cadre de ce manuscrit. Ce dispositif de phénotypage avait notamment pour but :

i) **De permettre la quantification des éléments du ionome de manière non destructive** et de façon cinétique sur les tissus aériens via l'usage d'un appareil XRF portatif. Les résultats ont fait l'objet d'une comparaison quant à la qualité de la quantification obtenue avec celle des appareils nécessitant des infrastructures beaucoup plus lourdes tels que ceux de PLATIN'. La faible sensibilité de la technologie XRF portative rencontrée dans la quantification de certains éléments, notamment à cause de la teneur en eau du matériel végétal frais *in situ*, n'a pas conduit à retenir cette technique compte tenu de la faible précision des quantifications obtenues. Puisqu'elle est déployable au champ et non destructive, cette approche pourrait être développée, après des travaux supplémentaires de calibration intégrant la teneur en eau des feuilles, afin d'obtenir une quantification plus fine des éléments dont la teneur serait, compte tenu de la limite de détection actuelle de ces appareils, supérieure à quelques dizaines de ppm.

ii) **De détecter le statut précoce d'une carence nutritionnelle via l'étude des longueurs d'ondes du spectre réémis par les feuilles grâce un spectromètre de réflectance portatif**. Afin de contourner la faible sensibilité de la technologie XRF, il a été démontré dans la littérature qu'il est possible, notamment dans le proche infrarouge (NIRS), de corréler les spectres de réflectance avec de nombreux traits dont la teneur en éléments tels que le N (Vigneau *et al.*, 2011; Ecarnot *et al.*, 2013; Caporaso *et al.*, 2018). L'étude comparative des spectres de réflectance de feuilles de plantes soumises à différentes carences n'entrant pas dans le cadre *stricto sensu* de ce travail de thèse, les résultats ne sont donc pas rapportés dans ce manuscrit.

iii) **D'évaluer enfin, via l'usage d'un système portatif (Li-6800, Li-cor), les effets des carences appliquées sur les niveaux d'échanges gazeux, la conductance stomatique et le niveau d'activité photosynthétique**.

b. Principaux résultats

La composition ionomique est dépendante de l'espèce et du tissu considéré. Cette étude, menée sur des cultures hydroponiques de colza et de blé révèle qu'au stade végétatif, le colza se distingue par des teneurs en éléments globalement supérieures à celles retrouvées chez le blé et ce, pour l'ensemble des tissus étudiés (feuilles en cours de croissance (YLBs), feuilles matures déjà développées (OLBs), ainsi que les racines) (**Tableau I – Chapitre III**). Certains éléments du ionome reflètent particulièrement la différence de composition minérale observée chez ces deux espèces, c'est notamment le cas du S, du Ca, du B et du Si (**Tableau I – Chapitre III-a et Figure 7 – Chapitre III-b**). Les résultats obtenus démontrent, par exemple, au sein des feuilles matures de plantes témoin une teneur en B dix fois supérieure chez le colza (espèce chez laquelle il est majoritairement constitutif d'une molécule pariétale complexe, le Rhamnogalacturonane II) (O'Neill *et al.*, 2004) à celle du blé et, quel que soit le tissu considéré, des teneurs en S et en Ca plus de deux fois supérieures. Ces résultats sont corroborés par des travaux antérieurs : il a ainsi été démontré que les dicotylédones nécessitent plus de Ca (White and Broadley, 2003) et de B (Hu *et al.*, 1996) pour la composition de leur paroi cellulaire et les Brassicacées telles que le colza présentent, de façon plus spécifique encore, une concentration en S élevée en comparaison à d'autres espèces de grandes cultures (Holmes, 1980; Zhao *et al.*, 1993). A l'inverse, la plus faible concentration en Ca, B et S des Poacées a également été rapportée dans des travaux plus récents (Broadley *et al.*, 2004; Neugebauer *et al.*, 2018). Ces dernières en revanche, telles que le blé, le riz, l'orge ou le maïs, sont considérées comme des espèces accumulatrices de Si, élément qui participe à la rigidité des parties aériennes en permettant un renforcement de la paroi cellulaire, plus spécifiquement lors de stress biotique ou abiotique (Epstein, 1999; Marschner, 2012). Ainsi, il n'est pas surprenant d'observer dans cette étude une teneur en Si des feuilles matures de blé près de 30 fois supérieure à celle de colza.

Ces différences se traduisent également par un différentiel de répartition des éléments au sein des tissus d'une même plante (**Figure 2 – Chapitre III-a**). Chez le blé par exemple, le Si est majoritairement retrouvé dans les feuilles (≈90% de la quantité totale de Si) (**Figure 2 – Chapitre III-a**), alors qu'une importante proportion de Mg, Fe, Ni, Cu, Na ou encore de Co est retrouvée au niveau racinaire (>40% de la quantité totale contenue dans la plante entière), influençant donc largement leur teneur au sein des différents tissus (**Figure 4 et 5 – Chapitre III-a**). La translocation des éléments depuis les racines vers les parties aériennes est notamment sous le contrôle des cellules du cadre de Caspary de l'endoderme racinaire (Barberon *et al.*, 2016) et chez les monocotylédones, la présence d'une barrière plus sélective comportant

plusieurs couches de subérine (Ma *et al.*, 2011; Olsen and Palmgren, 2014) aurait pour conséquence la séquestration de certains éléments dans les racines de blé.

Parmi d'autres, ces exemples appuient donc l'existence de différences de composition élémentaire inter-espèces et d'une variabilité espèce dépendante de la répartition des éléments entre ses différents organes (**Figure 7 – Chapitre III-b**). Ces résultats ont ainsi guidé la stratégie d'analyse vers des jeux de données indépendants où le ionome de chaque tissu au sein de chaque espèce a été isolé afin d'éviter un bruit de fond, notamment lors de la détermination des signatures ionomiques, comme suggéré par Baxter *et al.* (2012).

La composition ionomique est spécifiquement modifiée par les carences minérales et permet d'en déduire des signatures caractéristiques résultant de multiples interactions entre éléments. En effet, cette étude avait pour objectif principal d'évaluer les impacts de 18 carences nutritionnelles sur le ionome des différents tissus étudiés et d'en dégager des marqueurs pertinents. Pour cela et afin de ne pas confondre les effets d'une réduction de croissance sur les teneurs en éléments, des carences uniques en macroéléments et microéléments/éléments bénéfiques ont été appliquées respectivement 10 et 22 jours, par suppression totale de l'apport de l'élément concerné dans la solution nutritive. Ces durées ont été déterminées à partir des travaux de Maillard *et al.* (2015) démontrant qu'après 11 jours, la carence en N était la première à engendrer une diminution significative de la biomasse, les carences en microéléments n'ayant pas limité la croissance avant 30 jours. La variation du contenu ionomique a ainsi été évaluée de façon précoce, avant toute modification de la biomasse des plantes carencées**.**

L'analyse des teneurs quantifiées a été, comme évoquée précédemment, effectuée de façon indépendante pour chaque tissu au sein de chaque espèce avec une approche multivariée *via* une analyse de type PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis). L'objectif de cette analyse PLS-DA était donc de prédire la carence des échantillons, sur la base d'un modèle de classification entraîné à partir des valeurs de teneurs (Rohart *et al.*, 2017) (**Figure 1 – Chapitre III-b**). Brièvement, ce schéma d'analyse consistait donc i) à entrainer un modèle à partir d'un échantillon aléatoire du jeu de données initiales (80% des individus) et comprenant pour chacun d'entre eux, les teneurs de chaque élément du ionome (X = variables quantitatives prédictives) associées à chaque condition de traitement, carencé ou témoin (Y = classe; variable qualitative) puis ii) à prédire la carence des 20% d'individus restants.

Dans un premier temps, cette approche a permis d'évaluer la pertinence des différents tissus récoltés et dans l'ensemble, il en ressort de très bons niveaux de prédiction des carences dans la plupart des tissus utilisés (égaux ou supérieurs à 90%). Néanmoins, la précision de prédiction apparait plus faible pour les racines de colza (82%) et pour les feuilles matures (OLBs) de blé (89%). **En raison de l'homogénéité et de la qualité des résultats obtenus chez les deux espèces (niveau de prédiction de 94%), ainsi que de leur facilité d'accès au champ comparativement aux racines, les feuilles dont la croissance s'est déroulée au cours de la carence (YLBs), apparaissent être le tissu le plus pertinent dans la détermination du statut nutritionnel** (**Tableau 1 – Chapitre III-b**). Suggérée par Baxter *et al.* (2008*b*), cette hypothèse consistant à utiliser les feuilles comme indicateur pertinent n'avait été établie qu'à partir de l'étude des variations du ionome sous deux contraintes nutritionnelles uniquement (Fe et P). Les résultats présentés ici s'appuient donc sur 16 autres carences nutritionnelles et permettent de préciser les préconisations en ciblant un tissu dont la croissance s'effectue au cours de la contrainte appliquée. En effet, le ionome foliaire peut être considéré comme la résultante de l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques se déroulant au sein des racines et des parties aériennes, comprenant entre autres, l'absorption des éléments, leur transport apoplastique et symplastique, leur translocation vasculaire en partie sous l'effet de la force motrice qu'est l'évapotranspiration, et leur éventuelle remobilisation depuis d'autres tissus. Ces résultats ont ainsi conduit à explorer plus particulièrement les phénomènes observés au sein de ce tissu.

Lors de l'analyse PLS-DA, consistant à prédire les carences à partir des teneurs des individus, s'est légitimement posée la question du poids de l'élément concerné par la carence dans la qualité de la prédiction obtenue. En effet les carences appliquées ont, au niveau de ces jeunes feuilles, majoritairement engendré une importante diminution de la teneur de l'élément carencé, faisant de cette teneur un marqueur potentiellement spécifique de chaque carence (**Figure 4 et 5 – Chapitre III-a et Figure 6 – Chapitre III-b**). Néanmoins les résultats obtenus démontrent que l'utilisation de la teneur de l'élément carencé seule ne permet pas de différencier les 18 carences examinées dans cette étude, les niveaux de prédiction étant alors beaucoup plus faibles (58% et 33% chez le colza et le blé respectivement, contre 94% lorsque l'intégralité du ionome mesuré est pris en compte) (**Tableau 1 – Chapitre III-b**). De façon plus large, l'utilisation des teneurs en macroéléments uniquement a également fourni des niveaux de prédictions bien inférieurs (29% chez les deux espèces) à ceux obtenus avec l'ensemble des éléments du ionome. Chez le colza, l'utilisation des teneurs en macroéléments s'est même révélée moins efficiente que l'utilisation de la seule teneur de l'élément carencé. Ces résultats soutiennent des précédents

travaux démontrant que parmi les macroéléments, le N et le P sont considérés comme des éléments relativement peu informatifs au sein du ionome (Parent *et al.*, 2013). **Ces résultats fournissent également une preuve supplémentaire que la prise en compte des microéléments et des éléments bénéfiques dans l'analyse permet d'accroitre l'identification de chaque carence appliquée** (Cao *et al.*, 2019) et soutiennent également l'utilisation du ionome fonctionnel, comprenant l'ensemble des éléments, essentiels ou non (White *et al.*, 2017).

Au sein des jeunes feuilles et sur la base de l'ensemble des teneurs (macroéléments, microélément et élément bénéfiques), **les variations du contenu élémentaire provoquées par chaque carence présentent une grande spécificité** (**Tableau 2 – Chapitre III-b**). En effet, chaque carence provoque des modifications du ionome des feuilles suffisamment spécifiques, pour permettre à un modèle entrainé de prédire la carence d'échantillons inconnus. Afin de valider ces résultats, un modèle PLS-DA a d'ailleurs été entrainé sur les données acquises au cours de cette expérimentation et utilisé pour prédire la carence d'échantillons issus de Maillard *et al.* (2016*a*). Dans la grande majorité des cas, les niveaux de prédictions observés sont restés élevés malgré une composition de la solution nutritive différente avec de potentielles répercutions sur la teneur des éléments, comme indiqué précédemment (**Figure VI-1**). Il est tout de même intéressant de constater que la faible teneur en Mo des individus carencés en cet élément dans cette étude, n'a pas permis de correctement identifier les individus carencés en Mo provenant de Maillard *et al.* (2016*a*) (**Tableau 2 – Chapitre III-b**) au sein desquels la teneur moyenne en Mo était bien plus élevée en raison de la solution employée lors de la phase précédent la privation. Cette approche démontre ainsi des limites, qu'il est important de notifier, notamment lorsque le contenu de certains éléments et plus particulièrement des microéléments est anormal, comme dans le cadre d'une pollution en éléments traces, situation à laquelle peuvent être assimilées les teneurs en Mo de Maillard *et al.* (2016*a*). Ces limites amènent notamment à se questionner sur la possibilité d'utiliser le ionome en tant qu'outil prédictif au champ, particulièrement si ce dernier est entrainé et/ou calibré sur des données issues d'expérimentations en hydroponie, puisque le ionome semble présenter de fortes disparités (**Figure VI-1**). Cette question nécessiterait d'être approfondie par des travaux supplémentaires, reposant sur l'utilisation d'une base de données d'entrainement plus large comprenant un très grand nombre d'individus, récoltés au champ et au sein d'essais multi-locaux afin de maximiser la variabilité des sols rencontrés et des ionomes foliaires résultants. Néanmoins, cette étude fait la preuve de concept de l'usage du ionome en tant qu'outil prédictif. Bien que le nombre

d'individus disponibles, particulièrement intra-classe, puisse également constituer une limite, cette dernière est intrinsèquement liée aux difficultés techniques et logistiques de réaliser simultanément une culture avec 18 carences.

Enfin, l'analyse PLS-DA a également permis de mettre en évidence les éléments contribuant le plus à discriminer les différentes carences appliquées (**Figure 8 – Chapitre III-b**). **Elle a ainsi permis de proposer des signatures ionomiques spécifiques des carences en N, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, Si et Se chez les deux espèces et également en Mg, Cl, Cu, et Mo chez le blé**. Bien que les niveaux de prédictions obtenus étaient également élevés pour les carences non citées (ex: -B, -Ni, -Mo), ces carences ne se détachaient pas, seules, de toutes les autres. Les éléments permettant de discriminer ces dernières présentaient de trop grandes similarités avec au moins une autre carence, pour pouvoir qualifier de "signature" le résultat obtenu. Ces effets ont été principalement constatés lors de très faibles variations des teneurs au sein des jeunes feuilles, c'est notamment le cas chez le colza lors de la carence en Mo, ou lors de trop grandes similarités des variations entre carences (**Figure 6 – Chapitre III-b**).

Ces signatures ionomiques sont le fruit d'un très grand nombre d'interactions entre éléments observées lors de l'application des carences, dont certaines ont été déjà décrites dans la littérature et détaillées dans la partie synthèse bibliographique. De façon non exhaustive, c'est par exemple le cas de la forte teneur en Na observée lors de la carence en K. Ces éléments sont tous deux absorbés par des transporteurs de cations non sélectifs tels que HKT1 ou LCT1 (Schachtman et Liu, 1999) et sont donc à l'origine d'une absorption massive de Na spécifique de la carence en K, qui est retrouvée au niveau de sa signature ionomique. C'est également le cas des interactions entre le S et le Mo, qui présentent, sous la forme anionique, des similitudes structurelles et entrent en compétition au niveau de transporteurs racinaires de sulfate tels que SULTR1.1 et SULTR1.2 (Schiavon *et al.*, 2012). Lors d'une carence en S, qui provoque une surexpression de ces transporteurs, l'absorption indirecte de Mo sous forme de molybdate engendre une importante élévation de sa teneur au sein des feuilles. Cette observation, qui a d'ailleurs fait l'objet de l'identification d'un indicateur du statut soufré du colza (Maillard *et al.*, 2016*b*) est là encore, retrouvée dans les signatures mises en évidence. Enfin, la signature établie pour la carence en Fe est similaire à celle identifiée par Salt *et al.*, (2008). Lors d'une carence en Fe et sous l'effet, au moins en partie, de la surexpression d'un transporteur de fer racinaire (IRT1, **Figure 5 – Chapitre III-b**), une accumulation spécifique de Zn, Co et Ni dans les feuilles correspond à une signature spécifique de l'état nutritionnel résultant d'une carence Fe. Selon Salt *et al.*, (2008), la teneur en Fe est finement régulée au sein des feuilles d'*Arabidopsis* et maintenue constante lors d'une carence, cet élément ne peut à lui seul permettre d'identifier

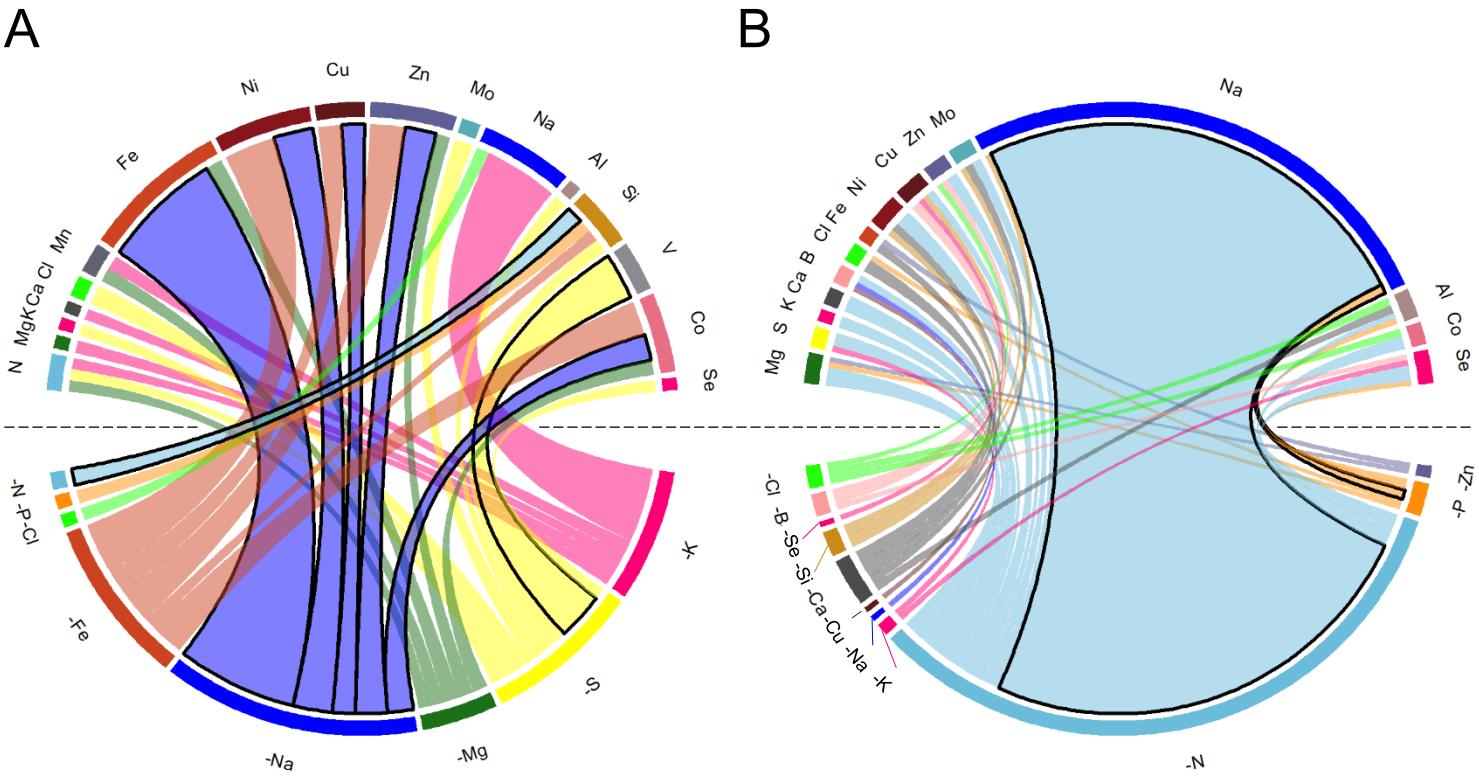


Figure VI-2. **Bilan des interactions nutritionnelles communes chez le colza et le blé lors de l'absorption des éléments en cas de carence**. La carence en un élément (partie inférieure) provoque l'augmentation (**A**) ou la diminution (**B**) de l'absorption des éléments situés dans la partie supérieure. La largeur des liens indiqués est proportionnelle à l'amplitude de l'interaction relevée chez le colza. Les liens présentant des bordures noires correspondent aux interactions mises en évidence au cours de ces travaux de thèse. Pour faciliter la lecture, l'effet d'une carence sur l'élément concerné n'est pas indiqué. Au total, 31 interactions positives et 40 interactions négatives ont été mises en évidence dont 8 n'avaient jamais été décrites dans la littérature à notre connaissance.

cette dernière au niveau foliaire. Cette constatation renforce l'intérêt de l'étude globale du ionome dans la détermination du statut nutritionnel et comme évoqué précédemment, la faible sensibilité de l'étude du seul élément carencé.

Finalement, les résultats obtenus ont également permis de mettre en évidence de nouvelles interactions non décrites dans la littérature et qui pourraient faire l'objet de recherches plus approfondies (**Figure VI-2**). C'est notamment le cas de l'interaction entre le N et le Na observée chez les deux espèces étudiées. L'arrêt presque total de l'absorption du Na observé lors de la carence en N (**Figure VI-2B**) suggère que le transport de Na pourrait être fonctionnellement lié à l'absorption de N, ce qui semble confirmé par des données extraites de la base de données Ionomic Hub contenant une analyse du ionome de lignées d'*Arabidospis* mutantes pour des transporteurs de nitrate (Salt et al., 2008). En effet, le transport actif secondaire du nitrate assuré notamment par NRT2.1, un transporteur de haute affinité fonctionnant comme un symporteur $NO_3^-/2H^+$, nécessite la présence d'un gradient électrochimique assuré par l'activité de pompes $H^{+/}$ATPase. Par conséquent, l'efflux secondaire de H^+ probablement couplé indirectement à un influx de Na^+ pourrait expliquer en partie la forte diminution de l'absorption de Na observée chez les plantes privées d'azote.

De la même manière, les plantes carencées en S démontrent une importante augmentation de l'absorption du V (6 et 2 fois plus élevée chez le colza et le blé respectivement) par rapport aux plantes témoins (**Figure VI-2A**). L'analyse de la concentration en V des feuilles de mutants KO d'Arabidopsis *sultr1.1* et *sultr1.2* soumis à une carence en S (**Figure 6 – Chapitre III-b**) suggère que ces transporteurs sont capables de contribuer à l'absorption du V probablement sous forme de vanadate, tout comme d'autres composés ayant des propriétés structurelles similaires tels que le Mo (molybdate) ou le Se (sélénate) déjà évoquées.

Une nouvelle interaction entre le Si et le N (une carence en N augmentant l'absorption du Si chez le blé et le colza, **Figure VI-2A**) a également été mise en évidence et soutient, indirectement, les récents travaux de Haddad *et al.* (2018) et Laîné *et al.* (2019) décrivant une augmentation de l'absorption du N sous l'effet un apport d'acide silicique chez le colza. Pour finir, il a également été constaté qu'une carence en Na, un élément bénéfique, conduit à une augmentation de l'absorption particulièrement élevée du Fe mais aussi du Zn, du Ni, du Cu et du Co (**Figure 4 – Chapitre III-b**). Il n'existe pas *a priori*, de connaissance qui permettraient d'y associer des mécanismes connus, mais la gamme des éléments affectés suggère un rôle potentiel direct ou indirect du Na sur l'expression ou la régulation du transport de ces éléments *via* IRT1.

En conclusion, ce travail démontre que la composition ionomique est spécifique du tissu et de l'espèce considérée. Bien qu'elle soit généralement considérée comme étroitement régulée, ces travaux suggèrent une grande plasticité de la composition du ionome lorsque les plantes sont exposées à une carence nutritionnelle. Ainsi la carence d'un élément, seule, est souvent à l'origine d'interactions entre les éléments minéraux, conduisant à des modifications spécifiques de la composition du ionome, majoritairement partagées par les deux espèces étudiées. De plus, ces résultats suggèrent également que les carences minérales peuvent être diagnostiquées de façon précoce grâce l'étude du ionome foliaire résultant de ces nombreuses interactions. Sur la base des éléments les plus contributifs dans la discrimination des carences étudiées, les signatures ionomiques identifiées au niveau de la feuille peuvent être étayées par des processus connus qui expliquent de telles variations et fournissent également des pistes d'exploration de nombreuses interactions encore méconnues.

2. Modification de la composition ionomique lors d'un stress hydrique

a. Quelques réflexions préalables sur la méthodologie employée

Lors de cette étude, des cultures de colza et de blé au stade végétatif ont été soumises à un déficit hydrique comportant deux phases : i) un arrêt complet de l'irrigation jusqu'à l'obtention d'une valeur cible du contenu en eau des pots, correspondant à 40% et 25% de la capacité au champ (CaC), puis ii) un maintien de ces niveaux pendant une dizaine de jours par arrosage automatisé (**Figure 1 – Chapitre IV et Figure 2 – Chapitre V**). Il existe de nombreuses méthodologies d'applications d'un stress hydrique décrites dans la littérature et dans le cadre de travaux sur la nutrition minérale, la méta-analyse de He and Dijkstra (2014) dresse le portrait type de 4 méthodologies usuellement employées à cette fin. L'étude présentée dans ce manuscrit combine ainsi plusieurs de ces approches en étudiant à la fois une phase de dessiccation, qui peut être qualifiée de stress modéré (40% CaC) ou sévère (25% Cac), ainsi que les effets d'une prolongation de leurs effets dans le temps. L'objectif de la première phase de cette approche expérimentale était de mettre en évidence les effets résultant de l'apparition progressive d'un manque d'eau chez la plante sur sa nutrition minérale, puis, avec la seconde, d'estimer si les modifications constatées étaient pérennes ou s'amplifiaient. L'approche envisagée dans cette étude a donc conduit à travailler sur sol en conditions contrôlées au sein de la plateforme de phénotypage haut débit (PPHD) du Centre Mondial de L'innovation (CMI) du Groupe Roullier, qui a permis un pilotage fin de la contrainte appliquée. Bien que comparable aux précédentes analyses effectuées lors de l'étude des carences nutritionnelles, l'utilisation du PEG (polyéthylène glycol) dans des conditions hydroponiques, très largement employé dans la

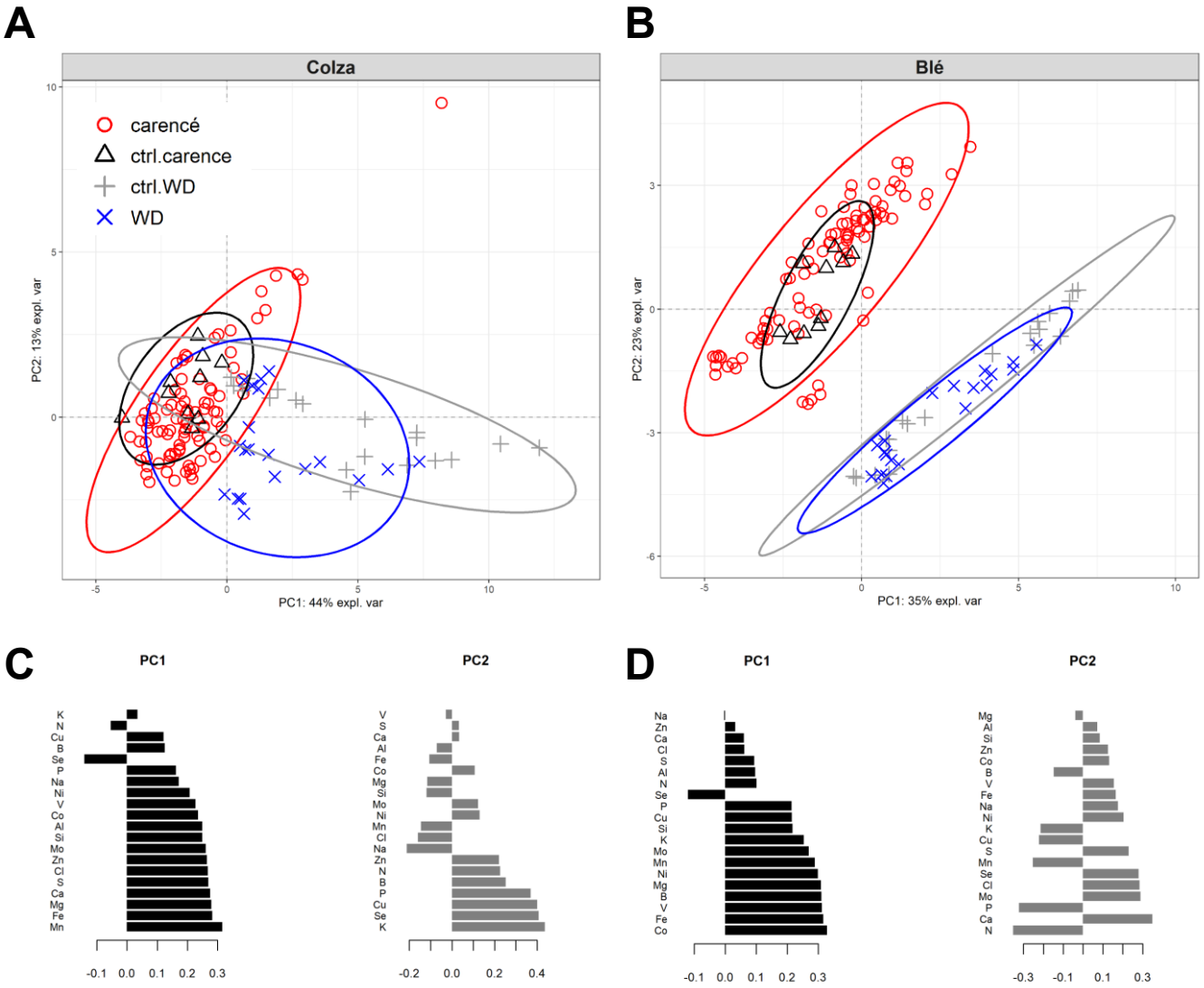


Figure VI-3. Analyse en composante principale (ACP) des teneurs élémentaires d'échantillons de feuilles de colza (A et C) et de blé (B et D) issus des expérimentations carences nutritionnelles et stress hydrique (WD) au sein du projet EAUPTIC. Tracé de la répartition des individus (**A et B**) et variables contribuant le plus à leur discrimination sur les composantes 1 (PC1) et 2 (PC2) (**C et D**). Les analyses ont été effectuées à partir des teneurs en N, Mg, P, S, K, Ca, B, Cl, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo, Na, Al, V, Si, Se et Co à partir d'échantillons de feuilles dont la croissance s'est déroulée au cours de la contrainte appliquée ou de plantes témoins (ctrl).

littérature (Meng *et al.*, 2016; Maillard *et al.*, 2018), présente d'importantes limites dans son usage au vu des objectifs visés dans cette étude et n'était pas en adéquation avec le cadre plus global du projet EAUPTIC dans lequel s'inscrit cette thèse, résolument tournée vers des solutions applicatives en conditions de plein champ. Ainsi, cette étude a été menée sur des plantes en pots, contenant un substrat développé à façon pour les équipes du CMI (Chapitre V – Supplementary Data 1), dans lequel toutefois, une solution nutritive contenant les éléments dans des proportions identiques à celles utilisées en condition hydroponique, a préalablement été apportée avant l'application du stress hydrique, afin de placer les plantes dans des conditions de nutrition minérale non limitantes (Chapitre V – Supplementary Data 2).

Il n'en subsiste pas moins que ce substrat constitue une réserve minérale, capable de restituer ou non le pool d'éléments disponibles et à l'instar des disparités observées lors de la comparaison des teneurs foliaires retrouvées au champ et en conditions hydroponiques (**Figure VI-1**), les teneurs des plantes témoins en pot présentaient également des différences notables avec celles cultivées en hydroponie (**Figure VI-3**). Ceci constitue ainsi une limite inhérente à la méthodologie employée en hydroponie, qui pourrait faire l'objet de travaux supplémentaires afin d'identifier les raisons pour lesquelles, dans des conditions en apparence optimales de croissance en termes d'apport de minéraux, les teneurs en éléments des feuilles des plantes cultivées présentent de telles variations. En effet, l'hypothèse selon laquelle une part des éléments présents dans le substrat utilisé serait adsorbée sur le complexe argilo-humique et/ou présents sous une forme non biodisponible pour la plante (équilibre red-ox, complexation…), n'explique pas pourquoi des éléments comme le Fe ou le Mn sont retrouvés en quantité supérieure à celle quantifiée au sein de plantes cultivées en système hydroponique, dont les racines sont pourtant en contact direct avec la solution nutritive et le pH tamponné de façon constante. Afin de corriger les effets liés aux conditions de culture, la pondération des teneurs mesurées au sein des individus stressés par celles mesurées au sein des individus témoins correspondant (ratio stressé / témoin) permet néanmoins d'observer une déviation relative du ionome en cas de carence ou de stress hydrique, comparable entre ces expérimentations.

Enfin, les effets du stress hydrique appliqué lors de cette étude ont été évalués grâce à un grand nombre de paramètres physiologiques usuellement employés dans la littérature (Tardieu, 2012) tels que : i) la concentration en phytohormones (ABA et SA), ii) le suivi des échanges gazeux instantanés (assimilation nette de CO_2 (A), la conductance stomatique (g_s), le taux d'évapotranspiration (E), l'efficience d'utilisation de l'eau (WUE)), iii) l'analyse du ratio isotopique du $\delta^{13}C$ considéré comme un indicateur intégratif et iv) des données issues

d'imagerie des plantes cultivées permettant d'estimer la surface foliaire, l'aire sous les feuilles (Convex hull area) dépendante du port de la plante et de leur degré de turgescence, ainsi qu'un indice colorimétrique (Excess Green Index) basé sur les longueurs d'ondes réémises par la plante dans le domaine visible.

b. Modifications ionomiques induites par une contrainte hydrique

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence une forte diminution de l'absorption des éléments lors de l'application d'un stress hydrique et ce, chez les deux espèces étudiées (**Figure 2 – Chapitre IV**). Dans l'ensemble, l'application d'un stress sévère ou prolongé, se traduit par une réduction de l'absorption, particulièrement exacerbée pour un groupe d'éléments comprenant le Fe, le Mo, le Zn et le Mn. Néanmoins, l'application d'un stress modéré court a également provoqué chez le blé, 5 jours seulement après l'arrêt de l'irrigation, une baisse pouvant atteindre 50% de l'absorption d'éléments tels que le Fe, le Mo, l'Al ou encore le V en comparaison aux plantes témoins maintenues à 80% de la capacité au champ. Des effets similaires ont été constatés chez le colza, lors d'un stress sévère ou modéré maintenu une dizaine de jours, se traduisant, là encore, par une réduction massive de l'absorption du Fe et du Mo (**Figure 2 – Chapitre IV**).

Cette chute de l'absorption racinaire des éléments a également engendré d'importantes variations des teneurs en éléments minéraux de l'ensemble des tissus étudiés (**Figure 3 – Chapitre IV),** particulièrement au sein des jeunes feuilles dont la croissance s'est déroulée lors du stress hydrique (YLBs). Lors d'un stress modéré court, ces variations se sont traduites par un maintien, voire une légère augmentation des teneurs foliaires, ce qui pourrait être attribué à une modification de la répartition des éléments, liée à une remobilisation, afin de soutenir la croissance des jeunes tissus (Maillard *et al.*, 2015; Etienne *et al.*, 2018). Avec l'augmentation de la sévérité ou de la durée du stress appliqué, les teneurs foliaires des éléments ont, dans l'ensemble, largement et durablement diminué. Cette modulation de la teneur en fonction de l'intensité du stress appliqué a également été relevée dans de récents travaux chez *Arabidopsis* (Acosta-Gamboa *et al.*, 2017), ainsi que chez le maïs (*Zea mays*) (Fischer *et al.*, 2019). Lors d'un stress modéré ou sévère de courte durée, ces effets sont, de plus, intervenus avant toute modification significative de la plupart des paramètres physiologiques mesurés chez le colza et dans une moindre mesure chez le blé (**Tableau 1 – Chapitre V**). Parmi ces derniers, les deux seuls capables de révéler de façon très précoce la présence d'un stress hydrique sont la teneur en ABA des jeunes feuilles, ainsi que l'Excess Green Index calculé à partir des données d'imageries. **Par conséquent, la modification de la**

composition ionomique est apparue être un phénomène précoce de la réponse des plantes à une contrainte hydrique.

Le rôle de l'ABA a été largement étudié et son accumulation précoce lors d'un stress hydrique est, chez de nombreuses espèces, à l'origine d'une fermeture des stomates et d'une réduction du flux transpiratoire (Qaderi *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2021). Si la concentration en ABA est effectivement apparue plus élevée au sein des feuilles de plantes stressées et ce de façon très précoce, peu de données mesurées relatives aux échanges gazeux permettent d'indiquer qu'elle a eu impact direct sur la conductance stomatique. **Par conséquent, la réduction de l'absorption racinaire et la modification des teneurs constatées ne peuvent être attribuées à la seule diminution du flux de masse**. Afin d'expliquer, d'un point de vue mécanistique cette chute brutale d'absorption, une analyse transcriptomique de l'expression de gènes en lien avec le transport des ions a donc été réalisée.

c. *Modifications de l'expression des gènes impliqués dans le transport des éléments, induites par une contrainte hydrique*

Pour de nombreuses raisons, cette analyse s'est focalisée sur une seule espèce, le colza, car : i) l'amplitude des variations de teneurs observée en réponse au stress hydrique apparaissait plus importante au sein de cette espèce, ii) la complexité accrue de comparaisons au sein de deux génomes différents, associée à une masse de données générée par l'aspect ionomique couplé à l'approche transcriptomique, aurait été difficile à appréhender et enfin iii) elle est une plante modèle étudiée au sein de l'UMR EVA depuis de nombreuses années et de ce fait permet de bénéficier d'un important recul. Cette analyse a donc été effectuée à partir des échantillons de jeunes feuilles, puisque l'étude menée sur les carences nutritionnelles a révélé le fort potentiel de ce tissu comme indicateur du statut nutritionnel de la plante. De plus, de bons niveaux de corrélation entre les teneurs au sein de ce tissu et le niveau d'absorption de chaque élément ont été relevés. L'utilisation des feuilles permet également une fiabilité accrue quant à la qualité de l'extraction ARN en comparaison aux racines, qui pour ces dernières, impliquerait de les extraire du sol et de les nettoyer abondamment, ce qui constitue des étapes chronophages qui peuvent par ailleurs impacter la qualité de l'ARN extrait. Enfin, dans la perspective de futurs transferts au champ, cette méthodologie employée se prêterait également bien mieux aux impératifs techniques qui y sont associés.

Sur un plan méthodologique, cette étude s'est alors basée sur une liste de gènes ayant un lien confirmé avec la fluctuation de la composition minérale, démontré dans la littérature grâce à l'utilisation de mutants *knock-out* ou surexpresseurs et récemment répertoriés par Whitt *et al.*

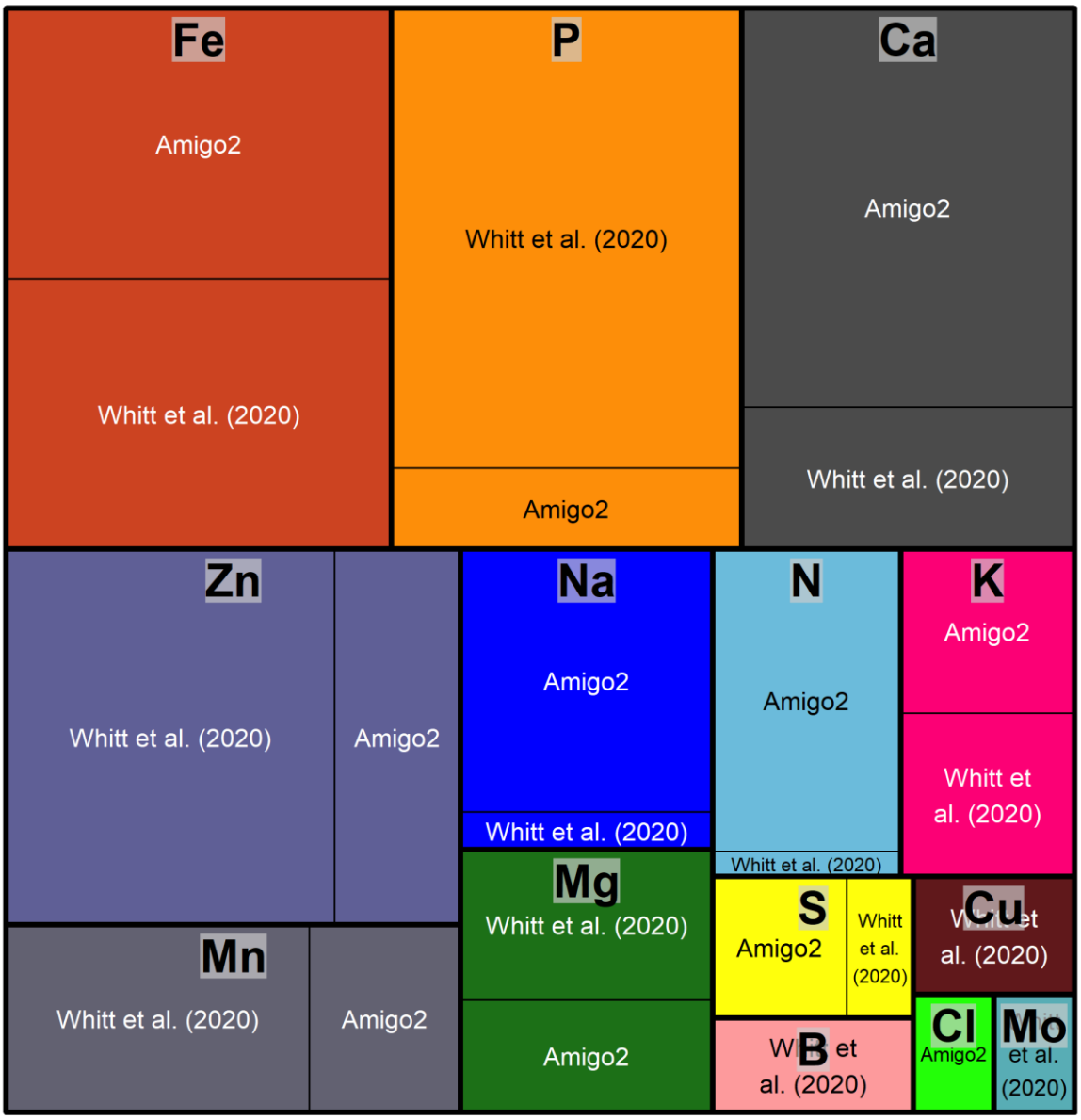


Figure VI-4. Répartition chez le colza du nombre de gènes foliaires différentiellement exprimés lors d'un stress hydrique, codant des transporteurs associés à chaque élément du ionome. Parmi les 114 DEG identifiés chez *Brassica napus*, 56 sont des orthologues des 21 gènes d'*Arabidopsis* appartenant à la liste de KIG de Whitt *et al.* (2020) et 58 sont issus de l'ajout effectué grâce à la Gene Ontology "ion transport" d'Amigo2.

(2020) sous la dénomination de KIG (Known Ionomic Genes). Les critères imposés pour qu'un gène puisse intégrer cette liste sont donc relativement stricts, la génération de mutants n'étant pas toujours possible. Selon ses auteurs, cette liste est donc limitée par les connaissances disponibles et par conséquent, possède actuellement une répartition inégale de gènes, majoritairement associés au Fe, au Zn, au Cu ou encore au Mn. De plus, dans nos conditions expérimentales, les orthologues de seulement 21 des 136 gènes d'*Arabidopsis* répertoriés par Whitt *et al.* (2020) étaient différentiellement exprimés chez *Brassica napus*. Afin d'élargir la liste des gènes étudiés, cette liste a donc été complémentée à l'aide de la base de données de la Gene Ontology "ion transport" (GO:0006811), comprenant 3018 gènes au moment de l'analyse. L'introduction de ces gènes a ainsi permis d'augmenter le nombre de gènes étudiés et permet d'obtenir, ici, une représentativité de chaque élément bien plus équilibrée dans le cadre particulier des gènes différentiellement exprimés lors d'un stress hydrique (**Figure VI-4**). L'intérêt de cet ajout de gènes est alors particulièrement significatif pour des éléments comme le Ca, le N, le Na, le S et le Cl (**Figure VI-4**). Cette liste étendue pourrait ainsi constituer un outil exploratoire au spectre plus large que celui offert par la liste de Whitt *et al.* (2020) dans le cadre de futures travaux.

Chez le colza, trois motifs d'expression de gènes associés au ionome ont donc été observés lors de l'application d'un stress hydrique : i) une augmentation de l'expression de l'ensemble des gènes associés au Cl et au Co ; ii) une diminution de l'expression des gènes associés à l'N, au P, au B, au Mo et au Ni (**Figure 6 – Chapitre V**) et enfin, iii) une régulation concomitante à la hausse et à la baisse de l'expression d'une combinaison de gènes associés au Mg, au S, au K, au Mn, au Fe, au Cu ou au Zn (**Figure 7 – Chapitre V**). Dans les deux derniers cas, la teneur des éléments concernés était pourtant négativement impactée par le stress hydrique, ce qui tend à démontrer que la réponse transcriptomique dans une situation de faible teneur provoquée par l'application d'un stress hydrique, n'aboutit pas systématiquement à une régulation globale conduisant à une augmentation de l'expression des gènes en lien avec le transport des éléments. L'hypothèse selon laquelle, l'importante baisse de teneurs foliaires pourrait être perçue par la plante comme une carence, engendrerait dans ce cas, une réponse au niveau transcriptomique qui devrait être comparable. En effet, il est généralement admis que l'expression des gènes codant pour les transporteurs d'ions, les enzymes d'assimilation et les facteurs de transcription ou de régulation, est généralement augmentée suite à une carence, ou inversement, diminuée en cas de nutrition optimale. C'est par exemple le cas pour l'N (Krapp *et al.*, 2014), le S (*Sultr1.1* ; *1.2* ; (Shinmachi *et al.*, 2010; Courbet *et al.*, 2019), le K (Ashley *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013) ou le Fe (*Irt1*, Vert *et al.*, 2002). Dans les conditions de stress

hydrique que nous avons étudiées, les observations concordent donc pour le S, dont l'absorption racinaire et la teneur au sein des jeunes feuilles étaient fortement diminuées et étaient associées, dans le même temps, à une expression accrue de *MSA1*, une protéine nucléaire qui régule l'homéostasie de S (Huang *et al.*, 2016) et des gènes codant pour les transporteurs de SO_4^{2-} (*Sultr3.1, 3.4, 4.1*). Elles semblaient également cohérentes avec l'hypothèse d'une réponse de type « satiété » pour le N, dont la teneur dans les feuilles est restée stable (voir augmentée), probablement en conséquence d'une remobilisation accrue de N des feuilles matures aux jeunes feuilles qui peut se produire grâce notamment à des processus autophagiques (Guiboileau *et al.*, 2012; Havé *et al.*, 2017), ne nécessitant donc pas l'induction de l'expression de gènes codant des transporteurs de N (*AMT1.1*, *AMT1.2*, *AMT2*, *DUR3*, *NRT2.5* ; *NRT3.1*, *NFP6.3*, *NFP7.3*) comme cela a été observé (**Figure 6 – Chapitre V**). Ces résultats rejoignent d'ailleurs ceux de la méta-analyse de He and Dijkstra (2014), démontrant qu'en fonction du type de stress hydrique appliqué, l'impact sur la teneur en N des plantes peut être faible et provoque surtout une altération du ratio N/P tel qu'observé chez les Poacées *Alopecurus pratensis* et *Holcus lanatus* (Gargallo-Garriga *et al.*, 2015). En revanche, le cas du Fe est plus intrigant car ce dernier fait partie des éléments dont l'absorption a été fortement réduite lors du stress hydrique, entraînant une diminution massive de sa teneur dans tous les tissus (hormis lors d'un stress modéré court) et d'après les connaissances actuelles, cette situation devrait se traduire par une très forte induction de l'expression d'*IRT1* (Eide *et al.*, 1996; Henriques *et al.*, 2002; Nishida *et al.*, 2012). Cependant, une analyse ciblée *via* RT-qPCR (résultats non présentés) visant à vérifier les résultats obtenus par RNAseq, n'a révélé aucune différence significative dans l'expression d'*IRT1* entre les plantes stressées et les plantes témoins. De plus, l'expression d'autres gènes impliqués dans le transport de Fe (**Figure 7 – Chapitre IV)** était également réduite lors d'un stress hydrique modéré prolongé ou lors d'un stress sévère, quelle qu'en soit la durée, tels que NRAMP1 (Cailliatte *et al.*, 2010), YSL1 (Waters *et al.*, 2006), ou encore ZIF1 (Haydon *et al.*, 2012). Par conséquent, lors d'un stress hydrique, la faible absorption de Fe pourrait résulter d'une expression génique réduite avant même d'être causée par des effets physiologiques plus généraux constatés lors de cette contrainte, tels qu'une réduction du flux transpiratoire et de la biomasse. Ces travaux soutiennent donc l'hypothèse que le transport et le métabolisme du Fe sont affectés de façon spécifique par un stress hydrique. Ceci corrobore les travaux de Rasheed *et al.* (2016) démontrant chez *Arabidopsis* que l'expression des gènes impliqués dans l'absorption du Fe (*IRT1*, *IRT3* et *FRO2*) était réduite après 5 et 9 jours de stress hydrique, au sein des racines cette fois.

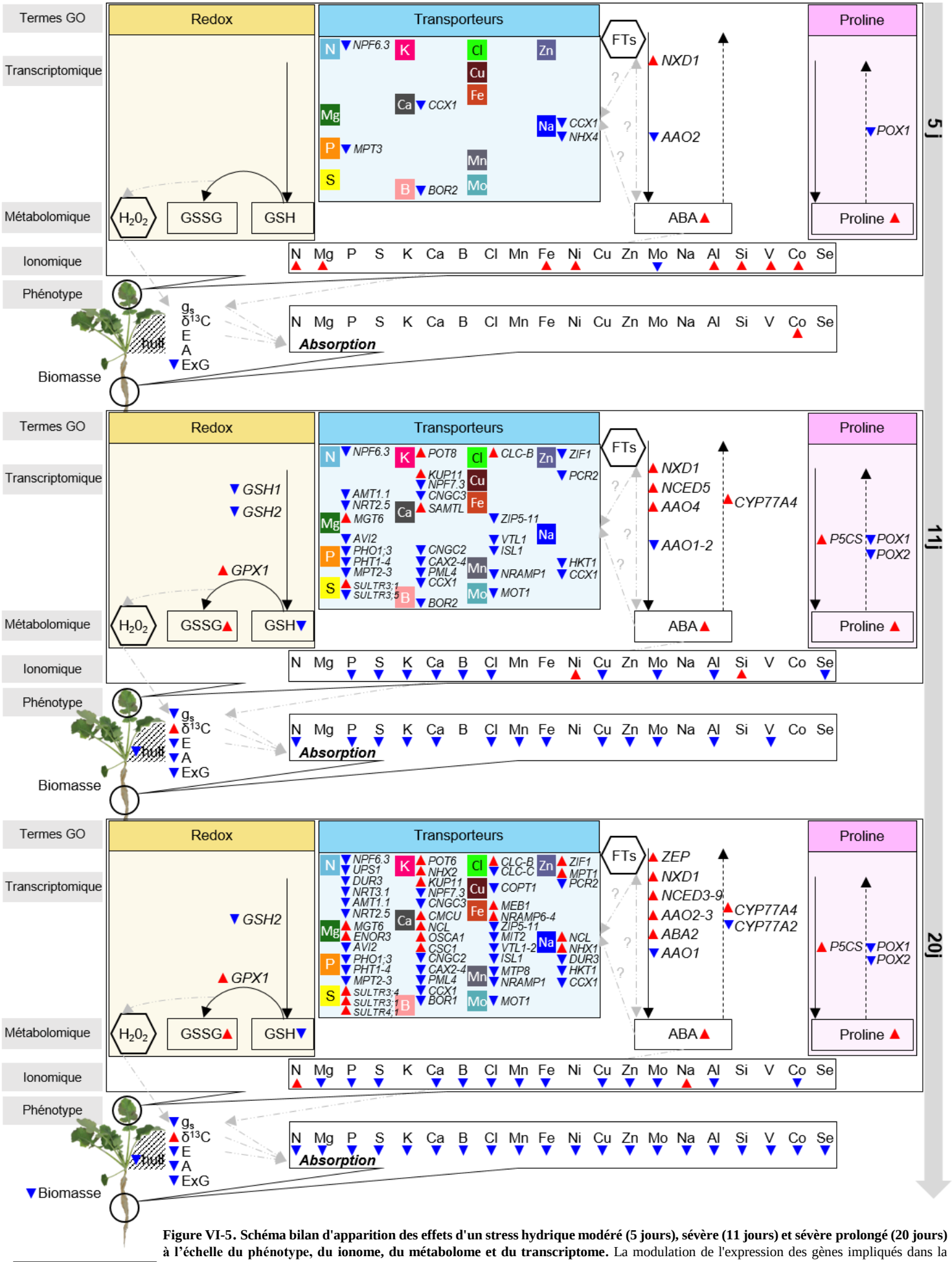


Figure VI-5. Schéma bilan d'apparition des effets d'un stress hydrique modéré (5 jours), sévère (11 jours) et sévère prolongé (20 jours) à l'échelle du phénotype, du ionome, du métabolome et du transcriptome. La modulation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse ou la dégradation du glutathion, de l'ABA et de la proline est comparée à celle impliquant les transporteurs d'ions. Elles sont concomitantes, ou non, à l'accumulation des métabolites, à la variation du ionome foliaire et/ou à la variation d'absorption racinaire des éléments. Les liens fonctionnels avérés et présumés (?) de l'ABA sur l'absorption des éléments via l'expression des transporteurs ou la modulation de l'évapotranspiration sont indiqués. AAO4 : aldéhyde oxydase; ABA : acide abscissique; $\delta^{13}C$: abondance de l'isotope stable ^{13}C; E : taux d'évapotranspiration; ExG : excess green index (indice de vert); FTs : facteurs de transcription; GPX : glutathion peroxydase; Gs : conductance stomatique; GSH : glutathion réduit; GSH1 : glutamate-cystéine ligase; GSH2 : glutathion synthase; GSSG : glutathion oxydé; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène; hull : aire sous les feuilles; NCED5 : néoxanthine dioxygénase; NXD1 : cofacteur de la biosynthèse de néoxanthine; P5CS : pyrroline-5-carboxylate synthase; POX1 : proline oxydase

De façon plus générale encore, les profils d'expression observés lors d'une contrainte hydrique, d'intensité et de durée variable, tendent à démontrer que le système de régulation impliquant les transporteurs d'ions, dans sa globalité, diffère de celui observé lors de carences nutritionnelles. Néanmoins, dans cette étude, la nécessité de combiner des analyses ionomiques et transcriptomiques a également révélé certaines difficultés, qui nécessitent de prendre du recul et d'être prudent lors de l'interprétation des données. En premier lieu, il existe une différence notoire dans l'échelle de temps associée à chacun des types de données comparés. Le ionome résulte en effet de processus à plus long terme, mettant en jeu les mécanismes d'absorption, de transport ou encore d'accumulation, dont le pas de temps est bien supérieur à celui des données transcriptomiques, qui fournissent quant à elles une évaluation quasi instantanée de la situation observée. En second lieu, l'interprétation des données d'expression des gènes étudiés doit s'effectuer au regard d'un schéma complexe, impliquant le type de transport assuré (influx ou efflux à travers une membrane donnée), la localisation subcellulaire et la fonction des protéines codées (absorption racinaire, chargement ou déchargement du xylème et phloème, enzymes d'assimilation) ou encore la régulation potentielle de ces gènes (facteurs de transcription).

Globalement, les résultats montrent clairement que l'absorption des éléments par les racines est spécifiquement affectée lors des premiers stades d'un déficit hydrique, et qu'elle concerne principalement le Mo, le Fe, le Zn et le Mn, qui peuvent donc être utilisés comme un proxy du statut de la plante (Figure 2 – Chapitre IV). Cependant, l'identification de systèmes de régulation spécifiques et précoces reste encore à explorer, bien que les modifications de l'équilibre hormonal et de l'état oxydatif de la plante, puissent être des facteurs déclenchants (Lee *et al.*, 2007; Rasheed *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2021). Pour cette raison, nous avons donc cherché à positionner (proposition de bilan au sein de la **Figure VI-5)**, de façon chronologique, les modifications du ionome foliaire observées au sein d'un ensemble de processus physiologiques et moléculaires connus pour être altérés de façon précoce par un déficit hydrique. Ceci a été rendu possible par une analyse plus globale des données de séquençage ARN (RNAseq), associée à une approche métabolomique non ciblée afin d'étudier certains des processus les plus fréquemment décrits dans la littérature tels que la régulation des phytohormones (**Figure 6 – Chapitre V**), la synthèse de la proline (**Figure 7 – Chapitre V**), ainsi que les composés antioxydants représentés ici par le glutathion (**Figure 6 – Chapitre V**). Ces approches révèlent ainsi que 5 jours seulement après l'arrêt de l'irrigation, ce stress modéré engendre au niveau transcriptomique une diminution de l'expression de gènes de transport dont NPF 6.3 (N), CCX1 (Ca), MPT3 (P), BOR1 (B) et NHX4 et CCX1 (Na) quand dans le même

temps, les teneurs des éléments associés sont restées constantes au sein des jeunes feuilles. A ce stade, une importante accumulation d'ABA est déjà observée, mais au niveau transcriptomique, très peu de gènes impliqués dans la biosynthèse ou la dégradation de ces deux hormones présentent une expression différentielle par rapport au témoin. Il en est de même pour la proline, dont le niveau d'accumulation est déjà 5 fois supérieur à celui des plantes témoins, mais là encore, sans importantes modifications de l'expression des gènes impliqués dans son métabolisme. Cette accumulation et l'absence de modulation de l'expression de gènes impliqués dans sa biosynthèse (pyrroline-5-carboxylate synthase) ou son catabolisme (proline déshydrogénase) pourrait être dû au fait qu'il s'agit d'un tissu en cours de croissance et dont le comportement est majoritairement "puits" (Dellero *et al.*, 2020). Enfin, comme le stress hydrique s'accompagne généralement d'un stress oxydatif lié à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), le métabolisme du glutathion a également été positionné et là encore, au niveau moléculaire, aucune modification d'expression de gènes impliqués dans la synthèse du glutathion, ainsi que des enzymes impliquées dans le piégeage du peroxyde d'hydrogène n'a été relevé avant 11 jours (stress sévère).

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent au niveau transcriptomique que la régulation négative des transporteurs d'ions est déclenchée de façon très précoce, puis est concomitante à celle de nombreux gènes en lien avec la synthèse d'ABA, de JA, du glutathion ou encore de la proline (**Figure VI-5**). Au niveau ionomique, des variations de teneurs au niveau foliaire constituent également une réponse précoce des effets du manque d'eau. Avec l'augmentation de la durée et de l'intensité du stress hydrique, ces teneurs sont très largement diminuées et ce très certainement en raison d'une importante dérégulation des gènes en lien avec les transporteurs d'ions, qui s'oppose alors bien souvent à celle qu'il serait possible d'observer lors de carences nutritionnelles. Plus tardivement lorsque le stress hydrique devient sévère, de nombreuses régulations transcriptomiques, cette fois plus globales, interviennent pour des systèmes impliquant notamment la photosynthèse, les ribosomes, la phosphorylation des protéines, etc (**Figure 3 – Chapitre IV).**

Ces résultats soulignent ainsi la nécessité d'études complémentaires afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans cette dérégulation précoce des transporteurs d'ions. Parmi les cibles privilégiées, l'étude du rôle de l'ABA sur l'absorption apparait être une piste de choix au vu de récents travaux démontrant l'effet d'un apport exogène d'ABA sur l'absorption des éléments chez le riz (*Oryza sativa*) (Liu *et al.*, 2018). De plus, une étude approfondie du réseau de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des gènes codant les transporteurs d'ions, lui aussi en relation étroite avec l'ABA (Liu *et al.*,

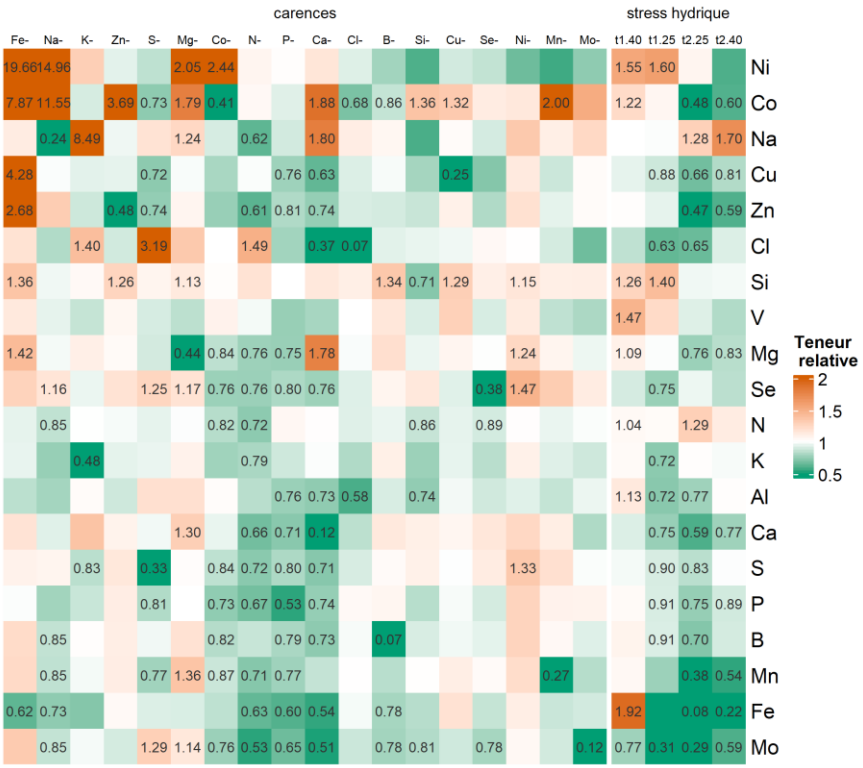


Figure VI-6. Heatmap comparative des variations des teneurs relatives en élément au sein des jeunes feuilles de colza lors d'une carence nutritionnelle ou d'un stress hydrique. La teneur relative en éléments correspond au ratio de la teneur en éléments de plantes stressées sur celle de plantes témoins. Seules les teneurs dont les valeurs ont significativement varié ($p < 0,05$) sont indiquées, le dégradé de couleur indiquant des valeurs relatives par rapport plantes témoins comprises entre 0,5 (vert) et 2 (orange). t1.40 et t2.40, stress hydrique (WD) modéré cours et prolongé ; t1.25 et t2.25, stress sévère cours et prolongé

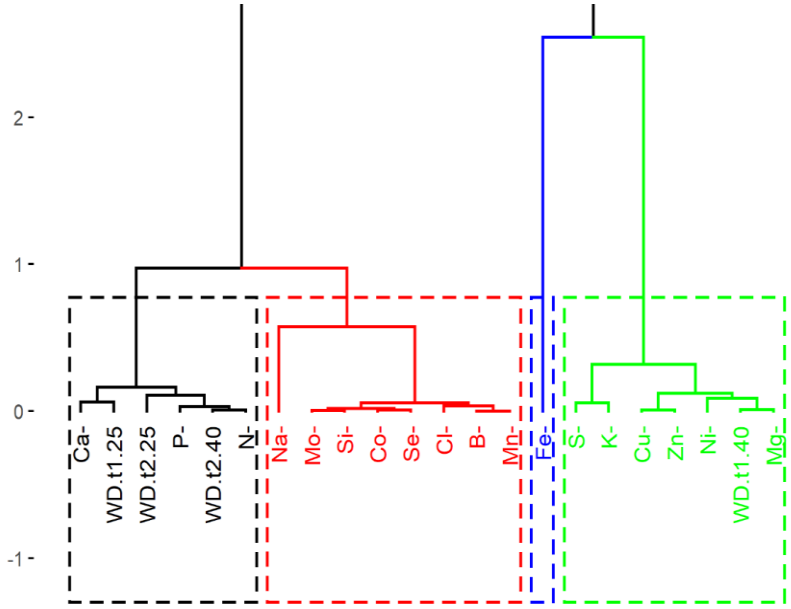


Figure VI-7. Comparaison de l'impact de carences nutritionnelles uniques et du stress hydrique sur la composition du ionome. Clustering hiérarchique sur les composantes principales d'une ACP établie à partir des teneurs du ionome de jeunes feuilles.

2015), constitue également une perspective de recherche prometteuse, qui serait d'ailleurs envisageable à partir de l'importante masse de données acquise au cours de ces expérimentations et qui restent encore à valoriser.

3. Confrontation des effets du stress hydrique sur la composition ionomique avec ceux observés lors de carences nutritionnelles

L'effet d'une carence nutritionnelle unique sur le ionome a été comparée à celui observé lors de l'application d'un stress hydrique (**Figure VI-6**). Dans l'ensemble, ces contraintes appliquées chez le colza provoquent majoritairement une chute de la teneur de la plupart des éléments au sein des feuilles en cours de croissance. Néanmoins, certaines carences provoquent une élévation assez typique de la teneur d'éléments particuliers, démontrée précédemment dans la détermination des signatures, c'est notamment le cas pour le Ni, Co, Na, Cu, Zn ou encore le Cl. Lors d'un stress hydrique, certains de ces éléments, comme le Ni ou le Na, sont également susceptibles de présenter une teneur plus élevée. Néanmoins, le stress hydrique se démarque principalement par l'ampleur de la diminution des teneurs observées, particulièrement pour le Fe, le Mo, le Mn et le Zn. Le regroupement de l'ensemble de ces contraintes démontre, après clustering hiérarchique (**Figure VI-7**), une proximité plus ou moins importante du ionome des individus ayant subi un stress hydrique sévère (t1.25 et t2.25) ou modéré prolongé (t2.40) avec celui de carences en macroéléments N, P et Ca. Il s'agit des carences qui globalement, ont eu un impact négatif sur la teneur de l'ensemble des éléments du ionome, tel qu'observé lors d'un stress hydrique. De proche en proche, l'élévation de la teneur de certains éléments comme le Ni, Co ou le Si lors d'un stress hydrique modéré court (t1.40), associe ces individus à ceux d'un regroupement de carences ayant eu un impact similaire (S, K, Cu, Zn, Ni ou Mg). Dans l'absolu, la classification hiérarchique effectuée ici regroupe les modalités les moins dissemblables, quand bien même des différences de variations des teneurs observées de certains éléments peuvent subsister. Enfin, les carences en Fe et Na, possèdent les profils ionomiques les plus contrastés en raison de l'amplitude de l'élévation des teneurs observées au sein des feuilles.

Cette classification hiérarchique (**Figure VI-7**) suggère donc que la spécificité de la signature ionomique observée lors d'un stress hydrique sévère, court ou prolongé, relativement aux signatures induites par des carences minérales, réside principalement dans i) l'amplitude de la diminution des teneurs et ce, ii) de façon généralisée pour la majeure partie des éléments du ionome.

II. Perspectives de recherches et de développement

1. Perspectives à visée fondamentale

Caractérisation des mécanismes susceptibles d'expliquer certaines interactions originales détectées lors de carences nutritionnelles

C'est notamment le cas de l'interaction observée entre le N, le P et le Na : lors d'une carence en N et dans une moindre mesure en P, l'absorption de Na est quasiment nulle. La mise en place d'expérimentations de biologie fonctionnelle utilisant des mutants *Arabidopsis* déficients pour l'absorption du nitrate pourraient permettre d'étudier les systèmes d'absorption du Na. Contrairement à la cellule animale, il n'y a chez les plantes aucun canal spécifique du Na^+ mis en évidence et cet élément semble pénétrer dans le cytoplasme, principalement via par les canaux potassiques (Schachtman et Liu, 1999). Cette étude pourrait donc permettre de comprendre la relation étroite observée entre l'absorption du nitrate et du Na, qui pourrait être liée ou non à un couplage de l'efflux de proton H^+ par les pompes ATPase à un influx de Na^+.

Mise en évidence et quantification de la capacité de remobilisation de certains éléments lors de carence,

Des données exploitées à partir des résultats obtenus lors de carences minérales mais non valorisés, démontrent très clairement que certains éléments sont remobilisés au niveau foliaire pour soutenir la croissance des tissus en cours de croissance et ceci avait déjà été observé chez de nombreuses espèces par Maillard *et al.* (2015). Il a en effet été démontré qu'un certain nombre d'éléments sont mobiles et remobilisables, c'est notamment le cas du S et du N chez *Brassica napus*, via des processus de protéolyse (Avice and Etienne, 2014) et d'autophagie (Guiboileau *et al.*, 2012; Havé *et al.*, 2017). Nos résultats montrent par ailleurs et de façon plus originale une remobilisation racinaire assez intense (forte réduction des teneurs et des quantités racinaires) pour des éléments comme le Ca, le Mn, le Cl et le Co ce qui mériterait des études complémentaires, visant à déterminer la forme et le lieu d'accumulation mais aussi les mécanismes requis pour une réallocation vers les parties aériennes. Dans ce cadre, des analyses transcriptomiques pourraient être réalisées à partir des racines des plantes carencées pour ces éléments. Avant d'envisager une fertilisation adaptée pour pallier à une carence chez les végétaux, l'identification des processus de remobilisation et des gènes associés pourrait permettre de rendre, intrinsèquement, plus efficients les cultivars d'espèces de grandes cultures lors de carences minérales transitoires.

Etude de la régulation de l'absorption du Fe et du Mo lors d'une contrainte hydrique

Ces deux éléments sont les plus impactés lors de l'application d'un stress hydrique et ce de façon précoce. Des études suggèrent le rôle de l'ABA ainsi que d'un réseau complexe de facteurs de transcription dans la régulation de l'absorption des éléments (Liu *et al.*, 2015, 2018). L'étude de mutants d'*Arabidopsis* déficients dans l'accumulation d'ABA couplée à une approche ionomique pourrait permettre d'évaluer le rôle de cette phytohormone sur l'homéostasie du contenu élémentaire lors d'un stress hydrique. Elle permettrait potentiellement d'identifier l'ABA comme médiateur de la réponse de la nutrition minérale au stress hydrique. En effet, son accumulation précoce concomitante à l'importante diminution de l'expression des transporteurs d'ions pourrait être dûe à des gènes ayant des effets pléiotropiques. Il serait pour cela nécessaire de s'inspirer des méthodologies employées par Acosta-Gamboa *et al.* (2017) dans la mise en place technique d'une telle expérimentation qui nécessiterait, entre autres, de pallier à la faible biomasse produite par *Arabidopsis thaliana* pour la quantification élémentaire notamment par XRF qui nécessite une quantité notable d'échantillons (environ 1 g sec).

S'assurer de la biodisponibilité des éléments et de l'effet du substrat lors d'une contrainte hydrique appliquée sur une culture sur sol

Un autre facteur explicatif, qui n'a pas été abordé lors de ces études, concerne l'effet d'un stress hydrique sur la biodisponibilité des éléments dans le substrat utilisé. La diminution de la teneur en eau du sol est susceptible de provoquer la précipitation de composés, leur adsorption sur le complexe argilo-humique ou encore une modification du pH de la solution du sol, qui sont autant de paramètres susceptibles d'influencer négativement l'absorption racinaire des éléments. Une étude menée simultanément sur différents sols et/ou substrats pourrait permettre de distinguer les effets *in planta* du stress hydrique sur la capacité d'absorption et les variations du ionome, de ceux indirectement provoqués par une faible disponibilité des éléments. Une telle approche permettrait par ailleurs de généraliser les résultats obtenus (composition ionomique notamment) sur un sol donné grâce à l'utilisation d'une plus grande diversité pédologique.

2. Perspectives à visée appliquée

Validation au champ des signatures ionomiques lors d'une carence nutritionnelle

Puisque la composition du ionome apparait être impactée par le milieu de croissance ou la solution nutritive, ces résultats impliquent la nécessité d'une confrontation des résultats obtenus en hydroponie avec des expérimentations en conditions de plein champ. Cette étape

impliquerait des essais en parcelles sur la base d'analyses de sols révélant la présence d'une faible quantité ou biodisponibilité d'un élément et à même de générer une carence nutritionnelle chez la plante cultivée. Elle pourrait conduire à volontairement enrichir des parcelles données, afin de constituer une référence de comparaison. Les variations du ionome observées pourraient ainsi être rapportées à la biomasse et au rendement mesurés. La génération, *de novo*, de matériel végétal par la mise en place d'un essai spécifique, aurait l'avantage de permettre une récolte précise des tissus désirés au cours du développement végétatif de la plante. Néanmoins cette approche pourrait également être réalisée à partir de dispositifs existants, de matériel végétal déjà généré au sein de ces derniers, voir du regroupement de données issues de la littérature sous forme de méta-analyse, afin d'envisager la mise en place d'un indicateur précoce de carences nutritionnelles basé sur la composition ionomique, notamment par la constitution d'un important jeu de données d'entrainement à même d'alimenter des modèles prédictifs. Cette approche pourrait également être couplée à des indicateurs moléculaires puisque des travaux mis en place sur les carences en macroéléments démontrent la présence de gènes spécifiquement exprimés au sein de chaque carence, faisant d'eux des marqueurs d'intérêt qui ont d'ailleurs fait l'objet d'un article non relaté dans ce manuscrit (Courbet *et al.*, 2021). Combiner ces deux approches au champ pourrait permettre de valider ces marqueurs moléculaires, l'expression de gènes constituant un indicateur relativement instantané et fiable, quand les marqueurs ionomiques constituent quant à eux des marqueurs plus intégratifs. Ces derniers pourraient en outre, être bien plus performants que les outils d'aide à la décision (OAD) couramment employés aujourd'hui sous forme de pinces ou de bandelettes et permettant le suivi et le pilotage de la fertilisation, bien souvent uniquement basés sur la seule teneur en N des échantillons. Pour cela, la démocratisation d’un tel outil permettant la quantification des éléments du ionome devra notamment passer par une miniaturisation des technologies et la possibilité d'un portage au champ des appareils de mesure, comme cela semble être engagé dans l'usage de détecteurs XRF ou NIRS.

Validation au champ des variations du ionome lors d'un stress hydrique

Les effets du stress hydrique sur la composition ionomique des tissus végétaux pourraient également faire l'objet d'une évaluation au champ. Elle permettrait d'estimer plus précisément l'impact de ce stress qui, en conditions contrôlées, présente un certain nombre de difficultés pour sa mise en œuvre, comprenant le type de substrat, la dimension du pot, dont l'impact sur le développement racinaire est non négligeable et le pilotage du régime hydrique. Au cours de cette thèse, cette approche a été en partie réalisée, via l'analyse d'échantillons de feuilles drapeau

de blé soumis à des contraintes hydriques issus de l'UMR GDEC de Clermont-Ferrand. Ces premiers résultats démontrent une concordance dans la variation du ionome alors observée et celle mise en avant dans le cadre de cette thèse, mais cependant avec un nombre limité d'échantillons issus du champ. Néanmoins, ces échantillons sont issus d'un dispositif intégrant des témoins irrigués et des individus stressés non irrigués, ce qui implique que la contrainte hydrique subie par les plantes stressées ne résulte que des conditions climatiques de l'année en cours ; il est de fait nécessaire de se pencher sur des essais pluriannuels pour caractériser finement l'impact de la contrainte hydrique au champ sur le ionome. Puisqu'un dispositif similaire est en place au sein du projet EAUPTIC, il devrait permettre d'envisager ce type d'analyses dès 2022. L'ajustement fin du stade d'application du stress hydrique au champ tel qu'appliqué au cours de cette thèse nécessite, quant à elle, d'importantes infrastructures, comme celles du simulateur de climats extrêmes (SICLEX) de l'unité expérimentale INRAE de Lusignan.

Evaluer la variation génotypique du ionome lors d'un stress hydrique

Dans la continuité de la perspective précédente, les premiers résultats obtenus avec les échantillons de l'UMR GDEC démontrent un effet important du génotype sur la variation du ionome du blé au champ lors d'une contrainte hydrique. Il s'agit d'ailleurs d'une notion peu abordée au sein de ce manuscrit, dont les études n'ont été réalisées qu'à partir d'un seul génotype au sein de chaque espèce, cela en raison évidemment de contraintes inhérentes au travail en conditions contrôlées. Néanmoins, la prise en compte de cet aspect est importante et une modulation des résultats obtenus est attendue en fonction du niveau de tolérance de chaque variété. Il a d'ailleurs été démontré que l'absorption et les teneurs résultantes au sein de cultivars de tomate cerise (*Lycopersicon esculentum Mill.*) diffèrent chez des génotypes tolérants et sensibles à la sécheresse (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). Ainsi, la prise en compte de la notion de ionome au sein des programmes de sélection variétale passera, dans les années à venir, par l'identification des régions du génome associées à l'accumulation des éléments minéraux, ou locus à caractère quantitatif (QTL) (Bus *et al.*, 2014; Fatiukha *et al.*, 2019; Fikas *et al.*, 2019; Stich *et al.*, 2020; Campos *et al.*, 2021).

Identifier des solutions de fertilisation préventives permettant une meilleure résilience des plantes au stress hydrique et un maintien du rendement

Puisqu'au stade végétatif, le stress hydrique engendre principalement une chute massive de l'absorption des éléments minéraux et de leur teneur au sein des tissus, un pilotage fin de la fertilisation, notamment par un apport préventif d'éléments, pourrait accroitre la résilience des plantes au stress hydrique. Cette hypothèse est étayée par une partie de nos résultats qui suggèrent qu'une réduction de la nutrition minérale lors d'un stress hydrique ne serait pas une conséquence de la chute de la croissance mais plus probablement l'une de ses causes. Ces effets potentiels sont notamment suggérés par un certain nombre de travaux démontrant les effets bénéfiques d'un apport foliaire ou d'un enrobage de semences contenant un ou plusieurs éléments sur la tolérance au stress hydrique, notamment le Fe, le Mo et le Zn (Ghafarian *et al.*, 2013; Monjezi *et al.*, 2013; Pourjafar *et al.*, 2016; Kareem *et al.*, 2017; Zandipour *et al.*, 2018). Une expérimentation au cours de ces travaux de thèse et non relatée dans ce manuscrit a été menée dans ce sens, lors du développement reproducteur du colza. Elle visait à étudier l'effet de l'apport d'éléments au sol, seuls (Fe, Mo, Mn, Zn) ou combinés avant l'application du stress, sur la variation du ionome et les composantes de rendement grainier du colza. En raison des contraintes sanitaires, de l'indisponibilité des plateformes de phénotypage et de la difficulté de les utiliser avec des plantes au stade reproducteur, cette expérimentation a été effectuée en serre au sein du laboratoire EVA avec une gestion manuelle de la contrainte hydrique appliquée. Elle a fourni des résultats en demi-teinte concernant les variations du ionome obtenues, principalement en raison i) de l'application d'une fertilisation préventive et d'un stress hydrique au stade reproducteur (floraison) qui pourrait déjà être trop tardif (Taulemesse *et al.*, 2015) : les capacités d'absorption pourraient être trop limitées à ce stade pour compenser la faible absorption des éléments lors d'une contrainte hydrique et ii) d'une méthodologie bien moins performante que celles des plateformes automatisées dans le suivi et l'application du stress hydrique. Néanmoins, les résultats démontrent tout de même un effet positif de l'apport préventif d'éléments (comme le Mo) sur le rendement et la composition des grains, qu'il serait intéressant d'explorer à l'aide de travaux supplémentaires, ce qui permettrait d'une part une valorisation de cette expérimentation au stade reproducteur et d'autre part, d'envisager la conception d'engrais préventifs susceptibles de réduire les effets délétères d'un stress hydrique.

Références bibliographiques

Note : l'ensemble des références citées au sein des articles et du manuscrit sont listées ci-dessous.

Abbas S, Javed MT, Ali Q, Akram MS, Tanwir K, Ali S, Chaudhary HJ, Iqbal N. 2021. Elucidating Cd-mediated distinct rhizospheric and in planta ionomic and physio-biochemical responses of two contrasting Zea mays L. cultivars. Physiology and Molecular Biology of Plants **27**, 297–312.

Abdallah M, Dubousset L, Meuriot F, Etienne P, Avice JC, 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.

Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. Science **311**, 91–94.

Acosta-Gamboa LM, Liu S, Langley E, Campbell Z, Castro-Guerrero N, Mendoza-Cozatl D, Lorence A. 2017. Moderate to severe water limitation differentially affects the phenome and ionome of Arabidopsis. Functional Plant Biology **44**, 94.

Ahmad Z, Anjum S, Skalicky M, *et al.* 2021. Selenium Alleviates the Adverse Effect of Drought in Oilseed Crops Camelina (Camelina sativa L.) and Canola (Brassica napus L.). Molecules **26**, 1699.

Ahmad S, Raza MAS, Saleem MF, Zahra SS, Khan IH, Ali M, Shahid AM, Iqbal R, Zaheer MS. 2015. Mulching strategies for weeds control and water conservation in cotton. J Agric Biol Sci **8**, 299–306.

Ahmadi SAK, Ebadi A, Daneshian J, Jahanbakhsh S, Siadat SA, Tavakoli H. 2015. Effects of Irrigation Deficit and Application of Some Growth Regulators on Defense Mechanisms of Canola. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca **43**, 124–130.

Aiken R, Baltensperger D, Krall J, Pavlista A, Johnson J. 2015. Planting methods affect emergence, flowering and yield of spring oilseed crops in the U.S. central High Plains. Industrial Crops and Products **69**, 273–277.

Akmouche Y, Cheneby J, Lamboeuf M, *et al.* 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**, 300.

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.

Allen LH. 2000. Ending hidden hunger: the history of micronutrient deficiency control. Background Analysis for the World Bank-UNICEF Nutrition Assessment Project World Bank. Washington, DC.

Allen L, De Benoist B, Dary O, Hurrell R. 2006. Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization **126**. Geneva.

Amtmann A, Armengaud P. 2009. Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. Current Opinion in Plant Biology **12**, 275–283.

Andrés-ColÁs N, Perea-García A, Puig S, Peñarrubia L. 2010. Deregulated Copper Transport Affects Arabidopsis Development Especially in the Absence of Environmental Cycles. Plant Physiology **153**, 170–184.

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

Anil VS, Sankara Rao K. 2001. Calcium-mediated signal transduction in plants: A perspective on the role of Ca2+ and CDPKs during early plant development. Journal of Plant Physiology **158**, 1237–1256.

Anschütz U, Becker D, Shabala S. 2014. Going beyond nutrition: Regulation of potassium homoeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. Journal of Plant Physiology **171**, 670–687.

Aown M, Raza S, Saleem MF, Anjum SA, Khaliq T, Wahid MA. 2012. Foliar application of potassium under water deficit conditions improved the growth and yield of wheat (Triticum aestivum L.). J. Anim. Plant Sci **22**, 431–437.

Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C. 2002. Plant Breeding and Drought in C3 Cereals: What Should We Breed For? Annals of Botany **89**, 925–940.

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

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**, 601–639.

Ashkiani A, Sayfzadeh S, Rad AHS, Valadabadi A, Masouleh EH. 2020. Effects of foliar zinc application on yield and oil quality of rapeseed genotypes under drought stress. Journal of Plant Nutrition **43**, 1594–1603.

Ashley MK, Grant M, Grabov A. 2006. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. Journal of Experimental Botany **57**, 425–436.

Ashraf M, Shahbaz M, Ali Q. 2013. Drought-induced modulation in growth and mineral nutrients in canola (Brassica napus L.). Pak. J. Bot **45**, 93–98.

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.

Bagherikia S, Pahlevani M, Yamchi A, Zaynalinezhad K, Mostafaie A. 2019. Transcript Profiling of Genes Encoding Fructan and Sucrose Metabolism in Wheat Under Terminal Drought Stress. Journal of Plant Growth Regulation **38**, 148–163.

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.

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

Barberon M, Dubeaux G, Kolb C, Isono E, Zelazny E, Vert G. 2014. Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences **111**, 8293–8298.

Barberon M, Vermeer JEM, De Bellis D, *et al.* 2016. Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. Cell **164**, 447–459.

Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A. 2016. Plant adaptation to drought stress. F1000Research **5**.

Baux A, Colbach N, Allirand JM, Jullien A, Ney B, Pellet D. 2013. Insights into temperature effects on the fatty acid composition of oilseed rape varieties. European Journal of Agronomy **49**, 12–19.

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.

Baxter I, Gustin JL, Settles AM, Hoekenga OA. 2013. Ionomic Characterization of Maize Kernels in the Intermated B73 × Mo17 Population. Crop Science **53**, 208–220.

Baxter I, Hermans C, Lahner B, Yakubova E, Tikhonova M, Verbruggen N, Chao D, Salt DE. 2012*a*. Biodiversity of mineral nutrient and trace element accumulation in Arabidopsis thaliana. PLoS one **7**, e35121.

Baxter I, Hermans C, Lahner B, Yakubova E, Tikhonova M, Verbruggen N, Chao D, Salt DE. 2012*b*. Biodiversity of Mineral Nutrient and Trace Element Accumulation in Arabidopsis thaliana. PLOS ONE **7**, e35121.

Baxter I, Muthukumar B, Park HC, Buchner P, Lahner B, Danku J, Zhao K, Lee J, Hawkesford MJ, Guerinot ML. 2008*a*. Variation in molybdenum content across broadly distributed populations of Arabidopsis thaliana is controlled by a mitochondrial molybdenum transporter (MOT1). PLoS Genetics **4**, e1000004.

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

Benito B, Haro R, Amtmann A, Cuin TA, Dreyer I. 2014. The twins K+ and Na+ in plants. Journal of plant physiology **171**, 723–731.

Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological) **57**, 289–300.

van den Berg RA, Hoefsloot HC, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. BMC Genomics **7**, 142.

Bhaskara GB, Yang T-H, Verslues PE. 2015. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. Frontiers in Plant Science **6**, 484.

Billard V, Ourry A, Maillard A, Garnica M, Coquet L, Jouenne T, Cruz F, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Etienne P. 2014. Copper-Deficiency in Brassica napus Induces Copper Remobilization, Molybdenum Accumulation and Modification of the Expression of Chloroplastic Proteins (PA Cobine, Ed.). PLoS ONE **9**, e109889.

Bittner F. 2014. Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. Frontiers in plant science **5**, 28.

Bodner G, Nakhforoosh A, Kaul H-P. 2015. Management of crop water under drought: a review. Agronomy for Sustainable Development **35**, 401–442.

Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarría-Machado I, Martínez-Estévez M. 2017. Aluminum, a Friend or Foe of Higher Plants in Acid Soils. Frontiers in Plant Science **8**.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics **30**, 2114–2120.

Bouain N, Kisko M, Rouached A, *et al.* 2014. Phosphate/Zinc Interaction Analysis in Two Lettuce Varieties Reveals Contrasting Effects on Biomass, Photosynthesis, and Dynamics of Pi Transport. BioMed Research International **2014**, e548254.

Bouchereau A, Clossais-Besnard N, Bensaoud A, Leport L, Renard M. 1996. Water stress effects on rapeseed quality. European Journal of Agronomy **5**, 19–30.

Boyer JS. 1982. Plant Productivity and Environment. Science **218**, 443–448.

Branka K, Bosko Andrija G, Angelina T, Goran D. 2017. Yield and chemical composition of soybean seed under different irrigation regimes in the Vojvodina region. Plant, Soil and Environment **63**, 34–39.

Bray EA. 1997. Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science **2**, 48–54.

Brereton RG. 2006. Consequences of sample size, variable selection, and model validation and optimisation, for predicting classification ability from analytical data. TrAC Trends in Analytical Chemistry **25**, 1103–1111.

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

Brito C, Dinis L-T, Ferreira H, Coutinho J, Moutinho-Pereira J, Correia CM. 2019. Salicylic acid increases drought adaptability of young olive trees by changes on redox status and ionome. Plant Physiology and Biochemistry **141**, 315–324.

Broadley MR, Bowen HC, Cotterill HL, Hammond JP, Meacham MC, Mead A, White PJ. 2003. Variation in the shoot calcium content of angiosperms. Journal of Experimental Botany **54**, 1431–1446.

Broadley MR, Bowen HC, Cotterill HL, Hammond JP, Meacham MC, Mead A, White PJ. 2004. Phylogenetic variation in the shoot mineral concentration of angiosperms. Journal of Experimental Botany **55**, 321–336.

Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F. 2012. Chapter 7 - Function of Nutrients: Micronutrients. In: Marschner P, ed. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition). San Diego: Academic Press, 191–248.

Brown PH, Welch RM, Cary EE. 1987. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. Plant physiology **85**, 801–803.

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.

Bukhari MA, Sharif MS, Ahmad Z, Barutçular C, Afzal M, Hossain A, Sabagh AE. 2020. Silicon Mitigates the Adverse Effect of Drought in Canola (Brassica napus l.) Through Promoting the Physiological and Antioxidants Activity. Silicon.

Bus A, Körber N, Parkin IAP, Samans B, Snowdon RJ, Li J, Stich B. 2014. Species- and genome-wide dissection of the shoot ionome in Brassica napus and its relationship to seedling development. Frontiers in Plant Science **5**, 485.

Butz ND, Sharkey TD. 1989. Activity Ratios of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Accurately Reflect Carbamylation Ratios 1. Plant Physiology **89**, 735–739.

Cailliatte R, Schikora A, Briat J-F, Mari S, Curie C. 2010. High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for Arabidopsis Growth in Low Manganese Conditions. The Plant Cell **22**, 904–917.

Cakmak I. 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science **168**, 521–530.

Campos ACAL, Dijk WFA, Ramakrishna P, Giles T, Korte P, Douglas A, Smith P, Salt DE. 2021. 1,135 ionomes reveal the global pattern of leaf and seed mineral nutrient and trace element diversity in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal **106**, 536–554.

Campos ACA, Kruijer W, Alexander R, Akkers RC, Danku J, Salt DE, Aarts MG. 2017. Natural variation in Arabidopsis thaliana reveals shoot ionome, biomass, and gene expression changes as biomarkers for zinc deficiency tolerance. Journal of experimental botany **68**, 3643–3656.

Canales J, Uribe F, Henríquez-Valencia C, Lovazzano C, Medina J, Vidal EA. 2020. Transcriptomic analysis at organ and time scale reveals gene regulatory networks controlling the sulfate starvation response of Solanum lycopersicum. BMC Plant Biology **20**, 385.

Cao M-J, Wang Z, Wirtz M, Hell R, Oliver DJ, Xiang C-B. 2013. SULTR3;1 is a chloroplast-localized sulfate transporter in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal **73**, 607–616.

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

Caporaso N, Whitworth MB, Fisk ID. 2018. Near-Infrared spectroscopy and hyperspectral imaging for non-destructive quality assessment of cereal grains. Applied Spectroscopy Reviews **53**, 667–687.

Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S. 2009. AmiGO Hub, Web Presence Working Group. 2009. AmiGO: online access to ontology and annotation data. Bioinformatics **25**, 288–289.

Carmo-Silva AE, Gore MA, Andrade-Sanchez P, French AN, Hunsaker DJ, Salvucci ME. 2012. Decreased CO2 availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. Environmental and Experimental Botany **83**, 1–11.

Casadebaig P, Debaeke P, Lecoeur J. 2008. Thresholds for leaf expansion and transpiration response to soil water deficit in a range of sunflower genotypes. European Journal of Agronomy **28**, 646–654.

Champolivier L, Merrien A. 1996. Effects of water stress applied at different growth stages to Brassica napus L. var. oleifera on yield, yield components and seed quality. European Journal of Agronomy **5**, 153–160.

Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. Functional Plant Biology **30**, 239–264.

Chen Y, Li C, Yi J, Yang Y, Lei C, Gong M. 2020. Transcriptome Response to Drought, Rehydration and Re-Dehydration in Potato. International Journal of Molecular Sciences **21**, 159.

Chen L, Ren F, Zhong H, Jiang W, Li X. 2010. Identification and expression analysis of genes in response to high-salinity and drought stresses in Brassica napus. Acta Biochimica et Biophysica Sinica **42**, 154–164.

Chen W, Yao X, Cai K, Chen J. 2011. Silicon alleviates drought stress of rice plants by improving plant water status, photosynthesis and mineral nutrient absorption. Biological trace element research **142**, 67–76.

Chhaya, Yadav B, Jogawat A, Gnanasekaran P, Kumari P, Lakra N, Lal SK, Pawar J, Narayan OP. 2021. An overview of recent advancement in phytohormones-mediated stress management and drought tolerance in crop plants. Plant Gene **25**, 100264.

Chun-jie Y, Xue-kun Z, Chong-shun ZOU, Yong C, Pu-ying Z, Gui-ying LI. 2007. Effects of drought simulated by PEG-6000 on germination and seedling growth of rapeseed (Brassica napus L.). Chinese Journal of Oil Crop Sciences **29**, 425.

Cleland J. 2013. World population growth; past, present and future. Environmental and Resource Economics **55**, 543–554.

Colangelo EP, Guerinot ML. 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. Current Opinion in Plant Biology **9**, 322–330.

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.

Conn SJ, Conn V, Tyerman SD, Kaiser BN, Leigh RA, Gilliham M. 2011. Magnesium transporters, MGT2/MRS2-1 and MGT3/MRS2-5, are important for magnesium partitioning within Arabidopsis thaliana mesophyll vacuoles. New Phytologist **190**, 583–594.

Conte SS, Lloyd AM. 2010. The MAR1 transporter is an opportunistic entry point for antibiotics. Plant Signaling & Behavior **5**, 49–52.

Cosgrove DJ, Hedrich R. 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of Vicia faba L. Planta **186**, 143–153.

Courbet G, D'Oria A, Maillard A, *et al.* 2021. Comparative Omics Analysis of Brassica napus Roots Subjected to Six Individual Macronutrient Deprivations Reveals Deficiency-Specific Genes and Metabolomic Profiles. International Journal of Molecular Sciences **22**, 11679.

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.

Crawford NM. 1995. Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth. The Plant Cell **7**, 859–868.

Curie C, Alonso JM, Jean ML, Ecker JR, Briat J-F. 2000. Involvement of NRAMP1 from Arabidopsis thaliana in iron transport. Biochemical Journal **347**, 749–755.

Dai A. 2013. Increasing drought under global warming in observations and models. Nature Climate Change **3**, 52–58.

Dalcorso G, Manara A, Piasentin S, Furini A. 2014. Nutrient metal elements in plants. Metallomics **6**, 1770–1788.

Davidian J-C, Kopriva S. 2010. Regulation of Sulfate Uptake and Assimilation—the Same or Not the Same? Molecular Plant **3**, 314–325.

De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H. 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. Nature **442**, 939–942.

De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse J-M, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H. 2009. CLC-mediated anion transport in plant cells. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **364**, 195–201.

Debaeke P, Puech J, Casals ML, Petibon P. 1996. Élaboration du rendement du blé d'hiver en conditions de déficit hydrique. I. Étude en lysimètres. Agronomie **16**, 3–23.

Dellero Y, Clouet V, Marnet N, Pellizzaro A, Dechaumet S, Niogret M-F, Bouchereau A. 2020. Leaf status and environmental signals jointly regulate proline metabolism in winter oilseed rape. Journal of Experimental Botany **71**, 2098–2111.

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics **29**, 15–21.

Dong J, Grylls S, Hunt J, Armstrong R, Delhaize E, Tang C. 2019. Elevated CO2 (free-air CO2 enrichment) increases grain yield of aluminium-resistant but not aluminium-sensitive wheat (Triticum aestivum) grown in an acid soil. Annals of Botany **123**, 461–468.

D'Oria A, Courbet G, Billiot B, *et al.* 2022. Drought specifically downregulates mineral nutrition: plant ionomic content and associated gene expression. *Submitted to Plant Direct*.

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.

D'Oria A, Jing L, Arkoun M, Pluchon S, Pateyron S, Trouverie J, Etienne P, Diquélou S, Ourry A. 2022. Transcriptomic, Metabolomic and Ionomic Analyses Reveal Early Modulation of Leaf Mineral Content in Brassica napus under Mild or Severe Drought. International Journal of Molecular Sciences **23**, 781.

Drummond RSM, Tutone A, Li Y-C, Gardner RC. 2006. A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system. Plant Science **170**, 78–89.

Duncan O, Trösch J, Fenske R, Taylor NL, Millar AH. 2017. Resource: Mapping the Triticum aestivum proteome. The Plant Journal **89**, 601–616.

Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N. 2016. Water Deficit Enhances C Export to the Roots in Arabidopsis thaliana Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots. Plant Physiology **170**, 1460–1479.

Ecarnot M, Compan F, Roumet P. 2013. Assessing leaf nitrogen content and leaf mass per unit area of wheat in the field throughout plant cycle with a portable spectrometer. Field Crops Research **140**, 44–50.

Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences **93**, 5624–5628.

Eide DJ, Clark S, Nair TM, Gehl M, Gribskov M, Guerinot ML, Harper JF. 2005. Characterization of the yeast ionome: a genome-wide analysis of nutrient mineral and trace element homeostasis in Saccharomyces cerevisiae. Genome biology **6**, R77.

Epstein E. 1999. Silicon. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**, 641–664.

Erel R, Ben-Gal A, Dag A, Schwartz A, Yermiyahu U. 2014. Sodium replacement of potassium in physiological processes of olive trees (var. Barnea) as affected by drought. Tree Physiology **34**, 1102–1117.

Eriksson L. 1999. Introduction to multi-and megavariate data analysis using projection methods (PCA & PLS). Umeä, Sweden: Umetrics AB.

Etienne P, Diquelou S, Prudent M, Salon C, Maillard A, Ourry A. 2018. Macro and Micronutrient Storage in Plants and Their Remobilization When Facing Scarcity: The Case of Drought. Agriculture **8**, 14.

Fàbregas N, Fernie AR. 2019. The metabolic response to drought. Journal of Experimental Botany **70**, 1077–1085.

Fageria NK, Baligar VC, Li YC. 2008. The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. Journal of plant nutrition **31**, 1121–1157.

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 M-S, Zhao F-J, Fairweather-Tait SJ, Poulton PR, Dunham SJ, McGrath SP. 2008. Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **22**, 315–324.

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**, 663477.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development **29**, 185–212.

Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. 1982. On the Relationship Between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves. Functional Plant Biology **9**, 121–137.

Fatiukha A, Klymiuk V, Peleg Z, Saranga Y, Cakmak I, Krugman T, Korol AB, Fahima T. 2019. Variation in phosphorus and sulfur content shapes the genetic architecture and phenotypic associations within wheat grain ionome. bioRxiv, 580423.

Feng R, Wei C, Tu S. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. Environmental and Experimental Botany **87**, 58–68.

Fikas AA, Dilkes BP, Baxter I. 2019. Multivariate analysis reveals environmental and genetic determinants of element covariation in the maize grain ionome. Plant Direct **3**, e00139.

Fischer S, Hilger T, Piepho H-P, Jordan I, Cadisch G. 2019. Do we need more drought for better nutrition? The effect of precipitation on nutrient concentration in East African food crops. Science of The Total Environment **658**, 405–415.

Fitzpatrick KL, Tyerman SD, Kaiser BN. 2008. Molybdate transport through the plant sulfate transporter SHST1. FEBS Letters **582**, 1508–1513.

Forieri I, Sticht C, Reichelt M, Gretz N, Hawkesford MJ, Malagoli M, Wirtz M, Hell R. 2017. System analysis of metabolism and the transcriptome in Arabidopsis thaliana roots reveals differential co-regulation upon iron, sulfur and potassium deficiency. Plant, Cell & Environment **40**, 95–107.

Forieri I, Wirtz M, Hell R. 2013. Toward new perspectives on the interaction of iron and sulfur metabolism in plants. Frontiers in Plant Science **4**, 357.

Ganeteg U, Ahmad I, Jämtgård S, Aguetoni-Cambui C, Inselsbacher E, Svennerstam H, Schmidt S, Näsholm T. 2017. Amino acid transporter mutants of Arabidopsis provides evidence that a non-mycorrhizal plant acquires organic nitrogen from agricultural soil. Plant, Cell & Environment **40**, 413–423.

Gansel X, Muños S, Tillard P, Gojon A. 2001. Differential regulation of the NO3– and NH4+ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. The Plant Journal **26**, 143–155.

Gargallo-Garriga A, Sardans J, Pérez-Trujillo M, *et al.* 2015. Opposite metabolic responses of shoots and roots to drought. Scientific Reports **4**, 1–7.

Garza RID de la, Gregory JF, Hanson AD. 2007. Folate biofortification of tomato fruit. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 4218–4222.

Gassert F, Luck M, Scientist R, Llc Is, Scientist MLR, Llc Is. 2015. Aqueduct Water Stress Projections: Decadal Projections of Water Supply and Demand Using CMIP5 GCMs.

Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N. 1999. Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into Arabidopsis Roots. The Plant Cell **11**, 937–947.

Geiger D, Scherzer S, Mumm P, *et al.* 2009. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. Proceedings of the National Academy of Sciences **106**, 21425–21430.

Ghafarian AH, Zarghami R, Zand B, Bayat V. 2013. Wheat performance as affected by foliar application of molybdenum (Mo) under drought stress condition. International Journal of Agronomy and Plant Production **4**, 3050–3056.

Ghandilyan A, Barboza L, Tisné S, Granier C, Reymond M, Koornneef M, Schat H, Aarts MGM. 2009. Genetic analysis identifies quantitative trait loci controlling rosette mineral concentrations in Arabidopsis thaliana under drought. New Phytologist **184**, 180–192.

Ghobadi M, Bakhshandeh M, Fathi G, Gharineh MH, Alami-Said K, Naderi A, Ghobadi ME. 2006. Short and long periods of water stress during different growth stages of canola (Brassica napus L.): effect on yield, yield components, seed oil and protein contents. J. Agron **5**, 336–341.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology and biochemistry **48**, 909–930.

Girondé A, Dubousset L, Trouverie J, Etienne P, 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. Frontiers in Plant Science **5**.

Girondé A, Etienne P, Trouverie J, *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 Biology **15**, 59.

Gojon A, Nacry P, Davidian J-C. 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. Current opinion in plant biology **12**, 328–338.

Gong L, Zhang H, Gan X, *et al.* 2015. Transcriptome Profiling of the Potato (Solanum tuberosum L.) Plant under Drought Stress and Water-Stimulus Conditions. PLOS ONE **10**, e0128041.

Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. Nature Biotechnology **17**, 282–286.

Grant CA, Bailey LD. 1993. Fertility management in canola production. Canadian Journal of Plant Science **73**, 651–670.

Gromski PS, Muhamadali H, Ellis DI, Xu Y, Correa E, Turner ML, Goodacre R. 2015. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. Analytica Chimica Acta **879**, 10–23.

de Groot CC, van den Boogaard R, Marcelis LFM, 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.

Grotz N, Guerinot ML. 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1763**, 595–608.

Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wiren N. 2013. Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. Plant Physiology **163**, 161–179.

Grusak MA, Pearson JN, Marentes E. 1999. The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. Field crops research **60**, 41–56.

Gu M, Chen A, Sun S, Xu G. 2016. Complex Regulation of Plant Phosphate Transporters and the Gap between Molecular Mechanisms and Practical Application: What Is Missing? Molecular Plant **9**, 396–416.

Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataillé M-P, Avice J-C, Masclaux-Daubresse C. 2012. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. New Phytologist **194**, 732–740.

Gupta S, Yadav BS, Raj U, Freilich S, Varadwaj PK. 2017. Transcriptomic Analysis of Soil Grown T. aestivum cv. Root to Reveal the Changes in Expression of Genes in Response to Multiple Nutrients Deficiency. Frontiers in Plant Science **8**, 1025.

Guzmán C, Autrique JE, Mondal S, Singh RP, Govindan V, Morales-Dorantes A, Posadas-Romano G, Crossa J, Ammar K, Peña RJ. 2016. Response to drought and heat stress on wheat quality, with special emphasis on bread-making quality, in durum wheat. Field Crops Research **186**, 157–165.

Haberle J, Svoboda P, Raimanova I. 2008. The effect of post-anthesis water supply on grain nitrogen concentration and grain nitrogen yield of winter wheat. Plant Soil Environ **54**, 304–312.

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**, 516.

Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Petétot J, Somerville C, Poirier Y. 2002. Identification and Characterization of the Arabidopsis PHO1 Gene Involved in Phosphate Loading to the Xylem. The Plant Cell **14**, 889–902.

Hänsch R, Mendel RR. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). Current Opinion in Plant Biology **12**, 259–266.

Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Anee TI, Parvin K, Nahar K, Mahmud JA, Fujita M. 2019. Regulation of Ascorbate-Glutathione Pathway in Mitigating Oxidative Damage in Plants under Abiotic Stress. Antioxidants **8**, 384.

Hasanuzzaman M, Nahar K, Gill SS, Fujita M. 2013. Drought Stress Responses in Plants, Oxidative Stress, and Antioxidant Defense. Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance. John Wiley & Sons, Ltd, 209–250.

Havé M, Marmagne A, Chardon F, Masclaux-Daubresse C. 2017. Nitrogen remobilization during leaf senescence: lessons from Arabidopsis to crops. Journal of Experimental Botany **68**, 2513–2529.

Hawkins C, Ginzburg D, Zhao K, *et al.* 2021. Plant Metabolic Network 15: A resource of genome-wide metabolism databases for 126 plants and algae. Journal of Integrative Plant Biology **63**, 1888–1905.

Haydon MJ, Kawachi M, Wirtz M, Hillmer S, Hell R, Krämer U. 2012. Vacuolar Nicotianamine Has Critical and Distinct Roles under Iron Deficiency and for Zinc Sequestration in Arabidopsis. The Plant Cell **24**, 724–737.

He M, Dijkstra FA. 2014. Drought effect on plant nitrogen and phosphorus: a meta-analysis. New Phytologist **204**, 924–931.

He G, Zhang J, Hu X, Wu J. 2011. Effect of aluminum toxicity and phosphorus deficiency on the growth and photosynthesis of oil tea (Camellia oleifera Abel.) seedlings in acidic red soils. Acta Physiologiae Plantarum **33**, 1285–1292.

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.

Hervé MR, Nicolè F, Lê Cao K-A. 2018. Multivariate Analysis of Multiple Datasets: a Practical Guide for Chemical Ecology. Journal of Chemical Ecology **44**, 215–234.

Hibara K-I, Hosoki W, Hakoyama T, Ohmori Y, Fujiwara T, Itoh J-I, Nagato Y. 2013. Abnormal Shoot in Youth, a homolog of molybdate transporter gene, regulates early shoot development in rice. American Journal of Plant Sciences **4**, 1– 9.

Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. Plant and soil **321**, 117–152.

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station **347**.

Holmes MRJ. 1980. Nutrition of the oilseed rape crop. Applied Science Publishers.

Hosseini M, Hassibi P. 2011. Effects of water deficit stress on several quantitative and qualitative characteristics of canola (Brassica napus L.) cultivars. Notulae Scientia Biologicae **3**, 120–125.

Hou J, Huang X, Sun W, Du C, Wang C, Xie Y, Ma Y, Ma D. 2018. Accumulation of water-soluble carbohydrates and gene expression in wheat stems correlates with drought resistance. Journal of Plant Physiology **231**, 182–191.

Hu H, Brown PH, Labavitch JM. 1996. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. Journal of Experimental Botany **47**, 227–232.

Hu Y, Burucs Z, von Tucher S, Schmidhalter U. 2007. Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. Environmental and Experimental Botany **60**, 268–275.

Hu Y, Schmidhalter U. 2005. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science **168**, 541–549.

Huang C, Barker SJ, Langridge P, Smith FW, Graham RD. 2000. Zinc Deficiency Up-Regulates Expression of High-Affinity Phosphate Transporter Genes in Both Phosphate-Sufficient and -Deficient Barley Roots1. Plant Physiology **124**, 415–422.

Huang X-Y, Chao D-Y, Koprivova A, *et al.* 2016. Nuclear Localised MORE SULPHUR ACCUMULATION1 Epigenetically Regulates Sulphur Homeostasis in Arabidopsis thaliana. PLOS Genetics **12**, e1006298.

Hussain S, Khan AM, Rengel Z. 2019. Zinc-biofortified wheat accumulates more cadmium in grains than standard wheat when grown on cadmium-contaminated soil regardless of soil and foliar zinc application. Science of The Total Environment **654**, 402–408.

Iovieno P, Punzo P, Guida G, *et al.* 2016. Transcriptomic Changes Drive Physiological Responses to Progressive Drought Stress and Rehydration in Tomato. Frontiers in Plant Science **7**, 371.

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.

Jayakumar K, Jaleel CA. 2009. Uptake and accumulation of cobalt in plants: a study based on exogenous cobalt in soybean. Botany Research International **2**, 310–314.

Jayakumar K, Rajesh M, Baskaran L, 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.

Kamerlin SCL, Sharma PK, Prasad RB, Warshel A. 2013. Why nature really chose phosphate. Quarterly Reviews of Biophysics **46**, 1–132.

Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. 2017. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Research **45**, D353–D361.

Kareem F, Rihan H, Fuller M. 2017. The effect of exogenous applications of salicylic acid and molybdenum on the tolerance of drought in wheat. Agricultural Research and Technology **9**, 555768.

Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H. 2004. Vacuolar Sulfate Transporters Are Essential Determinants Controlling Internal Distribution of Sulfate in Arabidopsis. The Plant Cell **16**, 2693–2704.

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

Khan GA, Bouraine S, Wege S, Li Y, de Carbonnel M, Berthomieu P, Poirier Y, Rouached H. 2014. Coordination between zinc and phosphate homeostasis involves the transcription factor PHR1, the phosphate exporter PHO1, and its homologue PHO1;H3 in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **65**, 871–884.

Khan R, Gul S, Hamayun M, Shah M, Sayyed A, Ismail H, Begum A, Gul H. 2016. Effect of foliar application of zinc and manganese on growth and some biochemical constituents of Brassica junceae grown under water stress. J. Agric. Environ. Sci **16**, 984–997.

Khoshgoftarmanesh AH, Schulin R, Chaney RL, Daneshbakhsh B, Afyuni M. 2010. Micronutrient-efficient genotypes for crop yield and nutritional quality in sustainable agriculture. A review. Agronomy for Sustainable Development **30**, 83–107.

Klingler JP, Batelli G, Zhu J-K. 2010. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. Journal of Experimental Botany **61**, 3199–3210.

Kobayashi T, Itai RN, Ogo Y, Kakei Y, Nakanishi H, Takahashi M, Nishizawa NK. 2009. The rice transcription factor IDEF1 is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes. The Plant Journal **60**, 948–961.

Kopylova E, Noé L, Touzet H. 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. Bioinformatics **28**, 3211–3217.

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.

Krämer U, Talke IN, Hanikenne M. 2007. Transition metal transport. FEBS Letters **581**, 2263–2272.

Krapp A. 2015. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. Current Opinion in Plant Biology **25**, 115–122.

Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A-S, Chaillou S, Ferrario-Méry S, Meyer C, Daniel-Vedele F. 2014. Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany **65**, 789–798.

Krouk G, Lacombe B, Bielach A, *et al.* 2010. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. Developmental Cell **18**, 927–937.

Kuhn M. 2008. Building predictive models in R using the caret package. Journal of statistical software **28**, 1–26.

Kumar S, Kumar S, Mohapatra T. 2021. Interaction Between Macro- and Micro-Nutrients in Plants. Frontiers in Plant Science **12**, 753.

Kunert KJ, Vorster BJ, Fenta BA, Kibido T, Dionisio G, Foyer CH. 2016. Drought Stress Responses in Soybean Roots and Nodules. Frontiers in Plant Science **7**, 1015.

La VH, Lee B-R, Islam MdT, Park S-H, Jung H, Bae D-W, Kim T-H. 2019. Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses: Reactive oxygen species, proline, and redox state in Brassica napus. Environmental and Experimental Botany **157**, 1–10.

Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, *et al.* 2003. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in Arabidopsis thaliana. Nature Biotechnology **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.

Lambers H, Plaxton WC. 2015. Phosphorus: back to the roots. Annual plant reviews **48**, 3–22.

Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U. 2005. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. The EMBO journal **24**, 4041–4051.

Lapis-Gaza HR, Jost R, Finnegan PM. 2014. Arabidopsis PHOSPHATE TRANSPORTER1 genes PHT1;8 and PHT1;9 are involved in root-to-shoot translocation of orthophosphate. BMC Plant Biology **14**, 334.

Lawlor DW. 2013. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. Journal of Experimental Botany **64**, 83–108.

Lê Cao K-A, González I, Déjean S. 2009. integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. Bioinformatics **25**, 2855–2856.

Lee B-R, Kim K-Y, Jung W-J, Avice J-C, Ourry A, Kim T-H. 2007. Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (Trifolium repens L.). Journal of Experimental Botany **58**, 1271–1279.

Lee BR, Li LS, Jung WJ, Jin YL, Avice JC, Ourry A, Kim TH. 2009. Water deficit-induced oxidative stress and the activation of antioxidant enzymes in white clover leaves. Biologia plantarum **53**, 505–510.

Lei GJ, Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Dong NY, Zheng SJ. 2014. Abscisic acid alleviates iron deficiency by promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in Arabidopsis. Plant, Cell & Environment **37**, 852–863.

Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. 1999. Molecular and functional regulation of two NO3– uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. The Plant Journal **18**, 509–519.

Léran S, Varala K, Boyer J-C, *et al.* 2014. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. Trends in Plant Science **19**, 5–9.

Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. 2nd edn. (Academic Press: New York).

Li L-G, Sokolov LN, Yang Y-H, Li D-P, Ting J, Pandy GK, Luan S. 2008. A Mitochondrial Magnesium Transporter Functions in Arabidopsis Pollen Development. Molecular Plant **1**, 675–685.

Li L, Tutone AF, Drummond RSM, Gardner RC, Luan S. 2001. A Novel Family of Magnesium Transport Genes in Arabidopsis. The Plant Cell **13**, 2761–2775.

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**.

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**, 114.

Liu S, Lv Z, Liu Y, Li L, Zhang L. 2018*a*. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in Arabidopsis thaliana. Genetics and Molecular Biology **41**, 624–637.

Liu H, Ren X, Zhu J, Wu X, Liang C. 2018*b*. Effect of exogenous abscisic acid on morphology, growth and nutrient uptake of rice (Oryza sativa) roots under simulated acid rain stress. Planta **248**, 647–659.

Liu C, Zhang X, Zhang K, *et al.* 2015. Comparative Analysis of the Brassica napus Root and Leaf Transcript Profiling in Response to Drought Stress. International Journal of Molecular Sciences **16**, 18752–18777.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- ΔΔCT method. methods **25**, 402–408.

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.

Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN. 2010. The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in Arabidopsis Roots. The Plant Cell **22**, 2219–2236.

Lopez-Delacalle M, Camejo DM, García-Martí M, Nortes PA, Nieves-Cordones M, Martínez V, Rubio F, Mittler R, Rivero RM. 2020. Using Tomato Recombinant Lines to Improve Plant Tolerance to Stress Combination Through a More Efficient Nitrogen Metabolism. Frontiers in Plant Science **10**, 1702.

Loutfy N, El-Tayeb MA, Hassanen AM, Moustafa MFM, Sakuma Y, Inouhe M. 2012. Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (Triticum aestivum). Journal of Plant Research **125**, 173–184.

Ma JF, Miyake Y, Takahashi E. 2001. Silicon as a beneficial element for crop plants. Studies in Plant Science **8**, 17–39.

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. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. Trends in Plant Science **11**, 392–397.

Ma JF, Yamaji N, Mitani-Ueno N. 2011. Transport of silicon from roots to panicles in plants. Proceedings of the Japan Academy, Series B **87**, 377–385.

Macduff JH, Jarvis SC, Larsson CM, Oscarson P. 1993. Plant growth in relation to the supply and uptake of NO3–: a comparison between relative addition rate and external concentration as driving variables. Journal of Experimental Botany **44**, 1475–1484.

Magno Massuia de Almeida L, Avice J-C, Morvan-Bertrand A, *et al.* 2021. High temperature patterns at the onset of seed maturation determine seed yield and quality in oilseed rape (Brassica napus L.) in relation to sulphur nutrition. Environmental and Experimental Botany **185**, 104400.

Maierhofer T, Lind C, Hüttl S, *et al.* 2014. A Single-Pore Residue Renders the Arabidopsis Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective. The Plant Cell **26**, 2554–2567.

Maillard A, Ali N, Schwarzenberg A, Jamois F, Yvin J-C, Hosseini SA. 2018. Silicon transcriptionally regulates sulfur and ABA metabolism and delays leaf senescence in barley under combined sulfur deficiency and osmotic stress. Environmental and Experimental Botany **155**, 394–410.

Maillard A, Diquelou S, Billard V, Laine 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**, 317.

Maillard A, Etienne P, Diquélou S, Trouverie J, Billard V, Yvin J-C, Ourry A. 2016*a*. 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*b*. 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.

Malagoli P, Laine P, Rossato L, 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. Annals of Botany **95**, 853–861.

Malvi UR. 2011. Interaction of micronutrients with major nutrients with special reference to potassium. Karnataka Journal of Agricultural Sciences **24**.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. Science **298**, 1912–1934.

Mao D-D, Tian L-F, Li L-G, Chen J, Deng P-Y, Li D-P, Luan S. 2008. AtMGT7: An Arabidopsis Gene Encoding a Low-Affinity Magnesium Transporter. Journal of Integrative Plant Biology **50**, 1530–1538.

Mar C. 2020. Transcriptomic Response to Water Deficit Reveals a Crucial Role of Phosphate Acquisition in a Drought-Tolerant Common Bean Landrace. **9**, 445.

Marschner P (Ed.). 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd Edition. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.

Martínez JP, Silva H, Ledent JF, Pinto M. 2007. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (Phaseolus vulgaris L.). European Journal of Agronomy **26**, 30–38.

Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H. 2004. Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. Journal of Experimental Botany **55**, 1843–1849.

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. Dordrecht: Springer Netherlands, 43–54.

Mateus NS, Florentino AL, Oliveira JB, Santos EF, Gaziola SA, Rossi ML, Linhares FS, Bendassolli JA, Azevedo RA, Lavres J. 2021*a*. Leaf 13C and 15N composition shedding light on easing drought stress through partial K substitution by Na in eucalyptus species. Scientific Reports **11**, 20158.

Mateus N de S, Florentino AL, Santos EF, Ferraz A de V, Goncalves JL de M, Lavres J. 2021*b*. Partial Substitution of K by Na Alleviates Drought Stress and Increases Water Use Efficiency in Eucalyptus Species Seedlings. Frontiers in Plant Science **12**, 219.

Mayer JE, Pfeiffer WH, Beyer P. 2008. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. Current Opinion in Plant Biology **11**, 166–170.

McLean E, Egli I, Cogswell M, Benoist B de, Wojdyla D. 2007. Worldwide prevalence of anemia in preschool aged children, pregnant women and non-pregnant women of reproductive age. Nutritional anemia, 1–12.

Meng S, Zhang C, Su L, Li Y, Zhao Z. 2016. Nitrogen uptake and metabolism of Populus simonii in response to PEG-induced drought stress. Environmental and Experimental Botany **123**, 78–87.

Michaletti A, Naghavi MR, Toorchi M, Zolla L, Rinalducci S. 2018. Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. Scientific Reports **8**, 5710.

Mishra AK, Singh VP. 2010. A review of drought concepts. Journal of Hydrology **391**, 202–216.

Misra BB, Reichman SM, Chen S. 2019. The guard cell ionome: Understanding the role of ions in guard cell functions. Progress in Biophysics and Molecular Biology **146**, 50–62.

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.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science **7**, 405–410.

Monjezi F, Vazin F, Hassanzadehdelouei M. 2013. Effects of iron and zinc spray on yield and yield components of wheat (Triticum aestivum L.) in drought stress. Cercetari agronomice in Moldova **46**, 23–32.

Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li L, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinot ML. 2009. The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in Arabidopsis. The Plant Cell **21**, 3326–3338.

Munné-Bosch S, Alegre L. 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. Functional Plant Biology **31**, 203.

Muños S, Cazettes C, Fizames C, Gaymard F, Tillard P, Lepetit M, Lejay L, Gojon A. 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[W]. The Plant Cell **16**, 2433–2447.

Myers SS, Smith MR, Guth S, Golden CD, Vaitla B, Mueller ND, Dangour AD, Huybers P. 2017. Climate change and global food systems: potential impacts on food security and undernutrition. Annual review of public health **38**, 259–277.

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.

Nadeem M, Li J, Yahya M, Sher A, Ma C, Wang X, Qiu L. 2019. Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes: A Review. International Journal of Molecular Sciences **20**, 2541.

Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, *et al.* 2014. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. The Plant Journal **77**, 367–379.

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.

Nawaz F, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA, Shabbir RN, Bukhari MA. 2015. Supplemental selenium improves wheat grain yield and quality through alterations in biochemical processes under normal and water deficit conditions. Food Chemistry **175**, 350–357.

Nestel P, Bouis HE, Meenakshi JV, Pfeiffer W. 2006. Biofortification of Staple Food Crops. The Journal of Nutrition **136**, 1064–1067.

Neugebauer K, Broadley MR, El-Serehy HA, George TS, McNicol JW, Moraes MF, White PJ. 2018. Variation in the angiosperm ionome. Physiologia Plantarum **163**, 306–322.

Neupane P, Bhuju S, Thapa N, Bhattarai HK. 2019. ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. Biomolecular Concepts **10**, 1–10.

Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V, Rubio F. 2014. K+ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. Journal of Plant Physiology **171**, 688–695.

Nieves-Cordones M, Ródenas R, Chavanieu A, Rivero RM, Martinez V, Gaillard I, Rubio F. 2016. Uneven HAK/KUP/KT Protein Diversity Among Angiosperms: Species Distribution and Perspectives. Frontiers in Plant Science **7**, 127.

Nishida S, Aisu A, Mizuno T. 2012. Induction of IRT1 by the nickel-induced iron-deficient response in Arabidopsis. Plant signaling & behavior **7**, 329–331.

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.

Nussaume L, Kanno S, Javot H, Marin E, Nakanishi TM, Thibaud M-C. 2011. Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters. Frontiers in Plant Science **2**, 83.

van Oijen T, van Leeuwe MA, Gieskes WW, de Baar HJ. 2004. Effects of iron limitation on photosynthesis and carbohydrate metabolism in the Antarctic diatom Chaetoceros brevis (Bacillariophyceae). European Journal of Phycology **39**, 161–171.

Olle M, Bender I. 2009. Causes and control of calcium deficiency disorders in vegetables: a review. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology **84**, 577–584.

Olsen L, Palmgren M. 2014. Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed. Frontiers in Plant Science **5**, 30.

O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG. 2004. RHAMNOGALACTURONAN II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide. Annual Review of Plant Biology **55**, 109–139.

Osakabe Y, Arinaga N, Umezawa T, *et al.* 2013. Osmotic Stress Responses and Plant Growth Controlled by Potassium Transporters in Arabidopsis. The Plant Cell **25**, 609–624.

Padmalatha KV, Dhandapani G, Kanakachari M, *et al.* 2012. Genome-wide transcriptomic analysis of cotton under drought stress reveal significant down-regulation of genes and pathways involved in fibre elongation and up-regulation of defense responsive genes. Plant Molecular Biology **78**, 223–246.

Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, *et al.* 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. Nature Biotechnology **23**, 482–487.

Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M. 2015. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. Frontiers in Plant Science **6**, 723.

Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, Gauthier C, Jacques P-É, Li S, Xia J. 2021. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. Nucleic Acids Research **49**, W388–W396.

Parent S-É, Parent LE, Egozcue JJ, *et al.* 2013*a*. The Plant Ionome Revisited by the Nutrient Balance Concept. Frontiers in Plant Science **4**.

Parent S-É, Parent LE, Rozane D-E, Natale W. 2013*b*. Plant ionome diagnosis using sound balances: case study with mango (Mangifera Indica). Frontiers in Plant Science **4**, 39.

Park S-H, Lee B-R, La VH, Mamun MA, Bae D-W, Kim T-H. 2021. Drought Intensity-Responsive Salicylic Acid and Abscisic Acid Crosstalk with the Sugar Signaling and Metabolic Pathway in Brassica napus. Plants **10**, 610.

Parry MA, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ. 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. Annals of botany **89**, 833–839.

Peng J, Gong J. 2014. Vacuolar sequestration capacity and long-distance metal transport in plants. Frontiers in plant science **5**, 19.

Pii Y, Cesco S, Mimmo T. 2015. Shoot ionome to predict the synergism and antagonism between nutrients as affected by substrate and physiological status. Plant Physiology and Biochemistry **94**, 48–56.

Pilon M, Cohu CM, Ravet K, Abdel-Ghany SE, Gaymard F. 2009. Essential transition metal homeostasis in plants. Current opinion in plant biology **12**, 347–357.

Pinto E, Ferreira IMPLVO. 2015. Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. Journal of Plant Physiology **179**, 64–82.

Plaxton WC, Tran HT. 2011. Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants. Plant Physiology **156**, 1006–1015.

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**, 458.

Pourjafar L, Zahedi H, Sharghi Y. 2016. Effect of foliar application of nano iron and manganese chelated on yield and yield component of canola (Brassica napus L.) under water deficit stress at different plant growth stages. Agricultural Science Digest **36**, 172–178.

del Pozo T, Cambiazo V, González M. 2010. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in Arabidopsis thaliana. Biochemical and Biophysical Research Communications **393**, 248–252.

Price AH, Hendry G a. F. 1991. Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. Plant, Cell & Environment **14**, 477–484.

Prudent M, Vernoud V, Girodet S, Salon C. 2016. How nitrogen fixation is modulated in response to different water availability levels and during recovery: A structural and functional study at the whole plant level. Plant and Soil **399**, 1–12.

Puig S, Andrés-Colás N, García-Molina A, Peñarrubia L. 2007. Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. Plant, Cell & Environment **30**, 271–290.

Qaderi MM, Kurepin LV, Reid DM. 2006. Growth and physiological responses of canola (Brassica napus) to three components of global climate change: temperature, carbon dioxide and drought. Physiologia Plantarum **128**, 710–721.

Qaderi MM, Kurepin LV, Reid DM. 2012. Effects of temperature and watering regime on growth, gas exchange and abscisic acid content of canola (Brassica napus) seedlings. Environmental and Experimental Botany **75**, 107–113.

Ranjan A, Pandey N, Lakhwani D, Dubey NK, Pathre UV, Sawant SV. 2012. Comparative transcriptomic analysis of roots of contrasting Gossypium herbaceum genotypes revealing adaptation to drought. BMC Genomics **13**, 680.

Rasheed S, Bashir K, Matsui A, Tanaka M, Seki M. 2016. Transcriptomic Analysis of Soil-Grown Arabidopsis thaliana Roots and Shoots in Response to a Drought Stress. Frontiers in Plant Science **7**, 180.

Rathke G-W, Christen O, Diepenbrock W. 2005. Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (Brassica napus L.) grown in different crop rotations. Field Crops Research **94**, 103–113.

Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, Vilo J. 2019. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). Nucleic Acids Research **47**, W191–W198.

Rawat N, Neelam K, Tiwari VK, Dhaliwal HS. 2013. Biofortification of cereals to overcome hidden hunger. Plant Breeding **132**, 437–445.

Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM. 1999. AtAMT1 gene expression and NH4+ uptake in roots of Arabidopsis thaliana: evidence for regulation by root glutamine levels. The Plant Journal **19**, 143–152.

Raza S, Farrukh Saleem M, Mustafa Shah G, Jamil M, Haider Khan I. 2013. Potassium applied under drought improves physiological and nutrient uptake performances of wheat (Triticum Aestivun L.). Journal of soil science and plant nutrition **13**, 175–185.

Raza MAS, Saleem MF, Ashraf MY, Ali A, Asghar HN. 2012. Glycinebetaine applied under drought improved the physiological efficiency of wheat (Triticum aestivum L.) plant. Soil Environ **31**, 67–71.

Raza MAS, Shahid AM, Muhammad I, Khan IH, Saleem MF, Salman A. 2015. Studies on Canola (Brassica napus L.) and Camelina (Camelina sativa L.) under different irrigation levels. Journal of Agricultural and Biological Science **10**, 130–138.

Raza MAS, Shahid AM, Saleem MF, Khan IH, Ahmad S, Ali M, Iqbal R. 2017. Effects and management strategies to mitigate drought stress in oilseed rape (Brassica napus L.): a review. Zemdirbyste-Agriculture **104**, 85–94.

Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology **161**, 1189–1202.

Ricachenevsky FK, de Araújo Junior AT, Fett JP, Sperotto RA. 2018. You shall not pass: root vacuoles as a symplastic checkpoint for metal translocation to shoots and possible application to grain nutritional quality. Frontiers in plant science **9**, 412.

Rigaill G, Balzergue S, Brunaud V, *et al.* 2018. Synthetic data sets for the identification of key ingredients for RNA-seq differential analysis. Briefings in Bioinformatics **19**, 65–76.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics **26**, 139–140.

Rodríguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O. 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotecnología Aplicada **22**, 1–10.

Rogers EE, Guerinot ML. 2002. FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in Arabidopsis. The Plant Cell **14**, 1787–1799.

Rohart F, Gautier B, Singh A, Cao K-AL. 2017. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. PLOS Computational Biology **13**, e1005752.

Roser M, Ritchie H, Ortiz-Ospina E. 2013. World Population Growth. Our World in Data.

Rouached H, Secco D, Arpat B, Poirier Y. 2011. The transcription factor PHR1 plays a key role in the regulation of sulfate shoot-to-root flux upon phosphate starvation in Arabidopsis. BMC Plant Biology **11**, 19.

Saito S, Uozumi N. 2020. Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients. Frontiers in Plant Science **11**, 44.

Saja-Garbarz D, Ostrowska A, Kaczanowska K, Janowiak F. 2021. Accumulation of Silicon and Changes in Water Balance under Drought Stress in Brassica napus var. napus L. Plants **10**, 280.

Salt DE. 2004. Update on Plant Ionomics. Plant Physiology **136**, 2451–2456.

Salt DE, Baxter I, Lahner B. 2008. Ionomics and the Study of the Plant Ionome. Annual Review of Plant Biology **59**, 709–733.

Sánchez-Rodríguez E, del Mar Rubio-Wilhelmi M, Cervilla LM, Blasco B, Rios JJ, Leyva R, Romero L, Ruiz JM. 2010. Study of the ionome and uptake fluxes in cherry tomato plants under moderate water stress conditions. Plant and Soil **335**, 339–347.

Sarda X, Diquelou S, Abdallah M, Nesi N, Cantat O, Gouee PL, Avice JC, Ourry A. 2013. Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. The Journal of Agricultural Science **152**, 616–633.

Sasaki A, Yamaji N, Ma JF. 2016. Transporters involved in mineral nutrient uptake in rice. Journal of Experimental Botany **67**, 3645–3653.

Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma JF. 2012. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. The Plant Cell **24**, 2155–2167.

Schaaf G, Honsbein A, Meda AR, Kirchner S, Wipf D, Wirén N von. 2006. AtIREG2 Encodes a Tonoplast Transport Protein Involved in Iron-dependent Nickel Detoxification in Arabidopsis thaliana Roots *. Journal of Biological Chemistry **281**, 25532–25540.

Schachtman D, Liu W. 1999. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. Trends in plant science **4**, 281–287.

Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM. 1998. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. Plant Physiology **116**, 447–453.

Schaub P, Al-Babili S, Drake R, Beyer P. 2005. Why Is Golden Rice Golden (Yellow) Instead of Red? Plant Physiology **138**, 441–450.

Scheible W-R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M. 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 Physiology **136**, 2483–2499.

Schiavon M, Pittarello M, Pilon-Smits EAH, Wirtz M, Hell R, Malagoli M. 2012. Selenate and molybdate alter sulfate transport and assimilation in Brassica juncea L. Czern.: Implications for phytoremediation. Environmental and Experimental Botany **75**, 41–51.

Schläpfer P, Zhang P, Wang C, *et al.* 2017. Genome-Wide Prediction of Metabolic Enzymes, Pathways, and Gene Clusters in Plants. Plant Physiology **173**, 2041–2059.

Seneviratne SI, Lüthi D, Litschi M, Schär C. 2006. Land-atmosphere coupling and climate change in Europe. Nature **443**, 205–209.

Shakoor N, Ziegler G, Dilkes BP, Brenton Z, Boyles R, Connolly EL, Kresovich S, Baxter I. 2016. Integration of experiments across diverse environments identifies the genetic determinants of variation in Sorghum bicolor seed element composition. Plant physiology **170**, 1989–1998.

Shao H-B, Chu L-Y, Jaleel CA, Zhao C-X. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. Comptes Rendus Biologies **331**, 215–225.

Shariatipour N, Heidari B, Ravi S, Stevanato P. 2021. Genomic analysis of ionome-related QTLs in Arabidopsis thaliana. Scientific Reports **11**, 19194.

Sharma P, Dubey RS. 2005. Drought Induces Oxidative Stress and Enhances the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings. Plant Growth Regulation **46**, 209–221.

Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu J-K. 2002. The Putative Plasma Membrane Na+/H+ Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na+ Transport in Plants. The Plant Cell **14**, 465–477.

Shibagaki N, Grossman AR. 2006. The Role of the STAS Domain in the Function and Biogenesis of a Sulfate Transporter as Probed by Random Mutagenesis *. Journal of Biological Chemistry **281**, 22964–22973.

Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T, Hayashi H, Yoneyama T, Davies JP. 2002. Selenate-resistant mutants of Arabidopsis thaliana identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. The Plant Journal **29**, 475–486.

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.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany **58**, 221–227.

da Silva EC, Nogueira R, da Silva MA, de Albuquerque MB. 2011. Drought stress and plant nutrition. Plant stress **5**, 32–41.

Simova-Stoilova L, Vassileva V, Feller U. 2016. Selection and Breeding of Suitable Crop Genotypes for Drought and Heat Periods in a Changing Climate: Which Morphological and Physiological Properties Should Be Considered? Agriculture **6**, 26.

Smith FW, Ealing PM, Hawkesford MJ, Clarkson DT. 1995. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. Proceedings of the National Academy of Sciences **92**, 9373–9377.

Soares JC, Santos CS, Carvalho SMP, Pintado MM, Vasconcelos MW. 2019. Preserving the nutritional quality of crop plants under a changing climate: importance and strategies. Plant and Soil **443**, 1–26.

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.

Stein AJ. 2010. Global impacts of human mineral malnutrition. Plant and Soil **335**, 133–154.

Stich B, Benke A, Schmidt M, Urbany C, Shi R, von Wirén N. 2020. The maize shoot ionome: its interaction partners, predictive power, and genetic determinants. Plant, Cell & Environment **43**, 2095–2111.

Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. 2011. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. PLOS ONE **6**, e21800.

Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science **15**, 89–97.

Tahir MA, Rahmatullah T, Aziz M, Ashraf S, Kanwal S, Maqsood MA. 2006. Beneficial effects of silicon in wheat (Triticum aestivum L.) under salinity stress. Pakistan Journal of Botany **38**, 1715–1722.

Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Smith FW, Blake-Kalff M, Hawkesford MJ, Saito K. 2000. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in Arabidopsis thaliana. The Plant Journal **23**, 171–182.

Tanguilig VC, Yambao EB, O'toole JC, De Datta SK. 1987. Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake of rice, maize, and soybean. Plant and Soil **103**, 155–168.

Tardieu F. 2005. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. Comptes Rendus Geoscience **337**, 57–67.

Tardieu F. 2012. Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. Journal of Experimental Botany **63**, 25–31.

Tardieu F. 2013. Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. Frontiers in Physiology **4**, 17.

Tardieu F, Granier C, Muller B. 2011. Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? Current Opinion in Plant Biology **14**, 283–289.

Tardieu F, Simonneau T. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. Journal of experimental botany, 419–432.

Taulemesse F, Le Gouis J, Gouache D, Gibon Y, Allard V. 2015. Post-Flowering Nitrate Uptake in Wheat Is Controlled by N Status at Flowering, with a Putative Major Role of Root Nitrate Transporter NRT2.1 (H Yang, Ed.). PLOS ONE **10**, e0120291.

Tejada-Jiménez M, Galván A, Fernández E, Llamas Á. 2009. Homeostasis of the micronutrients Ni, Mo and Cl with specific biochemical functions. Current Opinion in Plant Biology **12**, 358–363.

Tejada-Jiménez M, Llamas Á, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E. 2007. A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 20126–20130.

Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M. 2004. mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. The Plant Journal **37**, 914–939.

Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H. 2003. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. The Plant Journal **34**, 685–695.

Thomine S, Vert G. 2013. Iron transport in plants: better be safe than sorry. Current Opinion in Plant Biology **16**, 322–327.

Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. Proceedings of the National Academy of Sciences **97**, 4991–4996.

Tomatsu H, Takano J, Takahashi H, Watanabe-Takahashi A, Shibagaki N, Fujiwara T. 2007. An Arabidopsis thaliana high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**, 18807–18812.

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**, 464.

Troll W, Lindsley J. 1955. A photometric method for the determination of proline. Journal of biological chemistry **215**, 655–660.

Trygg J, Wold S. 2002. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). Journal of Chemometrics **16**, 119–128.

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.

Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M. 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. Nature Methods **12**, 523–526.

Usadel B, Poree F, Nagel A, Lohse M, Czedik-Eysenberg A, Stitt M. 2009. A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize. Plant, Cell & Environment **32**, 1211–1229.

Velu G, Guzman C, Mondal S, Autrique JE, Huerta J, Singh RP. 2016. Effect of drought and elevated temperature on grain zinc and iron concentrations in CIMMYT spring wheat. Journal of Cereal Science **69**, 182–186.

Verma TS, Minhas RS. 1987. Zinc and phosphorus interaction in a wheat-maize cropping system. Fertilizer research **13**, 77–86.

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J-K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. The Plant Journal **45**, 523–539.

Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat J-F, Curie C. 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. The Plant Cell **14**, 1223–1233.

Véry A-A, Nieves-Cordones M, Daly M, Khan I, Fizames C, Sentenac H. 2014. Molecular biology of K+ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? Journal of Plant Physiology **171**, 748–769.

Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass ADM. 2000. Regulation of High-Affinity Nitrate Transporter Genes and High-Affinity Nitrate Influx by Nitrogen Pools in Roots of Barley1. Plant Physiology **123**, 307–318.

Vigani G, Briat J-F. 2016. Impairment of Respiratory Chain under Nutrient Deficiency in Plants: Does it Play a Role in the Regulation of Iron and Sulfur Responsive Genes? Frontiers in Plant Science **6**, 1185.

Vigneau N, Ecarnot M, Rabatel G, Roumet P. 2011. Potential of field hyperspectral imaging as a non destructive method to assess leaf nitrogen content in Wheat. Field Crops Research **122**, 25–31.

Wang L, Chen K, Zhou M. 2021. Structure and function of an Arabidopsis thaliana sulfate transporter. Nature Communications **12**, 4455.

Wang W, Ding G, White PJ, Wang M, Zou J, Xu F, Hammond JP, Shi L. 2020. Genetic dissection of the shoot and root ionomes of Brassica napus grown with contrasting phosphate supplies. Annals of Botany **126**, 119–140.

Wang Y-Y, Hsu P-K, Tsay Y-F. 2012. Uptake, allocation and signaling of nitrate. Trends in Plant Science **17**, 458–467.

Wang P, Yang C, Chen H, Song C, Zhang X, Wang D. 2017. Transcriptomic basis for drought-resistance in Brassica napus L. Scientific Reports **7**, 40532.

Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S. 2013. The critical role of potassium in plant stress response. International journal of molecular sciences **14**, 7370–7390.

Waraich EA, Ahmad R, Ashraf MY. 2011. Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. Australian Journal of Crop Science **5**, 764.

Waters BM, Armbrust LC. 2013. Optimal copper supply is required for normal plant iron deficiency responses. Plant Signaling & Behavior **8**, e26611.

Waters BM, Chu H-H, DiDonato RJ, Roberts LA, Eisley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL. 2006. Mutations in Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 Reveal Their Roles in Metal Ion Homeostasis and Loading of Metal Ions in Seeds. Plant Physiology **141**, 1446–1458.

Welch RM, Graham RD. 2002. Breeding crops for enhanced micronutrient content. Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities. Springer, 267–276.

White PJ. 2018. Selenium metabolism in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1862**, 2333–2342.

White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants. Annals of botany **92**, 487–511.

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, Broadley MR, El-Serehy HA, George TS, Mc Nicol JW, Neugebauer K, Pongrac P, Carstensen A, Laursen KH, Schjoerring JK. 2017. Plant nutrients–the functional ionome. Proceedings book of the XVIII International Plant Nutrition Colloquium with Boron and Manganese Satellite Meetings (2017). Denmark: University of Copenhagen.59–60.

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**, e00272.

Wilhite DA. 2016. *Droughts: a global assesment*. London: Routledge.

Williams L, Salt DE. 2009. The plant ionome coming into focus. Current opinion in plant biology **12**, 247–249.

World Bank. 2006. Repositioning Nutrition as Central to Development: A Strategy for Large-Scale Action. World Bank, Washington, DC

World Health Organization. 2000. The world health report 2000: health systems: improving performance. World Health Organization.

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.

Xu Z, Zhou G, Shimizu H. 2010. Plant responses to drought and rewatering. Plant Signaling & Behavior **5**, 649–654.

Xuan W, Beeckman T, Xu G. 2017. Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. Current Opinion in Plant Biology **39**, 57–65.

Yong H-Y, Zou Z, Kok E-P, Kwan B-H, Chow K, Nasu S, Nanzyo M, Kitashiba H, Nishio T. 2014. Comparative Transcriptome Analysis of Leaves and Roots in Response to Sudden Increase in Salinity in Brassica napus by RNA-seq. BioMed Research International **2014**, e467395.

Yruela I. 2013. Transition metals in plant photosynthesis. Metallomics **5**, 1090–1109.

Zandipour E, Norozei AH, Bostani A. 2018. Effect of Zinc and Iron Foliar Application with Two Levels of Irrigation Water Acidity on the Quantitative and Qualitative Parameters of Wheat (triticum Aestivum L.). Applied Ecology and Environmental Research **16**, 3097–3112.

Zargar SM, Gupta N, Nazir M, Mahajan R, Malik FA, Sofi NR, Shikari AB, Salgotra RK. 2017. Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. Plant Gene **11**, 154–159.

Zelazny E, Vert G. 2015. Regulation of iron uptake by IRT1: endocytosis pulls the trigger. Molecular plant **8**, 977–979.

Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM. 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. Field Crops Research **97**, 111–119.

Zhang J, Mason AS, Wu J, Liu S, Zhang X, Luo T, Redden R, Batley J, Hu L, Yan G. 2015. Identification of Putative Candidate Genes for Water Stress Tolerance in Canola (Brassica napus). Frontiers in Plant Science **6**.

Zhao F, Evans EJ, Bilsborrow PE, Syers JK. 1993. Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (Brassica napus L). Journal of the Science of Food and Agriculture **63**, 29–37.

Zhao XQ, Mitani N, Yamaji N, Shen RF, Ma JF. 2010. Involvement of Silicon Influx Transporter OsNIP2;1 in Selenite Uptake in Rice. Plant Physiology **153**, 1871–1877.

Zhou X, Yang J, Kronzucker HJ, Shi W. 2020. Selenium Biofortification and Interaction With Other Elements in Plants: A Review. Frontiers in Plant Science **11**, 1741.

Zhu M, Monroe JG, Suhail Y, *et al.* 2016. Molecular and systems approaches towards drought-tolerant canola crops. New Phytologist **210**, 1169–1189.

Zimmer W, Mendel R. 1999. Molybdenum metabolism in plants. Plant biology **1**, 160–168.

Annexes

Chapitre III

Article 1

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.

	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 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).

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

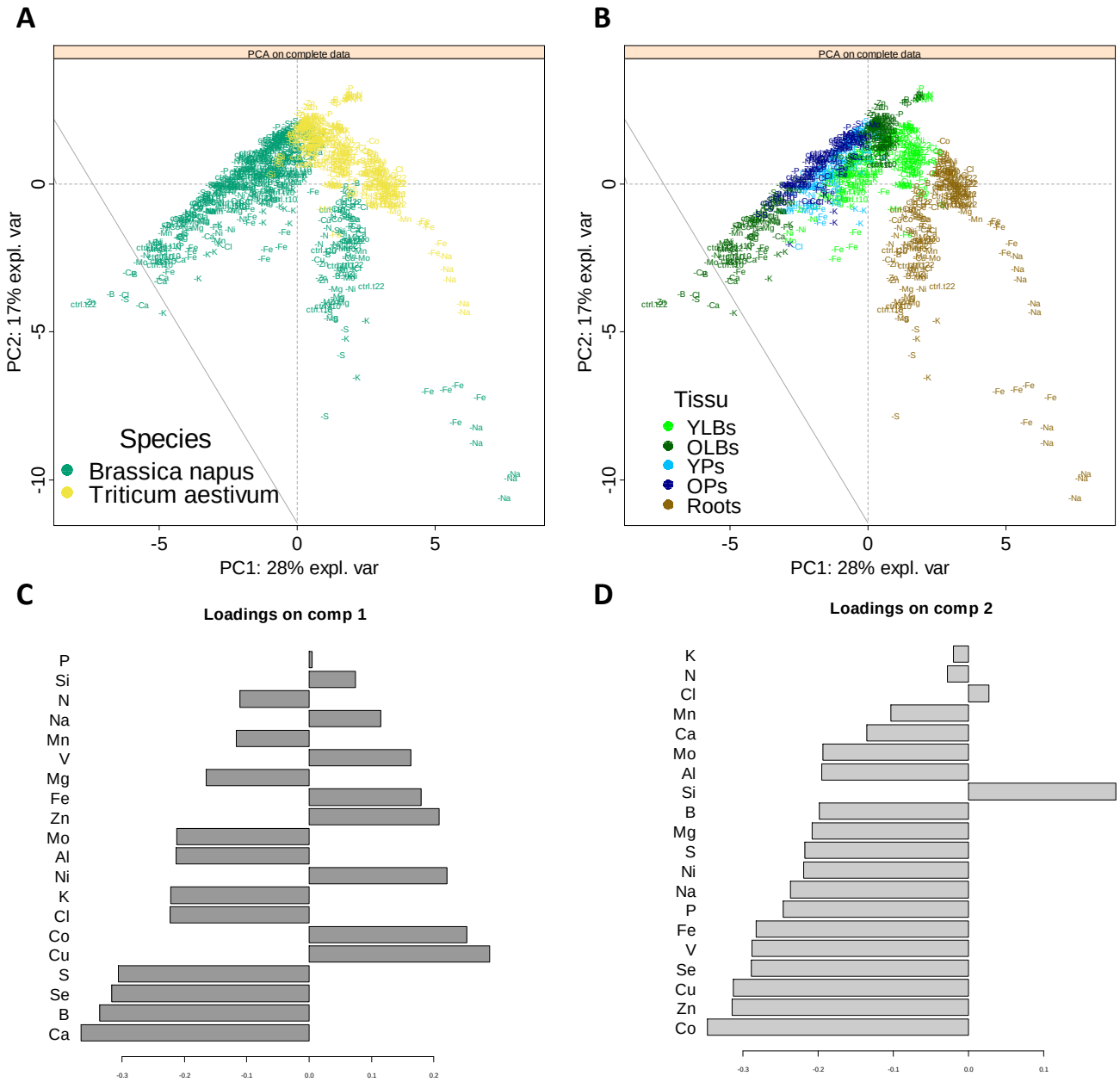
Nutrients	Elemental concentrations (µM) of deprived solutions :						
	Control	-N	-Mg	-P	-S	-K	-Ca
N	3500	0.048	3500	3500	3500	3500	3500
Mg	400	400	0	400	400	400	400
P	200	200	200	0	200	200	200
S	507	507	507	507	0	507	507
K	1500	1500	1500	1500	1500	0	4700
Ca	2110	1690	2100	2070	1970	2500	0
B	10	10	10	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

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).

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 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.



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.

		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 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”).

					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

Chapitre IV

Soil properties	Methods of anaysis	Value
Exchangeable CaO (‰)	NFX 31-108 - ICP AES	2.14
Total nitrogen (‰)	NF ISO 13 878 - Dumas method	1.22
Exchangeable MgO (‰)	NFX 31-108 - ICP AES	0.46
P_2O_5 (‰)	NFX 31-160 - Dyer method	0.18
Exchangeable K_2O (‰)	NFX 31-108 - ICP AES	0.093
SO_3 (KH_2PO_4) (mg/Kg)	Extr. KH2PO4 - ICP AES	186
P_2O_5 (‰)	NFX 31-161 - Joret Hébert method	0.076
Exchangeable Na_2O (‰)	NFX 31-108 - ICP AES	0.035
P_2O_5 (‰)	NF ISO 11263 - Olsen method	0.048
Cu EDTA (mg/Kg)	NFX 31-120 - ICP AES	1.2
Soluble boron Eau (mg/Kg)	NFX 31-122	0.16
Fe EDTA (mg/Kg)	NFX 31-120 - ICP AES	49.1
Mn EDTA (mg/Kg)	NFX 31-120 - ICP AES	23.8
Zn EDTA (mg/Kg)	NFX 31-120 - ICP AES	1.4
Clay (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	31
C/N	NF ISO 13 878 - Dumas method	42.9
Organic carbon (‰)	NF ISO 14 235	52.3
CEC (me/Kg)	NFX 31-130 - Metson method	110
Fine silt (s.déc) (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	24
Coarse silt (s.déc) (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	6.1
Organic matter (‰)	NF ISO 14 235	90.4
Water pH	NF ISO 10 390	6.2
KCl pH	NF ISO 10 390	5.9
Fine sand (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	36
Coarse sand (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	903

Supplementary Data 1. Physical and chemical soil properties

Salts	Salt concentrations (µM)
KNO_3	1000
$Ca(NO_3)_2$ +4H_2O	1250
$Si(OH)_4$	900
HCl	600
$CaCl_2$ + 2H_2O	500
$MgSO_4$	400
$CaCO_3$	360
KH_2PO_4	200
Na_2SiO_3	200
K_2SO_4	100
KCl	100
NaFe-EDTA 3H_2O	50
NaFe-EDDHA	50
H_3BO_3	10
$MnSO_4$	3
$ZnSO_4$	3
$CuSO_4$	0.7
$NiCl_2$	0.15
$CoCl_2$	0.1
Na_2SeO_4	0.01
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.008

Nutrients	Elemental concentrations in solution (µM)	input kg ha^{-1}
N	3500	40
Mg	400	8
P	200	5
S	507	13
K	1500	48
Ca	2110	69
B	10	0.09
Cl	2001	58
Mn	3	0.13
Fe	100	5
Ni	0.15	0.007
Cu	0.7	0.04
Zn	3	0.16
Mo	0.056	0.004
Na	500	9
Al		
Si	1100	25
V		
Co	0.1	0.005
Se	0.01	0.001

Supplementary Data 2. Composition of the nutrient solution derived from Hoagland nutrient solution and adapted to ensure the plants' mineral needs during the experiment. Elemental concentrations were kept balanced in solution to provide 40 kg N ha-1 to ensure a non-limiting mineral condition for all the experiments.

Supplementary Data 3. En raison de la dimension du fichier, ces données supplémentaires ne sont pas fournies ici et seront accessibles via un lien url dès lors que l'article sera accepté auprès de Plant Direct.

		Brassica napus				*Triticum aestivum*			
		t1.40	**t1.25**	**t2.40**	**t2.25**	**t1.40**	**t1.25**	**t2.40**	**t2.25**
Macronutrients	N	123 689 ± 8 362	372 193 ± 14 807	489 435 ± 8 875	502 777 ± 7 307	26 363 ± 1 529	63 970 ± 2 612	114 521 ± 4 646	131 992 ± 3 288
	Mg	9 021 ± 649	37 259 ± 3 098	100 253 ± 4 593	116 454 ± 3 955	1 357 ± 70	3 975 ± 154	8 572 ± 411	9 546 ± 258
	P	15 980 ± 1 005	58 839 ± 4 103	118 825 ± 3 266	141 920 ± 2 685	5 103 ± 308	12 957 ± 530	24 242 ± 1 088	29 618 ± 779
	S	29 266 ± 2 147	109 346 ± 6 971	224 718 ± 6 471	263 849 ± 3 257	1 933 ± 127	6 173 ± 297	10 727 ± 477	11 956 ± 347
	K	147 081 ± 8 720	572 973 ± 28 112	1 069 421 ± 20 025	989 043 ± 8 953	37 789 ± 2 220	79 959 ± 3 620	211 808 ± 8 280	228 772 ± 4 877
	Ca	53 782 ± 3 587	214 775 ± 12 340	466 304 ± 17 614	522 812 ± 8 627	2 194 ± 113	5 644 ± 205	13 320 ± 669	14 913 ± 373
Micronutrients	B	105 ± 8	381 ± 25	786 ± 23	928 ± 22	6.9 ± 0.3	21 ± 1	42 ± 2	53 ± 2
	Cl	27 079 ± 2 411	165 378 ± 17 806	441 428 ± 15 930	547 388 ± 4 555	4 202 ± 284	14 285 ± 689	31 629 ± 1 298	41 843 ± 1 449
	Mn	592 ± 47	2 817 ± 290	10 597 ± 450	10 741 ± 565	127 ± 7	368 ± 14	832 ± 38	931 ± 27
	Fe	548 ± 61	4 943 ± 651	22 167 ± 1 199	20 490 ± 1 576	780 ± 46	1 380 ± 53	3 112 ± 218	2 377 ± 98
	Ni	2.3 ± 0.2	6.8 ± 0.3	31.2 ± 2.5	18 ± 0.7	1.7 ± 0.1	3.1 ± 0.1	90 ± 2.8	91.6 ± 2.8
	Cu	11 ± 1	41 ± 3	93 ± 3	111 ± 2	11 ± 1	24 ± 1	40 ± 2	44 ± 1
	Zn	115 ± 8	423 ± 43	1 429 ± 58	1 590 ± 78	37 ± 2	100 ± 4	190 ± 7	206 ± 6
	Mo	10 ± 1	60 ± 4	120 ± 4	135 ± 3	2.6 ± 0.2	4.8 ± 0.16	26 ± 1.14	26 ± 0.7
Beneficial nutrients	Na	9 098 ± 593	36 839 ± 3 132	78 878 ± 2 980	103 369 ± 4 580	387 ± 26	978 ± 38	1 869 ± 91	2 391 ± 111
	Al	1 162 ± 118	6 266 ± 536	14 007 ± 748	17 218 ± 457	833 ± 68	1 782 ± 74	3 087 ± 153	3 307 ± 157
	Si	3 905 ± 452	17 550 ± 1 426	45 223 ± 2 987	56 644 ± 3 910	13 328 ± 844	32 235 ± 942	64 656 ± 2 919	60 686 ± 1 580
	V	0.69 ± 0.08	4.4 ± 0.45	6.1 ± 0.4	5.9 ± 0.41	1.3 ± 0.08	2.4 ± 0.09	5.1 ± 0.44	3.7 ± 0.17
	Co	1.4 ± 0.1	6 ± 0.7	16.8 ± 0.9	18.2 ± 1	0.66 ± 0.06	1.3 ± 0.1	4 ± 0.2	4.6 ± 0.1
	Se	0.8 ± 0.06	2.3 ± 0.1	5.1 ± 0.1	4 ± 0.1	0.13 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.69 ± 0.05	0.54 ± 0.02

Supplementary Data 4. Nutrient net uptake (NU) from t_0 in *B. napus* and *T. aestivum* control plants maintained at ≥ 80 % of FC. Data are expressed as the mean ± SE (n=25) in µg plant^{-1}.

Brassica napus

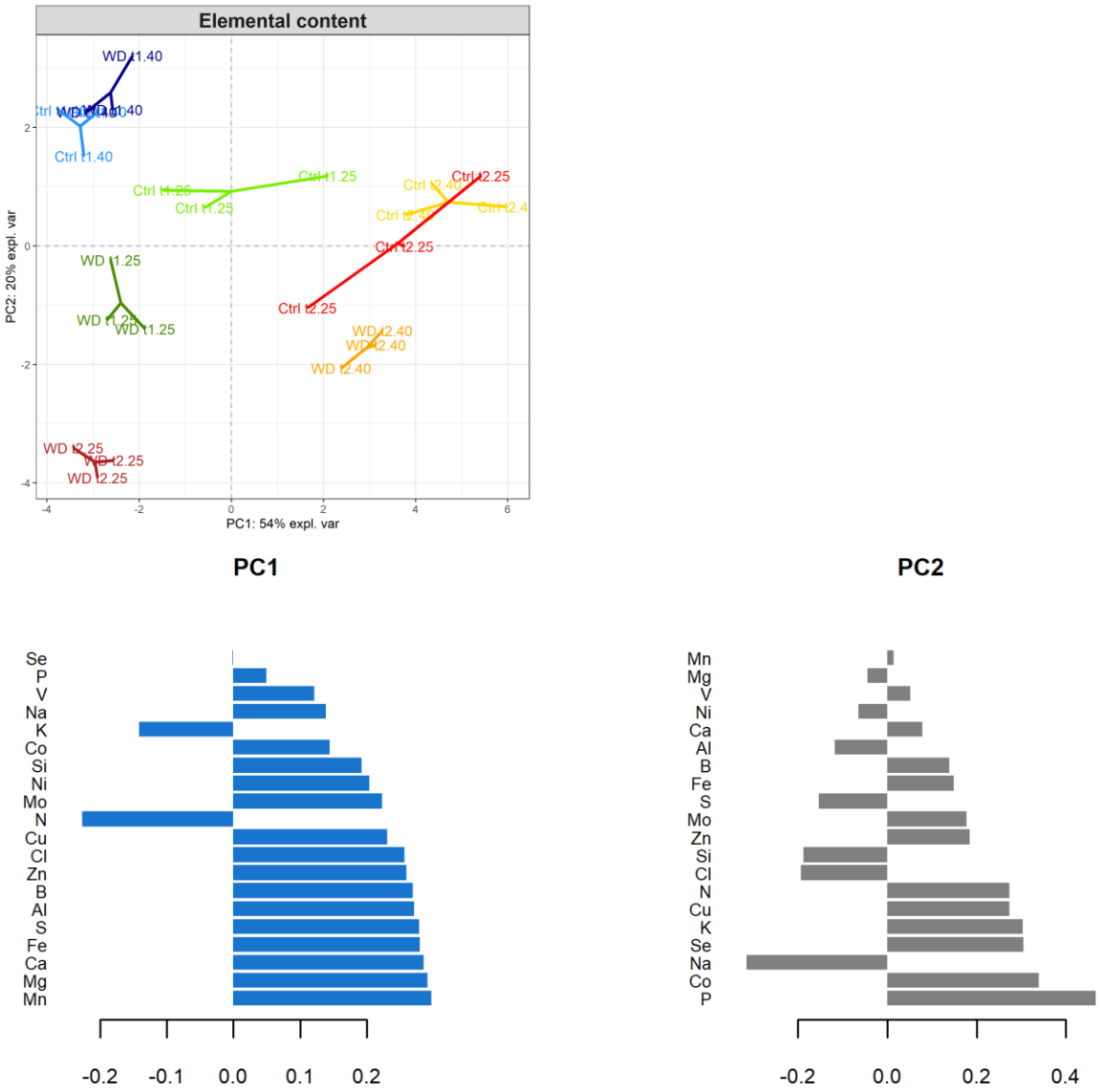
	t1.40					*t1.25*					*t2.40*					*t2.25*				
	YLBs	Yps	roots	OLBs	OPs	YLBs	Yps	roots	OLBs	OPs	YLBs	Yps	roots	OLBs	OPs	YLBs	Yps	roots	OLBs	OPs
N	68 504 ± 361	50 131 ± 215	25 633 ± 254	63 069 ± 244	49 727 ± 366	57 625 ± 915	46 386 ± 408	20 485 ± 239	54 798 ± 1 363	45 616 ± 992	42 552 ± 572	25 647 ± 255	15 259 ± 92	36 285 ± 826	32 994 ± 254	35 876 ± 451	19 387 ± 235	15 321 ± 51	29 933 ± 499	23 722 ± 417
Mg	3 933 ± 27	2 553 ± 17	1 094 ± 9	4 660 ± 29	4 444 ± 51	4 746 ± 119	3 697 ± 137	1 408 ± 33	5 532 ± 150	4 865 ± 242	6 721 ± 135	6 168 ± 92	1 526 ± 20	7 769 ± 231	6 604 ± 187	6 212 ± 202	6 069 ± 203	1 645 ± 15	7 479 ± 206	5 689 ± 163
P	9 431 ± 53	6 008 ± 35	5 313 ± 34	8 237 ± 79	4 621 ± 96	8 828 ± 97	4 953 ± 113	5 998 ± 55	8 461 ± 198	4 606 ± 97	8 960 ± 60	5 633 ± 26	5 982 ± 20	9 278 ± 102	5 208 ± 57	8 421 ± 140	5 483 ± 40	5 379 ± 98	9 487 ± 190	4 933 ± 89
S	11 864 ± 98	6 454 ± 21	5 227 ± 34	18 496 ± 123	7 481 ± 114	14 216 ± 135	6 791 ± 128	4 569 ± 55	21 633 ± 182	8 222 ± 278	17 742 ± 258	6 707 ± 75	4 013 ± 31	24 257 ± 198	8 085 ± 107	16 659 ± 364	7 046 ± 119	4 281 ± 22	24 517 ± 444	7 784 ± 147
K	48 990 ± 920	89 567 ± 1 682	24 388 ± 923	64 667 ± 937	84 953 ± 1 269	58 301 ± 1 209	96 313 ± 2 166	33 216 ± 603	79 608 ± 263	97 498 ± 2 219	38 353 ± 839	124 008 ± 1 528	28 256 ± 340	74 756 ± 1 139	112 171 ± 1 817	34 161 ± 1 014	79 283 ± 1 498	24 422 ± 898	70 557 ± 1 545	62 298 ± 1 394
Ca	18 098 ± 205	9 031 ± 58	5 049 ± 81	31 161 ± 123	20 843 ± 246	22 993 ± 227	12 284 ± 57	4 848 ± 71	38 624 ± 490	21 674 ± 1 033	30 734 ± 388	20 123 ± 348	4 968 ± 48	50 392 ± 912	25 144 ± 522	28 283 ± 657	18 361 ± 406	5 178 ± 77	50 488 ± 1 030	22 543 ± 397
B	43 ± 0.3	26 ± 0.1	18 ± 0.1	64 ± 0.7	25 ± 0.3	50 ± 0.5	26 ± 0.1	18 ± 0.2	74 ± 0.9	26 ± 0.3	58 ± 1.1	28 ± 0.2	17 ± 0.1	88 ± 1.2	25 ± 0.4	56 ± 1.3	30 ± 0.3	17 ± 0.2	87 ± 2	24 ± 0.1
Cl	7 659 ± 212	12 133 ± 374	2 298 ± 81	13 704 ± 353	11 355 ± 280	17 026 ± 816	21 154 ± 1 249	4 323 ± 225	22 836 ± 1 019	20 674 ± 1 253	23 556 ± 438	42 056 ± 624	5 097 ± 121	29 146 ± 601	32 162 ± 544	23 410 ± 388	38 564 ± 1 003	5 021 ± 128	31 458 ± 411	32 128 ± 389
Mn	226 ± 1	67 ± 0	63 ± 1	385 ± 4	119 ± 2	350 ± 18	129 ± 7	97 ± 4	544 ± 21	154 ± 11	827 ± 21	317 ± 8	119 ± 2	1 072 ± 32	324 ± 7	686 ± 41	261 ± 13	120 ± 3	956 ± 41	249 ± 13
Fe	155 ± 3	131 ± 6	678 ± 57	180 ± 13	318 ± 24	409 ± 69	83 ± 3	2 337 ± 171	399 ± 74	154 ± 18	1 803 ± 68	153 ± 5	1 402 ± 93	2 052 ± 103	489 ± 71	1 381 ± 121	171 ± 6	1 072 ± 62	1 439 ± 155	242 ± 8
Ni	0.61 ± 0.02	0.64 ± 0.02	2.04 ± 0.13	0.55 ± 0.03	1.47 ± 0.11	0.38 ± 0.01	0.92 ± 0.06	3.43 ± 0.19	0.46 ± 0.01	0.8 ± 0.02	5.49 ± 0.59	0.61 ± 0.04	2.56 ± 0.11	1.08 ± 0.17	1.22 ± 0.16	0.82 ± 0.03	0.73 ± 0.06	2.05 ± 0.09	0.63 ± 0	0.63 ± 0.03
Cu	7 ± 0.07	4 ± 0.05	7 ± 0.22	6 ± 0.03	3 ± 0.06	7 ± 0.11	3 ± 0.06	6 ± 0.05	5 ± 0.25	3 ± 0.13	9 ± 0.16	3 ± 0.04	6 ± 0.16	5 ± 0.06	4 ± 0.02	7 ± 0.16	4 ± 0.06	6 ± 0.26	4 ± 0.05	4 ± 0.09
Zn	76 ± 0.7	48 ± 0.4	52 ± 0.9	49 ± 0.5	48 ± 0.3	67 ± 4	40 ± 1	45 ± 0.4	45 ± 1.9	46 ± 1.7	133 ± 3.4	50 ± 1.1	44 ± 0.3	74 ± 2.3	71 ± 1.3	115 ± 6.4	50 ± 1	39 ± 0.9	66 ± 4.7	59 ± 2.4
Mo	4 ± 0.05	2 ± 0.03	3 ± 0.13	5 ± 0.09	4 ± 0.05	7 ± 0.2	4 ± 0.15	8 ± 0.4	8 ± 0.32	6 ± 0.28	7 ± 0.19	6 ± 0.08	5 ± 0.06	10 ± 0.3	8 ± 0.19	7 ± 0.36	5 ± 0.16	5 ± 0.16	10 ± 0.45	6 ± 0.16
Na	2 257 ± 35	6 063 ± 26	1 989 ± 81	3 086 ± 47	5 872 ± 58	3 213 ± 63	6 739 ± 145	2 622 ± 157	3 878 ± 127	7 121 ± 220	2 959 ± 129	8 235 ± 283	3 382 ± 73	4 532 ± 122	8 312 ± 143	3 012 ± 98	7 455 ± 375	4 905 ± 156	5 319 ± 194	7 846 ± 232
Al	326 ± 2	409 ± 5	831 ± 37	529 ± 17	546 ± 26	559 ± 12	540 ± 23	1 797 ± 193	696 ± 23	613 ± 27	636 ± 10	921 ± 15	1 767 ± 124	985 ± 54	831 ± 18	602 ± 6	844 ± 14	1 732 ± 116	858 ± 10	817 ± 14
Si	827 ± 7	701 ± 7	3 970 ± 328	1 554 ± 32	1 792 ± 160	1 042 ± 26	715 ± 8	10 029 ± 935	1 518 ± 23	991 ± 52	2 172 ± 217	921 ± 17	10 609 ± 769	4 060 ± 583	1 406 ± 78	1 242 ± 18	824 ± 7	13 894 ± 1 303	2 148 ± 147	1 028 ± 12
V	0.09 ± 0.003	0.08 ± 0.003	1.2 ± 0.073	0.15 ± 0.015	0.43 ± 0.037	0.05 ± 0.003	0.07 ± 0.004	4.14 ± 0.535	0.13 ± 0.004	0.17 ± 0.018	0.18 ± 0.021	0.08 ± 0.008	2.62 ± 0.28	0.53 ± 0.096	0.24 ± 0.012	0.06 ± 0.003	0.03 ± 0.001	1.8 ± 0.103	0.17 ± 0.011	0.2 ± 0.009
Co	0.86 ± 0.02	0.33 ± 0	1.31 ± 0.03	0.82 ± 0.01	0.34 ± 0	0.74 ± 0.06	0.29 ± 0.01	1.92 ± 0.08	0.77 ± 0.03	0.28 ± 0.01	1.15 ± 0.04	0.42 ± 0.01	2.4 ± 0.08	0.99 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.99 ± 0.06	0.49 ± 0.03	2.16 ± 0.07	0.81 ± 0.02	0.35 ± 0.02
Se	0.28 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.22 ± 0	0.33 ± 0	0.25 ± 0	0.35 ± 0	0.35 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.22 ± 0	0.3 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.22 ± 0	0.21 ± 0	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01

Triticum aestivum

	t1.40			t1.25			t2.40			t2.25		
	YLBs	roots	OLBs	YLBs	roots	OLBs	YLBs	roots	OLBs	YLBs	roots	OLBs
N	51 524 ± 177	30 242 ± 541	48 721 ± 165	47 033 ± 226	23 507 ± 498	41 105 ± 755	41 357 ± 173	17 679 ± 297	37 155 ± 634	40 936 ± 163	21 089 ± 564	36 262 ± 359
Mg	2 109 ± 26	1 741 ± 23	3 102 ± 27	2 383 ± 6	1 627 ± 34	3 708 ± 37	2 611 ± 26	1 671 ± 31	4 246 ± 51	2 599 ± 22	1 653 ± 21	4 250 ± 35
P	9 368 ± 34	6 464 ± 183	10 617 ± 90	8 861 ± 45	5 479 ± 149	10 438 ± 95	8 213 ± 68	4 525 ± 110	10 427 ± 100	8 289 ± 54	5 338 ± 68	14 245 ± 70
S	3 566 ± 18	2 708 ± 41	4 026 ± 22	4 187 ± 39	2 532 ± 43	3 970 ± 34	3 605 ± 20	2 391 ± 32	3 606 ± 28	3 481 ± 18	2 606 ± 21	3 423 ± 21
K	79 569 ± 214	35 152 ± 829	66 845 ± 394	59 759 ± 705	31 830 ± 1 083	56 857 ± 481	77 836 ± 1 472	26 504 ± 796	40 611 ± 1 004	70 410 ± 809	32 827 ± 514	54 610 ± 1 330
Ca	2 285 ± 35	3 784 ± 54	4 937 ± 58	2 687 ± 17	3 552 ± 70	6 540 ± 71	3 547 ± 43	3 934 ± 71	7 831 ± 111	3 624 ± 29	3 356 ± 80	8 609 ± 56
B	8 ± 0.14	6 ± 0.09	16 ± 0	11 ± 0.19	6 ± 0.07	23 ± 1	12 ± 0.19	6 ± 0.09	23 ± 0.23	15 ± 0.21	5 ± 0.06	24 ± 1
Cl	8 843 ± 63	3 498 ± 96	8 831 ± 56	10 173 ± 85	3 606 ± 71	8 584 ± 45	10 811 ± 269	4 090 ± 100	10 041 ± 156	11 950 ± 127	5 669 ± 111	12 550 ± 202
Mn	144 ± 3	217 ± 4	256 ± 2	179 ± 1	242 ± 4	356 ± 5	225 ± 2	260 ± 9	420 ± 7	224 ± 2	276 ± 9	390 ± 3
Fe	139 ± 6	3 228 ± 184	383 ± 21	234 ± 16	3 176 ± 156	482 ± 16	477 ± 10	2 930 ± 165	842 ± 52	375 ± 9	1 996 ± 89	285 ± 14
Ni	1 ± 0.01	8 ± 0.3	1 ± 0.02	1 ± 0.01	8 ± 0.3	1 ± 0.02	31 ± 0.8	7 ± 0.2	2 ± 0.1	28 ± 0.9	5 ± 0.1	1 ± 0.1
Cu	14 ± 0.1	30 ± 1.2	15 ± 0.1	14 ± 0.1	25 ± 0.6	13 ± 0.1	12 ± 0.1	20 ± 0.7	11 ± 0	12 ± 0.1	18 ± 0.3	10 ± 0.1
Zn	53 ± 1	93 ± 4	60 ± 1	62 ± 1	80 ± 4	56 ± 0	60 ± 1	69 ± 5	53 ± 1	53 ± 1	92 ± 2	41 ± 1
Mo	1 ± 0.03	8 ± 0.5	3 ± 0.04	2 ± 0.02	7 ± 0.5	4 ± 0.03	8 ± 0.1	6 ± 0.4	4 ± 0.1	7 ± 0.1	5 ± 0.3	2 ± 0.02
Na	313 ± 5	1 399 ± 78	419 ± 11	313 ± 3	1 689 ± 20	656 ± 17	314 ± 4	1 843 ± 48	780 ± 8	293 ± 2	2 295 ± 126	799 ± 25
Al	343 ± 8	3 323 ± 178	425 ± 13	385 ± 10	3 966 ± 172	672 ± 15	456 ± 18	4 009 ± 196	734 ± 34	419 ± 10	3 337 ± 204	503 ± 12
Si	9 595 ± 169	25 810 ± 1 282	28 174 ± 284	11 558 ± 190	28 556 ± 1 382	42 208 ± 469	13 267 ± 462	32 844 ± 3 053	47 460 ± 288	12 704 ± 71	23 218 ± 1 295	41 312 ± 777
V	0.1 ± 0.006	6 ± 0.3	0.38 ± 0.034	0.15 ± 0.012	7 ± 0.2	1 ± 0.02	0.45 ± 0.022	7 ± 0.4	1 ± 0.07	0.28 ± 0.009	5 ± 0.2	0.4 ± 0.027
Co	0.14 ± 0.003	4.22 ± 0.17	0.16 ± 0.01	0.22 ± 0.003	4.12 ± 0.08	0.2 ± 0.005	0.83 ± 0.02	3.81 ± 0.12	0.25 ± 0.01	0.92 ± 0.02	3.21 ± 0.08	0.21 ± 0.01
Se	0.18 ± 0.004	0.28 ± 0.01	0.2 ± 0.003	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.001	0.15 ± 0.003	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.13 ± 0.002	0.23 ± 0.003	0.24 ± 0.002

Supplementary Data 5. Mineral nutrient concentration of B. napus and T. aestivum control plants held at ≥ 80% field capacity level. Tissues developed before or after water deficit treatment are indicated as follows: young leaf blades (YLBs), old leaf blades (OLBs), young petioles (YPs) and old petioles (OPs).

Data are expressed as the mean ± SE (n=25) in parts per million (ppm).



Supplementary Data 6. Principal component analysis (PCA) and loading contribution plots that depict the importance of each element on component 1 (PC1) and 2 (PC), respectively. The bar length represents the regression coefficient with either a positive or negative sign. Variables are ranked according decreasing importance starting from the bottom.

Chapitre V

Supplementary Table S1: Physical and chemical soil properties

Soil properties	Methods of anaysis	Value
Exchangeable CaO (‰)	NFX 31-108 - ICP AES	2.14
Total nitrogen (‰)	NF ISO 13 878 - Dumas method	1.22
Exchangeable MgO (‰)	NFX 31-108 - ICP AES	0.46
P_2O_5 (‰)	NFX 31-160 - Dyer method	0.18
Exchangeable K_2O (‰)	NFX 31-108 - ICP AES	0.093
SO_3 (KH_2PO_4) (mg/Kg)	Extr. KH2PO4 - ICP AES	186
P_2O_5 (‰)	NFX 31-161 - Joret Hébert method	0.076
Exchangeable Na_2O (‰)	NFX 31-108 - ICP AES	0.035
P_2O_5 (‰)	NF ISO 11263 - Olsen method	0.048
Cu EDTA (mg/Kg)	NFX 31-120 - ICP AES	1.2
Soluble boron Eau (mg/Kg)	NFX 31-122	0.16
Fe EDTA (mg/Kg)	NFX 31-120 - ICP AES	49.1
Mn EDTA (mg/Kg)	NFX 31-120 - ICP AES	23.8
Zn EDTA (mg/Kg)	NFX 31-120 - ICP AES	1.4
Clay (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	31
C/N	NF ISO 13 878 - Dumas method	42.9
Organic carbon (‰)	NF ISO 14 235	52.3
CEC (me/Kg)	NFX 31-130 - Metson method	110
Fine silt (s.déc) (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	24
Coarse silt (s.déc) (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	6.1
Organic matter (‰)	NF ISO 14 235	90.4
Water pH	NF ISO 10 390	6.2
KCl pH	NF ISO 10 390	5.9
Fine sand (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	36
Coarse sand (‰)	NFX 31-107 - without decarbonatation	903

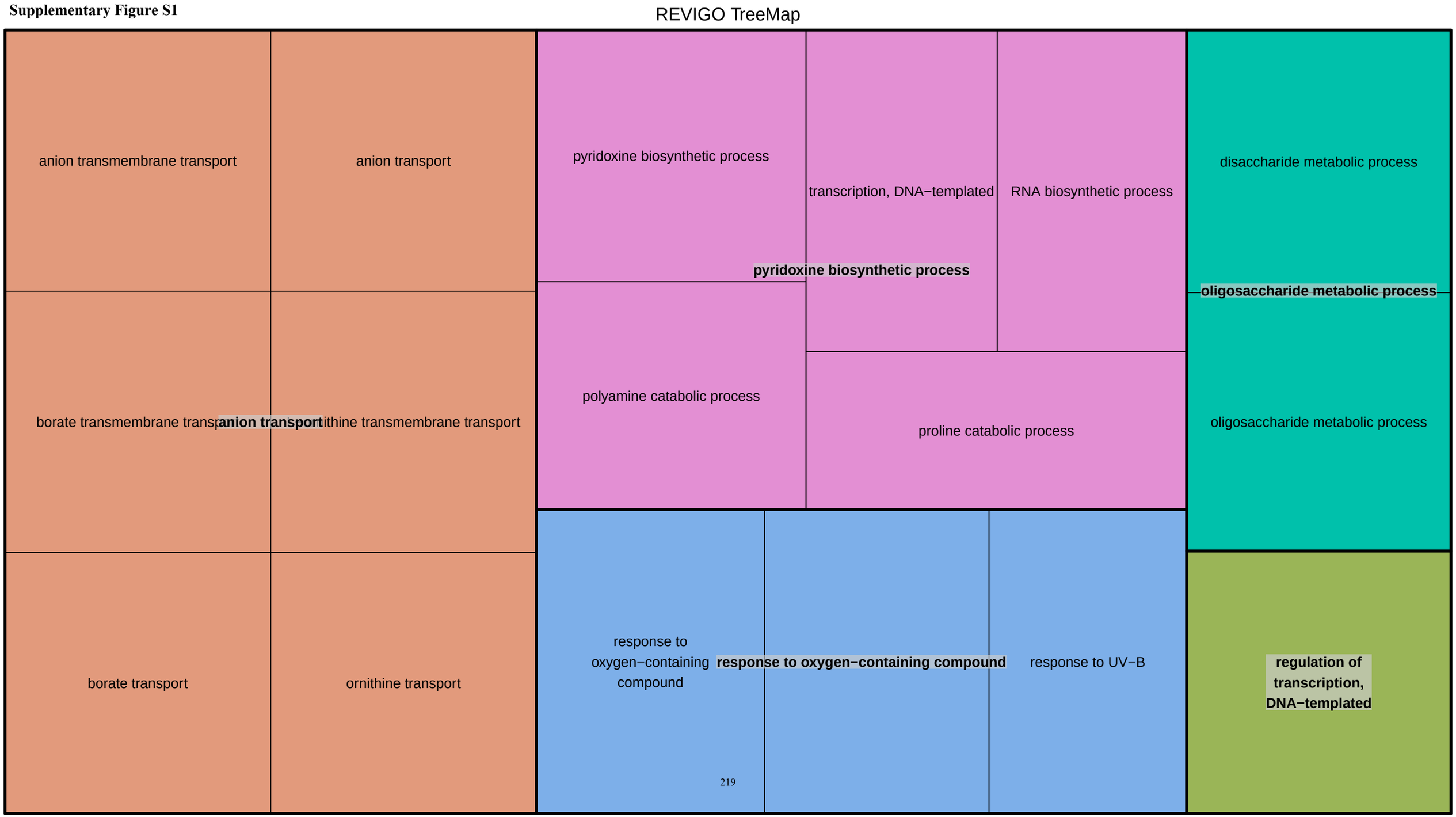
Supplementary Table S2: Composition of the nutrient solution derived from Hoagland nutrient solution and adapted to ensure the plants' mineral needs during the experiment. Elemental concentrations were kept balanced in solution to provide 40 kg N ha-1 to ensure a non-limiting mineral condition for all the experiments.

Salts	Salt concentrations (µM)
KNO_3	1000
$Ca(NO_3)_2$ +4H_2O	1250
$Si(OH)_4$	900
HCl	600
$CaCl_2$ + 2H_2O	500
$MgSO_4$	400
$CaCO_3$	360
KH_2PO_4	200
Na_2SiO_3	200
K_2SO_4	100
KCl	100
NaFe-EDTA 3H_2O	50
NaFe-EDDHA	50
H_3BO_3	10
$MnSO_4$	3
$ZnSO_4$	3
$CuSO_4$	0.7
$NiCl_2$	0.15
$CoCl_2$	0.1
Na_2SeO_4	0.01
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.008

Nutrients	Elemental concentrations in solution (µM)	input kg ha^{-1}
N	3500	40
Mg	400	8
P	200	5
S	507	13
K	1500	48
Ca	2110	69
B	10	0.09
Cl	2001	58
Mn	3	0.13
Fe	100	5
Ni	0.15	0.007
Cu	0.7	0.04
Zn	3	0.16
Mo	0.056	0.004
Na	500	9
Al		
Si	1100	25
V		
Co	0.1	0.005
Se	0.01	0.001

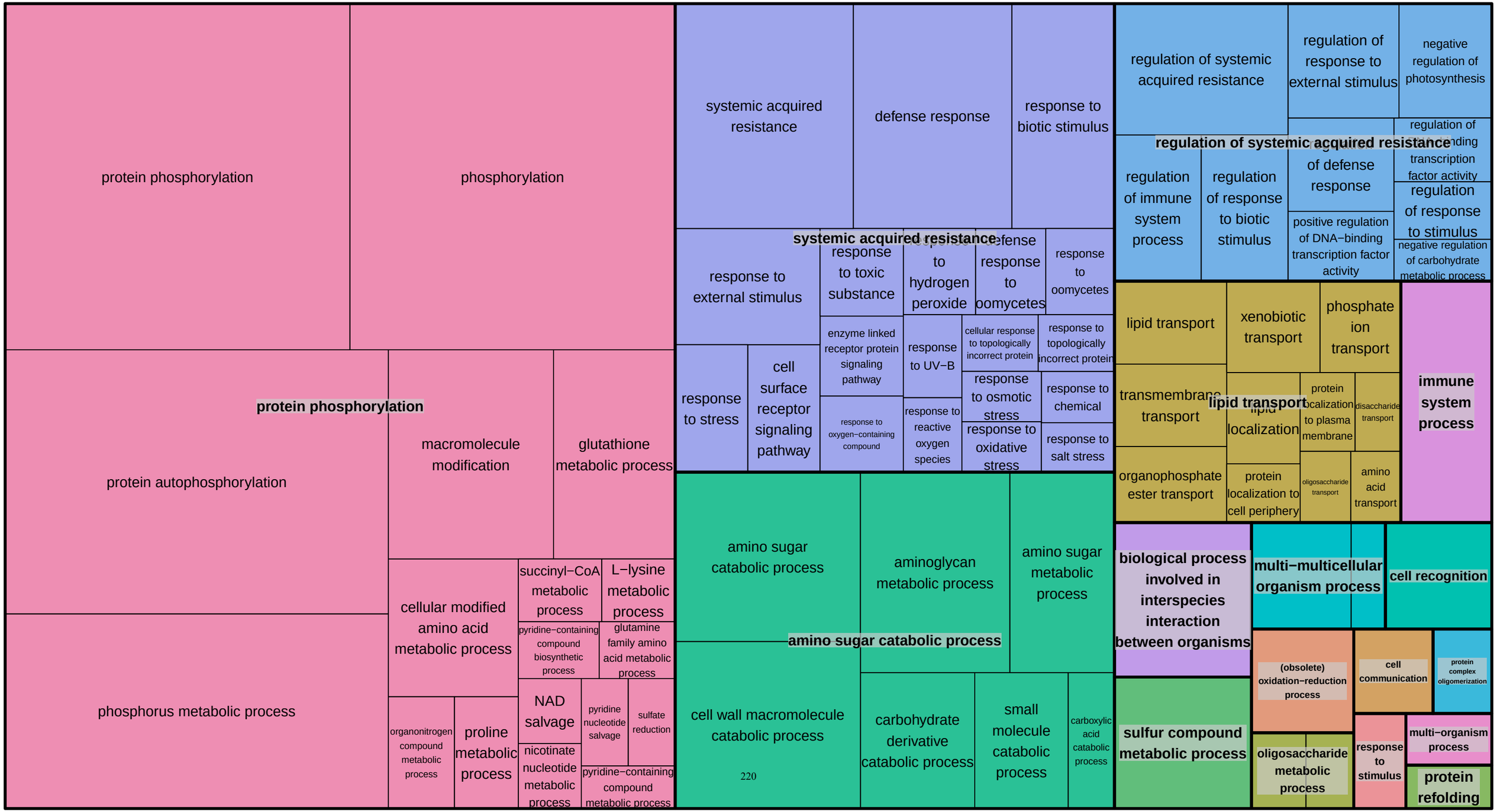
Supplementary Data 1 à 4 : en raison de la taille des fichiers, ces derniers sont accessibles sur le site de l'IJMS via le lien suivant : https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23020781/s1

Supplementary Figure S1

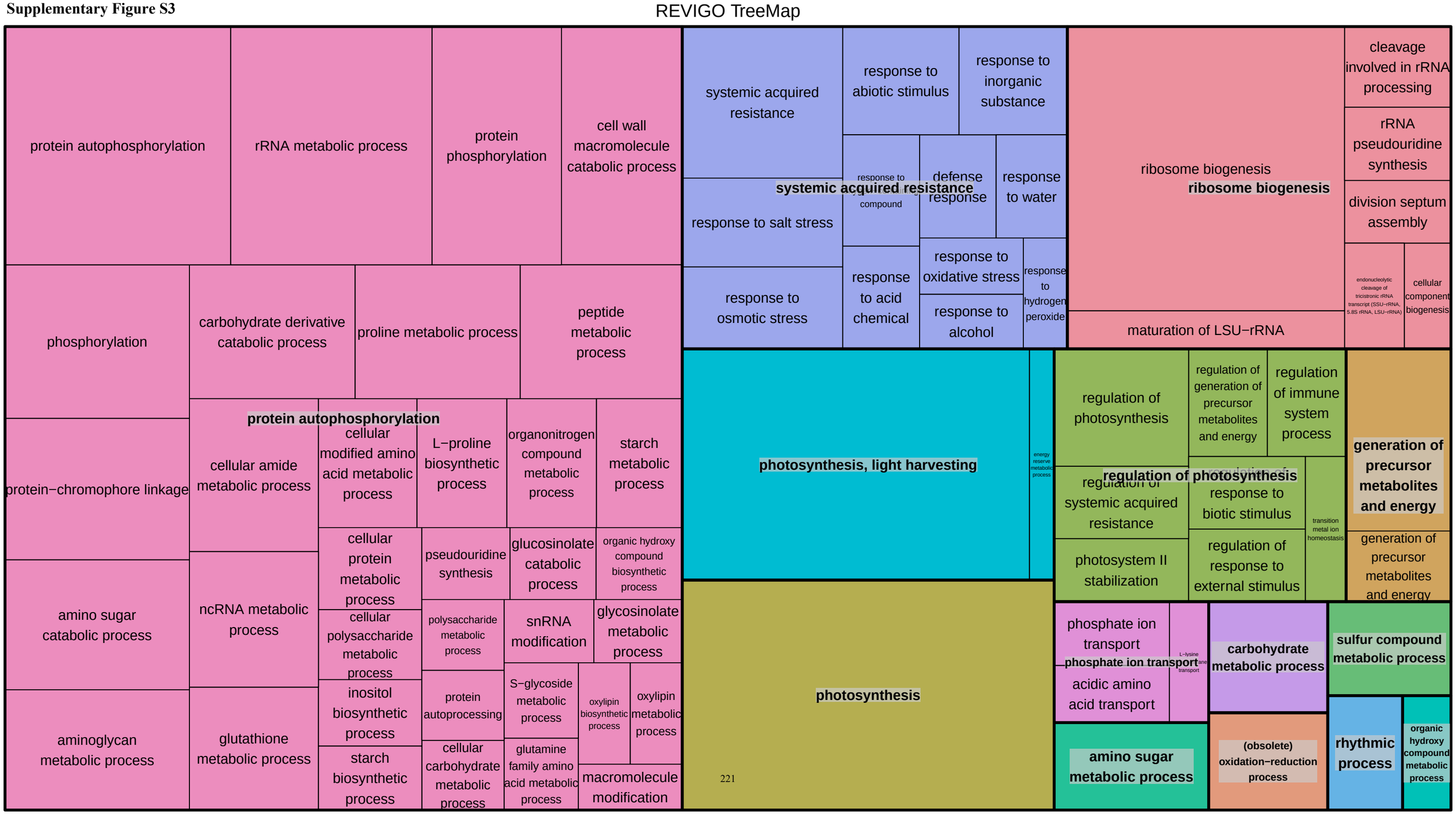


Supplementary Figure S2

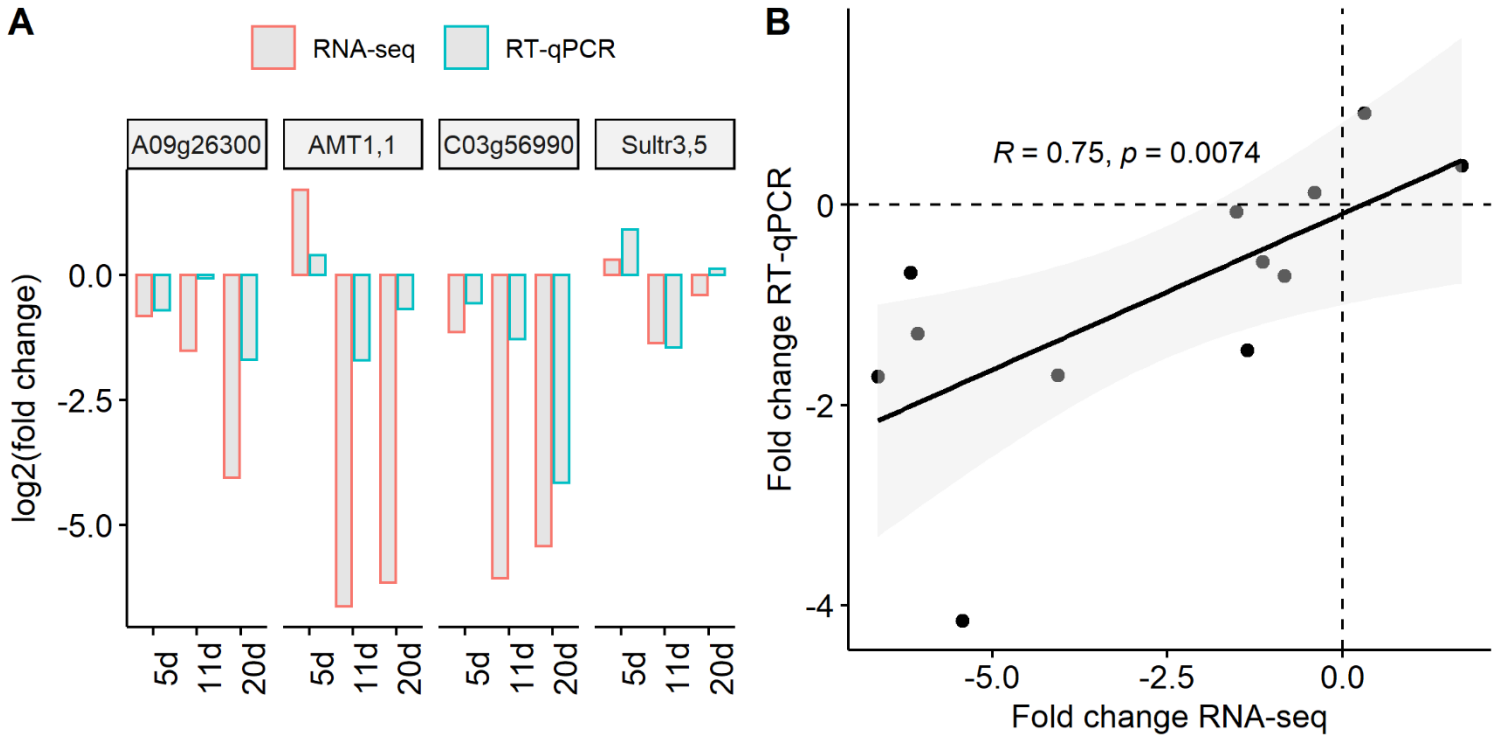
REVIGO TreeMap



Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S4: (A) Expression profiles of target genes used for RNAseq validation; (B) Spearman correlation and confidence interval between log2 fold change ratio from RNA-seq and RT-qPCR.



Aurélien D'ORIA. 2022.

Plasticité du ionome du colza et du blé en réponse aux carences minérales ou à un stress hydrique : identification des interactions entre éléments, de signatures ionomiques et des mécanismes associés

Thèse de doctorat à l'Université de Caen Normandie

Résumé : La nutrition minérale des plantes cultivées impacte indirectement celles des Hommes et dans un contexte de changement climatique et d'accroissement de la population mondiale, de nombreuses contraintes abiotiques sont susceptibles d'altérer la quantité et la qualité des produits récoltés. Afin de comprendre et d'optimiser la nutrition minérale des plantes, nous avons évalué les effets de 18 carences nutritionnelles uniques sur l'absorption et les variations de teneurs de 20 éléments au sein du ionome fonctionnel du colza et du blé. Cette étude a ainsi révélé 71 interactions communes pour lesquels l'absence d'un seul élément, a entrainé une augmentation (31) ou une diminution (40) de l'absorption des autres éléments avec pour conséquence, des variations typiques des teneurs foliaires qui ont permis de mettre en évidence des signatures ionomiques spécifiques des carences en N, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, Si ou Se chez les deux espèces étudiées et Mg, Cl, Cu ou Mo chez le blé. Ces effets s'expliquent, entre autres, par une modulation de l'expression de gènes codants des transporteurs d'ions à l'origine d'interactions nutritionnelles déjà décrites dans la littérature, ou nouvelles qui restent à explorer. Les effets d'un déficit hydrique, autre contrainte abiotique majeure, sur la nutrition minérale du colza et du blé ont également été déterminés et se traduisent par une diminution, précoce (avant une réduction de la croissance) et massive, de l'absorption et des teneurs foliaires des éléments minéraux. Au sein des feuilles de colza, le déficit hydrique se traduit également par une réduction de l'expression d'un grand nombre de gènes codant des transporteurs d'ions, précédant d'autres adaptations déjà décrites (synthèse d'ABA, de proline ou de glutathion). De façon surprenante, cette baisse des teneurs qui pourrait être perçue comme une carence par la plante, ne se traduit pas, au niveau transcriptomique, par une réponse comparable. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la réduction d'absorption des éléments et la modification des teneurs constatée lors d'un stress hydrique ne peuvent être attribuées à la seule diminution de l'évapotranspiration, principale force motrice du flux de masse.

Mots clés : *Brassica napus*, carences, déficit hydrique, ionome, transporteurs d'ions, *Triticum aestivum*

Aurélien D'ORIA. 2022.

Ionome plasticity of rapessed and wheat in response to mineral deficiencies or water stress: identification of interactions between elements, ionomic signatures and associated mechanisms

PhD thesis – Normandy University

Abstract: The mineral nutrition of cultivated plants affects indirectly those of humans and in a context of climate change while the world population increase, numerous abiotic stress may disturb the quantity and the quality of harvested products. In order to better understand and optimize plant mineral nutrition, we assessed the effects of 18 unique deficiencies on the uptake and content variations of 20 elements within the functional ionome of rapeseed and wheat. This study thus revealed 71 common interactions for which the lack of a single element led to an increase (31) or a decrease (40) in the absorption of the other elements and resulted in a typical variation of leaf content allowing the identification of specific ionomic signatures of N, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, Si, or Se deficiencies in both studied species as well as Mg, Cl, Cu or Mo in wheat. These effects can be explained, among other things, by a variation of the expression of genes encoding ion transporters which led to nutritional interactions already described in the literature, or new ones which remain to be explored. The effects of another major abiotic constraint, the water deficit, on the mineral nutrition of rapeseed and wheat were also determined and overall resulted in an early (before reduction of growth) and massive reduction of uptake and leaf content of almost all mineral elements. In rapeseed leaves, the water deficit also led to a down regulation of a large number of genes encoding ion transporters well before other previously described adaptation (ABA, proline and glutathion synthesis). Surprisingly, the decrease of the leaf element concentration was perceived at the transcriptomic level differently from a deficiency response. Consequently, these results suggest that the reduction of uptake and the modification of the ionome observed during a water stress cannot be attributed to the only decrease in evapotranspiration, the main driving force of mass flow.

Keywords: *Brassica napus*, deficiency, ionome, ion transporters, *Triticum aestivum*, water deficit