



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 145: SCIENCES DU VÉGÉTAL

Laboratoire : *Institut Jean-Pierre Bourguin*

THÈSE DE DOCTORAT
BIOLOGIE
SYNTHÈSE EN FRANÇAIS

par

Liliana Astrid AVILA OSPINA

Autophagie, sénescence et remobilisation de l'azote chez l'orge

Date de soutenance : 08/09/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse: Dr. Céline MASCLAUX-DAUBRESSE Directeur de Recherche INRA IJPB Versailles

Rapporteurs: Pr. Christine FOYER
Dr. Jacques LE GOUIS

Professeur à l'Université de Leeds, UK
Directeur de Recherche INRA GDEC Clermont-Ferrand

Examineurs: Pr. Jean-Christophe AVICE
Dr. Michael HODGES

Professeur à l'Université de Basse Normandie, Caen
Directeur de Recherche CNRS IBP Orsay

Autophagie, sénescence et remobilisation de l'azote chez l'orge

Cette thèse est la première à l'IJPB à étudier la sénescence des feuilles, la remobilisation et l'autophagie dans l'orge. L'introduction sera consacrée à la description de l'orge, des processus de sénescence dans les plantes en mettant l'accent sur la sénescence monocarpique des céréales, et à la relation avec des traits agronomiques importants comme le rendement et la teneur en protéines du grain. Enfin, comme ce projet fait partie d'un consortium soutenu par l'Union européenne, je vais décrire la structure de cette organisation et mon rôle dans l'accomplissement de son objectif principal qui est d'améliorer la productivité de l'usine à travers le contrôle de la durée de vie.

I. L'ORGE (*Hordeum vulgare* L.), UNE PLANTE MODELE ET UNE PLANTE D'INTERET AGRONOMIQUE

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est l'une des céréales les plus importantes du monde. Elle est l'une des premières cultures domestiquées et a été utilisée pendant des siècles pour l'alimentation humaine (Badr et al., 2000). Aujourd'hui, l'orge occupe le quatrième rang dans la production céréalière mondiale. Elle est utilisée pour l'alimentation animale, les malts de brassage et l'alimentation humaine (Akar et al., 2004). L'orge est aussi une culture qui s'adapte bien à des environnements différents, elle est cultivée à partir de 330 m en dessous du niveau de la mer à proximité de la Mer Morte et à 4200 m sur les Andes Boliviennes (FAO, 2009) L'orge est également une plante modèle bien connue et utilisée pour développer des méthodologies de sélection végétale, génétique, cytogénétique (Heneen, 2010).

I.1. Botanique et taxonomie

Règne: Plantae - Plantes

Sous-règne: Tracheobionta - Plantes vasculaires

Superdivision: Spermatophyta - Plantes à graines

Division: Magnoliophyta - Les plantes à fleurs

Classe: Liliopsida - monocotylédones

Sous-classe: Commelinidae

Ordre: Cyperales

Famille: Poaceae - famille Herbe

Genre: *Hordeum* - orge

Espèce: *H. vulgare*

Les caractères morphologiques et anatomiques sont à la base de la distinction des différentes espèces du genre *Hordeum* et peuvent être associés à la productivité agricole de nombreuses

façons. Par exemple, la longueur de la paille et de la résistance à la verse, les composantes du rendement, la réponse à diverses maladies, la photosynthèse, le temps et la quantité des besoins en eau, les engrais et les pesticides appliqués et les effets des stress environnementaux tels que la sécheresse, les carences du sol et la toxicité sont tous liés en partie à l'anatomie végétale et la morphologie de la plante (Reid, 1985). La plante d'orge cultivée est constituée de racines, de tiges (chaume) cylindriques avec 5 à 7 noeuds, et de feuilles alternées. L'épis au sommet de la tige est constitué de fleurs disposées en épillets simples (portant chacun deux glumes et la fleur). Trois épillets sont attachés à chaque nœud sur un rachis en zigzag plat. Ils sont tous fertiles dans les cultivars à six rangs. Dans les cultivars à deux rangs, les deux épillets latéraux sont stériles. Comme dans les autres céréales, le grain est un caryopse (Wiebe et Reid, 1961).

II. SENESCENCE ET DE L'AZOTE REMOBILISATION DANS L'ORGE

Sénescence (du latin: senescere) désigne le processus naturel de vieillissement et est le dernier stade de développement d'un organisme. La sénescence peut être déclenchée par des facteurs exogènes et endogènes et comprend plusieurs événements physiologiques régis par une machinerie moléculaire complexe, dont le but ultime est de garantir la remise en forme et / ou la survie de l'individu lui-même, ou de sa descendance (Breeze et al., 2011; Guiboileau et al., 2010; Lim et al., 2007). La sénescence se caractérise par une détérioration cellulaire, tissulaire, de l'organe ou de l'organisme (dans le cas des plantes monocarpiques comme l'orge, le blé, le riz et le maïs) (Avila-Ospina et al, 2014; Davies et Gan, 2012; Thomas, 2012).

Après le début de la sénescence, une remobilisation des éléments nutritifs s'effectue des tissus sénescents vers les organes puits. Au cours de ce processus, les composés riches en azote tels que les protéines et les acides nucléiques sont dégradés et transformés en acides aminés, urée et allantoïne. L'interconversion des acides aminés et de la glutamine en glutamate facilitent le chargement de l'azote dans le phloème et sa translocation vers les puits en développement.

La procédure de sénescence (initiation, progression et mort des tissus) est connu pour son influence sur les caractéristiques agronomiques clés tels que le rendement, l'utilisation des éléments nutritifs et la qualité de la récolte (Hoffmann et al, 2012;. Mickelson, 2003; Schmalenbach et Pillen, 2009; Uauy et al, 2006). Par conséquent, la compréhension des facteurs intrinsèques (génétiques et épigénétiques) et environnementaux qui régissent la sénescence, ainsi que le système détaillé de la remobilisation des éléments nutritifs (en particulier l'azote) est nécessaire afin d'aller vers une amélioration des cultures efficace (Distelfeld et al., 2014).

II.1.1. Synchronisation de la sénescence et du rendement

La productivité de l'orge est quantifiée par le rendement en grain qui est déterminé par des caractéristiques telles que le nombre (i) des épis par plante, (ii) d'épillets par épi, (iii) de grains par épi et (iv) le poids du grain (Distelfeld et al., 2014). Les trois premières caractéristiques sont déterminées génétiquement avant le début de la sénescence (Koppolu et al., 2013; Sreenivasulu et Schnurbusch, 2012) tandis que la dernière est déterminée tout au long de la phase de reproduction en fonction de facteurs génétiques et environnementaux. Par conséquent, une bonne synchronisation entre la sénescence et de remplissage du grain est nécessaire pour avoir des rendements en grains optimales. Des cultivars sénescents de sorgho, de blé et d'orge montrent un phénotype de SG, une augmentation de la biomasse et une légère augmentation du rendement en grains (Howard Thomas et Ougham, 2014). Ce phénotype SG est également associée à la résistance à la sécheresse et à une meilleure performance en conditions de faible teneur en azote pour le sorgho (Borrell et al., 2014). Cependant, l'augmentation des rendements des céréales SG n'est pas toujours significatif et est fortement influencée par les conditions environnementales (Gregersen et al., 2013), indiquant que la capacité des puits peut être une limitation pour atteindre des rendements élevés lorsque la sénescence est retardée (Bingham et al., 2007).

II.1.2. Teneur en protéines des grains (GPC)

La sénescence des plantes est un facteur important qui détermine la teneur en protéines du grain (GPC) dans l'orge. Un GPC élevé est préférable pour l'alimentation des animaux alors qu'un faible GPC est souhaité pour la production de malt (FAO, 2009). Les études pour l'amélioration du GPC ont montré qu'un GPC élevé est souvent associé à une réduction du rendement (Jukanti et Fischer, 2008). Ce phénomène a été expliqué par la dilution des protéines des grains due à l'accumulation de carbone liée au prolongement de la photosynthèse qui conduit à un rendement plus élevé en grain. En revanche, les cultivars sénescents auraient une remobilisation des éléments nutritifs et notamment de l'azote plus efficace, une plus forte GPC mais une baisse de rendement. Ces effets de la sénescence des feuilles sur le rendement et le GPC sont désignés sous le terme de «le dilemme de la sénescence» (Gregersen, 2011). Les gènes contrôlant le GPC tels que le facteur de transcription NAMB1, ont été trouvés dans le blé et l'orge (Jukanti et Fischer, 2008; Uauy et al, 2006; Voir ci-dessous dans le paragraphe facteur de transcription).

II.1.3. Remobilisation des éléments nutritifs

Chez les plantes monocarpiques, vivaces et annuelles, la sénescence ne se limite pas à la phase de reproduction. La sénescence dans l'orge commence à partir des feuilles les plus basses (les plus

anciennes) vers les feuilles plus hautes (plus jeunes). Dans la feuille, la sénescence commence à partir de la pointe et progresse vers la base. Au cours de la croissance végétative, les feuilles les plus anciennes sénescencent et l'azote qu'elles contiennent est transporté vers les jeunes feuilles via le phloème sous la forme d'acides aminés (glutamine et le glutamate principalement) (Feller et al., 2008). Après la floraison, l'azote est remobilisé la plupart du temps de la feuille étendard vers les grains en développement via le phloème (Gregersen et al, 2008.). Des publications récentes montrent que d'autres formes d'azote tels que le nitrate peuvent être mobilisées via le phloème et le xylème pendant la sénescence des feuilles chez *Arabidopsis* (Fan et al, 2009; Hsu et Tsay, 2013). Les sources d'azote utilisées pour la remobilisation sont certainement différentes selon le stade de développement et les conditions nutritives en azote. Lors de l'extension de la feuille, l'azote qui est principalement utilisé pour synthétiser la Rubisco qui sera recyclée après la maturation des feuilles. Au cours de la sénescence les protéines deviennent les sources d'azote importantes pour les autres organes en développement de la plante (Feller et al., 2008).

Le recyclage des éléments nutritifs pendant la sénescence des feuilles ne se fait pas seulement pour les composés azotés. Le catabolisme des lipides et des hydrates de carbone au cours de la sénescence nécessite une large panoplie d'enzymes. Les analyses transcriptomiques ont montré que les transcrits codant pour la phosphoenolpyruvate carboxylase, la citrate synthase, aconitase et isocitrate déshydrogénase sont induites lors de la sénescence dans le blé (Gregersen et Holm, 2007). Ces enzymes participent à la formation des squelettes de carbone et de composés intermédiaires des voies métaboliques liées à la β -oxydation des acides gras, à la glycolyse, à la néoglucogenèse et à la biosynthèse des acides aminés. L'amidon et les fructanes sont considérés comme les composés de stockage de carbone les plus importants chez les graminées. Au cours de la sénescence, leur dégradation en saccharose (le principal mode de transport de carbone dans les plantes) facilite le transport de carbone via le phloème jusqu'aux puits (Cerasoli et al, 2004; Reidel et al, 2009). Bien que les données du transcriptome indiquent que le carbone est recyclé et peut-être exporté vers les puits pendant la sénescence des feuilles, des études de fluxomique effectuées dans le maïs par exemple, montrent que le taux de la remobilisation de carbone à partir des feuilles sénescentes vers le grain est beaucoup plus faible que le taux de remobilisation de l'azote vers le grain (Cliquet et al., 1990). La source de carbone pour le remplissage des grains provient principalement de la fixation du CO_2 dans les feuilles, les tiges, les glumes ou l'enveloppes des siliques.

II.2. Remobilisation de l'azote

Les protéines des feuilles et en particulier les protéines photosynthétiques des plastes sont massivement dégradées pendant la sénescence, offrant une énorme réserve d'azote que les plantes peuvent utiliser pour satisfaire la demande de leurs puits pendant le remplissage du grain (Masclaux-Daubresse et al., 2010). La remobilisation de l'azote est un processus qui se fait étape par étape et implique différents organes de la plante et est très régulée au cours de la sénescence. L'efficacité des mécanismes de dégradation, d'assimilation et de transport de composés azotés garantit un remplissage efficace des grains qui apporte des bénéfices économiques.

II.2.1. Dégradation des composants chloroplastiques

Comme mentionné ci-dessus, la dégradation des chloroplastes est un événement important de la sénescence car la Rubisco et l'appareil photosynthétique (principaux composants du chloroplaste) représentent la plus grande source d'azote dans la feuille (Gregersen et al., 2008). Au cours de la sénescence, l'activité et le niveau de transcription des protéases sont induits (Hollmann et al., 2014; Parrott et al., 2005). Il s'agit de protéases plastidiales (aminopeptidases), cytosoliques (protéasome) et vacuolaires (cystéine et sérine protéases) (Distelfeld et al., 2014). Dans les feuilles sénescentes de blé, la Rubisco, la glutamine synthétase chloroplastique, d'autres protéines du stroma ont été localisées dans de petites vésicules sphériques appelées Rubisco Containing Bodies (RCB) (Chiba et al., 2003). Ces RCB bourgeonnent du chloroplaste et leur cargaison peut être dégradé dans la vacuole centrale, via des vésicules protéolytiques telles que les Senescence-Associated Vésicules (SAVs) (Martínez et al., 2008.) ou des vésicules d'autophagie (Izumi et al., 2010). Ces observations suggèrent que les dégradations plastidiales et vacuolaires travaillent ensemble pour la dégradation des contenus chloroplastiques.

II.2.2. Les protéases impliquées dans la dégradation des protéines de la cellule

L'identité des protéases chloroplastiques demeure largement inconnue. Plusieurs membres de la machinerie protéolytique du chloroplastes et d'autres organites tels que les mitochondries ont été décrits chez *Arabidopsis* (Sinvany-Villalobo et al., 2004). Ils comprennent les protéases ATP-dépendant (Clp, Lon et FtsH), la protéase Deg ATP-indépendante et la protéase Spp (Adam et Clarke, 2002; Ostersetzer et al., 2007; Schuhmann et Adamska, 2012).

Le rôle des protéases vacuolaires dans la dégradation des protéines chloroplastiques telles que la Rubisco a été démontré par l'utilisation d'inhibiteurs de protéases. Thoenen et al. (2007) ont montré que la dégradation de la grande sous-unité de la Rubisco au cours de la sénescence chez le blé est retardée par l'utilisation de l'inhibiteur de cystéine protéase comme E-64. De même, Martínez et al. (2007) a identifié dans les feuilles sénescentes de blé quatre protéases à cystéine

de 36, 39, 42 et 46 kDa par des essais d'activité sur gel et l'utilisation des inhibiteurs de protéases.

L'analyse transcriptomique des feuilles sénescentes de l'orge a montré une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de protéases à cystéine et d'autres gènes codant pour des protéines qui se trouvent dans les vacuoles lytiques (Hollmann et al, 2014; Parrott et al., 2010, 2007). Parrott et al. (2007) ont montré que les protéases sont induites au cours de la sénescence.

Grâce à la sur-expression de l'inhibiteur de protéase à cystéine de riz - la cystatine OC-1 - dans des plants de tabac, Prins et al. (2008) ont montré que la présence d'antiprotéases entraîne un retard de la sénescence associée à un ralentissement de la chute de Rubisco et de photosynthèse à la fois en condition de nutrition en azote optimale ou limitante. Les plantes sur exprimant OC-1 ont montré une augmentation de la quantité de Rubisco après la floraison par rapport aux plantes sauvages. Ces résultats suggèrent que les cystéine-protéases sont impliquées dans la dégradation de la Rubisco au cours de la sénescence des feuilles (Prins et al. 2008).

Tous ces résultats confirment que la dégradation des protéines des organites au cours de la sénescence est un processus qui comprend différents types de protéases impliquées à différents stades et dans différents compartiments cellulaires. Ils indiquent également une dégradation sélective de certaines protéines du chloroplaste. Par exemple, la Rubisco est pré-dégradée à l'intérieur du chloroplaste et ses produits de dégradation sont libérés dans des RCB transloqués vers la vacuole centrale (voir ci-dessus). En revanche, il n'existe aucune preuve du transfert de protéines thylakoïdiennes vers des compartiments vacuolaires (Distelfeld et al., 2014), ce qui suggère que différentes voies cataboliques peuvent être utilisées pour la dégradation des protéines du stroma et thylakoïdes.

III. L'AUTOPHAGIE ET SON ROLE DANS LA REMOBILISATION DES ELEMENTS NUTRITIFS PENDANT LA SENESCENCE

Pendant la dégradation des organites, les composants cytoplasmiques sont partiellement dégradés et transportés vers la vacuole centrale pour être remobilisés. Les vacuoles associées à la sénescence (SAVs) et les RCB sont ce genre de vésicules (Izumi et al, 2010; Martínez et al, 2008).

En plus des SAVs et RCB, la macro-autophagie (appelé autophagie signifie l'auto-alimentation, plus loin dans le texte) est également décrite dans les plantes. L'autophagie est considérée comme une voie prédominante pour le transport des protéines et des organites vers la vacuole centrale (Bassham, 2009; Thompson et Vierstra, 2005). L'autophagie permet de séquestrer une partie du

cytoplasme, y compris les organites entiers comme les peroxysomes ou les mitochondries, dans une vésicule à double membrane (appelée autophagosome) et qui sera délivrée à la vacuole centrale. Lorsque la vésicule est ancrée à la vacuole, la membrane externe des autophagosomes fusionne avec la membrane tonoplastique pour libérer la vésicule interne composée d'une membrane interne et de sa cargaison (structure appelée corps autophagique), qui est ensuite dégradé par des hydrolases vacuolaires (Li et Vierstra, 2012).

Un crible génétique de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a permis d'identifier un ensemble de gènes liés à l'autophagie (*ATG*) et nécessaires à la réalisation de ce processus. Ces gènes sont très conservés entre les organismes (levures, des animaux et des plantes) et plusieurs études utilisant des mutants knock-out et des systèmes de fusion de protéines comme marqueurs de l'autophagie (GFP-ATG8) ont démontré le rôle de l'autophagie dans le recyclage des nutriments pendant la sénescence et dans des conditions de stress (Guiboileau et al, 2012; Izumi et al, 2010; Slavikova et al, 2008; Thompson et al, 2005; Yoshimoto et al, 2004).

III.1. Machines autophagie et mécanismes dans les plantes

Comme il a été mentionné ci-dessus, les gènes *ATG* ont d'abord été identifiés dans la levure, puis des homologues de ces gènes ont également été trouvés chez les animaux et chez les plantes. Les études menées chez *Arabidopsis*, suivi par des études récentes dans le maïs, le riz, le blé, le soja et le tabac ont suggéré qu'un système *ATG* similaire existe dans le règne végétal (Chung et al, 2009; Guiboileau et al, 2012; Kuzuoglu- Ozturk et al, 2012; Xia et al, 2012; Zientara-Rytter et al, 2011). Plus de 30 gènes *ATG* ont été identifiés dans *S. cerevisiae*. Ces gènes sont liés non seulement à l'autophagie (considéré comme un processus non sélectif) dans la levure, mais aussi à d'autres processus morphologiquement similaires qui ciblent des substrats spécifiques tels que le cytoplasme de vacuole ciblage (voie Cvt), pexophagie (ciblant les peroxysomes) et mitophagie (ciblage des mitochondries) (Yang et Klionsky, 2010). Bien que ces quatre types d'autophagie nécessitent différents gènes *ATG* afin de remplir leur fonction, environ 17 gènes *ATG* (en fonction de l'espèce) sont nécessaires dans l'ensemble des quatre événements pour la formation de l'autophagosome et le transport de sa cargaison de la vacuole. Ces gènes font partie du cœur de la machinerie moléculaire et leurs homologues ont été retrouvés dans les plantes (Kim et al., 2012).

Gènes *ATG* appartenant à la machinerie moléculaire de base ont été divisés en quatre groupes fonctionnels: le complexe ATG1-ATG13 kinase, ATG9 et des protéines associées, un phosphatidylinositol 3-kinase complexe (PtdIns3K), et deux systèmes de conjugaison ubiquitine (ATG5-ATG12 et ATG8). La kinase ATG1-ATG13 et les complexes de PtdIns3K sont en charge

de l'initiation et la formation de la membrane de autophagosome, ATG9 et des protéines associées sont en charge le recrutement des lipides et la ATG5-ATG12 et systèmes de conjugaison de l'ubiquitine comme ATG8 sont en charge de la membrane allongement et la fermeture de la autophagosome (Il et Klionsky, 2009). Des gènes homologues appartenant à ces complexes ont été trouvés chez Arabidopsis (Avin-Wittenberg et al., 2012).

IV. CROPLIFE ITN CONSORTIUM

CropLife est un consortium créé en 2010 au titre du 7^{ème} programme-cadre de recherche de l'Union européenne. CropLife est un réseau de formation initiale (ITN) qui offre des possibilités pour les jeunes chercheurs (ESR; doctorants) et les chercheurs expérimentés (ER; post-doctorants dans leurs cinq premières années de carrière) pour développer leur carrière en intégrant dans leurs contacts des partenaires des secteurs public et privé. Le program comprend les activités locales de formation dans le laboratoire d'accueil et des cours dans l'ensemble du réseau, les écoles d'été et des ateliers. Les ESR et ER sont formés dans un contexte large de compétences en recherche de pointe, ainsi que dans un contexte offrant des outils complémentaires qui permettront d'améliorer leurs perspectives de carrière.

D'autres avantages découleront de détachements dans les laboratoires partenaires et des visites inter-sectorielles chez des partenaires associés du secteur privé.

Afin de garantir une formation au niveau le plus avancé, d'éminents scientifiques dans le domaine sont intégrés en tant que chercheurs invités.

Le programme se concentre sur la durée de vie de la feuille comme un déterminant majeur de la productivité des plantes et a pour objectif de développer de nouvelles stratégies de sélection pour prolonger la photosynthèse, retarder les processus de sénescence dans deux graminées de modèle : l'orge comme culture de céréales et de ray-grass anglais comme une culture dédiée à la biomasse et au fourrage.

En raison du caractère interdisciplinaire de ses membres, l'objectif principal de CropLife est abordé dans cinq modules de travail couvrant différents aspects tels que l'identification des facteurs clés initiateurs sénescence et de régulation de la durée de vie des protéines (WP1 et 2), l'élucidation des mécanismes moléculaires de la sénescence associée au gène de la dégradation des protéines et de remobilisation de l'azote (WP3) et l'analyse et l'exploitation de la variabilité génétique de la durée de vie afin d'obtenir de nouvelles variétés avec une productivité accrue (WP4). La diffusion et de l'exploitation des résultats de recherche (WP5) ainsi que la gestion et l'organisation des activités du consortium (WT6) sont également organisés en workpackage.

RÉSULTATS

Deux papiers dans lesquels j'apparais en premier auteur ont été rédigés en anglais et soumis dans des journaux scientifiques. Les paragraphes suivants résument leurs contenus.

La sénescence est la dernière étape du développement d'un organisme, et elle est caractérisée par la décomposition des cellules, des organes et dans certains cas, l'individu tout entier. Il s'agit d'un processus très complexe et réglementé qui a pour objectif ultime d'assurer la survie de l'individu ou de sa descendance. La sénescence peut être déclenchée par différents facteurs tels que le vieillissement, le stress et le développement, et dans le cas des cultures monocarpiques (comme l'orge et le blé), elle constitue un processus très important qui influence les caractéristiques agronomiques de rendement et de qualité du grain.

Les objectifs de ce travail est d'avoir un regard attentif sur le processus de sénescence naturelle et induite par le stress chez l'orge (*Hordeum vulgare*) avec un intérêt particulier pour la physiologie, le métabolisme et les processus moléculaires qui se succèdent.

Pour cela, j'ai d'abord normalisé les conditions de croissance en fort et faible azote pour l'orge (cv. Golden Promise) dans des chambres de culture qui fournissent à la fois des conditions optimales et limitantes pour les nitrates afin d'étudier les caractéristiques liées au stress nutritif et la sénescence. Pour l'étude des processus de sénescence au cours de la phase végétative, nous avons analysé séparément les rangs foliaires (feuille 1, L1, feuille 2, L2; feuille 3, L3) représentant de vieille feuille L1, des feuilles matures L2 et de jeunes feuilles L3. La sénescence séquentielle des feuilles pendant la phase de pré-floraison est un trait caractéristique de céréales monocarpiques et il est caractérisé par la sénescence des feuilles les plus anciennes et la remobilisation des éléments nutritifs à la plus jeune (Feller et al., 2007).

Par la suite, et grâce à la collaboration de partenaires de CropLife, nous avons obtenu des orges (cv. Carina) au champs jusqu'au stade de la reproduction (post-floraison) afin d'analyser les caractéristiques liées à la sénescence et la remobilisation des nutriments dans la feuille étendard.

Par la suite, j'ai analysé les marqueurs physiologiques de la sénescence des feuilles tels que la chlorophylle, la Rubisco et la teneur en protéines solubles dans les rangs foliaires de plantules cultivées en fort ou faible apport en nitrate. Les analyses d'autres caractères qui sont des marqueurs de sénescence foliaire comme l'efficacité photosynthétique, l'assimilation du CO₂, la teneur en acides aminés, le rapport GS1 / GS2 et la protéase et les activités GS, a été effectuée.

Puis, afin d'obtenir une vue plus détaillée des changements métaboliques qui se passent dans nos échantillons, j'ai effectué avec le Dr Gilles Clément une analyse du métabolome des rangs foliaires de plantes au stade végétatif et de feuilles étandard sénescentes ou non, par GC-MS. Dans cette étude, nous avons observé des variations dans la composition en métabolites primaires et secondaires, y compris en acides aminés, glucides et lipides, en fonction de l'âge de la feuille, du stress nitrate et du stade de développement. Nos résultats ont été comparés à des analyses similaires effectuées dans d'autres espèces telles que *Arabidopsis*.

Dans une deuxième partie, j'ai analysé les niveaux d'expression des gènes liés aux processus métaboliques associés à la sénescence et à la remobilisation des éléments nutritifs. Pour cela, j'ai décidé de suivre l'expression de gènes appartenant à la glutamine synthétase (*GSI* et *GS2*), l'asparagine synthétase (*ASN*) et l'autophagie (*ATG*) familles (Lam et al, 1998; Chung et al, 2009; Guiboileau et al, 2013).

Seuls deux gènes *ASN* (Moller et al., 2003), trois gènes *GSI* (Goodall et al., 2013) et un gène *GS2* (Baima et al., 1989) ont été décrites pour l'orge. J'ai recherché d'autres séquences codant ces fonctions. J'ai effectué plusieurs analyses *in silico* des séquences protéiques prédites afin de trouver les bases d'acides aminés essentiels pour la fonction des protéines correspondante afin de valider en quelque sorte les nouveaux gènes identifiés pour les *HvASN*, *HvGS* et *HvATG*. J'ai alors dessiné des amorces spécifiques pour mesurer les niveaux d'expression de ces gènes pendant la sénescence naturelle en réponse à la limitation en nitrate et au traitement à l'obscurité. Dans le cas de *HvATG5*, j'ai effectué une confirmation de la fonction par complémentation de mutants d'*Arabidopsis* en clonant la séquence CDS de *HvATG5* et en la surexprimant dans des mutants *atg5* d'*Arabidopsis*. J'ai validé la complémentation de fonction de la protéine en effectuant des essais avec la concanamycin-A (Yoshimoto et al., 2004) pour observer une reprise de l'activité autophagique et la croissance des plantes transformées dans des conditions différentes d'apport en nitrate ; le but étant d'observer si leurs tailles, leur réponse à l'azote et leur durée de vie ressemblent plus à des mutants *atg5* ou à des plantes de type sauvage (Guiboileau et al., 2013).

Afin de quantifier les niveaux d'expression de tous ces gènes identifiés, j'ai utilisé la RT-qPCR. J'ai évalué plusieurs couples d'amorces pour trouver un rendement élevé et obtenir des résultats fiables (en particulier des gènes appartenant à des familles multigéniques). La même chose a été faite pour les gènes constitutifs. Je utilisés deux marqueurs de sénescence : un SAG (sénescence Associated Gene) et un SRG (sénescence réprimée Gene) afin de comparer leurs tendances d'expression avec le profils des gènes d'intérêt. Pour cela, j'ai choisi comme *HvNAC13* comme

SAG (Christiansen et al., 2011) et *HvLSU* comme SRG (Feller et al., 2008). Après avoir établi les conditions optimales de qPCR, l'expression de *HvGS1*, *HvGS2*, *HvASN* et *HvATG* a été mesurée dans les plantules (stade végétatif) cultivées sous fort ou faible nitrate et dans des feuilles étendard (stade de la reproduction) de plantes cultivées au champ.

D'après les résultats que nous avons obtenus, nous avons décidé de rédiger notre travail en deux parties différentes. Le premier papier, « **Studying senescence in barley (*Hordeum vulgare* L.) primary leaves and flag leaves reveals specific metabolic shifts in sugar, amino acids and lipid metabolisms.** » montre que les feuilles sénescentes présentent des changements métaboliques spécifiques pour leurs contenus en sucre, acides aminés et lipides. Ce papier présente une image des événements physiologiques et métaboliques qui se produisent dans les feuilles d'orge pendant la sénescence. Le profilage métabolique de la sénescence des feuilles d'orge souligne les différences et les similitudes avec les études effectuées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ce document comprend également la réponse des gènes de remobilisation ASN et GS à la sénescence, à la nutrition en nitrate et à l'obscurité. Ce rapport sera utile pour normaliser les conditions dans lesquelles la sénescence de l'orge peut être comparée entre plantes sauvages et mutantes ou transformées.

Le deuxième article, intitulé « **The nineteen autophagy genes found in barley (*Hordeum vulgare* L.) are differentially regulated during leaf senescence, chronic nitrogen limitation and in response to dark treatment.** » présente la caractérisation des gènes d'autophagie chez l'orge.

Les gènes de l'autophagie sont régulés différemment pendant la sénescence des feuilles, la limitation chronique en azote et en réponse à l'obscurité.

Bien que les résultats contenus dans ces deux rapports peuvent être considérés comme très descriptifs, ils sont essentiels pour le développement d'études ultérieures sur l'autophagie dans les céréales, et en particulier pour l'analyse fonctionnelle de mutants ou transformants.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Questions scientifiques:

Dans cette étude, nous avons effectué une analyse biochimique, physiologique et moléculaire de la sénescence des feuilles d'orge. J'ai suivi la sénescence naturelle et induite par le stress dans les feuilles en utilisant deux modèles différents : au stade végétatif (feuilles de rang chez les plantules) et au stade reproduction, les feuilles étendards de plantes cultivées au champs. Nous

nous sommes concentrés principalement sur la mesure de caractères de sénescence tels que la teneur en chlorophylle, la photosynthèse et l'expression des gènes de sénescence associés au recyclage de l'azote et à la remobilisation.

Nous avons constaté que dans les deux modèles, nous obtenons une image similaire de la sénescence des feuilles. Nous observons une diminution de l'ensemble des composés azotés, une induction des marqueurs de remobilisation de l'azote tels que les protéines GS1, des activités protéolytiques plus élevées et une diminution des teneurs en Rubisco et GS2.

Il a également été observé que, en plus du vieillissement, dans des conditions de bas nitrate, les plantes montrent une augmentation de l'activité glutamine synthétase GS et des teneurs en protéines GS1 indiquant que les conditions limitantes en azote promeuvent une forte activité GS associée principalement à la fonction de remobilisation de l'azote.

Par la suite, l'expression des gènes *HvGS1* (glutamine synthétase 1) et *HvASN* (asparagine synthétase) a été évaluée. Pour ce faire, les séquences de trois isoformes de *HvGS1* (*HvGS1_1*, *HvGS1_2* et *HvGS1_3*) décrits précédemment par Goodall et al (2013) et deux isoformes *HvASN* (*HvASN1* et *HvASN2*) décrits par Moller et al (2003) ont été utilisés pour dessiner des amorces spécifiques et mesurer leurs niveaux d'expression dans nos échantillons par RT-qPCR. Grâce à des analyses d'alignement de séquence en utilisant la séquence du génome de l'orge récemment publiée (IBSC, 2012), deux gènes *HvGS1* supplémentaires (*HvGS1_4* et *HvGS1_5*) et trois gènes (*HvASN*, *HvASN3*, *HvASN4* et *HvASN5*) ont été identifiés.

Les cinq gènes *HvGS1* sont fortement exprimés dans les feuilles sénescentes des plantules et au stade de la reproduction dans la feuille étandard. Dans le cas des gènes *HvASN*, leur expression est fortement induite au cours de la sénescence dans les échantillons cultivés sous fort nitrate (HN) mais réprimée sous faible nitrate (LN). Cet effet opposé de la sénescence sur l'expression des gènes *HvASN* selon les conditions de nutrition en nitrate, HN et LN, suggère que les ASN nécessaires à la remobilisation de l'azote sont particulièrement sollicitées lorsque la nutrition en azote est pléthorique.

Dans les feuilles étandard, l'expression des *ASN* est induite par la sénescence a également été étudiée. Une tendance inverse est mesurée pour *HvASN3* qui est induit avec l'âge alors que *HvASN4* est réprimé. Cette différence peut être attribuée aux concentrations en sucre puisqu'on sait que l'expression des asparagine synthétases peut être régulée par la teneur en sucre et que ces concentrations varient avec l'âge des feuilles (Oliveira et al, 2002; Gaufichon et al, 2010.).

A partir des analyses phylogénétiques, il a été constaté que *HvASN1* et *HvASN2* sont regroupés avec *AtASN1*, tandis que *HvASN3* et *HvASN4* sont regroupés avec *AtASN2*. Cette association

semble être relayée par le fait que les gènes associés montrent la même réponse face à la régulation par les sucres. Nous avons observé une forte expression de *HvASN1* en condition d'obscurité et de la même manière il a été montré que *AtASN1* est également induit à l'obscurité (Moller et al, 2003; Oliveira et al, 2002). La répression de l'expression de *HvASN3* à l'obscurité rappelle celle de *AtASN2* connu pour être réprimé à l'obscurité et induit par les sucres (Gaufichon et al., 2010).

Nous avons identifié 19 gènes d'autophagie dans l'orge en utilisant les séquences des gènes *ATG* de levure, d'*Arabidopsis* et du riz. Des amorces spécifiques ont été conçues pour mesurer les niveaux d'expression par RT-qPCR. Huit gènes uniques (*HvATG3*, *HvATG5*, *HvATG6*, *HvATG7*, *HvATG9*, *HvATG12*, *HvATG13* et *HvATG16*) et trois familles de gènes (*HvATG1*, *HvATG8* et *HvATG18*) ont été identifiés. Ces gènes montrent des similarités de séquences importantes avec leurs homologues de levure, *Arabidopsis* et riz ainsi. Les acides aminés essentiels pour la fonction des protéines qu'ils codent sont conservés.

Les niveaux de transcription de ces gènes sont en général fortement augmentés dans les feuilles sénescences de plantules (à l'exception de *HvATG5* et *HvATG18_3*, *HvATG13* *HvATG6* et dans des conditions de LN). Tous les gènes *ATG* sont également plus exprimés dans des conditions de faible azote et en réponse à l'obscurité. Le gène le moins sensible à l'obscurité est *HvATG5*. Fait intéressant, au stade de la reproduction, les niveaux d'expression de *HvATG5* sont fortement induits dans les feuilles étendard sénescences. Etant donné que la feuille étendard est la principale source d'azote pour la remobilisation vers le grain en développement, ces résultats sont en accord avec le rôle de *ATG5* dans la remobilisation de l'azote comme montré par Guiboileau et al (2012) chez *Arabidopsis*. Ces résultats sont également cohérents avec l'expression tardive de *AtATG5* observée cours de la sénescence des feuilles chez *Arabidopsis* et décrite par Avila-Ospina et al (2014).

Ce travail de thèse présente une analyse du métabolome des feuilles sénescences au stade végétatif et au stade reproducteur. Quatre caractéristiques liées à la sénescence ont été observées : (i) une augmentation des composés carbonnés (sucres, les lipides et les acides gras) probablement des produits issus de la dégradation des membranes et de la paroi de la cellule (ii) une diminution des hexoses et des trioses de la voie de la glycolyse (iii) une augmentation d'acides organiques à partir du cycle de Krebs et (iv) une diminution de la plupart des acides aminés, à l'exception de la cystéine et de la lysine, en rapport avec le glutathion et les voies anapérotyques de la respiration. Ces données nous permettent de comparer le métabolisme des feuilles sénescences chez l'orge et chez *Arabidopsis*. L'accumulation des hexoses et des acides aminés mineurs dans les feuilles

sénescentes d'*Arabidopsis* n'est pas observée chez l'orge. Ces différences majeures posent la question des mécanismes de catabolisme et de remobilisation des composés azotés dans chacune de ces espèces. Ces mécanismes qui semblent différents demanderont des analyses plus poussées pour découvrir les spécificités des changements moléculaires et métaboliques qui se produisent pendant la sénescence des feuilles chez les deux espèces.

Perspectives à court terme

Réponse des composants génétiques et métaboliques à des conditions de stress tels que la sécheresse et les températures basses.

Dans le cas des plantes de grande culture, une bonne tolérance aux conditions environnementales difficiles représente une caractéristique très recherchée par les sélectionneurs parce que de haute valeur agronomique et économique. La mesure du niveau d'expression de gènes liés à la sénescence ou à la remobilisation de l'azote comme les *ATG*, *GSI* et *ASN* en conditions de sécheresse ou de stress froid pourrait donner une idée de la nature générale ou spécifique des mécanismes utilisés par les cultures monocotylédones pour faire face à ces situations. Par exemple, la réponse différentielle des gènes *AtASN* à la lumière au sucre (Lam et al, 2003; Moller et al, 2003.), l'expression différentielle des trois isoformes *HvGSI* selon les sources d'azote (Goodall et al., 2013) et l'augmentation de l'expression de *HvATG5* plus particulièrement observée dans les feuilles étendard vieilles, mais pas dans les vieilles feuilles de plantules (ce travail), suggèrent que la régulation de la sénescence et la remobilisation des éléments nutritifs est influencée par des facteurs environnementaux spécifiques et différents selon le stade de développement.

Création de gènes marqueurs de sénescence et la remobilisation des éléments nutritifs.

L'identification des gènes de sénescence et de remobilisation des éléments nutritifs est également importante pour comprendre la régulation de la physiologie de la plante. La découverte de *SAG12* chez *Arabidopsis* a permis de contrôler la sénescence des plantes et d'élucider l'importance des protéases à cystéine pour la remobilisation des éléments nutritifs (Grbic, 2003). Dans le blé, le gène NAC *TaNAM-B1* contrôle non seulement la sénescence mais aussi les contenus en protéines, Zn et Fe dans le grain (Uauy et al., 2006). Chez le maïs, deux isoformes de la glutamine synthétase, *ZmGSI-3* et *ZmGSI-4*, ont été identifiées comme participant à l'élaboration du rendement et leur relation avec le transport de l'asparagine à partir de feuilles vers le grain a été suggérée (Martin et al., 2006). Chez l'orge, de nombreux gènes ont été associés à la

sénescence foliaire sous conditions optimales et conditions de stress (Parrott et al., 2007; Hollmann et al., 2014), mais leur fonction spécifique n'est pas encore connue.

Nous avons observé que certains gènes *ATG*, par exemple *HvATG6*, *HvATG7*, *HvATG16* ou *HvATG18* sont fortement exprimés pendant la sénescence des feuilles sénescentes au stade végétatif et au stade reproducteur. *HvATG5* semble plus particulièrement surexprimé dans les feuilles étendard sénescentes ce qui suggère que ce gène pourrait avoir plus particulièrement un rôle dans cette feuille. L'ensemble de nos résultats suggèrent alors des rôles distincts pour les différents gènes d'autophagie et une importance relative aux différents moments du processus de sénescence. Il serait éventuellement possible que *HvATG6*, *HvATG7*, *HvATG16* et *HvATG18* soient importants pour le contrôle des premiers stades de la sénescence tandis que *HvATG5* pourrait être davantage liée aux étapes ultérieures et à la remobilisation des éléments nutritifs vers le grain en développement comme constaté chez *Arabidopsis* (Guiboileau et al., 2012; Avila-Ospina et al., 2014).

Les études d'association

Afin de faire une étude d'association entre les gènes identifiés dans cette étude (*HvATG*, *HvGS* et *HvASN*) et la sénescence foliaire et les caractères de remobilisation de l'azote, l'analyse de la séquence de gènes identifiés dans différentes variétés d'orge, dont la date de sénescence altérée, ou dont le GPC est altéré ou amélioré, pourrait être effectuée afin de réaliser une étude de génétique d'association. Grâce au séquençage des différents allèles présents dans des populations caractérisées au niveau agronomique, le polymorphisme nucléotidique (SNP) pourrait être identifié et des corrélations avec des caractères d'intérêt (rendement, GPC ou retard sénescence) analysées. Des études similaires ont été réalisées avec les gènes *HvNAM-1* et *HvNAM-2* de l'orge, qui sont l'orthologue du gène *TaNAM-B1* de blé (Uauy et al., 2006). Les variétés de blé "Karl" (à faible GPC) et «Lewis» (avec une grande GPC) ont montré des différences pour deux SNP de *HvNAM-1* qui traduisent deux changements d'acides aminés (Distelfeld et al., 2008).

Sélection des candidats pour des analyses fonctionnelles futures

La plupart des gènes décrits et analysés dans ce travail de thèse permettent d'avoir un modèle de sénescence et de réponse au stress nutritif. Toutefois, une sélection de candidats potentiels pour d'autres analyses fonctionnelles qui doit être faite. À l'heure actuelle, nos résultats ont montré une expression différentielle de *HvATG5* dans les feuilles sénescentes selon le stade de développement (fortement exprimé dans la sénescence de la feuille étendard et non en feuilles sénescentes de plantules). Cette expression, ainsi que les rapports précédents sur l'importance du

gène *AtATG5* dans la remobilisation de l'azote chez *Arabidopsis* (Guiboileau et al., 2012), suggèrent que ce gène est impliqué dans la régulation de la remobilisation des éléments nutritifs vers le grain. *HvATG5* serait ainsi un bon candidat pour transformer l'orge et faire une analyse fonctionnelle de ce gène.

Perspectives à long terme

L'analyse fonctionnelle des gènes associés à la sénescence chez l'orge

La transformation de plants d'orge permettrait de manipuler l'expression des gènes en rapport avec la durée de vie et la remobilisation des éléments nutritifs et de réaliser l'analyse fonctionnelle des gènes d'intérêt pour l'obtention des rendements. C'est l'un des objectifs du consortium CropLife et du groupe SATURNE (sénescence, l'autophagie, éléments nutritifs remobilisation et l'utilisation efficace de l'azote).

Dans ce travail de thèse, et sur la base des résultats observés, un rôle possible de *HvATG5* dans la remobilisation des éléments nutritifs au grain pendant la sénescence a été suggéré. Ce rôle putatif est étayé par des études antérieures ayant montré l'association de *ATG5* avec la durée de vie, la réponse au stress, le métabolisme et la remobilisation des éléments nutritifs chez *Arabidopsis* et également dans le monde animal. En effet, Guiboileau et al (2012) ont montré que les plantes d'*Arabidopsis atg5* knock-out sont moins efficace pour la remobilisation de l'azote des feuilles sénescentes vers le grain par rapport aux plantes sauvages. D'autre part, la surexpression de *ATG5* chez la souris conduit à une prolongation de la durée de vie et à l'amélioration de la fonction motrice, ce qui est considéré comme un phénotype anti-vieillessement (Pyo et al., 2013).

Toutes les fonctions ATG sont codées par des gènes uniques dans la levure. Chez d'autres espèces, ces fonctions ATG peuvent être codées par des familles de gènes. Selon l'espèce une ou plusieurs isoformes peuvent coder pour une même fonction ATG. Par exemple il existe 9 gènes *ATG8* chez *Arabidopsis* et trois chez l'orge. On trouve un seul gène *ATG6* dans *Arabidopsis* et trois gènes chez le riz. Dans le cas de la fonction de *ATG5*, une seule copie a été trouvée dans toutes les espèces pour lesquelles ce gène a été décrit, ce qui en fait un gène majeur et essentiel quelque soit la plante considérée.

Le fait qu'une fonction ATG soit régie par un seul gène supporte l'hypothèse du rôle important de *ATG5* dans la régulation de la durée de vie et la gestion des éléments nutritifs. Ceci fait de *HvATG5* un bon candidat pour l'analyse fonctionnelle ultérieure.

Un autre point qui doit être pris en compte est l'utilisation de promoteurs de gènes appropriés pour assurer une sur-expression efficace et adéquate de notre gène d'intérêt. Le promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) 35S gène est le plus couramment utilisé chez les

dicotylédones pour une expression constitutive (Benfey et Chua, 1990). Cependant, son activité dans la famille des monocotylédones est sensiblement plus faible (Christensen et Quail, 1996), ce qui indique la nécessité de promoteurs spécifiques pour dicotylédones et monocotylédones.

Actuellement, plusieurs promoteurs de monocotylédones dérivés sont utilisés pour l'ingénierie des céréales, les *ZmUbi1* de maïs et le riz *OsAct1* (actine-1), *OsTubA1* (tubuline-A), *OsCc1* (cytochrome c) et *OsRUB1* et 2 (ubiquitine) sont quelques exemples (Park et al., 2010). Ces promoteurs sont très actifs dans les cultures monocotylédones, mais chacun peut induire différents modes d'expression, selon le type cellulaire et le stade de développement. Par exemple, *ZmUbi1* entraîne une expression élevée surtout chez les jeunes feuilles et les racines, mais lorsque ces organes sont matures, son niveau d'expression diminue (Cornejo et al., 1993). En revanche, le promoteur *OsCc1* est très actif au stade végétatif et dans les tissus reproducteurs de plants de riz transgéniques (Jang et al., 2002).

L'utilisation d'un promoteur inadéquate pourrait conduire à l'absence de corrélation entre les niveaux de sur-expression du gène candidat et le phénotype observé dans les plantes transgéniques.

La dégradation des protéines au cours de la sénescence

L'azote remobilisé les grains en développement au cours de la sénescence de l'orge provient principalement de la protéolyse des protéines contenues dans les feuilles sénescentes. Il a été décrit que cette dégradation massive est réalisée non seulement via l'autophagie mais aussi par d'autres systèmes vésiculaires comme les RCB et SAVs. Bien que l'identité des protéases impliquées dans cette dégradation n'est pas connue, la forte expression de gènes codant pour des activités cystéine protéase a été observée chez l'orge et d'autres espèces au cours de la sénescence, ce qui suggère que l'activité protéolytique associée à la sénescence est principalement vacuolaire.

Si l'hypothèse que des protéases non vacuolaires pourraient être impliqués dans la dégradation des protéines à l'intérieur du chloroplaste ou dans les autophagosomes, RCB et SAVs a été émise, aucun candidat n'a été identifié. En outre, il a été proposé que le taux élevé de l'ubiquitination et l'oxydation des protéines pendant la sénescence pourrait en faire des cibles pour la dégradation par le protéasome. L'étude des processus de dégradation et de l'identification des protéases impliquées pendant la sénescence de l'orge peuvent fournir de nouveaux gènes cibles utilisables pour l'amélioration des caractéristiques de rendement, de GPC et remobilisation des nutriments.